УДК 616.36-003.826-036-074
DOI: 10.14739/2310-1237.2022.1.245985

Цитокіни, інсулінорезистентність і жорсткість артеріальної стінки в оцінюванні перебігу неалкогольної жирової хвороби печінки

Ю. М. Степанов[A,F], **В. І. Діденко**[A,E], **О. М. Татарчук**[B,C,D], **І. С. Коненко**[B,C,D], **О. П. Петішко***[C,E]

ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро

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

Прогресування неалкогольної жирової хвороби печінки асоціюється зі збільшенням поширеності серцево-судинних захворювань.

Мета роботи – оцінити рівень цитокінів, інсулінорезистентності, жорсткість артеріальної стінки при прогресуванні стеатозу печінки в пацієнтів із неалкогольною жировою хворобою печінки.

Матеріали та методи. Обстежили 87 пацієнтів із неалкогольною жировою хворобою печінки. Хворих поділили на групи: I – 14 осіб без стеатозу; II – 32 пацієнти зі стеатозом 1 ступеня; III – 30 хворих зі стеатозом 2 ступеня; IV – 11 осіб зі стеатозом 3 ступеня. Контрольна група – 30 практично здорових осіб. Стеатометрію з кількісним оцінюванням ступеня стеатозу печінки здійснили на ультразвуковому апараті Soneus P7. Вміст цитокінів (інтерлейкін-6, інтерлейкін-10, TNF-α) визначали за допомогою імуноферментного аналізу з використанням аналізатора Stat Fax 303 Plus. Рівень інсулінорезистентності визначали за допомогою індексу HOMA-IR.

Результати. Вміст інтерлейкіну-6 у сироватці крові хворих IV групи вірогідно підвищений щодо рівня в групі контролю (в 1,8 раза, $p < 0,05$), хворих I (у 3,2 раза, $p < 0,05$), II (в 3,0 раза, $p < 0,05$) та III (у 2,3 раза, $p < 0,05$) груп. В обстежених рівень TNF-α збільшувався з прогресуванням структурних змін печінки, і при 4 ступені стеатозу його вміст підвищений у 6,4 раза ($p < 0,05$) щодо показника групи контролю, у 8,0 раза ($p < 0,05$) щодо I групи хворих, у 3,4 раза ($p < 0,05$) – II, в 1,8 раза ($p < 0,05$) – III групи пацієнтів. Підвищення індексу HOMA-IR у 3,2 раза ($p < 0,05$) визначили у хворих із помірним стеатозом, 3,9 раза ($p < 0,05$) – у пацієнтів із вираженим стеатозом щодо показників контролю. Встановили кореляційний зв'язок між товщиною інтима-медіа лівої загальної сонної артерії та рівнем TNF-α ($r = 0,438$; $p = 0,006$), індексом HOMA-IR ($r = 0,557$; $p = 0,0008$).

Висновки. У хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки із прогресуванням ступеня стеатозу печінки встановлено вірогідне підвищення прозапальних цитокінів, інсулінорезистентності та товщини інтима-медіа лівої загальної сонної артерії.

Ключові слова: неалкогольна жирова хвороба печінки, цитокіни, жорсткість артерій.

Патологія. 2022. Т. 19, № 1(54). С. 5-11

***E-mail:** petishko_oksana@i.ua

Cytokines, insulin resistance and arterial wall stiffness in assessing the course of non-alcoholic fatty liver disease

Yu. M. Stepanov, V. I. Didenko, O. M. Tatarchuk, I. S. Konenko, O. P. Petishko

The progression of non-alcoholic fatty liver disease is associated with an increased prevalence of cardiovascular disease.

Aim: to assess the level of cytokines, insulin resistance, arterial wall stiffness during the progression of hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease.

Material and methods. 87 patients with non-alcoholic fatty liver disease were examined. Group I consisted of 14 patients without steatosis, group II – 32 patients with steatosis grade 1; III – 30 patients with steatosis grade 2, IV group – 11 patients with steatosis grade 3. The control group consisted of 30 apparently healthy individuals. Steatometry with a quantitative assessment of the grade of hepatic steatosis was performed using a Soneus P7 ultrasound machine. The content of cytokines (interleukin-6, interleukin-10, TNF-α) was determined using an enzyme-linked immunosorbent assay using a Stat Fax 303 Plus analyzer. The level of insulin resistance was determined using the HOMA-IR index.

Results. The content of interleukin-6 in the blood serum of patients of group IV was significantly increased relative to the level in the control group (by 1.8 times, $P < 0.05$), patients of group I (by 3.2 times, $P < 0.05$), II group (by 3.0 times, $P < 0.05$) and group III (2.3 times, $P < 0.05$). The level of TNF-α increased with the progression of structural changes in the liver and at grade 4 of steatosis its content was increased by 6.4 times ($P < 0.05$) relative to the level in the control group, by 8.0 times ($P < 0.05$) relative to group I patients, by 3.4 times ($P < 0.05$) – group II patients and by 1.8 times ($P < 0.05$) – group III patients. An increase in the HOMA-IR index by 3.2 times ($P < 0.05$) was found in patients with moderate steatosis and 3.9 times ($P < 0.05$) in patients with severe steatosis compared to controls. A correlation was established between the intima-media thickness of the left common carotid artery and the level of TNF-α ($r = 0.438$; $P = 0.006$) and the HOMA-IR index ($r = 0.557$; $P = 0.0008$).

Conclusions. In patients with non-alcoholic fatty liver disease with progression of the grade of hepatic steatosis, a significant increase in proinflammatory cytokines, insulin resistance and intima-media thickness of the left common carotid artery was found.

Key words: fatty liver, arterial stiffness.

Pathologia 2022; 19 (1), 5-11

Незважаючи на чималі досягнення у визначенні патогенетичних механізмів розвитку неалкогольної жирової хвороби печінки (НАЖХП), невирішеним питанням залишається гальмування прогресування структурних змін печінки. Майже половина населення у світі страждає на цю патологію, найчастіше – хворі з ожирінням і цукровим діабетом [1]. Серед основних чинників, що мають вагомий вплив на прогнозування перебігу НАЖХП, в останні роки дослідники вирізняють швидкість підвищення стадії фіброзу печінки [2]. Частота виявлення неалкогольного стеатогепатиту (НАСГ) коливається від 1,5 % до 6,5 % [3]. Але механізми, що спричиняють розвиток від простого стеатозу печінки до стеатогепатиту, потребують уточнення.

У 1998 р. G. Day запропонував модель «двох ударів», що пояснює патогенез НАЖХП та її прогресування у НАСГ. У цій моделі показано, що ожиріння, особливо вісцеральне, збільшує надходження в печінку вільних жирних кислот. Одночасно розвивається окисний стрес, який підтримується системою цитокінів із секрецією великої кількості фактора некрозу пухлин альфа (TNF-α), що призводить до апоптозу та фіброзу [4,5].

Відомо, що інсулінорезистентність (ІР) запускає ліполіз вісцерального жиру та окиснення вільних жирних кислот печінкою, спричиняючи глюконеогенез і жирову інфільтрацію гепатоцитів [1,6]. ІР призводить також до атеросклеротичних змін артеріальних судин, у результаті чого змінюються їхні пружно-еластичні властивості [7]. Вважають, що підвищення продукції TNF-α та інтерлейкіну-6 (ІЛ-6) відіграє особливу роль у патогенезі ІР печінки. Багато дослідників оцінюють TNF-α як медіатор ІР при ожирінні [8,9]. У роботі S. A. Townsend et al. показана залежність концентрації IL-6 від ступеня ожиріння, а також ІР [10]. TNF-α збільшує проникність судин і є медіатором деструкції тканин [9,11].

Опубліковано відомості щодо здатності TNF-α посилювати некроз та апоптоз клітин [12–14]. Припускають, що системне запалення відіграє важливу роль у накопиченні ліпідів у тканині печінки, при цьому виникає «хибне коло». Виявили взаємозв'язок між рівнем TNF-α та прогресуванням стеатозу печінки [1].

НАЖХП – мультисистемне захворювання, що вражає не тільки печінку, але й інші органи, зокрема серце і судини. Так, НАЖХП збільшує ризик виникнення серцево-судинних захворювань (ССЗ) внаслідок взаємозв'язку НАЖХП і встановлених факторів ризику розвитку ССЗ: ожиріння, гіпертензії, атерогенної дисліпідемії, ІР [15]. Встановлено, що перебіг НАЖХП і ССЗ супроводжується збільшенням рівня аналогічних біомаркерів. При стеатозі печінки жирова тканина виробляє прозапальні цитокіни, що беруть активну участь у формуванні ССЗ [8,16]. Підвищений вміст IL-6 у крові – прогностичний маркер розвитку цукрового діабету 2 типу, а надалі й виникнення інфаркту міокарда [8]. В рандомізованих контрольованих дослідженнях НАЖХП пов'язана зі збільшенням товщини інтима-медіа сонної артерії та посиленням жорсткості артеріальної стінки. Метааналіз 7 досліджень, що включав 3497 осіб, показав: виявлена в результаті ультразвукового дослідження НАЖХП асоціювалася з потовщенням інтима-медіа сонної артерії та великою кількістю бляшок сонних артерій [17,18].

Отже, сучасні дані дають підстави стверджувати: НАЖХП асоціюється зі збільшенням поширеності ССЗ, і найбільша кількість летальних випадків у пацієнтів з НАЖХП зумовлена ССЗ [15].

Мета роботи

Оцінити рівень цитокінів, інсулінорезистентності, жорсткість артеріальної стінки при прогресуванні стеатозу печінки в пацієнтів із НАЖХП.

Матеріали і методи дослідження

Обстежили 87 пацієнтів із НАЖХП віком від 30 до 66 років (49 жінок – 56,3 %, 38 чоловіків – 43,7 %). Хворих поділили на групи: I – 14 осіб без стеатозу (S0); II – 32 пацієнти зі стеатозом 1 ступеня (S1); III – 30 хворих зі стеатозом 2 ступеня (S2); IV – 11 осіб зі стеатозом 3 ступеня (S3). Контрольна група – 30 практично здорових осіб.

Верифікацію діагнозу здійснили шляхом аналізу скарг і даних анамнезу, результатів зсувнохвильової еластометрії, стеатометрії печінки, серологічних методів і результатів морфологічного дослідження. Критерії виключення – наявність вірусних гепатитів A, B, D, E, цирозів будь-якої етіології, ВІЛ, склерозуючого холангіту, гепатоцелюлярної карциноми, тромбозів судин портальної системи, гемохроматозу, хвороби Коновалова–Вільсона, синдрому Бадда–Кіарі; вагітність; ураження ендокринної системи; злоякісні новоутворення.

Стеатометрію (метод кількісного оцінювання коефіцієнта затухання (КЗ) ультразвуку (УЗ) в дБ/см для визначення ступеня стеатозу печінки) здійснили в реальному часі на апараті Soneus P7 (Україна). Результати оцінювали за морфологічною шкалою M. Sasso et al.: S0 відповідає нормі (частка гепатоцитів із жиром – 0–5 %) – від 1,0 дБ/см до 2,19 дБ/см; S1 – легкий ступінь стеатозу (частка гепатоцитів із жиром – 5,1–33,0 %) – від 2,20 дБ/см до 2,29 дБ/см; S2 – помірний ступінь (частка гепатоцитів із жиром – 33,1–66,0 %) – від 2,30 дБ/см до 2,90 дБ/см; S3 – тяжкий ступінь стеатозу (частка гепатоцитів із жиром – понад 66,0 %) – >2,90 дБ/см (*рис. 1*).

Локальну жорсткість судинної стінки визначали на УЗ апараті Soneus P7 (Україна), на 1,5 см проксимальніше біфуркації сонних артерій. У режимі W-Track напівавтоматично вимірювали параметри, рекомендовані Європейським консенсусом експертів із жорсткості артерій: мінімальний діаметр судини за серцевий цикл (D, мм), зміну діаметра судини за серцевий цикл (delta D, мм), індекс артеріального натягу (CAS), коефіцієнт комплаєнсу просвіту артерії (CC, мм^2/кПа), індекс артеріальної жорсткості (SI) та швидкість пульсової хвилі одноточковим способом (PWV, м/с).

Для імуноферментного аналізу кількості TNF-α, ІЛ-6, ІЛ-10 у сироватці крові використовували набори реактивів фірми «Вектор-БЕСТ», для визначення інсуліну – фірми «DRG International, Inc.». Імуноферментний аналіз виконали за допомогою аналізатора

Таблиця 1. Рівень цитокінів і показники вуглеводного обміну в сироватці крові хворих на НАЖХП, Me (LQ; UQ)

Показники, одиниці вимірювання	Контрольна група, n = 30	I група, n = 14	II група, n = 32	III група, n = 30	IV група, n = 11
ІЛ-6, пг/мл	2,4 (0,2; 4,9)	1,3 (1,2; 2,8)	1,4 (0,6; 3,7)	1,8 (1,5; 6,4)	4,2 (2,8; 35,1)[1,2,3,4]
ІЛ-10, пг/мл	7,5 (4,3; 11,6)	2,8 (2,0; 3,8)[1]	1,5 (1,1; 2,7)[1]	2,4 (1,7; 2,9)[1]	2,9 (1,9; 4,4)[1]
TNF-α, пг/мл	0,5 (0,1; 1,7)	0,4 (0,3; 8,7)	0,9 (1,2; 1,5)	1,8 (1,3; 4,8)	3,2 (2,6; 5,9)[1,2,3,4]
TNF-α/ІЛ-10	0,07 (0,06; 0,09)	0,14 (0,13; 2,76)	0,58 (0,18; 1,17)	0,77 (0,54; 3,58)	1,03 (0,69; 2,16)
Інсулін, мкОД/мл	11,0 (2,3; 15,2)	17,2 (12,4; 21,6)	16,6 (8,3; 24,5)	29,3 (21,9; 37,3)[1,2,3]	34,2 (30,8; 43,0)[1,2,3]
HOMA-IR	2,1 (1,4; 2,4)	3,9 (3,0; 4,4)	4,3 (2,5; 6,2)	7,6 (5,4; 9,6)[1,2,3]	8,1 (7,2; 10,6)[1,2,3]

[1]: p < 0,05 – вірогідність різниці порівняно з контрольною групою; [2]: p < 0,05 – вірогідність різниці порівняно з I групою; [3]: p < 0,05 – вірогідність різниці порівняно з II групою; [4]: p < 0,05 – вірогідність різниці порівняно з III групою.

«Stat Fax 303 Plus» (США). Інсулінорезистентність оцінювали за допомогою індексу HOMA-IR.

Для оптимізації математичного опрацювання результати внесли в базу даних, що побудована за допомогою електронних таблиць Microsoft Excel. Статистичне опрацювання результатів виконали за допомогою пакета прикладних програм Statistica 6.1 (серійний № AGAR909E415822FA). Відповідність розподілу даних до закону нормального розподілу перевірили за допомогою методу Шапіро–Вілка. Для опису даних застосували медіану (Me), нижній (LQ) і верхній (UQ) квартилі. Для порівняння кількісних показників використали Kruskal–Wallis test і U-критерій Манна–Вітні. Статистичну значущість оцінювали на рівні не нижче ніж 95,0 % (p < 0,05). Вираженість взаємозв'язків між змінними встановили за допомогою значущих коефіцієнтів рангової кореляції Спірмена (r).

Усі пацієнти підписали інформовану згоду на участь у дослідженні.

Результати

У результаті визначення стану цитокінової регуляції в обстежених виявили зростання прозапальних цитокінів із прогресуванням ступеня стеатозу печінки (*табл. 1*).

Так, у хворих I групи рівень TNF-α статистично не відрізнявся від показника контрольної групи. У II та III групах хворих виявили зростання щодо контролю TNF-α в 1,9 раза та 3,6 раза (p < 0,05) відповідно. У пацієнтів IV групи вміст TNF-α підвищений у 6,4 раза (p < 0,05) щодо рівня в групі контролю, 8,0 раза (p < 0,05) – I групи, 3,4 раза (p < 0,05) – II, в 1,8 раза (p < 0,05) – III групи хворих. За результатами Kruskal–Wallis test, вірогідність різниці рівня TNF-α між групами становила 0,011.

Вміст ІЛ-6 у сироватці крові найвищий у IV групі, вірогідно перевищував показник у групі контролю (в 1,8 раза, p < 0,05), а також вищий у 3,2 раза (p < 0,05) щодо показника пацієнтів I групи, в 3,0 раза (p < 0,05) – II, 2,3 раза (p < 0,05) – III групи хворих.

Рівень протизапального ІЛ-10 у всіх груп хворих залишався на нижній межі норми, медіана його значення вірогідно знижена. Відсутність стимуляції вироблення ІЛ-10 призводить до порушення співвідношення TNF-α/ІЛ-10 у хворих на НАЖХП.

Найвище його значення встановили у хворих IV групи – підвищення в 14,7 раза (p < 0,05) щодо групи контролю, в 7,4 раза (p < 0,05) – щодо показників у I групі, в 1,8 раза (p < 0,05) – II, 1,4 раза (p > 0,05) – щодо III групи пацієнтів.

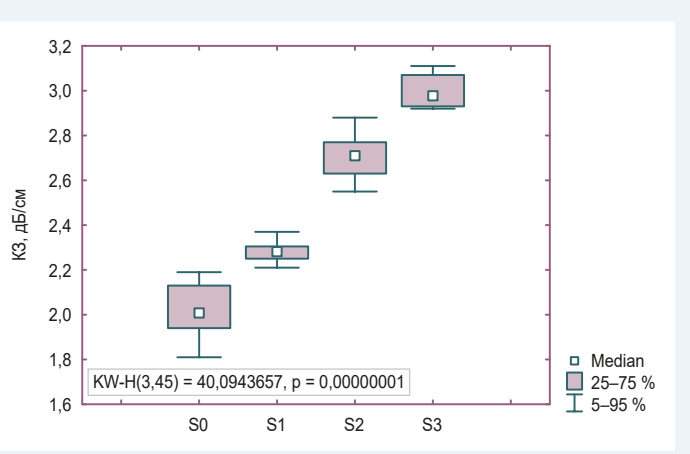


Рис. 1. Коефіцієнт затухання ультразвуку у хворих на НАЖХП залежно від ступеня стеатозу.

У хворих III і IV груп спостерігали вірогідне збільшення вмісту інсуліну (у 2,7 раза, p < 0,05; в 3,1 раза, p < 0,05 відповідно), індексу HOMA-IR (в 3,2 раза, p < 0,05; в 3,9 раза, p < 0,05 відповідно) щодо показників групи контролю (*табл. 1*). Пацієнти III та IV груп також вірогідно відрізнялися за рівнем інсуліну та індексу HOMA-IR від хворих I та II груп. За результатами Kruskal–Wallis test, вірогідність різниці рівня інсуліну та індексу HOMA-IR становила 0,005 і 0,0004 відповідно.

Результати кореляційного аналізу показали зв'язок КЗ і вмісту ІЛ-6 (r = 0,324; p =0,032), TNF-α (r = 0,434; p = 0,003), індексу HOMA-IR (r = 0,479; p = 0,002).

У результаті оцінювання жорсткості артеріальної стінки (ЖАС) загальної лівої сонної артерії встановили збільшення діаметра залежно від прогресування ступеня стеатозу печінки з пропорційним зменшенням його приросту (p > 0,05) (*табл. 2*).

На *рис. 2* наведено приклад сонологічного протоколу вимірювання локальної жорсткості судинної стінки лівої загальної сонної артерії (ЗСА) у хворого на НАЖХП.

У пацієнтів із НАЖХП у результаті оцінювання жорсткості артеріальної стінки правої загальної сонної артерії встановлено відсутність статистично значущих відмінностей залежно від ступеня стеатозу. Але виявили тенденцію до збільшення показників швидкості пульсової хвилі (PWV, м/с) та модуля еластичності (ЕМ, кПа) залежно від прогресування стеатозу (*табл. 3*).

Виявили збільшення товщини інтима-медіа (ТІМ) з обох боків у хворих на НАЖХП залежно від

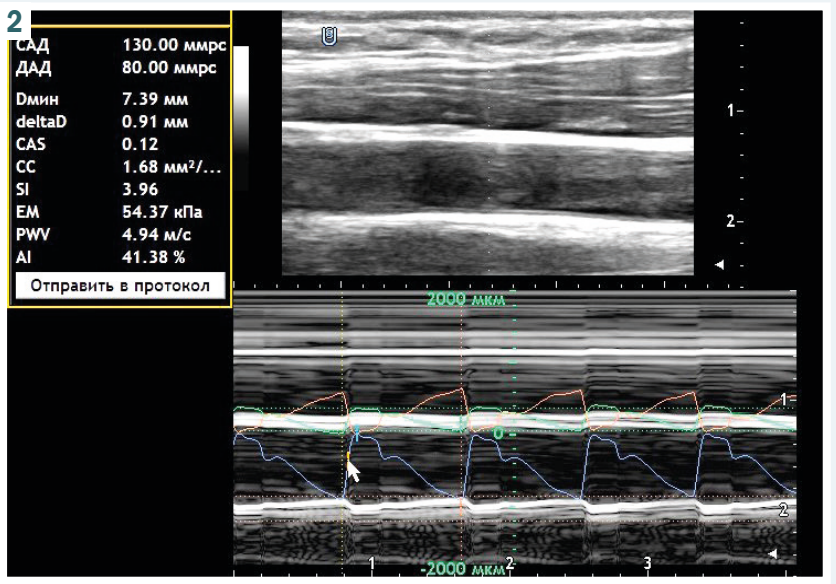
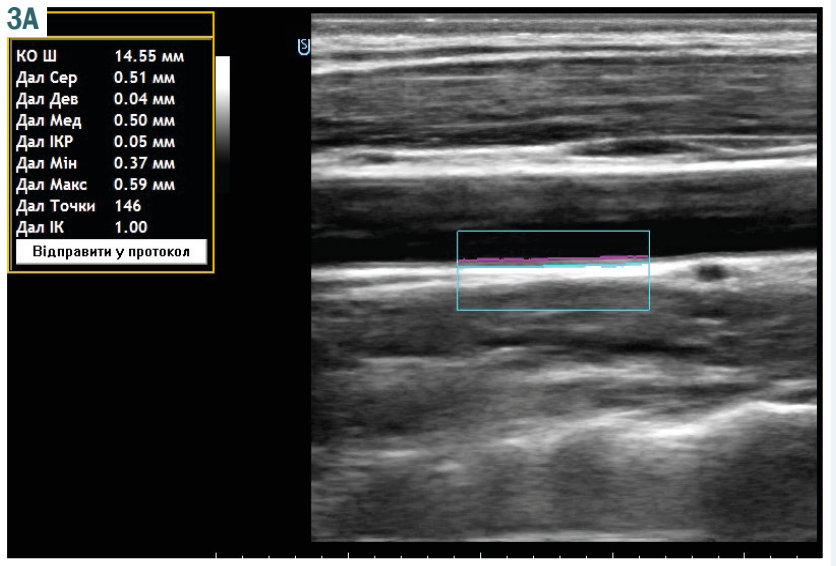


Рис. 2. Сонологічний протокол вимірювання локальної жорсткості судинної стінки загальної лівої сонної артерії у хворого на НАЖХП.



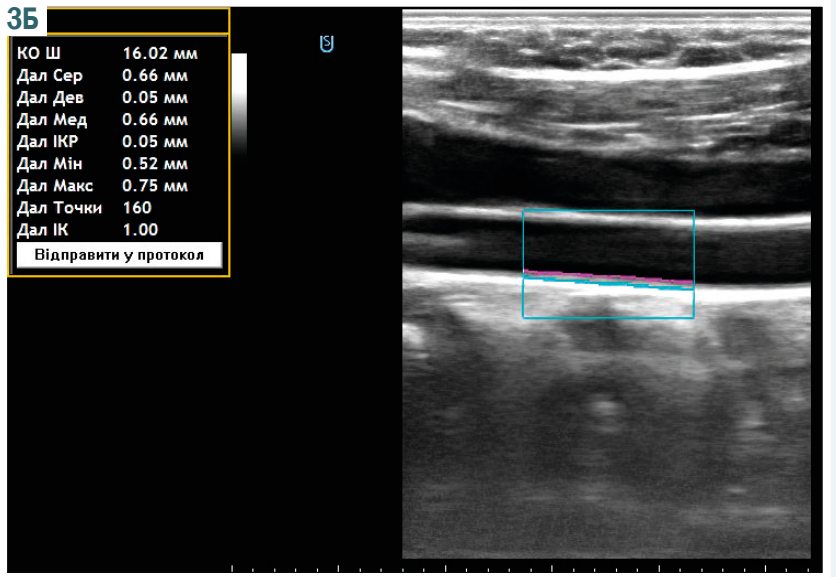


Рис. 3. ТІМ лівої (**А**) та правої (**Б**) ЗСА у хворих на НАЖХП.

Таблиця 2. Показники ЖАС лівої загальної сонної артерії у хворих на НАЖХП залежно від ступеня стеатозу, Me (LQ; UQ)

Показники, одиниці вимірювання	Контрольна група, n = 30	I група, n = 14	II група, n = 32	III група, n = 30	IV група, n = 11
Dmin, мм	7,70 (7,39; 7,90)	8,47 (7,97; 8,89)	8,62 (7,62; 9,23)	8,55 (8,09; 8,89)	8,93 (8,32; 9,24)
delta D, мм	0,34 (0,27; 0,39)	0,41 (0,30; 0,54)	0,31 (0,22; 0,39)	0,40 (0,26; 0,48)	0,33 (0,31; 0,34)
CAS	0,07 (0,05; 0,08)	0,05 (0,03; 0,06)	0,04 (0,04; 0,05)	0,04 (0,03; 0,06)	0,03 (0,03; 0,04)
CC, мм^2/кПа	0,80 (0,56; 0,91)	0,92 (0,59; 1,43)	0,74 (0,54; 0,84)	0,92 (0,76; 1,31)	0,78 (0,66; 0,95)
SI	5,48 (5,22; 7,56)	9,72 (6,37; 12,81)	11,51 (9,75; 16,10)	9,92 (6,50; 13,09)	10,24 (8,58; 10,87)
EM, кПа	64,02 (64,35; 78,79)	132,48 (83,75;187,81)	147,17 (113,63; 188,96)	127,02 (99,67; 173,92)	155,29 (112,91; 157,68)
PWV, м/с	5,57 (5,19; 5,99)	7,74 (6,21; 9,37)	8,69 (7,66; 9,49)	7,68 (6,80; 9,03)	8,51 (8,14; 8,59)
AI, %	13,18 (5,13; 48,00)	3,49 (0; 14,60)	16,0 (6,34; 26,54)	11,27 (6,62; 24,52)	4,55 (0; 9,52)

Таблиця 3. Показники ЖАС правої загальної сонної артерії у хворих на НАЖХП залежно від ступеня стеатозу, Me (LQ; UQ)

Показники, одиниці вимірювання	Контрольна група, n = 30	I група, n = 14	II група, n = 32	III група, n = 30	IV група, n = 11
Dmin, мм	8,16 (7,70; 8,78)	8,60 (7,42; 9,36)	8,47 (8,06; 8,76)	8,77 (8,13; 9,39)	8,93 (8,62; 9,04)
delta D, мм	0,35 (0,20; 0,43)	0,37 (0,24; 0,45)	0,32 (0,24; 0,41)	0,38 (0,26; 0,49)	0,34 (0,33; 0,42)
CAS	0,06 (0,04; 0,07)	0,05 (0,03; 0,07)	0,04 (0,03; 0,05)	0,04 (0,03; 0,05)	0,04 (0,04; 0,04)
CC, мм^2/кПа	0,78 (0,52; 0,89)	0,81 (0,59; 0,96)	0,77 (0,55; 0,93)	0,94 (0,69; 1,29)	0,84 (0,64; 0,97)
SI	7,02 (5,87; 8,88)	10,28 (7,04; 17,46)	11,52 (9,29; 16,18)	9,44 (7,95; 14,25)	10,69 (10,05; 10,99)
EM, кПа	84,78 (73,07; 116,80)	138,93 (85,63; 231,52)	151,50 (119,97; 202,44)	127,37 (103,83; 195,46)	157,03 (145,74; 165,82)
PWV, м/с	6,26 (5,79; 7,37)	7,98 (6,28; 10,42)	8,45 (7,46; 9,78)	7,70 (6,92; 9,58)	8,55 (8,26; 8,80)
AI, %	29,80 (8,33; 45,90)	5,42 (1,04; 8,19)	8,70 (0; 16,67)	8,01 (0; 15,89)	7,41 (4,17; 14,29)

прогресування ступеня стеатозу печінки (*рис. 3*). Максимальне значення ТІМ встановили у хворих на НАЖХП зі ступенем стеатозу S3 (*рис. 4*). За результатами Kruskal–Wallis test, вірогідність різниці ТІМ лівої загальної сонної артерії між групами пацієнтів становила 0,0069.

У результаті кореляційного аналізу у пацієнтів із НАЖХП встановили зв'язки ТІМ лівої загальної сонної артерії та вмісту TNF-α (r = 0,438; p = 0,006), індексу HOMA-IR (r = 0,557; p = 0,0008) (*рис. 5*).

Обговорення

Нині активно вивчають роль цитокінів при НАЖХП. Виявили, що прозапальні цитокіни (TNF-α, ІЛ-6) відіграють важливу роль у підтримці запального процесу під час НАЖХП [1,8,12].

Результати останніх досліджень показали: розвиток стеатозу у хворих на НАЖХП пов'язаний зі значними змінами рівня цитокінів [8,13,14]. Це спричиняє розвиток ендотоксимії, ІР, вісцерального ожиріння, системного запалення, а також розвиток і прогресування стеатозу через стимуляцію печінкового запалення, некроз та апоптоз клітин, індукцію фіброзу [8,11,13,14].

У результаті нашого дослідження виявили зв'язки К3 та ІЛ-6 (r = 0,324; p = 0,032), TNF-α (r = 0,434; p = 0,003) та індексом HOMA-IR (r = 0,479; p = 0,002), що свідчить про вплив прозапальних цитокінів та ІР на розвиток стеатозу печінки. Доречність застосування показника ТІМ як діагностичного критерію раннього виявлення інсулінорезистентності (прогресування метаболічного синдрому) у пацієнтів із НАЖХП підтверджує встановлений кореляційний зв'язок цього показника з індексом HOMA-IR (r = 0,557; p = 0,0008). З іншого боку, визначений зв'язок ТІМ лівої загальної сонної артерії та вмісту TNF-α (r = 0,438; p = 0,006).

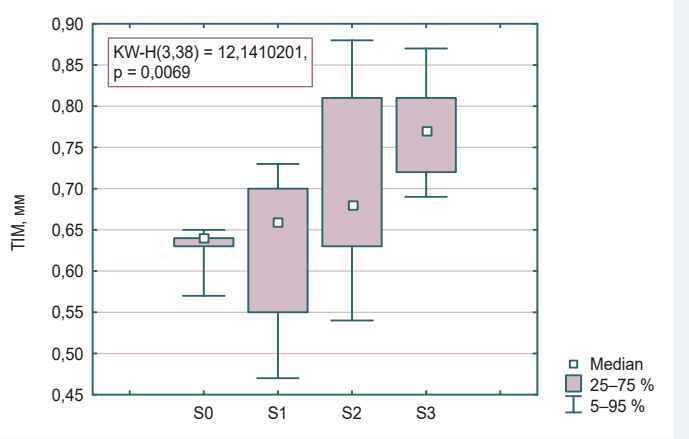


Рис. 4. ТІМ лівої загальної сонної артерії у хворих на НАЖХП залежно від ступеня стеатозу.

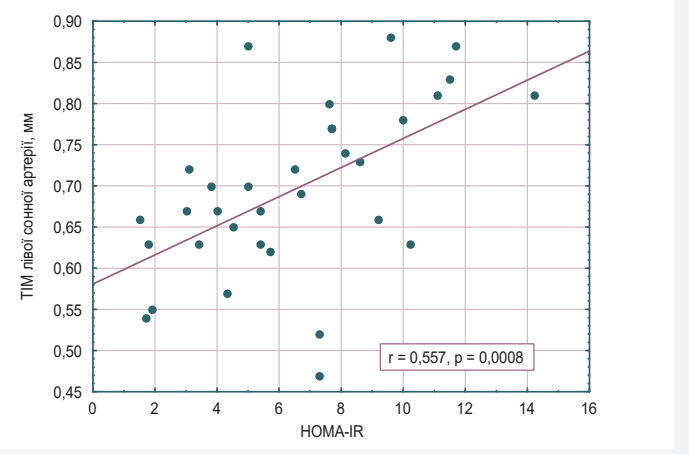


Рис. 5. Кореляційний зв'язок ТІМ лівої загальної сонної артерії та індексу HOMA-IR у хворих на НАЖХП.

На нашу думку, збільшення ТІМ – наслідок прозапальної активації цитокінів та розвитку інсулінорезистентності.

Отже, прогресування ступеня стеатозу печінки у хворих на НАЖХП супроводжується збільшенням вмісту прозапальних цитокінів, інсулінорезистентності та товщини інтима-медіа з обох боків.

Висновки

1. У хворих на НАЖХП із прогресуванням ступеня стеатозу печінки встановили вірогідне зростання прозапальних цитокінів. Концентрація ІЛ-6 у сироватці крові хворих IV групи вірогідно підвищена щодо рівня в групі контролю (в 1,8 раза, $p < 0,05$), пацієнтів I (у 3,2 раза, $p < 0,05$), II (у 3,0 раза, $p < 0,05$) та III (у 2,3 раза, $p < 0,05$) груп.

2. В усіх групах хворих на НАЖХП рівень TNF-α підвищений, залежав від ступеня стеатозу печінки. У хворих IV групи його вміст підвищений у 6,4 раза ($p < 0,05$) щодо рівня в групі контролю, у 8,0 раза ($p < 0,05$) – щодо I групи, у 3,4 раза ($p < 0,05$) – II, у 1,8 раза ($p < 0,05$) – III групи хворих.

3. Підвищення індексу HOMA-IR в 3,2 раза ($p < 0,05$) виявили у хворих на НАЖХП із помірним стеатозом, у 3,9 раза ($p < 0,05$) – у пацієнтів із вираженим стеатозом (частка гепатоцитів із жиром становить понад 66 %) порівняно з контролем.

4. Встановили кореляційний зв'язок між ТІМ лівої загальної сонної артерії та рівнем TNF-α ($r = 0,438$; $p = 0,006$), індексом HOMA-IR ($r = 0,557$; $p = 0,0008$).

Перспективи подальших досліджень полягають у визначенні діагностичної інформативності вмісту цитокінів і показників жорсткості артеріальної стінки для прогнозування перебігу неалкогольної жирової хвороби печінки.

Фінансування

Дослідження виконане в рамках НДР Державної установи «Інститут гастроентерології НАМН України»: «Вивчити клініко-біохімічні та структурні особливості формування стеатозу та фіброзу у пацієнтів з хронічними дифузними захворюваннями печінки», № держреєстрації 0118U001834.

Конфлікт інтересів: відсутній.
Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 06.12.2021
Після доопрацювання / Revised: 14.01.2022
Прийнято до друку / Accepted: 21.01.2022

Відомості про авторів:

Степанов Ю. М., д-р мед. наук, професор, директор ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро.
ORCID ID: 0000-0002-6721-2468
Діденко В. І., канд. мед. наук, старший науковий співробітник, заступник директора з наукової роботи, ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро.
ORCID ID: 0000-0001-8953-396X
Татарчук О. М., канд. біол. наук, старший науковий співробітник науково-дослідного сектора, ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро.
ORCID ID: 0000-0002-0672-972X
Коненко І. С., канд. мед. наук, зав. відділення мініінвазивних ендоскопічних втручань та інструментальної діагностики, ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро.
ORCID ID: 0000-0002-7619-699X
Петішко О. П., науковий співробітник відділу науково-організаційної, методичної роботи та інформаційних технологій, ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро.
ORCID ID: 0000-0002-4559-4055

Information about authors:

Stepanov Yu. M., MD, PhD, DSc, Professor, Director of State Institution "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro.
Didenko V. I., MD, PhD, Senior Researcher, Deputy Director for Research, State University "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro.
Tatarchuk O. M., PhD, Senior Researcher of the Research Sector, State Institution "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro.
Konenko I. S., MD, PhD, Head of the Department of Mini-invasive Endoscopic Interventions and Instrumental Diagnostics, State Institution "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro.
Petishko O. P., Researcher of the Department of Scientific-Organizational, Methodical Work and Information Technologies, State Institution "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro.

Список літератури

[1] Фадєєнко Г. Д., Колеснікова О. В., Соломенцева Т. А. Нові можливості лікування неалкогольного стеатогепатиту. *Сучасна гастроентерологія*. 2018. № 1. С. 53-60.
[2] Sanyal A. J. Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. 2019. Vol. 16, Iss. 6. P. 377-386. https://doi.org/10.1038/s41575-019-0144-8
[3] Younossi Z. M. The epidemiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Clinical Liver Disease*. 2018. Vol. 11, Iss. 4. P. 92-94. https://doi.org/10.1002/cld.710
[4] Parkash O., Saeed S. Molecular Basis for Pathogenesis of Steatohepatitis: Contemporary Understanding and New Insights. *Non-alcoholic fatty liver disease – molecular bases, prevention and treatment* / ed. R. Valenzuela. IntechOpen. 2018. P. 54. https://doi.org/10.5772/intechopen.71405
[5] Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From «two hit theory» to «multiple hit model» / Y. L. Fang, H. Chen, C. L. Wang, L. Liang. *World journal of gastroenterology*. 2018. Vol. 24, Iss. 27. P. 2974-2983. https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i27.2974
[6] Tilg H., Moschen A. R., Roden M. NAFLD and diabetes mellitus. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. 2017. Vol. 14, Iss. 1. P. 32-42. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.147
[7] NAFLD and cardiovascular diseases: a clinical review / P. Kasper, A. Martin, S. Lang et al. *Clinical research in cardiology*. 2021. Vol. 110, Iss. 7. P. 921-937. https://doi.org/10.1007/s00392-020-01709-7
[8] Engin A. Non-alcoholic fatty liver disease. *Obesity and Lipotoxicity. Advances in Experimental Medicine and Biology* / eds. : A. Engin, A. Engin. Springer, Cham. 2017. Vol. 960. P. 443-467. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_19
[9] Non-alcoholic fatty liver diseases: Update on the challenge of diagnosis and treatment / Oh H., Jun D. W., Saeed W. K., Nguyen M. H. *Clinical and Molecular Hepatology*. 2016. Vol. 22, Iss. 3. P. 327-335. https://doi.org/10.3350/cmh.2016.0049
[10] Townsend S. A., Newsome P. N. Mistakes in nonalcoholic fatty liver disease and how to avoid them. *UEG Education*. 2017. Vol. 17. P. 39-41. URL : https://s3-eu-west-1.amazonaws.com/ueg-elearning/ueg-mistakes-series/Mistakes.in.series-102017.NAFLD.pdf
[11] Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis / A. Wieckowska, B. G. Papouchado, Z. Li et al. *The American journal of gastroenterology*. 2008. Vol. 103, Iss. 6. 1372-1379. https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01774.x
[12] Взаємозв'язки між ультразвуковими, імунологічними змінами при прогресуванні стеатозу та фіброзу печінки у хворих на хронічні дифузні захворювання печінки різної етіології / Ю. М. Степанов, В. І. Діденко, І. С. Коненко, О. М. Татарчук. *Патологія*. 2019. Т. 16, № 2. С. 222-230. https://doi.org/10.14739/2310-1237.2019.2.177167
[13] Molecular links between non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma / S. Raza, S. Rajak, B. Anjum, R. A. Sinha. *Hepatoma research*. 2019. Vol. 5. P. 42. https://doi.org/10.20517/2394-5079.2019.014

[14] Aspects of immunological status and carbon metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease in correlation with its fibrous transformation / Y. M. Stepanov, V. I. Didenko, I. S. Konenko et al. *Вісник проблем біології і медицини*. 2019. Вип. 3. С. 196-200. https://doi.org/10.29254/2077-4214-2019-3-152-196-200
[15] Губергриц Н. Б., Беляева Н. В. Современные подходы к лечению сочетания неалкогольной жировой болезни печени и сердечно-сосудистых заболеваний. *Сучасна гастроентерологія*. 2019. № 3. С. 41-48. https://doi.org/10.30978/MG-2019-3-41
[16] Роль сывороточных биомаркеров в диагностике неалкогольной жировой болезни печени / Г. Д. Фадеенко, И. Э. Кушнир, Т. Л. Можина и др. *Сучасна гастроентерологія*. 2019. № 3. С. 58-65. https://doi.org/10.30978/MG-2019-3-58.
[17] The relationship between arterial stiffness and nonalcoholic fatty liver disease / Y. J. Lee, J. Y. Shim, B. S. Moon, et al. *Digestive diseases and sciences*. 2012. Vol. 57, Iss. 1. P. 196-203. https://doi.org/10.1007/s10620-011-1819-3
[18] Sookoian S., Pirola C. J. Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review. *Journal of hepatology*. 2008. Vol. 49, Iss. 4. P. 600-607. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.06.012

References

[1] Fadieienko, G. D., Kolesnikova, O. V., & Solomenseva, T. A. (2018). Novi mozhlyvosti likuvannia nealkoholnoho steatohepatytu [The new opportunities of treatment of non-alcoholic steatohepatitis]. *Suchasna hastroenterolohiia*, (1), 53-60. [in Ukrainian].
[2] Sanyal, A. J. (2019). Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, *16*(6), 377-386. https://doi.org/10.1038/s41575-019-0144-8
[3] Younossi, Z. M. (2018). The epidemiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Clinical Liver Disease*, *11*(4), 92-94. https://doi.org/10.1002/cld.710
[4] Parkash, O., & Saeed, S. (2018). Molecular Basis for Pathogenesis of Steatohepatitis: Contemporary Understanding and New Insights. In R. Valenzuela (Ed.). *Non-alcoholic fatty liver disease – molecular bases, prevention and treatment* (pp. 54-54). https://doi.org/10.5772/intechopen.71405
[5] Fang, Y. L., Chen, H., Wang, C. L., & Liang, L. (2018). Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From "two hit theory" to "multiple hit model". *World journal of gastroenterology*, *24*(27), 2974-2983. https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i27.2974
[6] Tilg, H., Moschen, A. R., & Roden, M. (2017). NAFLD and diabetes mellitus. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, *14*(1), 32-42. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.147
[7] Kasper, P., Martin, A., Lang, S., Kütting, F., Goeser, T., Demir, M., & Steffen, H. M. (2021). NAFLD and cardiovascular diseases: a clinical review. *Clinical research in cardiology, 110(7),* 921-937. https://doi.org/10.1007/s00392-020-01709-7
[8] Engin, A. (2017). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. In: A. Engin, A. Engin (Eds.), *Obesity and Lipotoxicity. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 960, pp. 443-467). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_19
[9] Oh, H., Jun, D. W., Saeed, W. K., & Nguyen, M. H. (2016). Non-alcoholic fatty liver diseases: Update on the challenge of diagnosis and treatment. *Clinical and Molecular Hepatology*, *22*(3), 327-335. https://doi.org/10.3350/cmh.2016.0049
[10] Townsend, S. A., & Newsome, P. N. (2017). Mistakes in nonalcoholic fatty liver disease and how to avoid them. *UEG Education*, *17*, 39-41. https://s3-eu-west-1.amazonaws.com/ueg-elearning/ueg-mistakes-series/Mistakes.in.series-102017.NAFLD.pdf
[11] Wieckowska, A., Papouchado, B. G., Li, Z., Lopez, R., Zein, N. N., & Feldstein, A. E. (2008). Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *The American journal of gastroenterology*, *103*(6), 1372-1379. https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01774.x
[12] Stepanov, Yu. M., Didenko, V. I., Konenko, I. S., & Tatarchuk, O. M. (2019). Vzaiemozviazky mizh ultrazvukovymy, imunolohichnymy zminamy pry prohresuvanni steatozu ta fibrozu pechinky u khvorykh na khronichni dyfuzni zakhvoriuvannia pechinky riznoi etiolohii [Relationships between ultrasonic, immunological changes in the progression of liver steatosis and fibrosis in patients with chronic diffusive liver diseases of various etiologies]. *Pathologia, 16*(2), 222-230. [in Ukrainian]. https://doi.org/10.14739/2310-1237.2019.2.177167
[13] Raza, S., Rajak, S., Anjum, B., & Sinha, R. A. (2019). Molecular links between non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *Hepatoma research*, *5*, 42. https://doi.org/10.20517/2394-5079.2019.014
[14] Stepanov, Y. M., Didenko, V. I., Konenko, I. S., Tatarchuk, O. M., & Petishko, O. P. (2019). Aspects of immunological status and carbon metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease in correlation with its fibrous transformation. *Visnyk problem biolohii i medytsyny, 3*(152), 196-200. https://doi.org/10.29254/2077-4214-2019-3-152-196-200
[15] Gubergrits, N. B., & Byelyayeva, N. V. (2019). Sovremennye podkhody k lecheniyu sochetaniya nealkogol'noi zhirovoi bolezni pecheni i serdechno-sosudistykh zabolevanii [Modern approaches to the treatment of combed non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease]. *Suchasna hastroenterolohiia*, (3), 41-48. [in Russian]. https://doi.org/10.30978/MG-2019-3-41
[16] Fadeenko, G. D., Kushnir, I. E., Mozhina, T. L., Chernova, V. M., & Solomentseva, T. A. (2019). Rol syvorotochnykh biomarkerov v diagnostike nealkogolnoi zhirovoi bolezni pecheni [The role of serum biomarkers in the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease]. *Suchasna hastroenterolohiia*, (3), 58-65. [in Russian]. https://doi.org/10.30978/MG-2019-3-58
[17] Lee, Y. J., Shim, J. Y., Moon, B. S., Shin, Y. H., Jung, D. H., Lee, J. H., & Lee, H. R. (2012). The relationship between arterial stiffness and nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive diseases and sciences*, *57*(1), 196-203. https://doi.org/10.1007/s10620-011-1819-3
[18] Sookoian, S., & Pirola, C. J. (2008). Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review. *Journal of hepatology*, *49*(4), 600-607. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.06.012

УДК 616.125-008.313-085.273:[616-092-036+575.174.015.3]
DOI: 10.14739/2310-1237.2022.1.252662

Вплив клінічних і генетичних чинників на стабільність антикоагуляції варфарином у хворих із фібриляцією передсердь

Я. М. Михайловський*

Запорізький державний медичний університет, Україна

Ключові слова: фібриляція передсердь, варфарин, CYP2C9, CYP4F2, VKORC1, поліморфізм, гени, SAMe-TT2R2, стабільність антикоагуляції.

Патологія. 2022. Т. 19, № 1(54). С. 12-17

***E-mail:** yarikzgmu@gmail.com

Мета роботи – визначити вплив клінічних і генетичних чинників на стабільність антикоагуляції варфарином у хворих із фібриляцією передсердь (ФП) протягом року.

Матеріали та методи. У дослідження залучили 60 хворих із ФП віком 70,50 (64,25; 76,25) року (32 чоловіки, 28 жінок). Показники коагулограми з розрахунком міжнародного нормалізованого відношення (МНВ) визначали на апараті Coag Chrome 3003 щомісяця; встановлювали бали за шкалами CHA_2DS_2-VASC, HAS-BLED, SAMe-TT2R2; TTR обчислювали за методом Rosendaal et al.

Поліморфізми генів CYP2C9, CYP4F2, VKORC1 визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з використанням термоциклера CFX-96 (BioRad).

Результати. Медіани TTR у групах хворих із балом за шкалою SAMe-TT2R2 <2 (n = 33) та ≥2 (n = 27) вірогідно не відрізнялися (74 % і 68 % відповідно, p > 0,05). У групі з прогнозованим лабільним МНВ зареєстрували достовірно більшу кількість хворих зі значенням TTR <70 % (59,36 % проти 30,30 %; $\chi^2 = 5,07$, p < 0,05). Оцінка за шкалою SAMe-TT2R2 ≥2 підвищувала ризик незадовільного контролю МНВ у 1,96 раза (CI 1,05–3,63). Взаємозв'язок TTR із поліморфізмами генів CYP2C9, CYP4F2 та VKORC1 не виявили.

Епізоди надмірної гіпокоагуляції (МНВ >4) протягом року зафіксували у 24 (40 %) хворих. Надмірна гіпокоагуляція вірогідно частіше розвивалася в носіїв поліморфного алеля A гена VKORC1 порівняно з диким генотипом G/G (51,43 % проти 24,00 %; $\chi^2 = 4,57$, p < 0,05). Наявність мутантного алеля A гена VKORC1 підвищувала ризик виникнення надмірної гіпокоагуляції в 2,14 раза (RR = 2,14; CI 1,06–4,69).

Із клінічних факторів вірогідний вплив на розвиток надмірної гіпокоагуляції мало приймання аміодарону ($\chi^2 = 3,13$, p < 0,05) з відносним ризиком RR = 1,83 (CI 1,01–3,35).

Висновки. Оцінювання за шкалою SAMe-TT2R2 може бути корисним під час прогнозування незадовільного контролю МНВ, а визначення поліморфізмів гена VKORC1 – розвитку епізодів надмірної гіпокоагуляції. Для з'ясування потенційної ефективності та безпечності терапії варфарином необхідне комплексне оцінювання з використанням клінічних і генетичних методів.

Key words: atrial fibrillation, warfarin, CYP2C9, CYP4F2, VKORC1, polymorphism, genes, SAMe-TT2R2, anticoagulation stability.

Pathologia 2022; 19 (1), 12-17

The influence of clinical and genetic factors on the stability of warfarin's anticoagulant effect in patients with atrial fibrillation

Ya. M. Mykhailovskyi

The aim. To investigate the influence of clinical and genetic factors on the stability of warfarin's anticoagulant effect in patients with atrial fibrillation (AF) during the year.

Materials and methods. The study involved 60 patients with AF, age 70.50 (64.25; 76.25) years (32 men and 28 women). Coagulogram indexes with International Normalized Ratio (INR) were determined using Coag Chrome 3003 monthly; the CHA_2DS_2-VASC, HAS-BLED, SAMe-TT2R2 scales scores were evaluated; the calculation of TTR was performed using the Rosendaal method. CYP2C9, CYP4F2, VKORC1 genes polymorphisms were determined using multiplex real time polymerase chain reaction in CFX-96 thermocycler (BioRad).

Results. Median TTR in groups of patients with SAMe-TT2R2 score <2 (n = 33) and ≥2 (n = 27) did not differ significantly (74 % versus 68 % respectively, P > 0.05). There were significantly more patients with TTR <70 % in the group with predicted labile INR (59.36 % versus 30.30 %; $\chi^2 = 5.07$, P < 0.05). SAMe-TT2R2 score ≥2 increased the risk of poor INR control by 1.96 times (CI 1.05–3.63). No association of TTR with CYP2C9, CYP4F2 and VKORC1 gene polymorphisms was found.

Episodes of excessive hypocoagulation (INR >4) were detected in 21 (40 %) patients during the year. Excessive hypocoagulation was significantly more common in patients carrying the allele A of the VKORC1 gene in comparison with non-carriers (51.43 % versus 24.00 %; $\chi^2 = 4.57$, P < 0.05). The presence of mutant allele A was associated with 2.14-fold higher risk of excessive hypocoagulation (RR = 2.14; CI 1.06–4.69).

Taking amiodarone ($\chi^2 = 3.13$; P < 0.05) had a significant effect on the development of excessive hypocoagulation with a relative risk RR = 1.83 (CI 1.01–3.35).

Conclusions. SAMe-TT2R2 score can be useful to predict poor INR control, while VKORC1 genotype estimating – to predict excessive hypocoagulation episodes. An integrated approach using clinical and genetic methods is needed to determine the potential efficacy and safety of warfarin therapy.

Препарати вибору для профілактики ішемічного інсульту та системних емболій при фібриляції передсердь (ФП) – пероральні антикоагулянти, зокрема варфарин (ВФ), який залишається доволі вживаним препаратом у реальній клінічній практиці [1].

Призначаючи ВФ, слід враховувати, що його терапевтична доза широко варіює. Чинники, що впливають на режим дозування ВФ, – вік, стать, вага, дієта, приймання деяких медикаментів, наявність супутніх захворювань, активність ферментів метаболізму вітаміну К і біотрансформації ВФ [2–4]. Останнє залежить від індивідуальних генетичних особливостей, зокрема поліморфізмів генів VKORC1, CYP2C9, CYP4F2 [5–7]. Тому встановлення дози та моніторинг лікування здійснюється під контролем коагулограми з визначенням міжнародного нормалізованого відношення (МНВ). Згідно з сучасними рекомендаціями, оптимальним є рівень МНВ у діапазоні 2,0–3,0, що показує баланс мінімальних ризиків інсульту та геморагій [1]. У разі зниження цього показника <2,0 зростає ризик тромбоемболічних подій, а при підвищенні >3,0 – значних кровотеч [8,9].

За рекомендаціями ESC 2020, показником адекватності антикоагуляції під час застосування антагоністів вітаміну К є TTR (time in therapeutic range, %) – час перебування МНВ у цільовому діапазоні. При підтриманні TTR >70 % варфарин є так само ефективним, як і прямі пероральні антикоагулянти в профілактиці інсульту, хоча і має дещо більшу частоту геморагічних ускладнень порівняно з апіксабаном і дабігатраном, але не з ривароксабаном [10]. При TTR <65 % ризик інсульту та системної емболії зростає у 2,6 раза, значної кровотечі – в 1,5 раза, смерті від усіх причин – у 2,4 раза порівняно з відповідними показниками в разі TTR ≥65 % [11]. Кожне підвищення TTR на 10 % корелює зі зменшенням частоти системних тромбоемболій на 0,32 % за пацієнто-рік. Але TTR не має істотного впливу на виникнення кровотеч [12]. Більше прогностичне значення щодо геморагій мають епізоди підвищення МНВ >4 (епізоди надмірної гіпокоагуляції) [13]. Для оцінювання можливого недосягнення стабільності антикоагуляції найчастіше застосовують шкалу SAMe-TT2R2 [14].

У фаховій літературі наведено суперечливі дані щодо впливу генетичних поліморфізмів на TTR. Прогностичне значення індексу SAMe-TT2R2 залишається дискутабельним [15–17]. Зв'язок епізодів надмірної гіпокоагуляції з генетичними поліморфізмами досліджено переважно в ініціальний період терапії, а при тривалому лікуванні він вивчений недостатньо.

Мета роботи

Визначити вплив клінічних і генетичних чинників на стабільність антикоагуляції варфарином у хворих із фібриляцією передсердь протягом року.

Матеріали і методи дослідження

У дослідження залучили 60 хворих із ФП різної етіології віком 70,5 (64,25; 76,25) року (32 чоловіки, 28 жінок). Пацієнти перебували під спостереженням в антикоагулянтному кабінеті на базі ННМЦ «Університетська клініка» ЗДМУ протягом 1 року. Варфарин призначали відповідно до чинного алгоритму встановлення індивідуальної дози з досягненням цільових значень МНВ. Протягом періоду спостереження рівень МНВ після визначення дози препарату контролювали 1 раз на 4 тижні.

Таблиця 1. Шкала SAMe-TT2R2

Абревіатура	Показник		Бали
S	Sex, female	Жіноча стать	1
A	Age <60	Вік менше ніж 60 років	1
Me	Medical history	Понад 2 супутні захворювання (АГ, ІХС, інфаркт міокарда, АПАНК, ХСН, інсульт в анамнезі, цукровий діабет, захворювання печінки/нирок)	1
T	Treatment	Ліки, що взаємодіють (наприклад, аміодарон)	1
T_2	Tobacco use	Куріння	2
R_2	Race	Раса (неєвропеоїдна)	2

АГ: артеріальна гіпертензія; **ІХС:** ішемічна хвороба серця; **АПАНК:** атеросклероз периферичних артерій кінцівок; **ХСН:** хронічна серцева недостатність.

За хворими встановили патронаж із можливістю отримання консультативної допомоги дистанційно. Відомості про кожного хворого вносили в електронну базу даних (реєстр). Пацієнтам надавали детальні рекомендації щодо дієти та способу життя, особливостей контролю дози ВФ. Дизайн дослідження узгоджено з комісією з питань біоетики ЗДМУ.

Критерії залучення в дослідження – верифікована фібриляція передсердь, наявність письмової інформованої згоди на участь. Критерії виключення – протезовані клапани серця, вади серця, тяжкі порушення функції нирок і печінки, гострий коронарний синдром, гострі порушення мозкового кровообігу, онкологічні та гематологічні захворювання, психічні порушення, інфекції.

Клінічний діагноз ФП встановлювали згідно з рекомендаціями ESC (2020 року) [1]. Хворих обстежили за загальноприйнятими стандартами. Показники коагулограми з розрахунком міжнародного нормалізованого відношення встановлювали на апараті Coag Chrome 3003, оцінювали ризик тромбоемболічних подій за шкалою CHA2DS2-VASC і ризик кровотеч за шкалою HAS-BLED.

Значення TTR обчислювали за методом Rosendaal et al. [18], результат наведено у відсотках. Для всіх хворих розрахували бал за шкалою SAMe-TT2R2 відповідно до оригінального джерела [14]. Фактори, що включені в шкалу SAMe-TT2R, наведені в *таблиці 1*.

Поліморфізм генів CYP2C9, CYP4F2, VKORC1 у хворих із ФП визначали у відділі молекулярно-генетичних досліджень навчального медико-лабораторного центру ЗДМУ за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в термоциклері CFX-96 (BioRad) з флуоресцентною схемою детекції стандартними наборами реагентів за методикою, що описана в попередніх роботах [19].

Статистично дані опрацювали за допомогою програми Statistica 13.0 (StatSoft Inc., № JPZ8041382130ARCN10-J). Нормальність розподілу змінних перевіряли за допомогою критерію Шапіро–Вілка. Залежно від типу розподілу дані наведено як M ± m (середнє арифметичне ± стандартна похибка середнього арифметичного) або Me (Q_{25}; Q_{75})

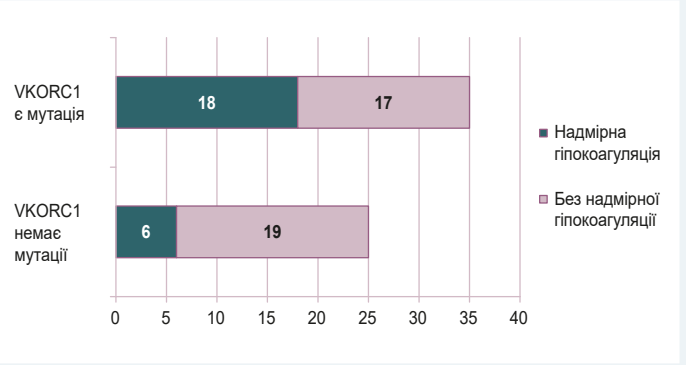


Рис. 1. Взаємозв'язок поліморфізму гена VKORC1-1639 (G/A) з розвитком надмірної гіпокоагуляції на тлі антикоагулянтної терапії ВФ.

Таблиця 2. Клінічна характеристика хворих, які включені в дослідження (n = 60)

Показник, одиниці вимірювання	n (%), M ± m, Me (Q_{25}; Q_{75})
Вік, років	68,20 ± 1,20
Чоловіки / жінки	32 / 28
Ішемічний інсульт / системні емболії в анамнезі	12 (20,00 %)
Артеріальна гіпертензія	56 (93,33 %)
ІХС (гострий коронарний синдром в анамнезі або стабільна стенокардія)	19 (31,67 %)
Хронічна серцева недостатність	40 (66,67 %)
Цукровий діабет /порушення глікемії натще	12 (20,00 %)
Хронічне обструктивне захворювання легень	1 (1,67 %)
Тютюнокуріння	5 (8,33 %)
Терапія аміодароном	11 (18,33 %)
Терапія статинами	51 (85,00 %)
Середній бал за шкалою CHA2DS2-VASc	3,43 ± 0,18
Середній бал за шкалою HAS-BLED	2,20 ± 0,13
Середній бал за шкалою SAMe-TT2R2	1,37 ± 0,10
Медіана TTR, %	72,00 (60,00; 79,50)
Медіана дози ВФ, мг	5,00 (3,75; 6,25)

Таблиця 3. Взаємозв'язок TTR із клінічними та генетичними чинниками у хворих із ФП на тлі антикоагулянтної терапії ВФ

Групи	Загальна кількість хворих	Медіана TTR	Кількість хворих із незадовільним контролем	χ^2, p
SAMe-TT2R2 <2	33	74,00 (63,50; 81,50) %	10 (30,30 %)	χ^2 = 5,07, p < 0,05
SAMe-TT2R2 ≥2	27	68,00 (58,00; 75,00) %	16 (59,26 %)	
VKORC1, є мутація	35	70,01 (58,00; 77,22) %	17 (48,57 %)	χ^2 = 0,94, p > 0,05
VKORC1, немає мутації	25	73,10 (64,50; 80,50) %	9 (36,00 %)	
CYP4F2, є мутація	20	71,00 (60,50; 82,50) %	9 (45,00 %)	χ^2 = 0,008, p > 0,05
CYP4F2, немає мутації	40	72,50 (59,30; 79,50) %	17 (42,50 %)	
CYP2C9*2, є мутація	14	73,50 (63,80; 84,25) %	4 (28,57 %)	χ^2 = 0,93, p > 0,05
CYP2C9*2, немає мутації	46	70,00 (58,80; 77,25) %	22 (47,83 %)	
CYP2C9*3, є мутація	8	75,50 (66,80; 82,00) %	2 (25,00 %)	χ^2 = 0,55, p > 0,05
CYP2C9*3, немає мутації	52	70,50 (59,30; 79,50) %	24 (46,15 %)	

(медіана, 25 і 75 перцентилі). Вірогідність відмінностей оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента або непараметричного U-критерію Манна–Вітні для незалежних вибірок, враховуючи розподіл даних. Міжгрупові відмінності якісних ознак оцінювали з використанням критерію χ^2 Пірсона (при малій вибірці – з поправкою Йєтса). Для визначення ступеня впливу певного чинника на патологічні порушення використали розрахунок відносного ризику (RR) з визначенням 95 % довірчого інтервалу (CI). Відмінності вважали вірогідними при рівні статистичної значущості p < 0,05.

Результати

Клінічна характеристика хворих наведена в *таблиці 2*.

За даними, що наведені в *таблиці 2*, основа когорти – хворі з ФП високого тромботичного ризику, середній бал за шкалою CHA2DS2-VASC – 3,43 ± 0,18. Це зумовлено високою частотою наявності основних серцево-судинних захворювань. Так, артеріальну гіпертензію виявили в 93,3 % хворих, ішемічну хворобу серця – в 31,7 %, хронічну серцеву недостатність – у 66,7 % пацієнтів. Порушення вуглеводного обміну мали 20,0 % хворих.

Середній бал за шкалою HAS-BLED становив 2,20 ± 0,13, за шкалою SAMe-TT2R2 – 1,37 ± 0,10. Медіана дози ВФ становила 5,00 (3,75; 6,25) мг. Медіана TTR – 72,00 (60,00; 79,50) %. Значення понад 70 % зафіксовано у 34 хворих із ФП. Із препаратів, що впливають на метаболізм ВФ, 11 (18,33 %) хворих приймали аміодарон, 51 (85,00 %) – статини.

Встановлено, що медіани TTR у групах хворих із балом за шкалою SAMe-TT2R2 <2 (n = 33) та ≥2 (n = 27) вірогідно не відрізнялися (74 % і 68 % відповідно, p > 0,05). У групі з прогнозованим лабільним МНВ зареєстрували вірогідно більше хворих зі значенням TTR <70 % (59,36 % проти 30,30 %; χ^2 = 5,07, p < 0,05). Оцінка за шкалою SAMe-TT2R2 ≥2 підвищувала ризик незадовільного контролю МНВ у 1,96 раза (CI 1,05–3,63). Взаємозв'язок TTR із поліморфізмами генів CYP2C9, CYP4F2 та VKORC1 не виявили (*табл. 3*).

Епізоди надмірної гіпокоагуляції (МНВ >4) протягом року зафіксували у 24 (40 %) хворих. Оцінка за шкалою HAS-BLED у хворих з епізодами надмірної гіпокоагуляції та без них вірогідно не відрізнялася (p > 0,05). Встановили, що надмірна гіпокоагуляція вірогідно частіше розвивалася у групі хворих-носіїв поліморфного алеля A гена VKORC1 порівняно з диким генотипом G/G (51,43 % проти 24,00 %; χ^2 = 4,57, p < 0,05) (*рис. 1*). Наявність мутантного алеля A гена VKORC1 підвищувала ризик виникнення надмірної гіпокоагуляції у 2,14 раза (RR = 2,14; CI 1,06–4,69). Взаємозв'язок генотипів CYP2C9, CYP4F2 з епізодами надмірної гіпокоагуляції не виявили.

Серед клінічних факторів, що мають зв'язок із чутливістю до варфарину, вірогідний вплив на розвиток надмірної гіпокоагуляції мало приймання аміодарону (χ^2 = 3,13, p < 0,05) з відносним ризиком RR = 1,83 (CI 1,01–3,35). Не встановили взаємозв'язок інших клінічних факторів, як-от вік, стать, зріст, вага, коморбідність, приймання статинів, із розвитком надмірної гіпокоагуляції.

Обговорення

Згідно з результатами нашого дослідження, оцінка за шкалою SAMe-TT2R2 ≥2 асоційована з незадовільним контролем МНВ, хоча і не впливала на середній TTR у групі. У доступній фаховій літературі немає одностайної думки щодо прогностичної ролі цієї шкали. Метааналіз 2018 року [15], що включив 16 досліджень, підтвердив передбачувальну значущість індексу SAMe-TT2R2 щодо недосягнення адекватної антикоагуляції. У дослідженні SPORTIF, яке включало 3665 пацієнтів, показано: шкала SAMe-TT2R2 дала змогу виявити пацієнтів із більшою імовірністю досягнення субоптимального антикоагулянтного контролю зі збільшенням частоти тромбоемболічних подій [20]. Поряд із тим у низці досліджень показано відсутність впливу індексу SAMe-TT2R2 на прогноз у хворих із ФП, незважаючи на можливість передбачити некомплаєнтних пацієнтів [16,21]. Але така відмінність може бути пояснена різною віковою структурою групи хворих, у частині випадків – розміром вибірки.

В інших метааналізах [21–23] показано, що оцінювання за шкалою SAMe-TT2R2 допомагало виявити пацієнтів із високою імовірністю незадовільного контролю МНВ, але мало низьку прогностичну здатність. У дослідженні корейських вчених не визначили зв'язок між оцінкою за шкалою SAMe-TT2R2 і лабільним МНВ [24]. Але такий результат можна пояснити іншою етнічною структурою пацієнтів, що брали участь у дослідженні. Отже, хоча предикторна роль шкали SAMe-TT2R2 у передбаченні незадовільного контролю МНВ і, як наслідок, тромбоемболічних подій залишається дискутабельною, наші результати загалом не суперечать даним інших досліджень і метааналізів.

Нині намагаються поліпшити діагностичну цінність шкали SAMe-TT2R2. Припускають, що краща точність оцінювання стабільності антикоагуляції можлива, якщо використовувати дані щодо генотипів, які впливають на ефективність терапії варфарином. Але ми не виявили значущого взаємозв'язку мутацій генів CYP2C9, CYP4F2 і VKORC1 зі значенням TTR. Це дещо суперечить результатам окремих досліджень. Так, у роботі M. Da Silveira et al. показано: генотипи CYP2C9*3 (AA) і VKORC1-1639 (GG) асоційовані з гіршим антикоагулянтним контролем [25]. У дослідженні Jane Skov et al. виявлений зв'язок стабільності антикоагуляції з варіантними генотипами CYP2C9 і VKORC1 [26]. Але інші дослідники не виявили суттєвого впливу генетичних поліморфізмів на TTR, що збігається з нашими результатами [27,28].

Варіативність результатів можна пояснити етнічними особливостями та розбіжностями в дієті пацієнтів. Значення генетично детермінованої швидкості обміну вітаміну К у стабільності антикоагуляції істотно зменшується, якщо пацієнт добре проінструктований щодо правил харчової поведінки під час приймання варфарину та якщо здійснюється спостереження в умовах антикоагулянтного кабінету.

Один із найважливіших факторів ризику кровотеч, на думку багатьох авторів, – рівень коагуляції. У дослідженні SPIRIT показано: ризик виникнення внутрішньочерепного крововиливу збільшується в 1,37 раза на кожне перевищення МНВ на 0,5 одиниці більше за терапевтичний діапазон [29]. Вплив клінічних і генетичних чинників на розвиток епізодів надмірної коагуляції під час тривалої терапії ВФ вивчено недостатньо. У дослідженні Yun Kyung Park et al. такий взаємозв'язок не встановили [24]. Розбіжності з нашим дослідженням можна пояснити різною расою пацієнтів. Зв'язок поліморфізму гена VKORC1 з епізодами надмірної гіпокоагуляції теоретично може призвести до більшої частоти розвитку кровотеч у хворих із мутантним генотипом. Це твердження узгоджується з нашими попередніми результатами: поліморфізм гена VKORC1 пов'язаний із підвищеною частотою геморагічних ускладнень з відносним ризиком 2,14 [30].

Висновки

1. У хворих із ФП, які мають бал за шкалою SAMe-TT2R2 ≥2, спостерігають збільшення частоти реєстрації значення TTR <70 % як критерію нестабільності антикоагуляції ($\chi^2 = 2,35$, $p < 0,05$). Взаємозв'язок TTR із поліморфізмами генів CYP2C9, CYP4F2 і VKORC1 не виявили.

2. Надмірна гіпокоагуляція вірогідно частіше розвивалася у групі хворих-носіїв поліморфного алеля А гена VKORC1 порівняно з диким генотипом G/G ($\chi^2 = 4,57$, $p < 0,05$). Наявність мутантного алеля А гена VKORC1 підвищує ризик виникнення надмірної гіпокоагуляції у 2,14 раза (RR = 2,14; CI 1,06–4,69). Із клінічних факторів вірогідний вплив на розвиток надмірної гіпокоагуляції мало приймання аміодарону ($\chi^2 = 3,13$, $p < 0,05$) з відносним ризиком RR = 1,83 (CI 1,01–3,35).

3. Оцінювання за шкалою SAMe-TT2R2 може бути корисним під час прогнозування незадовільного контролю МНВ, а визначення поліморфізмів гена VKORC1 – розвитку епізодів надмірної гіпокоагуляції. Тому для визначення потенційної ефективності та безпечності терапії варфарином необхідне комплексне оцінювання з використанням клінічних і генетичних методів.

Перспективи подальших досліджень полягають у порівнянні стабільності антикоагуляції варфарином у хворих з емпіричним і фармакогенетичним методом визначення дози.

Фінансування
Дослідження виконане в рамках НДР Запорізького державного медичного університету «Коморбідні стани, серцево-судинні та онкологічні захворювання в загальноклінічній практиці: розробка сучасних діагностичних та лікувальних заходів», № держреєстрації 0120U101587.

Конфлікт інтересів: відсутній.
Conflicts of interest: author has no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 09.02.2022
Після доопрацювання / Revised: 28.03.2022
Прийнято до друку / Accepted: 30.03.2022

Відомості про автора:
Михайловський Я. М., PhD-аспірант каф. сімейної медицини, терапії, кардіології та неврології факультету післядипломної освіти, Запорізький державний медичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0002-1310-8585

Information about the author:
Mykhailovskyi Ya. M., PhD-student of the Department of Family Medicine, Therapy, Cardiology and Neurology of Faculty of Postgraduate Education, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Список літератури

[1] Hindricks G., Potpara T., Dagres et al. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC / G. Hindricks, T. Potpara, N. Dagres et al. *European heart journal*. 2021. Vol. 42, Iss. 5. P. 373-498. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa612

[2] Warfarin dosing algorithms: A systematic review / I. G. Asiimwe, E. J. Zhang, R. Osanlou et al. *British journal of clinical pharmacology*. 2021. Vol. 87, Iss. 4. P. 1717-1729. https://doi.org/10.1111/bcp.14608

[3] The effect of amiodarone on warfarin anticoagulation: a register-based nationwide cohort study involving the Swedish population / J. Holm, J. D. Lindh, M. L. Andersson, B. Mannheimer. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. 2017. Vol. 15, Iss. 3. P. 446-453. https://doi.org/10.1111/jth.13614

[4] Non-Clinical Factors Associated with International Normalized Ratio Control in Patients on Warfarin Therapy: A Review Paper / T. Ramasamy, N. K. Pillai, C. G. Yap, N. K. Jahan. *Open Access Library Journal*. 2020. Vol. 7. P. 1-21. https://doi.org/10.4236/oalib.1106947

[5] Al-Eitan L. N., Almasri A. Y., Khasawneh R. H. Effects of CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms on warfarin sensitivity and responsiveness during the stabilization phase of therapy. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ*. 2019. Vol. 27, Iss. 4. P. 484-490. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.01.011

[6] Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Pharmacogenetics-Guided Warfarin Dosing: 2017 Update / J. A. Johnson, K. E. Caudle, L. Gong et al. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2017. Vol. 102, Iss. 3. P. 397-404. https://doi.org/10.1002/cpt.668

[7] Impact of the *CYP4F2* gene polymorphisms on the warfarin maintenance dose: A systematic review and meta-analysis / X. Sun, W. Y. Yu, W. L. Ma et al. *Biomedical reports*. 2016. Vol. 4, Iss 4. P. 498-506. https://doi.org/10.3892/br.2016.599

[8] Oral anticoagulant therapy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines / W. Ageno, A. S. Gallus, A. Wittkowsky et al. *Chest*. 2012. Vol. 141, Suppl. 2. P. e44S-e88S. https://doi.org/10.1378/chest.11-2292

[9] 2019 AHA/ACC/HRS Focused Update of the 2014 AHA/ACC/HRS Guideline for the Management of Patients With Atrial Fibrillation: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society / C. T. January, L. S. Wann, H. Calkins et al. *Journal of the American College of Cardiology*. 2019. Vol. 74, Iss. 1. P. 104-132. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.01.011

[10] Dabigatran, rivaroxaban and apixaban vs. high TTR warfarin in atrial fibrillation / S. Själander, V. Sjögren, H. Renlund et al. *Thrombosis research*. 2018. Vol. 167. P. 113-118. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.05.022

[11] Quality of Vitamin K Antagonist Control and 1-Year Outcomes in Patients with Atrial Fibrillation: A Global Perspective from the GARFIELD-AF Registry / S. Haas, H. Ten Cat, G. Accetta et al. *PloS one*. 2016. Vol. 11, Iss. 10. e0164076. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164076

[12] Estimation of the impact of warfarin's time-in-therapeutic range on stroke and major bleeding rates and its influence on the medical cost avoidance associated with novel oral anticoagulant use-learnings from ARISTOTLE, ROCKET-AF, and RE-LY trials / A. Amin, S. Deitelzweig, Y. Jing et al. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2014. Vol. 38, Iss. 2. P. 150-159. https://doi.org/10.1007/s11239-013-1048-z

[13] Risk factors for complications of chronic anticoagulation. A multicenter study. Warfarin Optimized Outpatient Follow-up Study Group / S. D. Fihn, M. McDonell, D. Martin et al. *Annals of internal medicine*. 1993. Vol. 118, Iss 7. P. 511-520. https://doi.org/10.7326/0003-4819-118-7-199304010-00005

[14] Factors affecting quality of anticoagulation control among patients with atrial fibrillation on warfarin: the SAMe-TT_2R_2 score / S. Apostolakis, R. M. Sullivan, B. Olshansky, G. Lip. *Chest*. 2013. Vol. 144, Iss. 5. P. 1555-1563. https://doi.org/10.1378/chest.13-0054

[15] Zulkifly H., Lip G., Lane D. A. Use of the SAMe-TT2R2 score to predict anticoagulation control in atrial fibrillation and venous thromboembolism patients receiving vitamin K antagonists: A review. *Heart rhythm*. 2018. Vol. 15, Iss. 4. P. 615-623. https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2017.11.026

[16] Pivatto Junior F., Scheffel R. S., Ries L. SAMe-TT2R2 Score in the Outpatient Anticoagulation Clinic to Predict Time in Therapeutic Range and Adverse Events. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2017. Vol 108, Iss. 4. P. 290-296. https://doi.org/10.5935/abc.20170052

[17] Poli D., Antonucc, E., Test, S., & Lip, G. Y. A prospective validation of the SAME-TT2R 2 score: how to identify atrial fibrillation patients who will have good anticoagulation control on warfarin. *Internal and emergency medicine*. 2014. Vol. 9, Iss. 4. P. 443-447. https://doi.org/10.1007/s11739-014-1065-8

[18] A method to determine the optimal intensity of oral anticoagulant therapy / F. R. Rosendaal, S. C. Cannegieter, F. J. van der Meer, E. Briët. *Thrombosis and haemostasis*. 1993. Vol. 69, Iss. 3. P. 236-239.

[19] Kolesnyk M. Y., Mykhailovskyi Y. M. Frequencies of polymorphisms in genes affecting the pharmacokinetics of warfarin in the Zaporizhzhia region. *Запорожский медицинский журнал*. 2021. Т. 23, № 4. С. 476-479. https://doi.org/10.14739/2310-1210.2021.4.227002

[20] Proietti M., Lane D. A., Lip G. Y. Relation of the SAMe-TT2R2 score to quality of anticoagulation control and thromboembolic events in atrial fibrillation patients: Observations from the SPORTIF trials. *International journal of cardiology*. 2016. Vol. 216. P. 168-172. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.04.131

[21] Prediction Score for Anticoagulation Control Quality Among Older Adults / K. J. Lin, D. E. Singer, R. J Glynn et al. *Journal of the American Heart Association*. 2017. Vol. 6, Iss. 10. e006814. https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006814

[22] Evaluation of the SAMe-TT2R2 score to predict the quality of anticoagulation control in patients with venous thromboembolism treated with vitamin K antagonists: Findings from the RIETE registry / J. Del-Toro-Cervera, P. Demelo-Rodriguez, F. Galeano-Valle et al. *Thrombosis research*. 2020. Vol. 194. P. 178-182. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.06.022

[23] Clinical usefulness of the SAMe-TT2R2 score: A systematic review and simulation meta-analysis / J. van Miert, S. Bos, N. Veeger, K. Meijer. *PloS one*. 2018. Vol. 13, Iss. 3. e0194208. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194208

[24] Lack of Association of Clinical Factors (SAMe-TT2R2) with CYP2C9/VKORC1 Genotype and Anticoagulation Control Quality / Y. K. Park, M. J. Lee, J. H Kim et al. *Journal of stroke*. 2015. Vol. 17, Iss. 2. P. 192-198. https://doi.org/10.5853/jos.2015.17.2.192

[25] Polymorphisms of *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3* and *VKORC1* genes related to time in therapeutic range in patients with atrial fibrillation using warfarin / M. Da Silveira, L. A. Melo, F. Gomes et al. *The application of clinical genetics*. 2019. Vol. 12. P. 151-159. https://doi.org/10.2147/TACG.S197316

[26] The influence of VKORC1 and CYP2C9 gene sequence variants on the stability of maintenance phase warfarin treatment / J. Skov, E. M. Bladbjerg, A. Leppin, J. Jespersen. *Thrombosis research*. 2013. Vol. 131, Iss. 2. P. 125-129. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2012.11.004

[27] Effect of SAMe-TT_2R_2 score and genetic polymorphism on the quality of anticoagulation control in Qatari patients treated with warfarin / H. Elewa, I. Qurishi, R. Abouelhassan et al. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2020. Vol. 49, Iss. 4. P. 659-666. https://doi.org/10.1007/s11239-020-02102-x

[28] Quality of oral anticoagulation control in Chinese patients with non-valvular atrial fibrillation: a prospective controlled study / Y. Li, J. Yu, Y. Kuang et al. *Current medical research and opinion*. 2020. Vol. 36, Iss. 9. P. 1433-1439. https://doi.org/10.1080/03007995.2020.1796611

[29] Gorter J. W. Major bleeding during anticoagulation after cerebral ischemia: patterns and risk factors. Stroke Prevention in Reversible Ischemia Trial (SPIRIT). European Atrial Fibrillation Trial (EAFT) study groups. *Neurology*. 1999. Vol 53, Iss. 6. P. 1319-1327. https://doi.org/10.1212/wnl.53.6.1319

[30] Kolesnyk M. Y., Mykhailovskyi Y. M. The interrelation of CYP2C9, CYP4F2, VKORC1 genes polymorphisms with warfarin dose and hemorrhagic complications risk rise in patients with atrial fibrillation: a retrospective study. *East European science Journal*. 2021. Vol. 1, Iss. 1. P. 37-43.

References

[1] Hindricks, G., Potpara, T., Dagres, N., Arbelo, E., Bax, J. J., Blomström-Lundqvist, C., Boriani, G., Castella, M., Dan, G. A., Dilaveris, P. E., Fauchier, L., Filippatos, G., Kalman, J. M., La Meir, M., Lane, D. A., Lebeau, J. P., Lettino, M., Lip, G., Pinto, F. J., Thomas, G. N., … ESC Scientific Document Group (2021). 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association

(EHRA) of the ESC. *European heart journal*, *42*(5), 373-498. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa612

[2] Asiimwe, I. G., Zhang, E. J., Osanlou, R., Jorgensen, A. L., & Pirmohamed, M. (2021). Warfarin dosing algorithms: A systematic review. *British journal of clinical pharmacology*, *87*(4), 1717-1729. https://doi.org/10.1111/bcp.14608

[3] Holm, J., Lindh, J. D., Andersson, M. L., & Mannheimer, B. (2017). The effect of amiodarone on warfarin anticoagulation: a register-based nationwide cohort study involving the Swedish population. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, *15*(3), 446-453. https://doi.org/10.1111/jth.13614

[4] Ramasamy, T., Pillai, N. K., Yap, C. G. & Jahan, N. K. (2020). Non-Clinical Factors Associated with International Normalized Ratio Control in Patients on Warfarin Therapy: A Review Paper. *Open Access Library Journal*, *7*, 1-21. https://doi.org/10.4236/oalib.1106947

[5] Al-Eitan, L. N., Almasri, A. Y., & Khasawneh, R. H. (2019). Effects of CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms on warfarin sensitivity and responsiveness during the stabilization phase of therapy. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ*, *27*(4), 484-490. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.01.011

[6] Johnson, J. A., Caudle, K. E., Gong, L., Whirl-Carrillo, M., Stein, C. M., Scott, S. A., Lee, M. T., Gage, B. F., Kimmel, S. E., Perera, M. A., Anderson, J. L., Pirmohamed, M., Klein, T. E., Limdi, N. A., Cavallari, L. H., & Wadelius, M. (2017). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Pharmacogenetics-Guided Warfarin Dosing: 2017 Update. *Clinical pharmacology and therapeutics*, *102*(3), 397-404. https://doi.org/10.1002/cpt.668

[7] Sun, X., Yu, W. Y., Ma, W. L., Huang, L. H., & Yang, G. P. (2016). Impact of the *CYP4F2* gene polymorphisms on the warfarin maintenance dose: A systematic review and meta-analysis. *Biomedical reports*, *4*(4), 498-506. https://doi.org/10.3892/br.2016.599

[8] Ageno, W., Gallus, A. S., Wittkowsky, A., Crowther, M., Hylek, E. M., & Palareti, G. (2012). Oral anticoagulant therapy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*, *141*(2 Suppl), e44S-e88S. https://doi.org/10.1378/chest.11-2292

[9] January, C. T., Wann, L. S., Calkins, H., Chen, L. Y., Cigarroa, J. E., Cleveland, J. C., Jr, Ellinor, P. T., Ezekowitz, M. D., Field, M. E., Furie, K. L., Heidenreich, P. A., Murray, K. T., Shea, J. B., Tracy, C. M., & Yancy, C. W. (2019). 2019 AHA/ACC/HRS Focused Update of the 2014 AHA/ACC/HRS Guideline for the Management of Patients With Atrial Fibrillation: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *Journal of the American College of Cardiology*, *74*(1), 104-132. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.01.011

[10] Själander, S., Sjögren, V., Renlund, H., Norrving, B., & Själander, A. (2018). Dabigatran, rivaroxaban and apixaban vs. high TTR warfarin in atrial fibrillation. *Thrombosis research*, *167*, 113-118. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.05.022

[11] Haas, S., Ten Cate, H., Accetta, G., Angchaisuksiri, P., Bassand, J. P., Camm, A. J., Corbalan, R., Darius, H., Fitzmaurice, D. A., Goldhaber, S. Z., Goto, S., Jacobson, B., Kayani, G., Mantovani, L. G., Misselwitz, F., Pieper, K., Schellong, S. M., Stepinska, J., Turpie, A. G., van Eickels, M., … GARFIELD-AF Investigators (2016). Quality of Vitamin K Antagonist Control and 1-Year Outcomes in Patients with Atrial Fibrillation: A Global Perspective from the GARFIELD-AF Registry. *PloS one*, *11*(10), e0164076. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164076

[12] Amin, A., Deitelzweig, S., Jing, Y., Makenbaeva, D., Wiederkehr, D., Lin, J., & Graham, J. (2014). Estimation of the impact of warfarin's time-in-therapeutic range on stroke and major bleeding rates and its influence on the medical cost avoidance associated with novel oral anticoagulant use-learnings from ARISTOTLE, ROCKET-AF, and RE-LY trials. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, *38*(2), 150–159. https://doi.org/10.1007/s11239-013-1048-z

[13] Fihn, S. D., McDonell, M., Martin, D., Henikoff, J., Vermes, D., Kent, D., & White, R. H. (1993). Risk factors for complications of chronic anticoagulation. A multicenter study. Warfarin Optimized Outpatient Follow-up Study Group. *Annals of internal medicine*, *118*(7), 511-520. https://doi.org/10.7326/0003-4819-118-7-199304010-00005

[14] Apostolakis, S., Sullivan, R. M., Olshansky, B., & Lip, G. (2013). Factors affecting quality of anticoagulation control among patients with atrial fibrillation on warfarin: the SAMe-TT_2R_2 score. *Chest*, 144(5), 1555-1563. https://doi.org/10.1378/chest.13-0054

[15] Zulkifly, H., Lip, G., & Lane, D. A. (2018). Use of the SAMe-TT2R2 score to predict anticoagulation control in atrial fibrillation and venous thromboembolism patients receiving vitamin K antagonists: A review. *Heart rhythm*, *15*(4), 615-623. https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2017.11.026

[16] Pivatto Junior, F., Scheffel, R. S., Ries, L., Wolkind, R. R., Marobin, R., Barkan, S. S., Amon, L. C., & Biolo, A. (2017). SAMe-TT2R2 Score in the Outpatient Anticoagulation Clinic to Predict Time in Therapeutic Range and Adverse Events. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, *108*(4), 290-296. https://doi.org/10.5935/abc.20170052

[17] Poli, D., Antonucci, E., Testa, S., & Lip, G. Y. (2014). A prospective validation of the SAME-TT2R 2 score: how to identify atrial fibrillation patients who will have good anticoagulation control on warfarin. *Internal and emergency medicine*, *9*(4), 443-447. https://doi.org/10.1007/s11739-014-1065-8

[18] Rosendaal, F. R., Cannegieter, S. C., van der Meer, F. J., & Briët, E. (1993). A method to determine the optimal intensity of oral anticoagulant therapy. *Thrombosis and haemostasis*, *69*(3), 236-239.

[19] Kolesnyk, M. Y., & Mykhailovskyi, Y. M. (2021). Frequencies of polymorphisms in genes affecting the pharmacokinetics of warfarin in the Zaporizhzhia region. *Zaporozhye Medical Journal*, *23*(4), 476-479. https://doi.org/10.14739/2310-1210.2021.4.227002

[20] Proietti, M., Lane, D. A., & Lip, G. Y. (2016). Relation of the SAMe-TT2R2 score to quality of anticoagulation control and thromboembolic events in atrial fibrillation patients: Observations from the SPORTIF trials. *International journal of cardiology*, *216*, 168-172. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.04.131

[21] Lin, K. J., Singer, D. E., Glynn, R. J., Blackley, S., Zhou, L., Liu, J., Dube, G., Oertel, L. B., & Schneeweiss, S. (2017). Prediction Score for Anticoagulation Control Quality Among Older Adults. *Journal of the American Heart Association*, *6*(10), e006814. https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006814

[22] Del-Toro-Cervera, J., Demelo-Rodriguez, P., Galeano-Valle, F., Fidalgo, Á., Sampériz, Á., Muñoz-Torrero, J., Lima, J., Sigüenza, P., Tufano, A., Monreal, M., & RIETE Investigators (2020). Evaluation of the SAMe-TT2R2 score to predict the quality of anticoagulation control in patients with venous thromboembolism treated with vitamin K antagonists: Findings from the RIETE registry. *Thrombosis research*, *194*, 178-182. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.06.022

[23] Van Miert, J., Bos, S., Veeger, N., & Meijer, K. (2018). Clinical usefulness of the SAMe-TT2R2 score: A systematic review and simulation meta-analysis. *PloS one*, *13*(3), e0194208. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194208

[24] Park, Y. K., Lee, M. J., Kim, J. H., Kim, S. J., Kim, J. S., Lee, S. Y., & Bang, O. Y. (2015). Lack of Association of Clinical Factors (SAMe-TT2R2) with CYP2C9/VKORC1 Genotype and Anticoagulation Control Quality. *Journal of stroke*, *17*(2), 192-198. https://doi.org/10.5853/jos.2015.17.2.192

[25] Da Silveira, M., Melo, L. A., Gomes, F., Andrade, L., Serur, I. P., Piscoya, I., Gueiros, R. M., Palmeira do Ó, K., de Lima, R. E., Brasileiro, V., Vasconcelos, L., & Sobral Filho, D. C. (2019). Polymorphisms of *CYP2C9*2, CYP2C9*3* and *VKORC1* genes related to time in therapeutic range in patients with atrial fibrillation using warfarin. *The application of clinical genetics*, *12*, 151-159. https://doi.org/10.2147/TACG.S197316

[26] Skov, J., Bladbjerg, E. M., Leppin, A., & Jespersen, J. (2013). The influence of VKORC1 and CYP2C9 gene sequence variants on the stability of maintenance phase warfarin treatment. *Thrombosis research*, *131*(2), 125-129. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2012.11.004

[27] Elewa, H., Qurishi, I., Abouelhassan, R., Abou Safrah, S., Alhamoud, E., & Bader, L. (2020). Effect of SAMe-TT_2R_2 score and genetic polymorphism on the quality of anticoagulation control in Qatari patients treated with warfarin. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, *49*(4), 659-666. https://doi.org/10.1007/s11239-020-02102-x

[28] Li, Y., Yu, J., Kuang, Y., Wu, C., Yang, L., Fang, Q., Pei, Q., & Yang, G. (2020). Quality of oral anticoagulation control in Chinese patients with non-valvular atrial fibrillation: a prospective controlled study. *Current medical research and opinion*, *36*(9), 1433-1439. https://doi.org/10.1080/03007995.2020.1796611

[29] Gorter J. W. (1999). Major bleeding during anticoagulation after cerebral ischemia: patterns and risk factors. Stroke Prevention In Reversible Ischemia Trial (SPIRIT). European Atrial Fibrillation Trial (EAFT) study groups. *Neurology*, *53*(6), 1319-1327. https://doi.org/10.1212/wnl.53.6.1319

[30] Kolesnyk, M. Y., & Mykhailovskyi, Y. M. (2021). The interrelation of CYP2C9, CYP4F2, VKORC1 genes polymorphisms with warfarin dose and hemorrhagic complications risk rise in patients with atrial fibrillation: a retrospective study. *East European science journal*, *1*(1), 37-43.

УДК 616.12-008.46-002.77-053.6:612.766.1
DOI: 10.14739/2310-1237.2022.1.243693

Толерантність до фізичного навантаження в підлітків із ревматичними захворюваннями, враховуючи систолічну функцію серця

Т. О. Головко*[1,2,A,B,D], Н. С. Шевченко[1,2,C,E], Л. Ф. Богмат[1,2,C,F], В. В. Ніконова[1,B]

[1]ДУ «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН України», м. Харків, [2]Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна

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

Ключові слова: систолічна функція міокарда, ревматичні захворювання, толерантність до фізичного навантаження, підлітки.

Патологія. 2022. Т. 19, № 1(54). С. 18-23

***E-mail:** golovko@karazin.ua

Мета роботи – визначити систолічну функцію серця та адаптивні можливості до фізичного навантаження в підлітків із ювенільним ідіопатичним артритом (ЮІА) і системним червоним вовчаком.

Матеріали та методи. Обстежили 72 підлітків із ревматичними захворюваннями (РЗ) віком 10–18 (13,11 ± 0,89) років; 58 дівчат і 14 хлопців. Група контролю – 46 здорових підлітків зіставного віку (14,73 ± 0,32 року); 29 дівчат і 17 хлопців. Усім хворим здійснили ультразвукове дослідження серця на апараті LOGIO V2 General Electric (США). Для визначення толерантності до мінімального фізичного навантаження виконали тест шестихвилинної ходьби (ТШХ). До тесту та після його завершення протягом першої хвилини відновлювального періоду підрахували частоту серцевих скорочень (ЧСС), виміряли артеріальний тиск, розрахували індекс Алговера (ІА). Пройдену дистанцію виміряли в метрах.

Результати. Встановили, що в підлітків із РЗ відбувається вірогідне зниження фракції викиду (ФВ) правого шлуночка (ПШ) на тлі істотного збільшення ударного об'єму (УО) та хвилинного об'єму кровообігу (ХОК) ПШ, що супроводжується вищими значеннями ЧСС. У пацієнтів з ЮІА визначили вірогідно меншу ФВ обох шлуночків серця на тлі достовірно вищих значень ЧСС, а також знижені УО лівого шлуночка (ЛШ) та ХОКлш; УОпш та ХОКпш були вірогідно вищими. Аналізуючи показники ТШХ, виявили: дистанція вірогідно менша в підлітків із РЗ, а відсоток приросту ЧСС після тесту – більший. Індекс Алговера вірогідно вищий до ТШХ, істотно підвищився після тесту. У підлітків із низькою ФВпш спостерігали достовірне зниження УОпш і ХОКпш на тлі вірогідно нижчої ЧСС, але ІА після ТШХ значущо вищий.

Висновки. У підлітків із РЗ на тлі збереження систолічної функції лівого шлуночка виявили зниження систолічної функції правого шлуночка серця, збільшення УОпш та ХОКпш на тлі підвищення ЧСС. Толерантність до фізичного навантаження зберігалася в межах нормальних значень внаслідок суттєвого підвищення активності систем регуляції. При зниженні систолічної функції правого шлуночка, що прогресує, виявили зниження його ударного та хвилинного об'ємів; це може вказувати на участь інших систем регуляції в адекватній підтримці системи кровообігу.

Key words: myocardial systolic function, rheumatic diseases, exercise tolerance, adolescents.

Pathologia 2022; 19 (1), 18-23

Tolerance to exercise in adolescents with rheumatic diseases taking into account systolic heart function

T. O. Holovko, N. S. Shevchenko, L. F. Bohmat, V. V. Nikonova

Aim: to determine the systolic heart function and adaptive capabilities to physical activity in adolescents with juvenile idiopathic arthritis and systemic lupus erythematosus.

Materials and methods. We examined 72 adolescents with RD at the age of 10–18 (13.11 ± 0.89) years, 58 were girls and 14 were boys. The control group consisted of 46 healthy adolescents of the corresponding age (14.73 ± 0.32 years) and gender (29 girls and 17 boys). An ultrasound examination of the heart using a General Electric LOGIO V2 apparatus (USA) was performed for all patients. The six-minute walk test was performed to determine the tolerance to minimal physical activity. Before the test and after completion during the first minute of the recovery period, heart rate was calculated, blood pressure was measured and the Allgower's index was calculated. The 6 minute walking distance was measured in meters.

Results. It was found that adolescents with RD had a significant decrease in EFrv against the background of a significant increase in SVrv and MVCrv, which was accompanied by higher HR values. In patients with JIA, reliably lower EF of both ventricles of the heart was established against the background of significantly higher heart rate values and a decrease in SVlv and MVClv, while SVrv and MVCrv were significantly higher. When analyzing 6MWT indicators, the distance was significantly shorter in adolescents with RD, and the percentage of increase in heart rate after the test was higher. Allgower's index was significantly higher before 6MWT and significantly increased after the test. In adolescents with low EFrv, there was a significant decrease in SVrv and MVCrv against the background of significantly low HR values, but the Allgower's index after 6MWT was significantly higher.

Conclusions. In adolescents with RD, while the systolic function of the left ventricle is preserved, there is a decrease in the systolic function of the right ventricle of the heart, an increase in SVrv and MVCrv on the background of an increase in heart rate. Tolerance to physical activity remains within normal limits due to a significant increase in the activity of regulatory systems. With a progressive decrease in the systolic function of the right ventricle, a decrease in its stroke and minute volumes was established, which may indicate the participation of other regulatory systems in adequate support of the circulatory system.

Ревматичні захворювання – одна з найактуальніших, найважливіших медичних і соціально-економічних проблем. До основних причин зниження якості життя та смертності пацієнтів із ревматичними захворюваннями (РЗ) належить патологія серцево-судинної системи (ССС) із розвитком серцевої недостатності (СН) [1–3]. Відповідно до функціональної класифікації СН Нью-Йоркської асоціації серця (NYHA), основні діагностичні показники субклінічної СН – суб'єктивні відчуття пацієнта: задуха під час фізичного навантаження та неможливість виконувати щоденну фізичну роботу [4].

Для хворих підліткового віку та молодих дорослих такі скарги частіше за все не характерні, їх виявляють тільки під час активного опитування на прийомі в лікаря. Тому для діагностики ранніх порушень ССС у пацієнтів із РЗ у цьому віковому періоді важливого значення набуває оцінювання толерантності до мінімального фізичного навантаження за результатами різних навантажувальних проб [5].

Останнім часом для вирішення цих завдань широко використовують тест шестихвилинної ходьби (ТШХ). Він простий у виконанні, не потребує додаткового обладнання. За результатами цього тесту можна розрахувати кілька коефіцієнтів, що дають змогу оцінити не тільки толерантність організму до фізичного навантаження, але й адаптаційні можливості ССС [6,7].

Для оцінювання показників функції системи кровообігу використовують також індекс Алговера. В разі невідкладних станів його розраховують для визначення ступеня крововтрати та шоку, тому його називають ще шоковим індексом [8,9]. Підвищення цього показника при хронічних захворюваннях вказує на збільшення серцевого викиду внаслідок тахікардії, а негативне значення – на дефіцит кровообігу [10].

Доцільним вважаємо виявлення найбільш ранніх ознак порушень діяльності серцево-судинної системи у підлітків із РЗ.

Мета роботи

Визначити систолічну функцію серця й адаптивні можливості до фізичного навантаження у підлітків із ювенільним ідіопатичним артритом і системним червоним вовчаком.

Матеріали і методи дослідження

Обстежили 72 підлітків із РЗ: 51 хворий на ювенільний ідіопатичний артрит (ЮІА), 21 пацієнт із системним червоним вовчаком (СЧВ). Вік обстежених – 10–18 (13,11 ± 0,89) років, 58 (80,5 %) дівчат і 14 (19,5 %) хлопців. Група контролю – 46 здорових підлітків, зіставні за віком (14,73 ± 0,32 року); 29 (63,1 %) дівчат і 17 (36,9 %) хлопців.

Клінічні діагнози встановили на підставі критеріїв, наведених у нормативних документах: наказі Міністерства охорони здоров'я України № 676 «Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «Ревматологія» від 12.10.2006 року; наказі Міністерства охорони здоров'я України № 832 «Про затвердження уніфікованого клінічного протоколу медичної допомоги дітям, хворим на ювенільний артрит» від 22.10.2012 року для встановлення діагнозу ЮІА. Користувалися діагностичними критеріями системного червоного вовчака (Systemic Lupus International Collaborating Clinics SLICC, 2012), рекомендаціями американської Колегії ревматологів (ACR) 1997 року.

Критерії залучення в дослідження – вік від 10 до 18 років; лікування базисними препаратами, тривалість якого становила не менше ніж 12 місяців; діагностований ідіопатичний артрит із суглобовою формою захворювання.

Критерії виключення – молодший вік, відсутність терапії або її тривалість менше ніж 1 рік, наявність інших захворювань суглобів (інфекційного, ендокринного чи деструктивного походження).

Усім хворим здійснили ультразвукове дослідження серця (ЕхоКГ) на апараті LOGIO V2 General Electric (США), датчиком 3Sc-RS в М- і В-режимах. ЕхоКГ виконували в стані спокою в горизонтальному положенні. Визначали фракцію викиду обох шлуночків (ФВпш, ФВлш), їхній ударний (УОпш, УОлш) і хвилинний (ХОКпш, ХОКлш) об'єми, частоту серцевих скорочень (ЧСС).

Для визначення толерантності до мінімального фізичного навантаження у підлітків із РЗ здійснили тест шестихвилинної ходьби; умови – в першій половині дня в коридорі стаціонарного відділення, довжина якого становила 58,6 метра. Для кожного пацієнта тест проводили один раз. Перед тестом діти були у стані спокою протягом 3 хвилин. Обмежень щодо харчування та шкідливих звичок (куріння, алкоголь, вживання наркотичних засобів) в обстежених не було. Тест відбувався в індивідуальному максимально швидкому темпі (уникаючи появи больових відчуттів, задишки, м'язової втоми або важкості в ногах, запаморочення, слабкості), що забезпечує проходження пацієнтом максимальної дистанції протягом 6 хвилин. Пройдену дистанцію вимірювали в метрах.

Відстежували динаміку клінічного стану пацієнта перед початком і після проби, реєструючи ЧСС, артеріальний тиск (АТ), а ппісля завершення тесту розраховували відсоток приросту ЧСС при мінімальному фізичному навантаженні (% приросту ЧСС). ЧСС підраховували в положенні сидячи протягом 15 секунд, використовуючи секундомір. АТ також вимірювали в положенні сидячи з манжеткою на лівій верхній кінцівці за методом Короткова, застосували апарат Microlife AG1-20. Після проби підраховували ЧСС і вимірювали АТ протягом першої хвилини відновлювального періоду [6,7,11].

Індекс Алговера (ІА) розраховували до та після ТШХ за формулою: ІА = ЧСС / САТ, де ЧСС – частота серцевих скорочень (кількість ударів за хвилину), САТ – систолічний артеріальний тиск (мм рт. ст.). ІА – головний прогностичний показник кровообігу, в нормі становить 0,5–0,7. Підвищення показника вказує на збільшення систолічного викиду, зниження – на виникнення дефіциту кровопостачання [8,10].

Статистично результати опрацювали за допомогою пакета прикладних програм SPSS17 (ліцензія № 4a180844250981ae3dae-s/nSPSS17). На першому етапі розрахували середню арифметичну величину

Таблиця 1. Показники систолічної функції серця та тесту шестихвилинної ходьби в пацієнтів із ревматичними захворюваннями порівняно з підлітками групи контролю, M ± m, Me (Q_{25}; Q_{75})

Показник, одиниці вимірювання	Пацієнти з РЗ, n = 72	Підлітки групи контроля, n = 46
ФВлш, %	66,89 ± 0,61 65,92 (63,30; 68,92)[1]	69,02 ± 0,78 68,50 (64,40; 72,30)
УОлш, мл/хв	52,35 ± 1,76 52,23 (43,75; 63,60)[2]	61,49 ± 2,41 59,32 (48,91; 72,50)
ХОКлш, л/хв	4,25 ± 0,32 3,86 (3,34;4,62)[1]	3,92 ± 0,19 3,71 (3,06; 4,37)
ФВпш, %	43,34 ± 1,70 45,06 (35,20; 49,04)[2]	58,51 ± 1,77 59,05 (53,35; 66,35)
УОпш, мл/хв	13,22 ±1,31 14,21 (9,48; 17,44)[2]	7,93 ± 0,47 7,67 (5,77, 9,50)
ХОКпш, л/хв	1,48 ± 0,10 1,05 (0,74; 1,34)[2]	0,51 ± 0,03 0,48 (0,39; 0,63)
ЧСС, уд./хв	78,34 ± 1,49 80,00 (68,50; 86,50)[2]	66,61 ± 1,65 65,00 (58,50; 73,00)
ІА до ТШХ	0,79 ± 0,02 0,77 (0,68; 0,87)[2]	0,69 ± 0,02 0,65 (0,59; 0,80)
ІА після ТШХ	0,99 ± 0,02 0,97 (0,88; 1,85)[2]	0,87 ± 0,03 0,85 (0,74; 0,97)
Відсоток приросту ЧСС, %	32,78 ± 2,52 30,00 (20,45; 37,93)[2]	24,54 ± 2,02 25,49 (16,67; 32,14)
Дистанція, м	489,29 ± 7,52 485,83 (443,10; 524,70)[1]	516,61 ± 8,74 511,61 (480,00; 539,28)

[1]: p < 0,01; [2]: p < 0,001 – вірогідність відмінностей показників у підлітків із ревматичними захворюваннями та групи контролю.

Таблиця 2. Показники систолічної функції серця та тесту шестихвилинної ходьби у підлітків із системним червоним вовчаком і ювенільним ідіопатичним артритом, M ± m, Me(Q_{25}; Q_{75})

Показник, одиниці вимірювання	Підлітки зі СЧВ, n = 21	Підлітки з ЮІА, n = 51	Підлітки групи контроля, n = 46
ФВлш, %	68,07 ± 1,42 67,00 (3,30; 69,50)	66,86 ± 0,74 66,02 (63,66; 68,80)[3]	69,02 ± 0,78 68,50 (64,40;72,30)
УОлш, мл/хв	51,97 ± 2,86 52,00 (43,39; 61,40)	51,07 ± 2,60 51,50 (38,40; 63,66)[1]	61,49 ± 2,41 59,33 (48,91, 72,50)
ХОКлш, л/хв	4,99 ± 1,05 3,98 (2,89; 4,76)	3,26 ± 0,17 3,17 (2,57; 3,67)[1,4]	3,92 ± 0,19 3,71 (3,06; 4,37)
ФВпш, %	47,52 ± 4,08 48,65 (41,60; 49,51)[1]	41,27 ± 2,42 42,61 (32,62; 49,13)[2]	58,51 ± 1,77 59,05 (53,35; 66,35)
УОпш, мл/хв	11,98 ± 2,83 13,72 (11,36; 15,31)[2]	10,92 ±1,64 9,99 (7,91; 16,33)[2]	7,93 ± 0,48 7,67 (5,77; 9,50)
ХОКпш, л/хв	1,02 ± 0,86 1,20 (0,86; 1,34)[2]	0,89 ± 0,13 0,92 (0,67; 1,19)[2]	0,51 ± 0,03 0,48 (0,39; 0,63)
ЧСС, уд./хв	81,29 ± 2,68 82,00 (74,00; 88,00)[2]	77,58 ± 2,11 80,00 (68,00; 86,00)[2]	66,61 ± 1,65 65,00 (58,50; 73,00)
ІА до ТШХ	0,76 ± 0,04 0,77 (0,64; 0,84)[3]	0,80 ± 0,02 0,78 (0,70; 0,86)[2]	0,69 ± 0,02 0,65 (0,59; 0,80)
ІА після ТШХ	0,99 ± 0,03 0,96 (0,89; 1,11)[1]	0,99 ± 0,03 0,99 (0,87; 1,08)[2]	0,87 ± 0,03 0,85 (0,74; 0,97)
Відсоток приросту ЧСС, %	36,68 ± 4,02 33,30 (25,00; 47,00)[2]	33,20 ± 3,34 28,25 (17,62; 41,17)[3]	24,54 ± 2,02 25,49 (16,67; 32,14)
Дистанція, м	476,08 ± 11,56, 480,98 (422,68; 495,55)[1]	492,64 ± 8,79 485,83 (451,82; 524,70)[1]	516,61 ± 8,74 511,61 (480,98; 539,28)

[1]: p < 0,01, [2]: p < 0,001, [3]: p < 0,05 – вірогідність відмінностей показників у підлітків із ревматичними захворюваннями та групи контролю; [4]: p < 0,01 – вірогідність відмінностей показників у дітей із системним червоним вовчаком порівняно з пацієнтами з ювенільним ідіопатичним артритом.

та її стандартну помилку, медіану; визначили верхній і нижній квартилі для всіх показників. Показники порівняли з відповідними даними підлітків групи контролю. На другому етапі розрахували показники для хворих на ЮІА і СЧВ окремо, порівняли з відповідними параметрами групи контролю, а також між групами хворих. На останньому етапі оцінили параметри діяльності серця підлітків із РЗ, ФВпш яких знаходилась у межах нижнього квартиля. Розрахували середню арифметичну величину, стандартну помилку, медіану, мінімальне та максимальне значення кожного показника. Порівняли з відповідними параметрами підлітків із РЗ, ФВпш яких знаходилась у межах верхнього квартиля. Розбіжності між середніми при нормальному розподілі показників оцінювали параметричними (критерій t Стьюдента, кутового перетворення Фішера) методами; при відхиленні від закону нормального розподілу – непараметричними (Вілкоксона, Манна–Вітні) методами математичної статистики.

Результати

На першому етапі дослідження проаналізували основні показники серця (за даними УЗД) і результати ТШХ дітей із РЗ порівняно з показниками підлітків групи контролю (*табл. 1*).

За даними, що наведені в *таблиці 1*, у підлітків із РЗ відбувається вірогідне зниження ФВпш на тлі істотного підвищення УОпш та його ХОК, що супроводжується вищими значеннями ЧСС.

Більшість (89 %) пацієнтів ані перед тестом, ані після його завершення не мали скарг, 11 % осіб скаржилися на незначний біль у суглобах, але дали згоду на участь. Тест у повному обсязі пройшли всі підлітки. Після тесту в 11 % обстежених зберігалися болі в суглобах, 11 % пацієнтів скаржилися на задишку, 7,5 % – на втому.

Дистанція, що пройдена пацієнтами із РЗ під час ТШХ, вірогідно коротша; у цих хворих виявили вірогідно більший приріст ЧСС та індекс Алговера до та після тесту (*табл. 1*).

На другому етапі порівняли показники систолічної функції серця та результати ТШХ окремо хворих на СЧВ та ЮІА з показниками підлітків групи контролю (*табл. 2*).

У пацієнтів з ЮІА визначили вірогідно нижчу ФВ і лівого, і правого шлуночків. Це супроводжувалось вірогідно вищими значеннями ЧСС і зниженням УОлш, його ХОК; УО та ХОК правого шлуночка вірогідно вищі порівняно з групою контролю (*табл. 2*).

У хворих на СЧВ показники ФВлш, його УО та ХОК не відрізнялися від відповідних показників групи контролю. ФВпш у цих пацієнтів вірогідно нижча, а УОпш і ХОКпш вірогідно вищі (*табл. 2*).

За результатами ТШХ, дистанція була вірогідно меншою в підлітків як із СЧВ, так і з ЮІА порівняно з групою контролю, а відсоток приросту ЧСС після тесту був більшим (*табл. 2*). Індекс Алговера вірогідно вищий у хворих на ЮІА та СЧВ до ТШХ, істотно підвищувався після його завершення.

Порівнявши показники систолічної функції серця пацієнтів із ЮІА та хворих на СЧВ, виявили: вірогідно нижчим був лише рівень ХОКлш, інші показники не відрізнялися (*табл. 2*).

Дистанція, подолана за 6 хвилин, і приріст ЧСС у відповідь на навантаження у хворих на ЮІА також не відрізнялися від показників пацієнтів із СЧВ (*табл. 2*).

В 11 пацієнтів із РЗ показники ФВпш знаходилися в межах нижнього квартиля (Q_{25}). У цю групу ввійшли

4 хворих на СЧВ і 7 пацієнтів із ЮІА (10 дівчат і 1 хлопець). У групу порівняння включили 12 осіб: 5 хворих на СЧВ, 7 пацієнтів із ЮІА, ФВпш яких знаходилась у межах верхнього квартиля (*табл. 3*).

У підлітків із низькою ФВпш, крім вірогідно нижчого цього показника, встановили вірогідне зниження УОпш і його ХОК на тлі достовірно нижчої ЧСС, але ІА після ТШХ вірогідно вищий (*табл. 3*).

Обговорення

На рівень смертності в популяції хворих на РЗ суттєво впливає передусім патологія ССС. За даними наукової літератури, ризик розвитку хронічної серцевої недостатності в пацієнтів із РЗ в 1,7 раза вищий, ніж у загальній популяції [12–14]. Хронічне автоімунне запалення – один із провідних факторів ризику виникнення серцево-судинних порушень при РЗ, оскільки має прямий токсичний вплив на кардіоміоцити, мікросудинне русло, екстрацелюлярний матрикс, прискорює ремоделювання міокарда та спричиняє розвиток його ішемії. Застосування у цих хворих доволі агресивних методів лікування для досягнення неактивного стану (ремісії) позитивно впливає ССС і дає змогу запобігти розвитку ендотеліальної дисфункції та прогресуванню атеротромбозу [15–17].

Скринінговий метод оцінювання функціонального стану міокарда – ехокардіографія, під час якої вимірюють фракцію викиду, ударний і хвилинний об'єми крові. Найчастіше в рутинній практиці досліджують стан лівого шлуночка серця, а правий залишається не оціненим, хоча останнім часом підтверджена його важлива роль у прогнозуванні стабільного функціонування ССС [4,18,19]. У багатьох дослідженнях у дорослих із РЗ виявили зниження функції лівого шлуночка серця та розвиток субклінічної серцевої недостатності, особливо в пацієнтів із персистенцією навіть субклінічної активності запального процесу, або у хворих, які взагалі не отримували терапію [18,19].

Серцева недостатність на ранніх етапах не має виразних клінічних проявів, тому її найчастіше не діагностують. Для СН характерне зниження толерантності до мінімального фізичного навантаження. Тому для ранньої діагностики широко використовують тест шестихвилинної ходьби, який дає змогу оцінити толерантність організму до мінімального фізичного навантаження [4,7].

Для оцінювання функціонального стану системи кровообігу застосовують також індекс Алговера. Вперше його використали в медицині екстремальних станів для визначення ступеня шоку [8]. Пізніше цей індекс почали застосовувати під час оцінювання адаптаційних можливостей ССС у спортсменів і людей похилого віку з ортопедичною патологією [11]. Його підвищення свідчить про збільшення серцевого викиду в спортсменів та адекватну реакцію на фізичне навантаження. У людей із хронічними захворюваннями підвищення цього індексу вказує на активацію систем нейрогуморальної регуляції в підтримці функціонування системи кровообігу. В разі прогресування СН індекс Алговера поступово знижується, а якщо є клінічні ознаки, набуває негативного значення [10,11].

Таблиця 3. Показники систолічної функції серця та тесту шестихвилинної ходьби у підлітків із ревматичними захворюваннями та фракцією викиду правого шлуночка в межах нижнього квартиля порівняно з хворими з фракцією викиду правого шлуночка в межах верхнього квартиля, M ± m, Me (min; max)

Показник, одиниці вимірювання	Підлітки з РЗ і ФВпш у межах нижнього квартиля, n = 11	Підлітки з РЗ і ФВпш у межах верхнього квартиля, n = 12
ФВлш, %	66,19 ± 1,25 66,46 (59,40; 71,62)	64,05 ± 0,78 63,85 (60,20; 68,40)
УОлш, мл/хв	55,42 ± 4,14 52,60 (28,30; 78,91)	52,97 ± 2,90 52,75 (30,02; 72,30)
ХОКлш, л/хв	4,31 ± 0,95 4,08 (2,86; 5,76)	4,22 ± 0,35 4,27 (2,48; 7,37)
ФВпш, %	30,46 ± 0,95 30,15 (25,18; 35,2)[1]	54,72 ± 1,96 52,75 (49,04; 73,08)
УОпш, мл/хв	9,45 ±2,29 9,70 (4,56; 16,97)[2]	15,63 ± 1,97 14,80 (7,91; 30,39)
ХОКпш, л/хв	0,73 ± 0,17 0,75 (0,36; 1,34)[2]	1,34 ± 0,20 1,25 (0,67; 3,10)
ЧСС, уд./хв	78,09 ± 2,87 78,00 (62,00; 101,00)[2]	84,17 ± 2,55 83,00 (68,00; 102,00)
ІА до ТШХ	0,82 ± 0,04 0,79 (0,68; 1,16)	0,77 ± 0,06 0,77 (0,54; 1,08)
ІА після ТШХ	1,13 ± 0,09 1,12 (0,75; 1,53)[2]	1,01 ± 0,05 1,05 (0,77; 1,19)
Відсоток приросту ЧСС, %	42,90 ± 9,18 32,00 (13,89; 104,55)	45,79 ± 9,07 32,14 (10,00; 93,75)
Дистанція, м	489,00 ± 22,85 485,83 (408,10; 626,74)	489,45 ± 17,91 480,98 (422,68; 597,58)

[1]: $p < 0,001$; [2]: $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей показників у пацієнтів із низькою ФВпш порівняно з хворими на ревматичні захворювання з нормальною ФВпш.

У нашому дослідженні встановили: в дітей із РЗ відбувається передусім зниження ФВпш при збереженні ФВлш, особливо виражені ці зміни в пацієнтів з ЮІА. При зниженні ФВпш його УО та ХОК залишаються доволі високими на тлі підвищення ЧСС внаслідок активації нейрогуморальних систем (симпато-адреналової, ренін-ангіотензин-альдостеронової).

Підлітки із СЧВ, за результатами ТШХ, порівняно з контрольною групою подолали найменшу дистанцію, але приріст ЧСС у відповідь на фізичне навантаження у них вірогідно вищий. Це свідчить про істотне напруження систем регуляції в забезпеченні адекватності кровообігу (ЦНС, гормональна регуляція).

У результаті детального аналізу групи хворих із суттєвим зниженням ФВпш (Me = 30,15 %) встановили найнижчі значення УОпш та ХОКпш, відсутність тахікардії; це може вказувати на зовсім інший рівень функціонування ССС і систем регуляції кровообігу. Про це свідчить дистанція, що пройдена під час ТШХ і приріст ЧСС, які вірогідно не відрізнялися від відповідних показників пацієнтів групи порівняння; індекс Алговера після тесту був найвищим (Me = 1,12, $p < 0,05$ проти Me = 1,05 групи порівняння).

Отже, в дітей із РЗ на тлі збереженої систолічної функції лівого шлуночка спостерігали істотне зниження систолічної функції правого шлуночка з підвищенням його ударного та хвилинного об'ємів, особливо в пацієнтів з ЮІА. Адаптивні можливості серцево-судинної системи цих підлітків залишаються майже на рівні контрольної групи внаслідок напруження систем регуляції. У разі зниження фракції викиду правого шлуночка, що прогресує, його ударний і хвилинний об'єми також вірогідно знижуються та не супроводжуються тахікардією,

а це свідчить про інші шляхи компенсації системи кровообігу в цих пацієнтів.

Висновки

1. У підлітків із ревматичними захворюваннями (ювенільний ідіопатичний артрит і системний червоний вовчак) на тлі збереження систолічної функції лівого шлуночка спостерігають зниження систолічної функції правого шлуночка серця, збільшення УОпш і ХОКпш на тлі підвищення частоти серцевих скорочень.

2. Толерантність до фізичного навантаження у підлітків із ревматичними захворюваннями зберігається в межах нормальних значень внаслідок суттєвого підвищення активності систем регуляції. Це підтверджено тестом шестихвилинної ходьби і високими значеннями індексу Алговера після навантаження.

3. При зниженні систолічної функції правого шлуночка, що прогресує, виявили зниження його ударного та хвилинного об'ємів; це може вказувати на участь інших систем регуляції в адекватній підтримці системи кровообігу.

Перспективи подальших досліджень: дослідження пацієнтів в динаміці для визначення рівня толерантності до мінімального фізичного навантаження залежно від тривалості терапії.

Фінансування
Робота виконана в рамках НДР ДУ «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків Національної академії медичних наук України»: «Прогнозування розвитку стійких пошкоджень систем і органів у дітей із ревматичними захворюваннями (системний червоний вовчак і ювенільний ревматоїдний артрит)», № держреєстрації 0119U100061.

Конфлікт інтересів: відсутній.
Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 04.11.2021
Після доопрацювання / Revised: 14.12.2021
Прийнято до друку / Accepted: 13.01.2022

Відомості про авторів:
Головко Т. О., канд. мед. наук, доцент каф. педіатрії № 2, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна; старший науковий співробітник відділу ревматології та коморбідних станів, ДУ «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН України», м. Харків.
ORCID ID: 0000-0003-3815-7874
Шевченко Н. С., д-р мед. наук, зав. каф. педіатрії № 2, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна; провідний науковий співробітник відділу ревматології та коморбідних станів, ДУ «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН України», м. Харків.
ORCID ID: 0000-0003-4407-6050
Богмат Л. Ф., д-р мед. наук, професор, зав. відділу ревматології та коморбідних станів, ДУ «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН України», м. Харків; професор каф. педіатрії № 2, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Україна.
ORCID ID: 0000-0001-5144-3686
Ніконова В. В., канд. мед. наук, старший науковий співробітник відділу ревматології та коморбідних станів, ДУ «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН України», м. Харків.
ORCID ID: 0000-0001-8269-6176

Information about authors:
Holovko T. O., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pediatrics No. 2, V. N. Karazin Kharkiv National University; Senior Researcher of the Department of Rheumatology and Comorbid Conditions, State Institution "Institute for Children and Adolescents Health Care of the NAMS of Ukraine", Kharkiv.
Shevchenko N. S., MD, PhD, DSc, Head of the Department of Pediatrics No. 2, V. N. Karazin Kharkiv National University; Leading Researcher of the Department of Rheumatology and Comorbid Conditions, State Institution "Institute for Children and Adolescents Health Care of the NAMS of Ukraine", Kharkiv.
Bohmat L. F., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Rheumatology and Comorbid Conditions, State Institution "Institute for Children and Adolescents Health Care of the NAMS of Ukraine», Kharkiv, Professor of the Department of Pediatrics No. 2, V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine.
Nikonova V. V., MD, PhD, Senior Researcher of the Department of Rheumatology and Comorbid Conditions, State Institution "Institute for Children and Adolescents Health Care of the NAMS of Ukraine", Kharkiv.

Список літератури

[1] Development of heart failure in patients with rheumatoid arthritis: A Danish population-based study / B. B. Logstrup, T. Ellingsen, A. B. Pedersen et al. *European journal of clinical investigation*. 2018. Vol. 48, Iss. 5. e12915. https://doi.org/10.1111/eci.12915
[2] Anti-TNF modulation reduces myocardial inflammation and improves cardiovascular function in systemic rheumatic diseases / N. Ntusi, J. M. Francis, E. Sever et al. *International journal of cardiology*. 2018. Vol. 270. P. 253-259. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.06.099
[3] Biologics and cardiovascular events in inflammatory arthritis: a prospective national cohort study / J. L. Lee, P. Sinnathurai, R. Buchbinder et al. *Arthritis research & therapy*. 2018. Vol. 20, Iss. 1. P. 171. https://doi.org/10.1186/s13075-018-1669-x
[4] 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure / T. A. McDonagh, M. Metra, M. Adamo et al. *European heart journal*. 2021. Vol. 42, Iss. 36. P. 3599-3726. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab368
[5] Del Castillo S., Shaddy R. E., Kantor P. F. Update on pediatric heart failure. *Current opinion in pediatrics*. 2019. Vol. 31, Iss. 5. P. 598-603. https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000807
[6] The historical evolution of the six-minute walk test as a measure of functional exercise capacity: a narrative review / P. O. Ubuane, B. A. Animasahun, O. A. Ajiboye et al. *Journal of Xiangya Medicine*. 2018. Vol. 3. https://doi.org/10.21037/jxym.2018.11.01
[7] Kasović M., Štefan L., Petrić V. Normative data for the 6-min walk test in 11–14 year-olds: a population-based study. *BMC pulmonary medicine*. 2021. Vol. 21, Iss. 1. P. 297-303. https://doi.org/10.1186/s12890-021-01666-5
[8] Derivation and Validation of Shock Index as a parameter for Predicting Long-term Prognosis in Patients with Acute Coronary Syndrome / T. Yu, C. Tian, J. Song et al. *Scientific reports*. 2017. Vol. 7, Iss. 1. P. 1-7. https://doi.org/10.1038/s41598-017-12180-2
[9] Shock index in the emergency department: utility and limitations / E. Koch, S. Lovett, T. Nghiem et al. *Open access emergency medicine : OAEM*. 2019. Vol. 11. P. 179-199. https://doi.org/10.2147/OAEM.S178358
[10] Адаптаційні можливості серцево-судинної системи в дітей із ревматичними захворюваннями та коморбідними станами / Н. С. Шевченко, Л. Ф. Богмат, Т. О. Головко, М. В. Дем'яненко. *Патологія*. 2019. Т. 16, № 1. С. 99-105. https://doi.org/10.14739/2310-1237.2019.1.166395
[11] Six-Minute Walk Test: Recommendations and procedure / L. Gochicoa-Rangel, U. Mora-Romero, S. Guerrero-Zúñiga et al. *Neumologia y cirugia de torax*. 2019. Vol. 78, Iss. 2. P. 164-172. https://doi.org/10.35366/NTS192J
[12] Heart Failure Risk Associated With Rheumatoid Arthritis–Related Chronic Inflammation / M. J. Ahlers, B. D. Lowery, E. Farber-Eger et al. *Journal of the American Heart Association*. 2020. Vol. 9, Iss. 10. e014661. https://doi.org/10.1161/JAHA.119.014661
[13] Kotyla P. J. Bimodal Function of Anti-TNF Treatment: Shall We Be Concerned about Anti-TNF Treatment in Patients with Rheumatoid Arthritis and Heart Failure? *International journal of molecular sciences*. 2018. Vol. 19, Iss. 6. P. 1739. https://doi.org/10.3390/ijms19061739
[14] Prevalence and pattern of comorbidities in chronic rheumatic and musculoskeletal diseases: the COMORD study / N. Ziade, B. El Khoury, M. Zoghbi et al. *Scientific reports*. 2020. Vol. 10., Iss. 1. P. 7683. https://doi.org/10.1038/s41598-020-64732-8

[15] Cardiovascular effects of biological versus conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drug therapy in treatment-naïve, early rheumatoid arthritis / S. Plein, B. Erhayiem, G. Fent et al. *Annals of the rheumatic diseases*. 2020. Vol. 79, Iss. 11. P. 1414-1422. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-217653
[16] Liu Yu., Kaplan M. J. Cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus: an update. *Current opinion in rheumatology.* 2018. Vol. 30, Iss. 5. P. 441-448. https://doi.org/10.1097/bor.0000000000000528
[17] Comparative Risks of Cardiovascular Disease in Patients With Systemic Lupus Erythematosus, Diabetes Mellitus, and in General Medicaid Recipients / M. Barbhaiya, C. H. Feldman, S. K. Chen et al. *Arthritis care & research*. 2020. Vol. 72, Iss. 10. P. 1431-1439. https://doi.org/10.1002/acr.24328
[18] Cardiovascular magnetic resonance imaging pattern at the time of diagnosis of treatment naïve patients with connective tissue diseases / S. Mavrogeni, G. Markousis-Mavrogenis, L. Koutsogeorgopoulou et al. *International journal of cardiology*. 2017. Vol. 236. P. 151-156. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.01.104
[19] Left ventricular function at two-year follow-up in treatment-naive rheumatoid arthritis patients is associated with anti-cyclic citrullinated peptide antibody status: a cohort study / B. B. Logstrup, D. Masic, T. B. Laurbjerg et al. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2017. Vol. 46, Iss. 6. P. 432-440. https://doi.org/10.1080/03009742.2016.1249941

References

[1] Løgstrup, B. B., Ellingsen, T., Pedersen, A. B., Kjaersgaard, A., Bøtker, H. E., & Maeng, M. (2018). Development of heart failure in patients with rheumatoid arthritis: A Danish population-based study. *European journal of clinical investigation*, *48*(5), e12915. https://doi.org/10.1111/eci.12915
[2] Ntusi, N., Francis, J. M., Sever, E., Liu, A., Piechnik, S. K., Ferreira, V. M., Matthews, P. M., Robson, M. D., Wordsworth, P. B., Neubauer, S., & Karamitsos, T. D. (2018). Anti-TNF modulation reduces myocardial inflammation and improves cardiovascular function in systemic rheumatic diseases. *International journal of cardiology*, *270*, 253-259. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.06.099
[3] Lee, J. L., Sinnathurai, P., Buchbinder, R., Hill, C., Lassere, M., & March, L. (2018). Biologics and cardiovascular events in inflammatory arthritis: a prospective national cohort study. *Arthritis research & therapy*, *20*(1), 171. https://doi.org/10.1186/s13075-018-1669-x
[4] McDonagh, T. A., Metra, M., Adamo, M., Gardner, R. S., Baumbach, A., Böhm, M., Burri, H., Butler, J., Čelutkienė, J., Chioncel, O., Cleland, J., Coats, A., Crespo-Leiro, M. G., Farmakis, D., Gilard, M., Heymans, S., Hoes, A. W., Jaarsma, T., Jankowska, E. A., Lainscak, M., … ESC Scientific Document Group (2021). 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European heart journal*, *42*(36), 3599-3726. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab368
[5] Del Castillo, S., Shaddy, R. E., & Kantor, P. F. (2019). Update on pediatric heart failure. *Current opinion in pediatrics*, *31*(5), 598-603. https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000807
[6] Ubuane, P. O., Animasahun, B. A., Ajiboye, O. A., Kayode-Awe, M. O., Ajayi, O. A., & Njokanma, F. O. (2018). The historical evolution of the six-minute walk test as a measure of functional exercise capacity: a narrative review. *Journal of Xiangya Medicine*, *3*(0). https://doi.org/10.21037/jxym.2018.11.01
[7] Kasović, M., Štefan, L., & Petrić, V. (2021). Normative data for the 6-min walk test in 11-14 year-olds: a population-based study. *BMC pulmonary medicine*, *21*(1), 297. https://doi.org/10.1186/s12890-021-01666-5
[8] Yu, T., Tian, C., Song, J., He, D., Sun, Z., & Sun, Z. (2017). Derivation and Validation of Shock Index as a parameter for Predicting Long-term Prognosis in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Scientific reports*, *7*(1), 11929. https://doi.org/10.1038/s41598-017-12180-2
[9] Koch, E., Lovett, S., Nghiem, T., Riggs, R. A., & Rech, M. A. (2019). Shock index in the emergency department: utility and limitations. *Open access emergency medicine : OAEM*, *11*, 179-199. https://doi.org/10.2147/OAEM.S178358
[10] Shevchenko, N. S., Bohmat L. F., Holovko T. O., & Demianenko M. V. (2019). Adaptatsionnye vozmozhnosti serdechno-sosudistoi sistemy u detei s revmaticheskimi zabolevaniyami i komorbidnymi sostoyaniyami [Adaptive capabilities of the cardiovascular system in children with rheumatic diseases and comorbid conditions]. *Pathologia*, *16*(1), 99-105. [in Russian]. https://doi.org/10.14739/2310-1237.2019.1.166395
[11] Gochicoa-Rangel, L, Mora-Romero, U., Guerrero-Zúñiga, S., Silva-Cerón, M., Cid-Juárez, S., Velázquez-Uncal, M., Durán-Cuéllar, A., Salas-Escamilla, I., Mejía-Alfaro, R., & Torre-Bouscoulet, L. (2019). Six-Minute Walk Test: Recommendations and procedure. *Neumologia y cirugia de torax*, *78*(2), 164-172. https://doi.org/10.35366/NTS192J
[12] Ahlers, M. J., Lowery, B. D., Farber-Eger, E., Wang, T. J., Bradham, W., Ormseth, M. J., Chung, C. P., Stein, C. M., & Gupta, D. K. (2020). Heart Failure Risk Associated With Rheumatoid Arthritis-Related Chronic Inflammation. *Journal of the American Heart Association*, *9*(10), e014661. https://doi.org/10.1161/JAHA.119.014661
[13] Kotyla P. J. (2018). Bimodal Function of Anti-TNF Treatment: Shall We Be Concerned about Anti-TNF Treatment in Patients with Rheumatoid Arthritis and Heart Failure?. *International journal of molecular sciences*, *19*(6), 1739. https://doi.org/10.3390/ijms19061739
[14] Ziade, N., El Khoury, B., Zoghbi, M., Merheb, G., Abi Karam, G., Mroue', K., & Messaykeh, J. (2020). Prevalence and pattern of comorbidities in chronic rheumatic and musculoskeletal diseases: the COMORD study. *Scientific reports*, *10*(1), 7683. https://doi.org/10.1038/s41598-020-64732-8
[15] Plein, S., Erhayiem, B., Fent, G., Horton, S., Dumitru, R. B., Andrews, J., Greenwood, J. P., Emery, P., Hensor, E. M., Baxter, P., Pavitt, S., & Buch, M. H. (2020). Cardiovascular effects of biological versus conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drug therapy in treatment-naïve, early rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, *79*(11), 1414-1422. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-217653
[16] Liu, Y., & Kaplan, M. J. (2018). Cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus: an update. *Current opinion in rheumatology*, *30*(5), 441-448. https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000528
[17] Barbhaiya, M., Feldman, C. H., Chen, S. K., Guan, H., Fischer, M. A., Everett, B. M., & Costenbader, K. H. (2020). Comparative Risks of Cardiovascular Disease in Patients With Systemic Lupus Erythematosus, Diabetes Mellitus, and in General Medicaid Recipients. *Arthritis care & research*, *72*(10), 1431-1439. https://doi.org/10.1002/acr.24328
[18] Mavrogeni, S., Markousis-Mavrogenis, G., Koutsogeorgopoulou, L., Dimitroulas, T., Bratis, K., Kitas, G. D., Sfikakis, P., Tektonidou, M., Karabela, G., Stavropoulos, E., Katsifis, G., Boki, K. A., Kitsiou, A., Filaditaki, V., Gialafos, E., Plastiras, S., Vartela, V., & Kolovou, G. (2017). Cardiovascular magnetic resonance imaging pattern at the time of diagnosis of treatment naïve patients with connective tissue diseases. *International journal of cardiology*, *236*, 151-156. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.01.104
[19] Løgstrup, B. B., Masic, D., Laurbjerg, T. B., Blegvad, J., Herly, M., Kristensen, L. D., Urbonaviciene, G., Hedemann-Nielsen, A., & Ellingsen, T. (2017). Left ventricular function at two-year follow-up in treatment-naive rheumatoid arthritis patients is associated with anti-cyclic citrullinated peptide antibody status: a cohort study. *Scandinavian journal of rheumatology*, *46*(6), 432-440. https://doi.org/10.1080/03009742.2016.124994

UDC 616.37-074/-076:543.427.4
DOI: 10.14739/2310-1237.2022.1.254173

Optimization of endocrine pancreas fluorescence analysis using machine methods

T. V. Ivanenko *[B-E], **A. V. Abramov** [A,C-F]

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

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

Key words: fluorescence microscopy, digital image analysis system, pancreas.

Pathologia
2022; 19 (1), 24-31

***E-mail:**
ivanenkotv@i.ua

The study aims to establish the appropriate parameters of UV excitation intensity and permanent excitation time on the pancreatic islets photobleaching, the ratio of the intensity of the useful signal in the region of interest to the intensity of nonspecific background fluorescence.

Materials and methods. The pancreas of three adult Wistar rats was fixed in Bouin solution (20 hours) and poured into paraplast after standard histological processing. The study was carried out on paraffin sections of the pancreas. The islets' insulin and glucagon were determined by immunofluorescence method using monoclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology). The immunofluorescence reaction was studied using an AxioImager-M2 fluorescent microscope. AxioVision digital image analysis system was used for fluorescence imaging, and ImageJ 64-bit image analysis system was used for image quantification. 30 pancreatic islets with an area from 3000 μm^2 to 5000 μm^2 (8–13 % of the frame area) were analyzed.

Results. Measurements carried out at constant values of hormone concentration in endocrinocytes showed a different estimate of the average fluorescence intensity for insulin and glucagon, which depended on the intensity of UV radiation. As the intensity of UV radiation increased, the average fluorescence intensity in the region of interest for insulin and glucagon increased, but when the camera exposure was corrected, it became almost the same. Regardless of this, the intensity of nonspecific background fluorescence increased monotonically. The use of the ratio of the logarithms of the background fluorescence of the drug and the fluorescence of endocrinocytes in the calculations gives a stable estimate of the relative concentration of hormones, which does not depend on the intensity of the selected UV radiation regime, as well as on the duration of UV irradiation of the drug. This makes it possible to neutralize the effect of photodynamic discoloration of the preparation caused by continuous irradiation. Methods for machine selection of the region of interest by various algorithms of the ImageJ program lead to different estimates of its area, integral, and average fluorescence values. At the same time, the result closest to the "ideal" interactive method of highlighting the area of interest for insulin and glucagon was shown by Otsu's algorithm.

Conclusions. In immunofluorescent examination of the pancreas, a moderate UV radiation mode should be selected, exposure correction of the CCD camera before taking each frame, and the total time for examining the visual field of the sample should be limited to 1–2 minutes. To highlight the area of interest for insulin and glucagon in automatic analysis, it is recommended to use the Otsu algorithm. To obtain a quantitative estimate of the average fluorescence intensity in the region of interest, it is recommended to use the ratio of the logarithms of the background fluorescence of the drug and endocrinocytes in the calculations.

Ключові слова: флуоресцентна мікроскопія, система цифрового аналізу зображень, підшлункова залоза.

**Патологія. 2022.
Т. 19, № 1(54).
С. 24-31**

Оптимізація флуоресцентного дослідження ендокринної частини підшлункової залози з використанням методів машинного аналізу

Т. В. Іваненко, А. В. Абрамов

Мета роботи – встановити оптимальні параметри інтенсивності, тривалості безперервного УФ-випромінювання на фотодинамічне знебарвлення досліджуваних тканин підшлункової залози, а також на співвідношення інтенсивності корисного сигналу в зоні дослідження флуоресценції та інтенсивності неспецифічної флуоресценції фону.

Матеріали та методи. Підшлункову залозу трьох дорослих щурів лінії Wistar фіксували в розчині Буена (20 годин) і заливали в парапласт після стандартної гістологічної обробки. Дослідження здійснили на парафінових зрізах підшлункової залози, в яких імунофлуоресцентним методом визначали інсулін і глюкагон у панкреатичних острівцях за допомогою антитіл виробництва Santa Cruz Biotechnology. Реакцію імунофлуоресценції вивчали на мікроскопі AxioImager-M2. Для зйомки флуоресценції використали систему аналізу цифрових зображень AxioVision, а для кількісного аналізу зображення – систему аналізу зображень ImageJ. Проаналізували 30 панкреатичних острівців площею 3000–5000 мкм^2 (8–13 % площі кадра).

Результати. Вимірювання, здійснені при постійних величинах концентрації гормонів в ендокриноцитах, показали різну оцінку середньої інтенсивності флуоресценції для інсуліну та глюкагону, що залежала від інтенсивності УФ радіації. З посиленням дії УФ радіації середня інтенсивність флуоресценції для інсуліну та глюкагону збільшувалась, але внаслідок корекції експозиції камери ставала майже однаковою. Незалежно від цього інтенсивність неспецифічної флуоресценції фону монотонно зростала. Використання в розрахунках відношення логарифмів флуоресценції фону препарату та флуоресценції ендокриноцитів дає стійку оцінку відносної концентрації гормонів, що не залежить від інтенсивності обраного режиму УФ радіації, а також від тривалості УФ опромінення препарату. Це дає змогу нівелювати ефект фотодинамічного знебарвлення препарату, спричиненого безперервним УФ опроміненням. Методи машинного

виділення ділянки інтересу різними алгоритмами програми ImageJ дають різну оцінку її площі, інтегральної та середньої величини флуоресценції. Результат, наближений до «ідеального» інтерактивного способу виділення ділянки інтересу для інсуліну та глюкагону, показав метод сегментації Оцу.

Висновки. Під час імунофлуоресцентного дослідження підшлункової залози слід обирати помірний режим УФ радіації, корегувати експозицію CCD камери перед кожним кадром, а загальний час дослідження поля зору зразка обмежити 1–2 хвилинами. Для виділення ділянки дослідження інсуліну та глюкагону під час автоматичного аналізу рекомендовано застосовувати алгоритм Оцу. Для отримання кількісної оцінки середньої інтенсивності флуоресценції у сфері дослідження рекомендоване використання в розрахунках відношення логарифмів флуоресценції фону препарату та ендокриноцитів.

The analysis of optical signals in microscopy plays an important role in scientific research in biology and medicine and in the diagnosis of human diseases. Among the many modern optical microscopy techniques, immunofluorescence is a standard approach among researchers (microscopists). It is used to detect and assess expression levels and localization of cellular proteins and other antigens in cells, tissue, and extracellular matrix. The use of some fluorophores in microscopy makes it possible to obtain photoemission in different spectral ranges, and, therefore, can be used to identify various cellular proteins synthesized within the cell or for the differentiation of intracellular organelles. To obtain accurate information in fluorescence imaging of macromolecules, a thorough understanding of the functional properties of fluorophores, optical imaging systems, and the effects of light-fluorophore interaction is required. The principles of fluorescence microscopy and the current development of this technology can be found in the review by S. Dunst & P. Tomancak [1], and various systems for obtaining optical data and approaches to their machine analysis are analyzed in the review by J. Fang et al. [2]. However, there are many different reasons why fluorescence imaging is sometimes not good enough to get true data. Some of the most common factors that reduce the quality of fluorescence imaging, as well as ways to improve the quality of fluorescence images, are reviewed by B. Herman [3], and J. W. Lichtman & J.-A. Conchello [4].

In the present study, we will analyze the factors set by the microscopist and affecting the quality of fluorescence imaging: the level of UV excitation intensity, the duration of permanent UV radiation of the tissue during microscopy (permanent excitation time), the role of photodynamic bleaching on the intensity of the useful fluorescence signal in the region of interest (ROI) and non-specific background fluorescence (BG), and methods of machine-defined ROI. As an object for research, we chose a pancreatic islet (islet of Langerhans), which is characterized by the heterogeneity of the cell population in both humans and rodents, and therefore is interesting for the study of multifluorescence. The number of pancreatic islets in the pancreas, the assessment of the pool of beta- and alpha-cells, as well as the quantitative assessment of the insulin and glucagon stores in pancreatic endocrinocytes, has an important practical meaning for understanding the mechanisms of pancreas endocrine function regulation, studying the mechanisms of immunological autoaggression against the islets, and their destruction in T1D (type 1 diabetes), the formation of amyloid, fatty infiltration, fibrosis, and inflammation (insulitis) in type 2 diabetes mellitus, as well as to assess the functional reserve of endocrinocytes for the creation of a bank of pancreatic organs and for their subsequent transplantation [5,6].

Aim

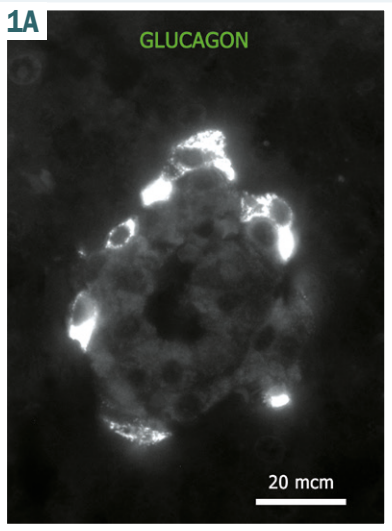
The study aims to establish the appropriate parameters of UV excitation intensity and permanent excitation time on the pancreatic islets photobleaching, the ratio of the intensity of the useful signal in the region of interest to the intensity of nonspecific background fluorescence.

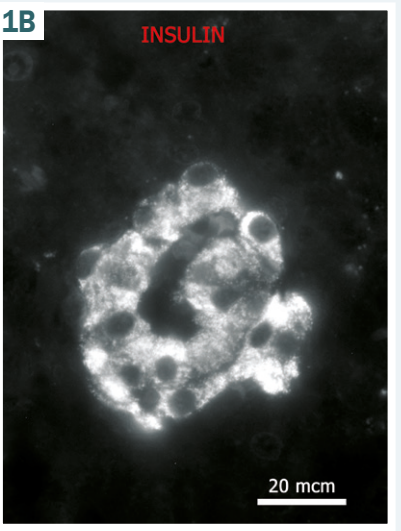
Materials and methods

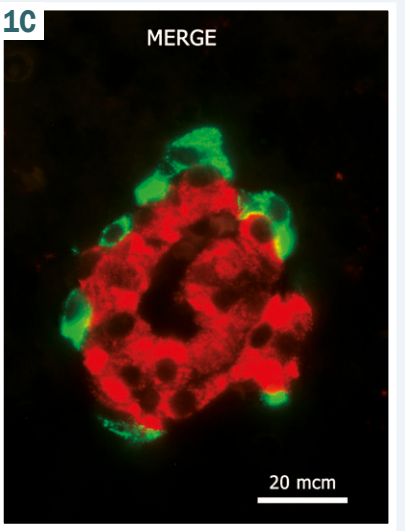
The pancreas of three adult Wistar rats was fixed in Bouin solution (20 hours) and poured into paraplast (McCormick, USA) after standard histological processing. Serial histological slices of the pancreas 5 μm thick were mounted on Superfrost™ Plus Microscope Slides (Menzel-Glaser, Germany), dewaxed, and unmasked in a citrate buffer solution (pH = 9.0) in the PT-module (Thermo Scientific, USA). Insulin and glucagon in pancreatic islets were detected by immunofluorescence techniques using antibodies produced by Santa Cruz Biotechnology (USA). Insulin Antibody (2D11-H5) AlexaFluor® 546-conjugated with Glucagon Antibody (K79bB10) FITC-conjugated were incubated in dilution 1:200 (wet chamber, T = +4 °C, 24 hours). Then slices were rinsed three times for 5 min in phosphate buffer solution (pH = 7.4) and enclosed in UltraCruz™ Mounting Medium with DAPI (Santa Cruz Biotechnology, USA) with cover glass (Menzel-Glaser, Germany).

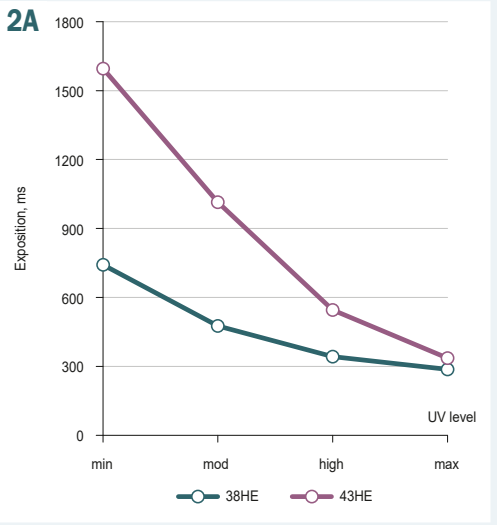
Immunofluorescence was studied using the AxioImager-M2 fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany) with mercury vapor lamp UV-light source HXP-120C (Leistungselektronik JENA GmbH, Germany), objective EC Plan-Neofluar 40x/1.3 Oil (Carl Zeiss, Germany), and the 14-bit digital monochrome camera AxioCam-HRm3 (Carl Zeiss, Germany). The high-emission 38HE filter (excitation 470/40 nm, beamsplitter 495 nm, emission 525/50 nm; Carl Zeiss, Germany) were used for glucagon detection, and the high-emission 43HE filter (excitation 550/25 nm, beamsplitter 570 nm, emission 605/70 nm; Carl Zeiss, Germany) were used for insulin detection. For fluorescent microscopy, we used Carl Zeiss™ Immersol™ immersion oil 518F (Fisher Scientific, Sweden). AxioVision Rel. 4.8.2 software (Carl Zeiss, Germany) was used for fluorescence frames shooting, and 64-bit image analysis system ImageJ Version 2.1.0/1.53c (an open-source under the GNU General Public License) was used for quantitative analysis of the immunofluorescence reaction.

We used grayscale images (1388 × 1040 pix) for quantitative analysis, on which the region of interest (ROI) corresponds to insulin or glucagon fluorescence, as well as the area of non-specific background fluores-









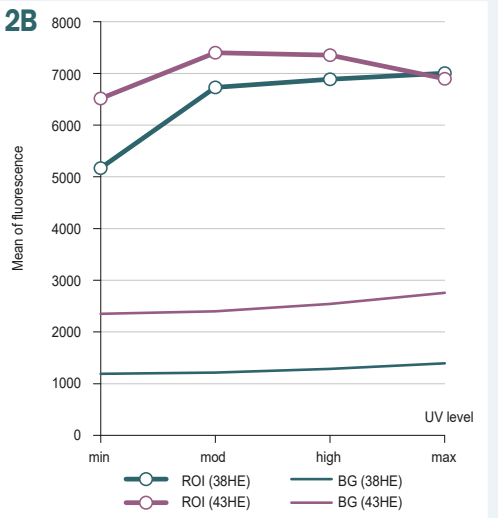


Fig. 1. A pancreatic islet (islet of Langerhans) of the adult Wistar rat.

Fig. 2. Influence of excitation intensity on the CCD camera exposure duration during shooting (**A**) and the mean of fluorescence intensity (**B**) in ROI and nonspecific BG fluorescence for FITC (filter set 38HE) and AlexaFluor®546 (filter set 43HE) fluorochromes.

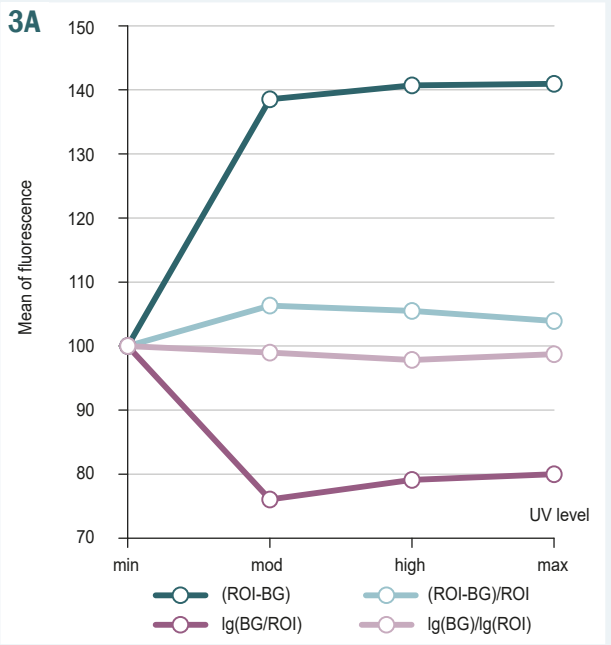
cence (BG) of the pancreatic slice, was selected by machine methods. Ten pancreatic islets from each animal (n = 30) with an area from 3000 to 5000 μm^2 (8–13 % of the frame area) were analyzed. Quantitative descriptors of fluorescence such as Total Area, Mean, Mode, Median, and Integrated density were measured using ImageJ software. The data are presented as average values of the measurement parameters of fluorescence in *Figs. 2–6* and *Table 1*.

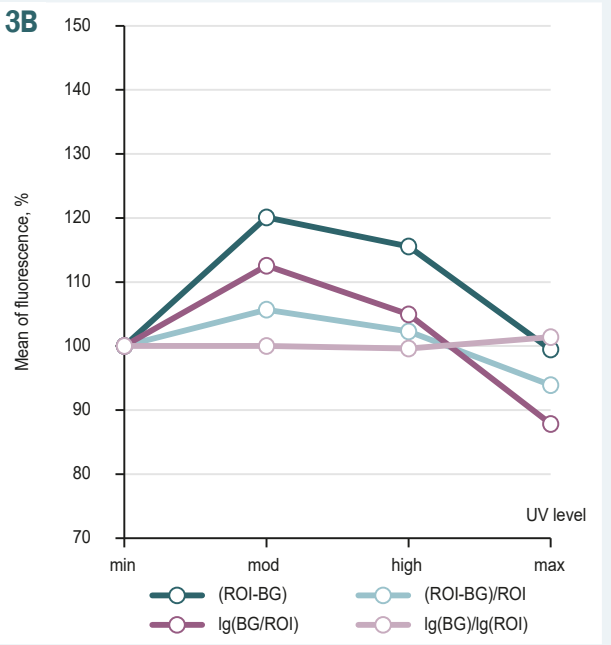
Results

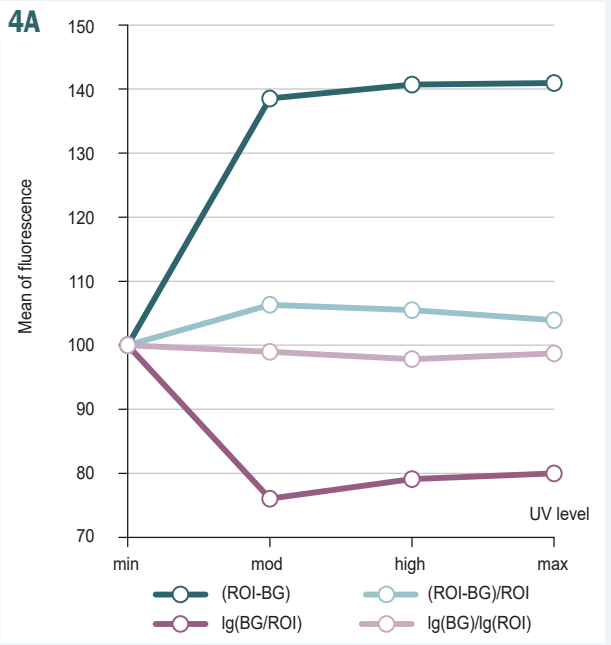
An example of a rat pancreatic islet is demonstrated in *Fig. 1*. We studied the effects of the intensity of UV radiation (excitation intensity), and the duration of radiation on the parameters of shooting a fluorescent image and on the quantitative characteristics of the fluorescence in the selected region of interest (ROI).

Excitation intensity influence. Modern digital CCD cameras have an auto-exposure mode for both light microscopy and fluorescence studies. For a better study of fluorescence, ultraviolet sources can adjust the mode of radiation. So, the HXP-120C UV source used by us allows using 4 modes, which visually differ in the intensity of fluorescence in the field of view, and which we conditionally called “minimum”, “moderate”, “high” and “maximum”. When choosing the mode of UV radiation intensity, the researcher must deal with two peculiarities of fluorescence microscopy: an increase of radiation intensity improves visualization in ROI but accelerates photodynamic bleaching, which affects the quantitative characteristics of fluorescence in ROI (*Fig. 2*).

The measurements were performed on the same pancreatic islet at constant values of hormones concentration (insulin and glucagon) in endocrinocytes. The obtained results showed different levels of average fluorescence intensity in ROI for insulin and glucagon. At the “min” mode of the excitation intensity, the frame exposure duration for FITC and AlexaFluor®546 fluorophores differed by more than 2 times. It is expected that as the UV radiation intensity increased, the camera exposure was shortened and became almost the same in the maximum mode for both fluorophores (*Fig. 2A*). The value of the average fluorescence intensity in ROI for insulin (filter 43HE) in the “minimum” mode of UV







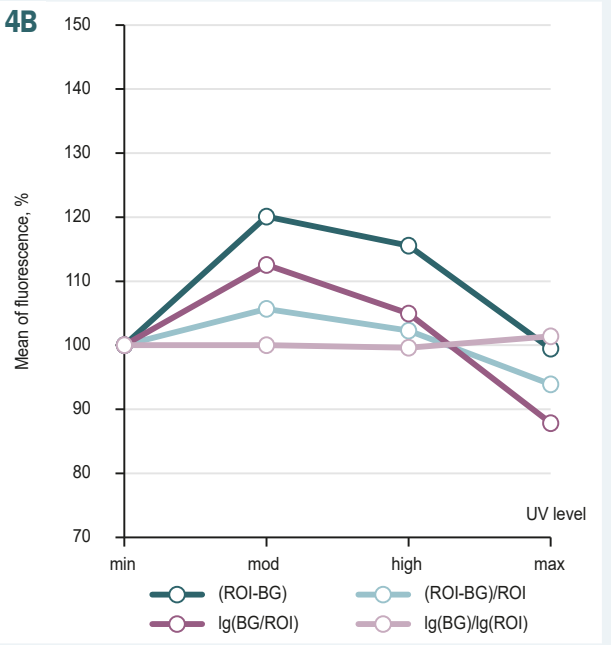


Fig. 3. Estimation of the average fluorescence intensity in ROI and nonspecific BG fluorescence for FITC (A) and AlexaFluor®546 (B) fluorophores at different excitation intensities.

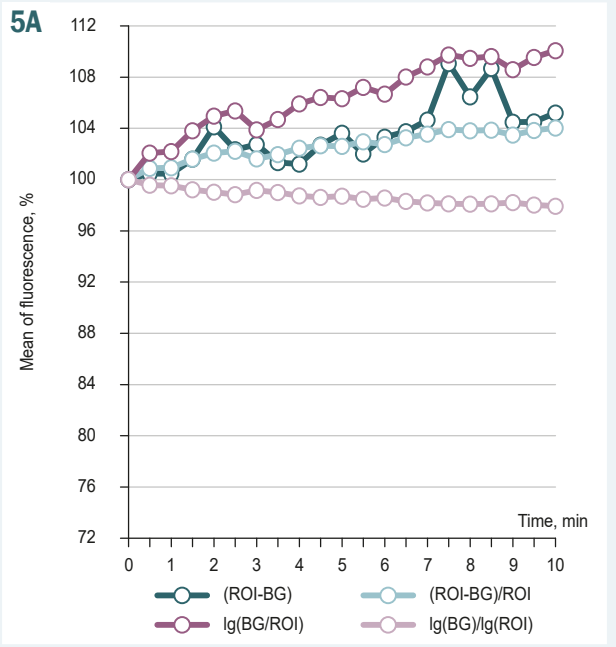
Fig. 4. Effect of permanent excitation time on CCD exposure time (A) and the average fluorescence intensity index (B) in ROI and nonspecific BG fluorescence for glucagon (FITC, filter set 38HE) and insulin (AlexaFluor®546, filter set 43HE).

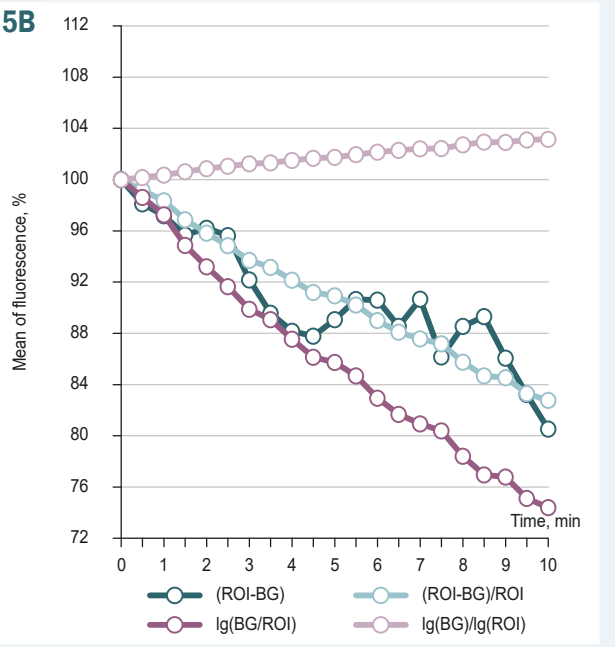
irradiation intensity was 26 % higher than for glucagon (filter 38HE), differed by 7–10 % in “moderate” and “high” modes, and was almost the same in “maximum” mode (*Fig. 2B*). At the same time, the intensity of nonspecific BG fluorescence increased predictably with increasing excitation intensity. Considering the fact that maximum parameters of average fluorescence intensity in ROI were obtained already at the moderate mode of excitation intensity, we consider this mode to be appropriate for use in practical fluorescence microscopy of the pancreas.

To estimate the average fluorescence intensity C_i in ROI, the following mathematical formulas were applied:

$$C_i = C_{ROI} - C_{BG} \quad (1);$$
$$C_i = (C_{ROI} - C_{BG}) / C_{ROI} \quad (2);$$
$$C_i = -lg\,(C_{BG} / C_{ROI}) \quad (3);$$
$$C_i = lg\,(C_{BG}) / lg\,(C_{ROI}) \quad (4).$$

where CROI is the average fluorescence intensity in ROI, and C_{BG} is the nonspecific BG fluorescence.





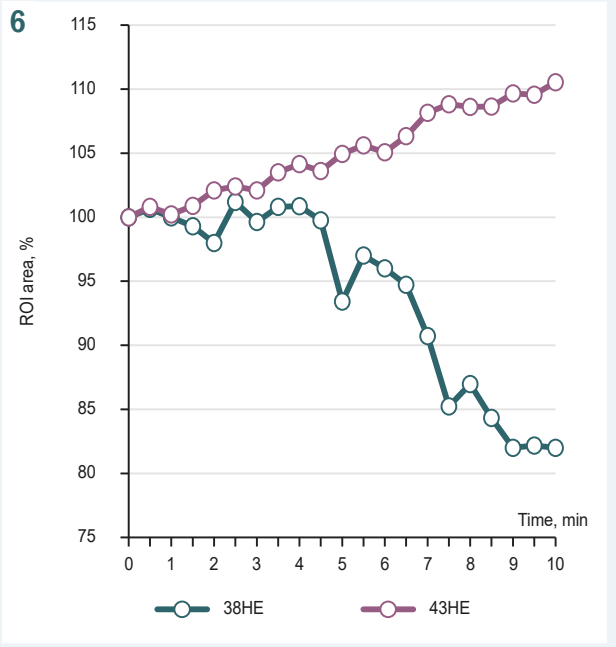


Fig. 5. Estimation of the average fluorescence intensity in ROI and nonspecific BG fluorescence for FITC, filter set 38HE (glucagon) **(5A)** and AlexaFluor®546, filter set 43HE (insulin) **(5B)** luorophores under continuous UV irradiation.

Fig. 6. Effect of permanent excitation time on the area of ROI for glucagon (FITC, filter set 38HE) and insulin (AlexaFluor®546, filter set 43HE). Otsu thresholding method was used to determine the boundaries of ROI.

The results shown in *Fig. 3* demonstrate that the ratio of the logarithms of the BG fluorescence of the pancreatic slice and the fluorescence of endocrinocytes (ROI) (formula 4) used in the calculation gives a stable estimate, independent of the intensity of the chosen excitation intensity mode.

Permanent excitation time influence. In immunofluorescence microscopy, the researcher constantly faces the effect of photodynamic bleaching of histological preparations with increasing duration of permanent excitation time, as well as with the impossibility of long-term storage of histological sections for analysis. To correct the effect of photobleaching and to adjust the fluorescent image in practice, the software for the microscopic camera uses automatic correction of exposure time and white balance setting. *Fig. 4* shows the analysis of the effect of the time of permanent UV radiation on camera exposure (Exposure Time) before imaging the same pancreatic islet. Exposure of the camera was adjusted by AxioVision program every 30 sec using the built-in algorithm for the emission length of each fluorophore separately, and UV radiation intensity was set to moderate mode.

As it can be seen from *Fig. 4*, the fluorescence of glucagon (FITC fluorophore) is stable and requires virtually no correction (-0.75 ± 1.60 ms every 30 sec), whereas insulin fluorescence (AlexaFluor®546 fluorophore) intensity decreases with prolonged excitation time and requires a correction with increased exposure (+79.35 ± 14.59 ms every 30 sec). Continuous 10-min UV irradiation slightly changes the average fluorescence intensity for glucagon

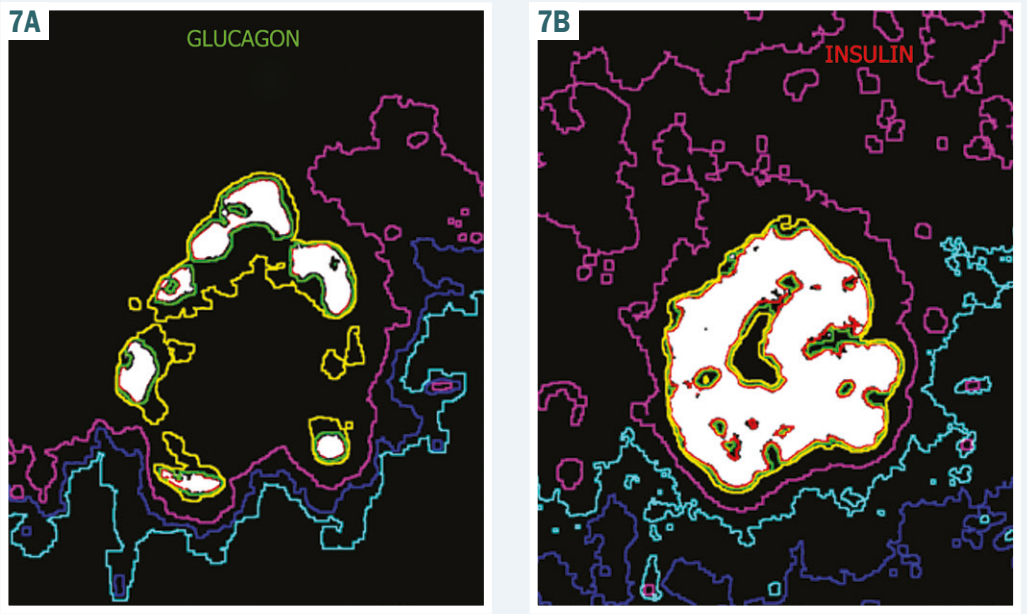


Fig. 7. Interactive selection of ROI (white), and ROI contours resulting from thresholding methods: Otsu (red), "Moments" (green), "MinError" (blue), "Huang" (cyan), "Mean" (magenta), "Li" (yellow).

Table 1. Thresholding method of the machine ROI selection and calculated area of ROI, mean and integrated fluorescence in ROI

Thresholding method of ROI selection	Glucagon (FITC, filter set 38HE)			Insulin (AlexaFluor546, filter set 43HE)		
	Area of ROI, %	Fluorescence		Area of ROI, %	Fluorescence	
		Mean, %	Integrated, %		Mean, %	Integrated, %
Interactive selection	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Default	3653.83	26.87	981.75	**100.99**	**99.62**	**100.61**
Huang	9621.43	21.52	2070.97	1329.15	38.21	507.82
Intermodes	24.47	153.17	37.48	138.91	87.73	121.86
IsoData	**101.72**	**101.55**	**103.30**	99.65	100.08	99.74
IJ_IsoData	6791.62	23.51	1596.92	**100.99**	**99.62**	**100.61**
Li	432.45	54.05	233.73	124.24	92.03	114.35
MaxEntropy	**99.07**	**101.75**	**100.80**	129.07	90.51	116.81
Mean	6552.12	23.70	1553.18	580.42	48.39	280.89
MinError	8145.39	22.52	1833.94	1850.33	34.47	637.80
Minimum	0.94	226.45	2.13	114.59	95.10	108.98
Moments	165.74	82.15	136.15	106.80	97.64	104.28
Otsu	**99.30**	**101.62**	**100.90**	**100.24**	**99.85**	**100.09**
Percentile	7093.69	23.30	1652.94	1045.55	40.86	427.25
RenyiEntropy	84.46	108.78	91.88	133.28	89.16	118.83
Shangbhad	1168.40	36.92	431.41	2.69	167.71	4.51
Triangle	402.34	19.71	79.28	138.91	87.73	121.86
Yen	64.00	119.82	76.69	131.64	89.69	118.07

and insulin in ROI (statistical coefficient of variation corresponding to 1.91 % and 2.74 %, respectively). Nevertheless, there was a significant increase in nonspecific BG fluorescence for AlexaFluor®546 fluorophore (by +31.8 %, coefficient of variation 8.72 %), and a moderate decrease in this index for FITC (by -15.7 %, coefficient of variation 3.85 %). These changes occur due to the photodynamic bleaching phenomenon as the duration of permanent UV radiation increases.

Considering the peculiarities of the changes in the fluorescence pattern under permanent UV radiation, the issue of a reliable assessment of the average fluorescence intensity and the integral fluorescence in ROI arises. Solving this problem, we can estimate the average concentration of the hormone in the endocrinocyte dependent on fluorescence intensity, and the total content of the hormone in the pancreatic islet obtained by analysis of the integral fluorescence. The use of the ratio of the logarithms of the BG fluorescence and ROI fluorescence (formula 4) gives a stable assessment independent both on the intensity of UV radiation and permanent excitation time and, thus, decreases the effect of photodynamic bleaching of the pancreatic slice (*Fig. 5*). At the same time, it should be borne in mind that formula 4 gives a minimal negative time trend when assessing the concentration of glucagon ($y = -0.0889x + 99.664$) and a slow positive trend when assessing the concentration of insulin ($y = 0.1583x + 99.998$).

It is important to note another important fact of the fluorescence pattern change, related to the affection

of ROI determined by standard methods of machine ROI selection under the permanent excitation time influence (*Fig. 6*). In this case, the fluorescent pattern remains stable for the correct selection of ROI only for the first minute of UV irradiation.

Machine segmentation methods. Different thresholding methods of machine segmentation lead to different estimations of ROI area, integral and average fluorescence value in ROI (*Table 1*). Using Otsu method allows to obtain result closest to the "perfect" interactive method of ROI selection for insulin and glucagon. Fine results were also obtained using segmentation methods "MaxEntropy" and "IsoData" for glucagon, and methods "IJ_IsoData" and "Default" for insulin.

Some results of the machine thresholding methods of ROI selection are shown in *Fig. 7*.

Discussion

Pancreatic islets (islets of Langerhans) occupy about 1–2 % of the total volume of the pancreas, and analysis of the heterogeneity of its endocrine structure is the key to estimating both the mass of islet endocrinocytes in healthy people and the islet beta-cell reserve in patients with type 1 and type 2 diabetes [5,7]. Immunofluorescence technique is applied since the 1990s to estimate the number of pancreatic islets [8] and analyze the pattern of their distribution in pancreatic tissue [9]. Methods of digital analysis of fluorescent images were applied to count the mass of beta-endocrinocytes in the intact pancreas [10], the number and quality of isolated islets [11], and pancreatic transplant material [12].

The main steps in the digital analysis of any images, including fluorescence images, are the following: 1) image acquisition and preprocessing; 2) segmentation; 3) extraction of features (quantitative descriptors) which make possible the further classification of the different cell types [13].

1) When recording fluorescence it should be taken into account that fluorescence intensity behaves according to Planck's law: **E** = **hv** = hc/λ, where E is energy, h is Planck's constant, v is light frequency, c equals light velocity, and λ equals light wavelength. Thus, energy is linearly proportional to the light frequency and inversely proportional to its wavelength. The quantum of energy (E) is greater for radiations of shorter wavelengths, such as UV radiation than for radiations of longer wavelength, such as IR radiation. Consequently, the quantum of energy emitted in the green part of the spectrum (FITC, filter set 38HE) is greater than the quantum emitted in the red spectral region (AlexaFluor®546, filter set 43HE). As a result of such energy difference of quanta, the effective exposure time required by the CCD camera during image capture for FITC fluorophore is less than for AlexaFluor®546 at all gradations of UV radiation intensity (*Fig. 2A*).

It should be considered that fluorophores are characterized by different fluorescence efficiency, or quantum yield (*QY*). A common way to compare the performance of fluorophores is to calculate the brightness index (*BI*): **BI** = **ε** × **QY** / *1000*, where ε is the extinction coefficient of the excitation irradiation. So, for the green fluorophore FITC $\varepsilon = 90 \times 10^3\ M^{-1}cm^{-1}$, $QY = 0.92$ and **BI** = 83, and for the red fluorophore AlexaFluor®546 $\varepsilon = 104 \times 10^3\ M^{-1}cm^{-1}$, **QY** = 0.96 and **BI** = 100 [14]. Despite the difference in the value of the brightness index of fluorophores, due to the software correction of the CCD exposure time, approximately the same value of the useful fluorescence intensity in ROI is achieved (*Fig. 4*).

2) Segmentation is aimed to isolate ROI of objects: pancreatic islets or single endocrinocytes. This step is crucial for the subsequent feature extraction procedure [González2018]. Morphological studies of the pancreas necessary for reconstruction its natural 3-D configuration are labor-intensive, requiring high-quality immunofluorescence microscopy technology and analysis of a large array of serial sections using 2-D microscopy with subsequent mounting [5]. This method needs machine analysis of a large array of fluorescence images using machine learning techniques [2], and hence the need to determine the rules by which ROI is allocated.

Nobuyuki Otsu in 1979 proposed the thresholding method of ROI selection [15], which later became one of the most used binarization methods for a grey-level image [13]. It is a clustering-based thresholding method and it refers to a bimodal image histogram that separates foreground and background pixels. Otsu's algorithm proposes to minimize the weighted sum of intraclass variations in the foreground and background pixels to establish an optimal threshold. The optimal threshold value separating the two classes is selected by applying intraclass variance minimization and interclass variance. The mathematics of another thresholding methods of ROI selection can be found in M. Sezgin & B. Sankur [16].

Our analysis demonstrated the excellent performance of the Otsu's algorithm for the allocation of insulin and glucagon fluorescence in pancreatic multifluorescence studies, and also demonstrated the best results in solving the problem of differentiation and counting of microbial cells [17].

To obtain a quantitative assessment of fluorescence in ROI, it is also necessary to determine the boundaries of nonspecific BG fluorescence region. BG segmentation of the entire area of the fluorescent image beyond the islet zone, or ROI, is not appropriate. In the case of small islets, artifacts can be found in BG region, that increases the average fluorescence in the BG region. We recommend allocation BG region by the result of subtracting ROI for insulin and glucagon from the zone of the oval circumscribed around the islet. As a result, the BG region will include nuclei of alpha- and beta-cells, other islet endocrinocytes (delta-, epsilon-, and PP-cells), as well as intraislet vessels.

3) In a fluorescent examination, the microscopist must spend some time searching for the required object of study. This increases the permanent excitation time on the tissue sample and causes photodynamic bleaching, due to the interaction of the fluorophore with light and oxygen. Photobleaching reduces the fluorescence signal and hence the signal-to-noise ratio of an immunofluorescent image. This directly reduces the intensity of the useful fluorescence signal and, conversely, increases the intensity of the nonspecific BG fluorescence in practice. Thus, photobleaching affects the definition of quantitative descriptors of the region of interest.

To improve ROI quantification, we analyzed various approaches and found that the formula $Ci = lg(C_{BG})/lg(C_{ROI})$ provides the most constant relative fluorescence in ROI independently of UV intensity, and also eliminates the photobleaching effect which occurs with an increase in the duration of UV radiation. In practical fluorescence microscopy, the C_i parameter can be related to the concentration of the studied biomolecule (hormone, receptor) in the object (cell, islet), and its multiplication by ROI area ($Conti = Ci \times AREA_{ROI}$) corresponds to the total content of biomarker in an object of investigation (cell, islet, pancreas). We believe that such an approach to assessing the concentration and content of the biomolecules can be useful when comparing different experiments, including those conducted at a time distance from each other.

Conclusions

1. We propose to select the moderate mode of UV radiation for pancreatic immunofluorescence investigation with the necessary adjustment of the CCD camera exposure time before acquisition of frame and to limit the permanent excitation time within 1–2 minutes.

2. Otsu's algorithm is recommended as an optimal threshold selection method for the machine segmentation of the region of interest for insulin and glucagon.

3. We established that the ratio of the logarithms of the background and the region of interest gives stable fluorescence quantification even in photobleaching associated with a high excitation intensity and prolonged excitation time.

Конфлікт інтересів: відсутній.
Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 05.12.2021
Після доопрацювання / Revised: 28.03.2022
Прийнято до друку / Accepted: 05.04.2022

Information about authors:
Ivanenko T. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Physiology with Course of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0001-6617-5178
Abramov A. V., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathological Physiology with Course of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0001-8520-2258

Відомості про авторів:
Іваненко Т. В., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медичний університет, Україна.
Абрамов А. В., д-р мед. наук, професор каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

References

[1] Dunst, S., & Tomancak, P. (2019). Imaging Flies by Fluorescence Microscopy: Principles, Technologies, and Applications. *Genetics*, *211*(1), 15-34. https://doi.org/10.1534/genetics.118.300227
[2] Fang, J., Swain, A., Unni, R., & Zheng, Y. (2021). Decoding Optical Data with Machine Learning. *Laser & photonics reviews*, *15*(2), 2000422. https://doi.org/10.1002/lpor.202000422
[3] Herman B. (2002). Fluorescence microscopy. *Current protocols in cell biology*, *Chapter 4*. https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0402s13
[4] Lichtman, J. W., & Conchello, J. A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature methods*, *2*(12), 910-919. https://doi.org/10.1038/nmeth817
[5] Campbell-Thompson, M., & Tang, S. C. (2021). Pancreas Optical Clearing and 3-D Microscopy in Health and Diabetes. *Frontiers in endocrinology*, *12*, 644826. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.644826
[6] De Boer, P., & Giepmans, B. N. (2021). State-of-the-art microscopy to understand islets of Langerhans: what to expect next?. *Immunology and cell biology*, *99*(5), 509-520. https://doi.org/10.1111/imcb.12450
[7] Dybala, M. P., Olehnik, S. K., Fowler, J. L., Golab, K., Millis, J. M., Golebiewska, J., Bachul, P., Witkowski, P., & Hara, M. (2019). Pancreatic beta cell/islet mass and body mass index. *Islets*, *11*(1), 1-9. https://doi.org/10.1080/19382014.2018.1557486
[8] Starlch, G. H., Zafiroya, M., Jablenska, R., Petkoy P., & Lardinois, C. K. (1991). A morphological and immunohistochemical investigation of endocrine pancreata from obese ob+/ob+ mice. *Acta Histochemical*, *90*(1), 93-101. https://doi.org/10.1016/S0065-1281(11)80167-4
[9] Schneider, B. S., Hastings, H. M., & Maytal, G. (1996). The Spatial Distribution of Pancreatic Islets Follows a Universal Power Law. *Proceedings the Royal Society (London)*, *263*, 129-131. https://doi.org/10.1098/rspb.1996.0020
[10] Parween, S., Kostromina, E., Nord, C., Eriksson, M., Lindström, P., & Ahlgren, U. (2016). Intra-islet lesions and lobular variations in β-cell mass expansion in ob/ob mice revealed by 3D imaging of intact pancreas. *Scientific reports*, *6*, 34885. https://doi.org/10.1038/srep34885
[11] Wang, L. J., & Kaufman, D. B. (2016). Digital Image Analysis to Assess Quantity and Morphological Quality of Isolated Pancreatic Islets. *Cell transplantation*, *25*(7), 1219-1225. https://doi.org/10.3727/096368915X689947
[12] Rickels, M. R., & Robertson, R. P. (2019). Pancreatic Islet Transplantation in Humans: Recent Progress and Future Directions. *Endocrine reviews*, *40*(2), 631-668. https://doi.org/10.1210/er.2018-00154
[13] González, R. C., & Woods, R. E. (2018). *Digital Image Processing* (4th ed.). *Pearson Education Limited*.
[14] McNamara, G., Difilippantonio, M., Ried, T., & Bieber, F. R. (2017). Microscopy and image analysis. *Current Protocols in Human Genetics*, *2017*, 4.4.1-4.4.89. https://doi.org/10.1002/cphg.42
[15] Otsu, N. (1979). A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, *9*(1) 62-69. https://doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076
[16] Sezgin, M., & Sankur, B. (2004). Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. *Journal of Electronic Imaging*, *13*(1), 146-165. https://doi.org/10.1117/1.1631315
[17] Nichele, L., Persichetti, V., Lucidi, M., & Cincotti, G. (2020). Quantitative evaluation of ImageJ thresholding algorithms for microbial cell counting. *OSA Continuum*, *3*(6), 1417-1427. https://doi.org/10.1364/OSAC.393971

UDC 612.017.11:616.832-004.2
DOI: 10.14739/2310-1237.2022.1.240436

Modulating effect of HERV-W ENV on peripheral blood monocytes in patients with different types of multiple sclerosis

O. M. Koliada[1,A,B,C,D], N. I. Vdovichenko[2,B,C,D],
T. I. Koliada*[2,A,C,E,F], O. V. Tupotilov[2,B,C,D]

[1]Kharkiv National Medical University, Ukraine, [2]Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv

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

Key words:
HERV-W, multiple sclerosis, cytokines, Toll-like receptors.

Pathologia
2022; 19 (1), 32-39

***E-mail:**
labimmun@gmail.com

The aim of the study was to determine the effect of the HERV-W ENV glycoprotein on the functional and metabolic characteristics of intact and stimulated peripheral blood monocytes, depending on the type of multiple sclerosis (MS), which can contribute to our understanding of their pathogenetic role in the development of neurological disorders and to design of novel therapeutic agents.

Materials and methods. To determine the reserve capacity index (Rci) of cytokine production, HERV-W ENV glycoprotein, *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) or ssRNA40/LyoVec were added to the monocyte-enriched cell suspension as agonists of TLR4 and TLR7/8. The study also included the evaluation of arginase activity in cell lysates of the monocyte fraction. The study involved 37 patients with relapsing-remitting type and 19 patients with progressive type of MS. The control group included 32 healthy individuals.

Results. In patients with MS of both groups, the reserve capacity of monocytes to produce IL-1β was lower than in healthy individuals, while the reserve capacity to produce TNF-α and IL-10 was almost twice as high as in the control group. This index for IL-1RA in monocytes obtained from the group with progressive MS and stimulated with HERV-W ENV was 2 times lower than the control; thus increased IL-1β values provoke chronic inflammation. The highest arginase activity in patients with relapsing-remitting MS was observed when monocytes were cultured with HERV-W ENV and LPS. In patients with progressive MS, during the cultivation of monocytes with LPS, arginase activity was significantly reduced relative to the control.

Conclusions. The results obtained indicate functional and metabolic changes in peripheral blood monocytes upon stimulation with TLR4 and TLR7/8, which may be associated with the disease course. In progressive MS, stimulation with HERV-W ENV leads to an imbalance of pro-inflammatory and regulatory cytokines, contributing to a chronic inflammation and, as a consequence, to a more severe course of the disease.

Ключові слова:
HERV-W, розсіяний склероз, цитокіни, Toll-подібні рецептори.

Патологія. 2022.
Т. 19, № 1(54).
С. 32-39

Модулювальна дія HERV-W ENV на моноцити периферичної крові в пацієнтів із різними типами перебігу розсіяного склерозу

О. М. Коляда, Н. І. Вдовіченко, Т. І. Коляда, О. В. Тупотілов

Мета роботи – визначити вплив глікопротеїну HERV-W ENV на функціональні та метаболічні особливості інтактних і стимульованих моноцитів периферичної крові залежно від типу перебігу розсіяного склерозу (РС), що є дуже важливим для розуміння їхньої патогенетичної ролі в розвитку неврологічних розладів і для розроблення нових терапевтичних засобів.

Матеріали та методи. Для визначення індексу резервної здатності продукції цитокінів у збагачену моноцитами суспензію клітин додавали глікопротеїн HERV-W ENV, ліпополісахарид *E. coli* або ssRNA40/LyoVec як агоністи TLR4 і TLR7/8. Оцінювали активність аргінази в лізатах клітин моноцитарної фракції.

У дослідженні взяли участь 37 пацієнтів із рецидивно-ремітуючим та 19 осіб із прогресуючим типом РС. Контрольна група – 32 здорові особи.

Результати. У пацієнтів із РС обох груп резервна здатність моноцитів до продукції IL-1β була меншою, ніж у здорових осіб, а резервна здатність до продукції TNF-α та IL-10 майже вдвічі вища за показник контрольної групи. Резервна здатність моноцитів до IL-1RA у групі пацієнтів із прогресуючим РС під дією HERV-W ENV вдвічі нижча за контроль, а отже підвищені показники IL-1β спричиняють хронічне запалення. Найбільшу активність аргінази в пацієнтів із рецидивно-ремітуючим РС спостерігали під час культивування моноцитів за наявності HERV-W ENV і LPS. У хворих на прогресуючий РС при культивуванні моноцитів з LPS аргіназна активність вірогідно знижена щодо контролю.

Висновки. Результати дослідження вказують на функціональні та метаболічні зміни моноцитів периферичної крові при стимуляції TLR4 і TLR7/8, що можуть бути асоційовані з типом клінічного перебігу захворювання. При прогресуючому перебігу РС індукція HERV-W ENV призводить до порушення балансу прозапальних і регуляторних цитокінів, спричиняючи хронічне запалення, а отже тяжчий перебіг захворювання.

Currently, there is a limited information on the effects of human endogenous retroviruses (HERVs) on the innate immune system, which represents the first line of defense against viruses and acts mainly through the detection of invariant microbial molecular patterns by pattern recognition receptors (PRRs) expressed on antigen-presenting cells (APCs), such as monocytes, macrophages and dendritic cells, as well as on other cell types. Examples of PRRs include transmembrane Toll-like receptors (TLRs), which can recognize various microbial products and act as a central element of the innate immune response to different classes of pathogens [1,2].

HERVs make up 8 % of the human genome and are derived from retroviral infections which integrated into mammalian germline cells millions of years ago [3]. HERVs are usually epigenetically silenced, but transactivation by exogenous viral infection, such as herpes virus type 6 (HHV-6), Epstein-Barr virus, or other viruses epidemiologically associated with multiple sclerosis (MS), can promote their (re)expression [4]. Studies have shown that human endogenous retrovirus type W (HERV-W) negatively affects the differentiation and remyelination of oligodendroglial progenitor cells through the pathogenic envelope protein HERV-W ENV. It has been shown that in multiple sclerosis, HERV-W ENV is present in myeloid cells associated with axons [5]. HERV-W ENV has been shown to induce a degenerative phenotype in microglial cells of patients with progressive multiple sclerosis, leading to the close spatial association of these cells with myelinated axons. Moreover, in HERV-W ENV-stimulated myelinated cocultures, microglia were found to structurally damage myelinated axons.

Elevated concentrations of HERV-W ENV protein, RNA, and/or DNA were detected in serum, cerebrospinal fluid, and brain in both clinically isolated syndrome (CIS) and clinically defined MS [6]. In addition, the HERV-W ENV presence was found to correlate with faster clinical progression of the disease and with an increased conversion into secondary progressive MS [7]. The HERV-W ENV glycoprotein inhibits myelin repair, hampering differentiation of oligodendroglial progenitor cells by inducing nitrosative stress through the activation of Toll-like receptor 4 (TLR4) [8]. In MS, monocytes are involved in both autoimmune inflammation and neurodegeneration, producing proinflammatory cytokines and molecules [9,10].

Therefore, HERV-W ENV may play a role in the pathogenesis of multiple sclerosis, so our study was aimed at analyzing the effect of this glycoprotein on the activity of monocytes at the functional level. We hypothesize that the expression of endogenous retrovirus HERV-W may contribute to inflammatory conditions, thereby fueling the autoimmune disorder.

Aim

To determine the effect of the HERV-W ENV glycoprotein on the functional and metabolic characteristics of intact and stimulated peripheral blood monocytes, depending on the type of multiple sclerosis, which can contribute to our understanding of their pathogenetic role in the development of neurological disorders and to design of novel therapeutic agents

Materials and methods

Immunological studies were conducted in the Laboratory of Clinical Immunology and Allergology of the State Institution “Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”. The study included 56 patients with a verified diagnosis of “multiple sclerosis” established in the Department of Neuroinfections and Multiple Sclerosis of the State Institution “Institute of Neurology, Psychiatry and Addiction Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”. All patients were divided into two groups depending on clinical course of the disease:

1. A group of patients with relapsing-remitting MS (RRMS), n = 37 (16 men and 21 women), the mean age of patients was 35.9 (32.3; 38.54) years; included patients with a disease duration of at least 12 months who had at least one MS exacerbation or one paramagnetic contrast center on MRI 12 months prior to randomization;

2. A group of patients with progressive MS (PMS), n = 19 (8 men and 11 women), the mean age was 39.4 (34.6; 43.7) years. In PMS, there is no remission after the onset due to the formation of a progression stage, although patients may experience periods of stabilization of the disease without relapse or new MRI activity.

For 6 months before the collection of biological material, patients had not received any therapy with the drugs that could modify the course of the disease.

The control group consisted of 32 healthy individuals (11 men and 21 women) with a mean age of 36.2 (33.4; 38.6) years. Criteria for inclusion in the control group were the absence of acute infections for at least 1 month before taking biological material, the absence of chronic inflammatory, allergic and autoimmune diseases.

The biological material was blood samples obtained from patients with multiple sclerosis and almost healthy people. All individuals who participated in the study gave their voluntary written consent to participate in the study. All participants gave their voluntary written consent to take part in the study.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Isolation was performed by the method of G. Rousselet, adapted to small blood volumes [11]. Separation was performed using double Percoll gradient (Sigma, USA). To prepare 100 mL of Percoll isoosmotic solution, 41.5 mL of Percoll with ρ = 1.131 g/cm^3 were dissolved in 48.5 mL of distilled water, 10 mL of 1.5 M NaCl solution were added and mixed thoroughly. To prepare 100 mL of Percoll hyperosmotic solution, 48.5 mL of Percoll with ρ = 1.131 g/cm^3 were dissolved in 41.5 mL of distilled water, 10 mL of 1.6 M NaCl solution was added and also mixed thoroughly.

Isolation cells of the monocyte fraction. To isolate cells of the monocyte fraction, 1 mL of the prepared mononuclear suspension was carefully layered on 3 mL of Percoll hyperosmotic solution and centrifuged at 580 g for 15 minutes at +20 °C. The cell layer was carefully removed from the phase interface using a plastic Pasteur pipette, resuspended in RPMI-1640 medium to 12 mL and centrifuged at 350 g for 7 minutes at +20 °C. After removal of the supernatant the procedure was repeated. After centrifugation the supernatant was removed, and the pellet was resuspended in 3 mL of complete RPMI

medium. The resulting suspension was adjusted to 5 × 10^6 cells/mL and divided by 0.1 mL. The number of monocytes in the suspension, determined with anti-CD14 PE-labeled monoclonal antibodies (EXBIO Praha, Czech Republic), was 75 % or more. Cell viability after trypan blue staining was at least 98 %.

TNF-α, IL-1β, IL-1RA, IL-10, IL-12p70, IL-12p40 concentrations in culture supernatants were determined using test systems "Alpha-TNF ELISA Best" A-8756, "Interleukin-1 beta ELISA Best" A-8766, "IL-1 receptor antagonist ELISA Best" A-8764, "Interleukin-10 ELISA Best" A-8774 manufactured by CJSC «Vector-Best-Ukraine» and test systems Human IL-12p70 Human ELISA Kit, IL-12 p40 Human ELISA Kit (Invivogen, USA).

For the series exposed to HERV-W ENV, LPS, and ssRNA40/LyoVec, the Reserve capacity index (Rci) of each cytokine production was calculated as the ratio of the cytokine content in the series with the exposure to the corresponding stimulator compared with that value in the series with intact cells (Rci_{HERV-W}, Rci_{RNA}, and Rci_{LPS}). For each experimental series, the ratio of IL-1RA and IL-1β production $(IL1RA/IL1β)_{INT}$, $(IL1RA/IL1β)_{HERV-W}$, $(IL1RA/IL1β)_{RNA}$, and $(IL1RA/IL1β)_{LPS}$ was also calculated.

Cultivation of cells of the monocyte fraction. Cells of the monocyte fraction were cultured in four parallel series: a) with the addition of ERVW-1 recombinant protein (MyBiosource, США) at concentration 1 μg/mL as a stimulator of TLR4, b) with the addition of *E. coli* lipopolysaccharide ("Sigma-Aldrich", USA) at concentration 1 μg/mL as a stimulator of TLR4, c) with the addition of a complex of resistant to nucleases guanine and uracil-enriched phosphothioate-modified ribooligonucleotide and cationic lipid single-stranded RNA ssRNA40/LyoVec (Invivogen, USA) at concentration 1 μg/mL as a stimulator of TLR7/8, d) control samples, cultured without an inducer. Monocytes suspension was cultured in 96-well plates at concentration 10^5 cells/mL in a final volume of 0.2 mL for 24 hours at +37 °C in an atmosphere of 5 % CO_2.

After incubation, the suspension was centrifuged at 350 g for 7 minutes at +20 °C, the precipitate was used to determine the cytokine levels and arginase activity and the supernatant – to determine the concentration of nitrites.

Determination of arginase activity and nitrite content in peripheral blood monocytes. Arginase activity in cell lysates was determined by the method of Classen et al. [12]. After removing the supernatant from the wells of the plate, the pellets with cultured cells were carefully washed with 0.2 μL of phosphate buffered saline, after careful removing of the washing solution 0.1 mL of a 0.1 % aqueous solution of Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA) was added to the wells and left for 15 minutes on a shaker for cell lysis. Then 0.1 mL of 50 mM Tris-HCl buffer (pH = 7.5; Sigma-Aldrich, USA) and 0.01 mL of 100 mM $MnCl_2$ solution were added. 0.1 mL of lysate from the wells was transferred to "safelock" tubes and incubated for 7 minutes at 56°C for activation of arginase. Then, 0.1 mL of a 0.5 M arginine solution (pH = 9.7; Sigma-Aldrich, USA) was added to each tube and incubated at t = +37 °C for 120 minutes (series without adding an inductor, with the addition of LPS and ssRNA40/LyoVec). The reaction was stopped by adding 0.8 mL of stop reagent to test tubes, and 0.9 mL to test tubes with 0.1 mL of standard solutions containing 0.0 μg, 7.5 μg, 15.0 μg, 30.0 μg, 45.0 μg and 60.0 μg of urea. To each tube 40 μl of 6 % alcoholic solution of α-isonitrosopropiophenone was added and vortexed for 5 seconds, then sequentially incubated for 30 minutes at t = +95 °C and for 30 minutes at t = +4 °C. After incubation, the urea content in the samples was determined on Stat Fax 303 plus (USA) with a filter installed at 545 nm.

The concentration of nitrites in the supernatants was determined by the method of Griess [12]. 0.1 mL of culture supernatants were transferred to the wells of a 96-well plate, mixed with 0.1 mL of Griess reagent and incubated for 30 min at t = +20 °C in darkness. Absorption was read on Stat Fax 303 plus (USA) with 545 nm filter installed and the nitrite concentrations were calculated according to a standard calibration curve. The results obtained were presented in μmol NO/10^5 cells.

Statistical processing of the obtained data was performed using STATISTICA 11.0 (StatSoft Inc.) and XLSTAT 19.6 (Addinsoft). The normality of the data distribution in the groups was checked using the W-Shapiro–Wilk test. The Mann–Whitney U-test was used to determine the significance of differences in the studied samples. The critical value to assess the significance across these findings was 0.05. Data in the text and tables are presented as medians, 1 and 3 quartiles: Me (Q25 %; Q75 %).

Results

The study of the functional activity of peripheral blood monocytes in patients with different types of MS was performed by modeling their activation with agonists, namely, by HERV-W ENV glycoprotein, *E. coli* lipopolysaccharides for TLR4 activation, and by ssRNA for TLR7/8 activation.

Evaluation of the immunomodulatory effect of the HERV-W ENV glycoprotein revealed significant differences in the reserve ability of monocytes to produce *in vitro* major proinflammatory and regulatory cytokines in patients with different types of the disease (*Table 1*).

It has been found that the reserve capacity of monocytes for TNF-α production in patients with MS was significantly higher than in healthy individuals. The value of Rci_{HERV-W} was 1.6 times higher in patients with a recurrent type of MS than in the control group, and 2.2 times higher than in patients with a progressive type of the disease. When ssRNA40/LyoVec and LPS were added as inducers, the value of Rci in RRMS and PMS groups was 3 times lower than in the control group.

Stimulation with HERV-W ENV glycoprotein led to an increase in production of IL-1β in MS patients, significantly more pronounced than in healthy people in the control group. In particular, HERV-W ENV-stimulated IL-1β production in patients with PMS was 1.6 times higher than that observed in the control group (412.3 (337.9; 564.6) pg/mL vs. 263.5 (171.2; 315.6) pg/mL in the control, P < 0.05). The level of stimulated IL-1β production in the RRMS group was 1.5 times higher compared with the control group (318.3 (247.4; 469.5)

Table 1. Reserve capacity index (Rci) of proinflammatory and regulatory cytokine production by peripheral blood monocytes upon stimulation with glycoprotein HERV-W ENV, ssRNA40/LyoVec and lipopolysaccharide *E. coli* in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) (n = 37), progressive multiple sclerosis (PMS) (n = 19), and healthy individuals (control) (n = 32), Me (Q25 %; Q75 %)

Cytokines	Series	Patients group		Control
		RRMS	PMS	
TNF-α	LPS	31.8 (28.5; 37.2)*	35.3 (30.2; 43.3)*	120.1 (108.4;131.6)
	ssRNA	43.8 (39.6; 47.2)*	35.6 (31.7; 40.8)*	131.1 (110.4; 148.7)
	HERV-W	35.2 (31.4; 39.6)*	46.8 (42.7; 51.1)*	21.4 (18.5; 25.6)
IL-1β	LPS	7.8 (5.3; 9.6)*	12.5 (10.2; 16.4)*	58.1 (49.5; 66.8)
	ssRNA	9.3 (6.7; 11.6)*	20.2 (16.3; 24.7)*	61.6 (57.2; 65.9)
	HERV-W	5.4 (3.9; 7.1)*	7.2 (5.5; 9.4)*	33.6 (29.4; 37.5)
IL-1RA	LPS	24.6 (21.3; 28.1)	10.4 (8.5; 12.7)*	22.3 (18.4; 25.1)
	ssRNA	23.8 (20.9; 26.7)*	21.4 (19.5; 24.6)*	12.7 (10.3; 15.2)
	HERV-W	17.2 (15.6; 20.5)	7.6 (5.3; 9.0)*	15.4 (12.6; 17.9)
IL-10	LPS	9.3 (7.2; 12.6)	5.4 (3.6; 6.8)*	16.5 (13.2; 18.6)
	ssRNA	4.2 (3.1; 5.8)*	1.6 (0.8; 1.9)*	12.3 (10.3; 15.1)
	HERV-W	7.2 (5.2; 9.3)	6.7 (4.5; 8.8)	4.5 (3.2; 6.0)
IL-12p70	ЛПС	9.1 (7.7; 10.8)*	0.9 (0.5; 1.1)*	2.5 (2.2; 3.6)
	ssRNA	8.3 (6.5; 10.8)*	1.2 (0.8; 1.5)	3.1 (2.6; 3.9)
	HERV-W	9.2 (8.1; 11.3)*	1.3 (0.8; 1.5)*	2.7 (2.0; 3.3)
IL-12p40	LPS	1.6 (1.1; 2.0)	2.3 (1.7; 2.9)*	1.3 (1.0; 1.9)
	ssRNA	1.9 (1.2; 2.3)*	2.4 (1.9; 2.9)	3.6 (3.0; 4.1)
	HERV-W	1.5 (1.1; 1.8)	1.3 (0.8; 1.9)*	2.7 (2.2; 3.4)

*: P < 0.05 when compared with the control group.

Table 2. Arginase activity of peripheral blood monocytes of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) (n = 37), progressive multiple sclerosis (PMS) (n = 19) and healthy individuals (control) (n = 32), mU/10^5 cells, Me (Q25 %; Q75 %)

Series	Patients group		Control
	RRMS	PMS	
Non-stimulated cells	2.51 (2.24; 2.86)	2.42 (2.11; 2.73)	2.24 (2.01; 2.54)
HERV-W ENV-stimulated cells	9.15 (6.73; 12.15)	9.34 (8.77; 10.46)*	5.73 (4.13; 7.64)
LPS-stimulated cells	10.41 (8.23; 11.54)	6.22 (5.15; 8.56)*	11.54 (10.03; 12.18)
ssRNA40/LyoVec-stimulated cells	6.59 (5.82; 8.21)	8.74 (6.37; 10.27)	5.46 (3.55; 7.14)

*: P < 0.05 when compared with the control group.

pg/mL vs. 213.9 (186.5; 256.3) pg/mL in the control). The ratio of stimulated IL-1β production to its spontaneous production was significantly reduced relative to control, namely, by 3.7 and 5.5 times in the RRMS and PMS groups, respectively.

Stimulation of IL-1β production during incubation of monocytes with the addition of ssRNA40/LyoVec was more pronounced in the group of patients with a progressive type of MS (P < 0.05 compared with control). At the same time, the values of Rci_{LPS} and Rci_{RNA} had significant differences both between the groups of RRMS and PMS, and between the groups of patients and control group. Rci_{RNA} in the PMS group was 2.2 times higher than in the RRMS group (P < 0.05 when compared between groups of patients), and 3 times lower than in the control group (P < 0.05 when compared between PMS group and control).

In the group of patients with recurrent type of MS, Rci_{RNA} was reduced even more relative to the control indicator, namely, by 6.6 times. Decreased reserve capacity of monocytes to produce TNF-α and IL-1β compared to this indicator in healthy individuals may, on the one hand, indicate changes in the subpopulation of cells producing these cytokines, and on the other hand, indicate the "depletion" of these cells, the presence of impairment in MyD88-mediated signaling and NF-κB activation [13].

HERV-W ENV glycoprotein-induced production of IL-1RA increased both in the control group and in patients with RRMS and PMS. The level of stimulated IL-1RA production in patients with RRMS was 1.8 times higher than in the control group (P < 0.05); in patients with PMS, this indicator did not differ from the control values. It is noteworthy that the value of Rci_{HERV-W} in the group of PMS was 2 times lower than in the control, which may indicate a decrease in the reserve capacity of monocytes to synthesize this protein in patients with PMS; thus, against the background of elevated IL-1β levels in the PMS group, this imbalance provokes chronic inflammation.

The rate of Rci_{LPS} of IL-1RA production in group of patients with PMS was reduced by 2.1 times compared with the control. In ssRNA40/LyoVec-induced production of IL-1RA, the reserve capacity indices in the groups did not differ from the control. Patients with MS also had a significant reduction in $(IL1RA/IL1β)_{INT}$ relative to the control. In the RRMS group, the value of $(IL1RA/IL1β)_{INT}$ was 1.2 (0.9; 1.4) units, in the PMS group 2.3 (1.8; 2.5) units, while in the control group it constituted 9.1 (7.8; 9.6) units. $(IL1RA/IL1β)_{HERV-W}$ was 5.3 (4.9; 5.6) units in the RRMS group, 2.5 (2.1; 2.9) units in the PMS group. The ratio of LPS-induced production of IL-1RA and IL-1β in patients with PMS was significantly reduced compared with the control.

In patients of the RRMS group, the $(IL1RA/IL1\beta)_{LPS}$ was 3.4 (3.1; 3.6) units. The value of $(IL1RA/IL1\beta)_{RNA}$ in patients of the RRMS group constituted 2.8 (2.5; 3.1) units, in the PMS group 2.5 (2.2; 2.7) units, in the control group 2.2 (2.0; 2.5) units ($P > 0.05$ when comparing groups of patients and controls, as well as groups of patients with each other).

Stimulation with HERV-W ENV led to an increase in IL-10 production in the PMS group, and it is important to note that in patients of both groups the value of Rci_{HERV-W} was almost twice higher than in the control group, in contrast to the series treated with other stimulants.

The level of LPS-induced IL-10 production in observed groups of patients with MS did not differ from the control on the background of a moderate decrease in reserve capacity index. With ssRNA40-induction, the content of this cytokine in the RRMS and PMS groups was reduced relative to the control by 3 and 6.3 times, respectively ($P < 0.05$). Rci_{RNA} was reduced by 2.9 times in the RRMS group and 7.7 times in the PMS group, $P < 0.05$.

Therefore, the greatest effect on IL-10 production was observed when monocytes obtained from patients with progressive type of MS were stimulated with HERV-W ENV glycoprotein.

The level of IL-12p70 production in the cultivation of intact monocytes in both groups of patients with MS was significantly lower than in the control. In the RRMS group, the low level of IL-12p70 production by intact cells was accompanied by increased Rci_{HERV-W} values relative to the control (9.2 (8.1; 11.3) units vs. 2.7 (2.0; 3.3) units in control, $P < 0.05$), Rci_{LPS} (9.1 (7.7; 10.8) units vs. 2.5 (2.2; 3.4) units in the control, $P < 0.05$), and Rci_{RNA} (8.3 (6.5; 10.8) units vs. 3.1 (2.6; 3.9) units), $P < 0.05$). At the same time, in patients with a progressive type of disease, stimulation of monocytes did not lead to a significant increase in IL-12p70 production, which may indicate the depletion of IL-12-producing cells against the background of high spontaneous production of this cytokine.

During incubation of monocytes, we evaluated both the production of the IL-12p70 dimer and the production of the IL-12p40 subunit, which is synthesized mainly by the cells of the monocyte fraction of PBMCs. In intact cells of patients with PMS, against the background of increased production of IL-12p70 compared with the group of RRMS, there were an elevated levels of production of the IL-12p40 subunit, namely 3 times higher than in the RRMS group and 1.7 times higher than in the control. Stimulation of monocytes with LPS led to a significant increase in IL-12p40 production, namely by 2.7 times. In the RRMS group, a reduced reserve ability to synthesize the IL-12p40 subunit was observed.

The modulating effect of TLR4 and TLR7/8 agonists on the production of TNF-α, IL-1β and IL-10 by PBMCs obtained from patients with different types of MS reflects the persistence of the detected imbalance of immunoregulatory cytokines; in patients with a progressive type of the disease, there was a tendency to more pronounced production of proinflammatory cytokines against the background of reduced reserve ability to synthesize anti-inflammatory cytokines.

At the next stage of our work, we studied the differences in the functioning of the arginase and NO-synthase pathways of L-arginine metabolism in intact and TLR4- and TLR7/8-activated peripheral blood monocytes in patients with different types of MS.

Moderate basal arginase activity ($P > 0.05$ relative to the control) was found in groups of patients with relapsing-remitting and progressive types of MS. The arginase pathway of L-arginine metabolism was predominant in the intact cells of the monocyte fraction of PBMCs, as evidenced by the low level of NO production in all groups (<0.1 μmol NO/10^5 cells).

Under the action of the stimulating HERV-W ENV glycoprotein, arginase activity increased by 3.6 times relative to the intact cells in the RRMS group, 3.8 times in the PMS group, and 2.6 times in the control group ($P < 0.05$).

Cultivation with LPS led to an increase in arginase activity of monocytes compared with intact cells, constituting 4.1 times in the RRMS group, 2.6 times in the PMS group and 5.2 times in the control group, but when comparing the stimulation in the PMS group, arginase activity turned out to be below the levels in control ($P < 0.05$). Stimulation with ssRNA40/LyoVec also caused an increase in arginase activity, namely 2.6 times in the RRMS group, 3.6 times in the PMS group and 2.4 times in the control ($P < 0.05$).

Arginase activity during the cultivation of monocytes treated with various agonists depended on the type of the clinical course of MS. In patients with RRMS, the highest arginase activity was observed in monocyte culture in the presence of HERV-W ENV and LPS. In monocytes obtained from patients with PMS, cultivation with LPS led to a significant reduction of arginase activity relative to the control. Basal and stimulated production of nitric oxide by monocytes after 24 hours cultivation in all groups was <0.1 μmol NO/10^5 cells, indicating a predominance of the arginase pathway of L-arginine metabolism.

Discussion

HERV-W ENV protein has numerous effects on microglia, such as morphological changes in microglia in amoeboid cells, increased cell proliferation, stimulation of the secretion of proinflammatory factors, suppression of the expression of neuroprotective factors, and decreased myelin clearance. It has been shown that HERV-W ENV is present on TLR4-positive microglia in MS lesions closely associated with myelinated axons. In myelinated cocultures stimulated with ENV proteins, microglia are forced to contact with axons, which leads to the leakage of intraaxonal and myelin proteins. Taken together, these observations suggest that HERV-W ENV in the MS brain may induce myeloid cells to cause damage to myelinated axons. HERV-W ENV-mediated modulation of microglial cell polarization to a proinflammatory (M1) phenotype contributes to axonal damage and neurodegeneration in MS [5].

In the works of Rolland et al. and Saresella et al., when studying the mechanisms of the pro-inflammatory properties of the surface unit (ENV-SU) of the HERV-W/MS-associated retrovirus (MSRV) envelope protein, it was shown that ENV-SU is able to specifically activate monocytes through the pattern recognition receptors CD14 and TLR4. This activation is associated with the release of major pro-inflammatory cytokines such

as IL-1β, IL-6 and TNF-α [14,15]. In our study, we observed a similar secretion profile of IL-1β, IL-12 and IL-1RA in monocyte culture in the presence of HERV-W ENV and LPS.

HERV-W ENV protein may exhibit its TLR4-dependent proinflammatory effect in the central nervous system (CNS) and thus initiates and/or significantly exacerbates the disease. This idea is consistent with the data of Perron et al. [16] that the HERV- ENV glycoprotein is expressed in the white matter of MS brains and that the viral load detected in the cerebrospinal fluid increases with the progression of MS and thus can have an important prognostic value for the disease [17]. The effect of viral load was confirmed by our studies *in vitro* in a group with a progressive type of MS, for which it was shown that the HERV-W ENV glycoprotein causes an imbalance in the production of IL-1β/IL-1RA. Thus, the reduced value of the ratio of IL-1RA and IL-1β production during the cultivation of intact monocytes, as well as with the addition of TLR4 and TLR7/8 agonists in patients with MS may indicate a violation of auto- and paracrine regulation in IL-1RA/IL-1β system, and can be considered as one of the pathogenetic mechanisms of the formation of the pro-inflammatory context [18,19].

Mameli et al. have demonstrated that cytokines such as TNF-α and IFN-γ can activate the ERVWE1 promoter. The highest activation of HERV-W expression in glioblastoma cells was observed under the influence of TNFα. They also emphasized that the mechanism of activation of transcription by these cytokines is associated with increased binding of the p65 subunit of NF-κB to a sensitive element located in the enhancer region of the ERVWE1 promoter [20].

According to our data, the reserve capacity of monocytes to produce TNF-α in patients with MS was also higher than in healthy individuals, which may indicate changes in the subpopulation composition of cells producing these cytokines (reflecting the increased contribution of CD14+CD16++ monocytes).

The studies of Wang et al. have shown that TLR4 knockdown disrupts HERV-W ENV-induced TNF-α and IL-10 expression. Overexpression of HERV-W ENV results in upregulation of MyD88, transmitting a signal from TLR4. HERV-W ENV upregulates IL-10 and TNF-α expression by suppressing MyD88 production in glial cells [21].

The results of our work indicate a tendency towards activation of peripheral blood monocytes in patients with MS with their polarization towards proinflammatory M1 phenotype, at the same time there was an increased activation of arginase in monocytes upon stimulation with HERV-W ENV, especially pronounced in patients with a progressive course of the disease.

Plasticity of cells of monocyte origin is due to the dynamic integration of numerous signals coming from neighbouring pro- and anti-inflammatory cells, characterized by different metabolic states and differential regulation of phenotypic markers. Among them, the expression of such enzymes as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and arginase-1 is commonly used as a signature marker for evaluation of pro- and anti-inflammatory polarization of monocytes, respectively [22–24].

The differential distribution of proinflammatory and anti-inflammatory monocytes at the borders of the CNS can significantly affect the functional activation of these cells invading the central nervous system during autoimmune inflammation. CNS barrier cells (blood-brain barrier (BBB) endothelial cells and vascular plexus epithelial cells) can directly regulate the transcription of NOS2 (encoding iNOS) and Arg1 (encoding arginase-1) in interacting monocytes. Namely, while stimulation of BBB endothelial cells with TNF-α and IFN-γ induces NOS2 expression in monocytes, IL-1β-induced activation of BBB endothelial cells leads to significant upregulation of Arg1 in monocytes [23,25].

Our data are consistent with the numerous data of the authors [1,2,5,15,16], that the MSRV envelope protein fraction contains a binding site for the cellular receptor and allows the virus to naturally interact with host cells. CD14 and TLR4 are evolutionarily conserved receptors that play a critical role in APCs activation and proinflammatory cytokine production in response to LPS [26]. Thus, CD14 and TLR4 are PRRs that interact to activate innate immunity in response to both bacteria and viruses. These receptors are involved in mediating the proinflammatory effect of the MSRV envelope protein, identifying the HERV-W family proteins as a putative new class of viral ligands for these PRRs.

Thus, our studies confirm that HERV-W ENV can activate the innate immune system through TLR4 and promote the development of a Th1-type immune response. This statement is consistent with the idea that due to its proinflammatory properties, the HERV-W envelope protein can participate in immunopathological cascades associated with chronic inflammatory and neurodegenerative diseases.

Conclusions

1. The study of TLR-mediated activation of cells of the monocyte fraction of PBMCs in patients with relapsing-remitting and progressive type of MS revealed a modulating effect of HERV-W ENV on the production of TNF-α, IL-1β, IL-12 and IL-10. In patients with MS of both groups, the reserve capacity of monocytes for IL-1β production was lower than in healthy individuals, while the reserve capacity for TNF-α and IL-10 production was almost twice as high as in the control group. It is important to note that in the PMS group the value of Rci_{HERV-W} for IL-1RA was 2 times lower than the control, so against the background of elevated IL-1β in the PMS group, this imbalance provokes chronic inflammation.

2. The study of the arginase pathway revealed a significant increase in the arginase activity in monocytes upon stimulation with TLR4 and TLR7/8 compared to the baseline, and it was more pronounced in patients with PMS upon monocytes incubation with HERV-W ENV.

3. In monocytes obtained from patients with the progressive type of MS, incubation with HERV-W ENV leads to the stimulation of the production of both proinflammatory and regulatory cytokines with anti-inflammatory action; it is considered as an important mechanism of disruption of intercellular cooperation, which can result in a biased

immune response, contributing to increased disease susceptibility and more severe course of MS.

Prospects for future research. Further studies on the effect of human endogenous retroviruses on the activation of mononuclear phagocytes in MS are very important for understanding the pathogenic and neuroprotective pathways in neurological disorders and for the development of new therapeutic agents.

Funding

The study was financed from the state budget within the framework of the research and development program "Investigation of the role of virus-mediated activation of mononuclear phagocytes in multiple sclerosis" (state registration number 0120U100668) of the Laboratory of Clinical Immunology and Allergology of "Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine".

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.
Конфлікт інтересів: відсутній.

Надійшла до редакції / Received: 20.09.2021
Після доопрацювання / Revised: 11.01.2022
Прийнято до друку / Accepted: 20.01.2022

Information about authors:

Koliada O. M., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Physiology named after D. O. Alpern, Kharkiv National Medical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0003-2826-0667
Vdovichenko N. I., Researcher of the Laboratory of Clinical Immunology and Allergology, SI "Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0002-6952-9389
Koliada T. I., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Clinical Immunology and Allergology, SI "Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0002-4143-8514
Tupotilov O. V., Researcher of the Laboratory of Clinical Immunology and Allergology, SI "Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0001-6353-1667

Відомості про авторів:

Коляда О. М., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної фізіології імені Д. О. Альперна, Харківський національний медичний університет, Україна.
Вдовіченко Н. І., науковий співробітник лабораторії клінічної імунології та алергології, ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», м. Харків.
Коляда Т. І., д-р мед. наук, професор, зав. лабораторії клінічної імунології та алергології, ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», м. Харків.
Тупотілов О. В., науковий співробітник лабораторії клінічної імунології та алергології, ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», м. Харків.

References

[1] Grandi, N., & Tramontano, E. (2018). HERV Envelope Proteins: Physiological Role and Pathogenic Potential in Cancer and Autoimmunity. *Frontiers in microbiology*, *9*, 462. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00462

[2] Lezhnyova, V. R., Martynova, E. V., Khaiboullin, T. I., Urbanowicz, R. A., Khaiboullina, S. F., & Rizvanov, A. A. (2020). The Relationship of the Mechanisms of the Pathogenesis of Multiple Sclerosis and the Expression of Endogenous Retroviruses. *Biology*, *9*(12), 464. https://doi.org/10.3390/biology9120464

[3] Küry, P., Nath, A., Créange, A., Dolei, A., Marche, P., Gold, J., Giovannoni, G., Hartung, H. P., & Perron, H. (2018). Human Endogenous Retroviruses in Neurological Diseases. *Trends in molecular medicine*, *24*(4), 379-394. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.02.007

[4] Charvet, B., Reynaud, J. M., Gourru-Lesimple, G., Perron, H., Marche, P. N., & Horvat, B. (2018). Induction of Proinflammatory Multiple Sclerosis-Associated Retrovirus Envelope Protein by Human Herpesvirus-6A and CD46 Receptor Engagement. *Frontiers in immunology*, *9*, 2803. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02803

[5] Kremer, D., Gruchot, J., Weyers, V., Oldemeier, L., Göttle, P., Healy, L., Ho Jang, J., Kang T Xu, Y., Volsko, C., Dutta, R., Trapp, B. D., Perron, H., Hartung, H. P., & Küry, P. (2019). pHERV-W envelope protein fuels microglial cell-dependent damage of myelinated axons in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(30), 15216-15225. https://doi.org/10.1073/pnas.1901283116

[6] Van Horssen, J., van der Pol, S., Nijland, P., Amor, S., & Perron, H. (2016). Human endogenous retrovirus W in brain lesions: Rationale for targeted therapy in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis and related disorders*, *8*, 11-18. https://doi.org/10.1016/j.msard.2016.04.006

[7] Gruchot, J., Kremer, D., & Küry, P. (2019). Neural Cell Responses Upon Exposure to Human Endogenous Retroviruses. *Frontiers in genetics*, *10*, 655. https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00655

[8] Kremer, D., Schichel, T., Förster, M., Tzekova, N., Bernard, C., van der Valk, P., van Horssen, J., Hartung, H. P., Perron, H., & Küry, P. (2013). Human endogenous retrovirus type W envelope protein inhibits oligodendroglial precursor cell differentiation. *Annals of neurology*, *74*(5), 721-732. https://doi.org/10.1002/ana.23970

[9] Mammana, S., Fagone, P., Cavalli, E., Basile, M. S., Petralia, M. C., Nicoletti, F., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2018). The Role of Macrophages in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Pathways of Alzheimer's Disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Multiple Sclerosis: Pathogenetic Cellular Effectors and Potential Therapeutic Targets. *International journal of molecular sciences*, *19*(3), 831. https://doi.org/10.3390/ijms19030831

[10] Baufeld, C., O'Loughlin, E., Calcagno, N., Madore, C., & Butovsky, O. (2018). Differential contribution of microglia and monocytes in neurodegenerative diseases. *Journal of neural transmission*, *125*(5), 8090826. https://doi.org/10.1007/s00702-017-1795-7

[11] Rousselet, G. (Ed.) (2018). Macrophages: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1784). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3

[12] Reiner N. E. (2009). Methods in molecular biology. Macrophages and dendritic cells. Methods and protocols. Preface. *Methods in molecular biology*, *531*, v–vi. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-396-7

[13] Murray, P. J. (2017). Macrophage Polarization. Annual review of physiology, *79*, 541-566. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034339

[14] Rolland, A., Jouvin-Marche, E., Viret, C., Faure, M., Perron, H., & Marche, P. N. (2006). The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. *Journal of immunology*, *176*(12), 7636-7644. https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.12.7636

[15] Saresella, M., Rolland, A., Marventano, I., Cavarretta, R., Caputo, D., Marche, P., Perron, H., & Clerici, M. (2009). Multiple sclerosis-associated retroviral agent (MSRV)-stimulated cytokine production in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Multiple sclerosis*, *15*(4), 443-447. https://doi.org/10.1177/1352458508100840

[16] Perron, H., Lazarini, F., Ruprecht, K., Péchoux-Longin, C., Seilhean, D., Sazdovitch, V., Créange, A., Battail-Poirot, N., Sibaï, G., Santoro, L., Jolivet, M., Darlix, J. L., Rieckmann, P., Arzberger, T., Hauw, J. J., & Lassmann, H. (2005). Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins: physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions. *Journal of neurovirology*, *11*(1), 23-33. https://doi.org/10.1080/13550280590901741

[17] Rosenberger, K., Derkow, K., Dembny, P., Krüger, C., Schott, E., & Lehnardt, S. (2014). The impact of single and pairwise Toll-like receptor activation on neuroinflammation and neurodegeneration. *Journal of neuroinflammation*, *11*, 166. https://doi.org/10.1186/s12974-014-0166-7

[18] Carpintero, R., & Burger, D. (2011). IFNβ and glatiramer acetate trigger different signaling pathways to regulate the IL-1 system in multiple sclerosis. *Communicative & integrative biology*, *4*(1), 112-114. https://doi.org/10.4161/cib.4.1.14205

[19] O'Loughlin, E., Madore, C., Lassmann, H., & Butovsky, O. (2018). Microglial Phenotypes and Functions in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *8*(2), a028993. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028993

[20] Mameli, G., Astone, V., Khalili, K., Serra, C., Sawaya, B. E., & Dolei, A. (2007). Regulation of the syncytin-1 promoter in human astrocytes by multiple sclerosis-related cytokines. *Virology*, *362*(1), 120-130. https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.12.019

[21] Wang, X., Wu, X., Huang, J., Li, H., Yan, Q., & Zhu, F. (2021). Human endogenous retrovirus W family envelope protein (HERV-W env) facilitates the production of TNF-α and IL-10 by inhibiting MyD88s in glial cells. *Archives of virology*, *166*(4), 1035-1045. https://doi.org/10.1007/s00705-020-04933-8

[22] Okada, K., Kobata, M., Sennari, Y., Iwanaka, Y., Hashimoto, T., Ohnari, K., & Tahara, M. (2017). Levels of nitric oxide metabolites in cerebrospinal fluid correlate with cognitive impairment in early stage multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, *88*(10), 892-893. https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-315585
[23] Rodriguez, P. C., Ochoa, A. C., & Al-Khami, A. A. (2017). Arginine Metabolism in Myeloid Cells Shapes Innate and Adaptive Immunity. *Frontiers in immunology*, *8*, 93. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00093
[24] Lan, M., Tang, X., Zhang, J., & Yao, Z. (2018). Insights in pathogenesis of multiple sclerosis: nitric oxide may induce mitochondrial dysfunction of oligodendrocytes. *Reviews in the neurosciences*, *29*(1), 39-53. https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0033
[25] Ivan, D. C., Walthert, S., & Locatelli, G. (2021). Central Nervous System Barriers Impact Distribution and Expression of iNOS and Arginase-1 in Infiltrating Macrophages During Neuroinflammation. *Frontiers in immunology*, *12*, 666961. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.666961
[26] Herzmann, N., Salamon, A., Fiedler, T., & Peters, K. (2017). Lipopolysaccharide induces proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stromal cells in vitro via TLR4 activation. *Experimental cell research*, *350*(1), 115-122. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.11.012

UDC 616.858-008.6:616.8-009.3]-073.97
DOI: 10.14739/2310-1237.2022.1.246660

Diagnostic value of motor evoked potential parameters in patients with Parkinson's disease stage II

A. V. Demchenko[A,E,F], **Dzh. N. Aravitska***[B,C,D]

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

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

Key words: Parkinson disease, motor symptoms, motor evoked potentials, transcranial magnetic stimulation.

Pathologia 2022; 19 (1), 40-46

***E-mail:** Syegmund94@gmail.com

The aim of our study was to identify the most informative parameters of motor evoked potential (MEP) based on clinical and neurophysiological comparisons in patients with Parkinson's disease (PD) stage II.

Materials and methods. The study included 90 patients aged 45 to 75 years with stage II PD according to Hoehn–Yahr. Examination of patients was performed according to the following scheme: clinical and neurological examination with MDS UPDRS scale and neurophysiological examination to determine the latency, amplitude and duration of MEP after 4 tests with a gradual increase of magnetic field induction. Our study involved patients with predominantly right and left-sided motor symptoms, so for correct statistical analysis, the dominant side was considered as the debut side or the side with more pronounced motor symptoms, the subdominant side was considered as the opposite one.

Results. In cases of patients with stage II PD the MEP latency significantly decreased, and the amplitude and duration of MEP significantly increased in samples with increasing magnetic field induction in the right and left hemispheres of the brain. It was found significant positive moderate correlation between UPDRS part III total score and MEP latency in the ipsilateral premotor cortex to the dominant side of motor symptoms with samples of magnetic induction (1.1 TI – r = 0.34, P < 0.05; 1.32 TI – r = 0.32, P < 0.05; 1.76 TI – r = 0.31, P < 0.05). Also positive mild correlation was found between MEP latency in the ipsilateral premotor cortex to the subdominant side of motor symptoms and UPDRS part III total score (1.54 TI – r = 0.22, P < 0.05; 1.76 TI – r = 0.29, P < 0.05). Mild positive correlation (r = 0.29, P < 0.05) was found between MEP duration of ipsilateral premotor cortex to the subdominant side of motor symptoms and UPDRS part III total score in sample with 1.54 TI magnetic induction. No significant correlations were found to the amplitude parameter and the severity of clinical symptoms in investigated patients with PD stage II.

Conclusions. The most informative neurophysiological indicators in patients with PD stage II are the MEP latencies. The MEP latencies of the premotor cortex, which is ipsilateral to the side with more pronounced motor symptoms, have a particularly close relationship with UPDRS part III total score in the samples with 1.10–1.76 TI magnetic inductions (r = 0.31–0.34, P < 0.05). The MEP duration of premotor cortex, which is ipsilateral to the side with less pronounced motor symptoms, is most closely associated with the severity of motor manifestations on the subdominant side in patients with PD stage II (r = 0.27, P < 0.05).

Ключові слова: хвороба Паркінсона, моторні симптоми, викликаний моторний потенціал, транскраніальна магнітна стимуляція.

Патологія. 2022. Т. 19, № 1(54). С. 40-46

Діагностична цінність параметрів моторного викликаного потенціалу в пацієнтів із хворобою Паркінсона II стадії

А. В. Демченко, Дж. Н. Аравіцька

Мета роботи – визначити найбільш інформативні параметри моторного викликаного потенціалу (МВП) у пацієнтів із хворобою Паркінсона (ХП) II стадії на підставі клініко-нейрофізіологічних зіставлень.

Матеріали та методи. У дослідження залучили 90 хворих віком від 45 до 75 років із ХП II стадії за Хен–Яром. Хворим здійснили клініко-неврологічне обстеження з оцінюванням за шкалою MDS UPDRS, а також нейрофізіологічне дослідження з визначенням латентності, амплітуди, площі та тривалості МВП після проведення 4 проб з поступовим підвищенням індукції магнітного поля. У дослідженні брали участь переважно пацієнти з право- та лівобічними моторними симптомами, тому для коректного статистичного аналізу домінантний бік вважали дебютним або боком із більш вираженими руховими симптомами, субдомінантний бік вважали протилежним домінантному.

Результати. Виявили, що в обстежених із ХП II стадії латентність МВП вірогідно зменшувалася, а амплітуда та тривалість МВП достовірно збільшувались у пробах із підвищенням індукції магнітного поля у правій і лівій гемісферах головного мозку. Визначили вірогідну помірну кореляцію між загальним балом UPDRS частини III та латентністю МВП в іпсилатеральній премоторній корі до домінантного боку моторних симптомів у пробах із магнітною індукцією (1,1 Тл – r = 0,34, p < 0,05; 1,32 Тл – r = 0,32, p < 0,05; 1,76 Тл – r = 0,31, p < 0,05). Також встановили позитивну слабку кореляцію між латентністю МВП в іпсилатеральній премоторній корі до субдомінантного боку моторних симптомів із загальним балом UPDRS частини III (1,54 Тл – r = 0,22, p < 0,05; 1,76 Тл – r = 0,29, p < 0,05). Виявили слабку позитивну кореляцію (r = 0,29, p < 0,05) між тривалістю МВП іпсилатеральної премоторної кори до субдомінантного боку моторних симптомів і загальною оцінкою UPDRS частини III у зразку з магнітною індукцією 1,54 Тл. Вірогідні кореляції амплітуди та вираженості клінічних симптомів у пацієнтів із ХП II стадії не визначили.

Висновки. Найбільш інформативний нейрофізіологічний показник у пацієнтів із ХП II стадії – латентність МВП. Латентність МВП премоторної кори іпсилатерального боку з більш вираженими моторними симптомами має особливо тісний зв'язок з оцінкою UPDRS частини III у пробах із магнітною індукцією 1,10–1,76 Тл (r = 0,31–0,34, p < 0,05). Тривалість МВП премоторної кори іпсилатерального боку з менш вираженими руховими симптомами найтісніше пов'язана з вираженістю моторних проявів на субдомінантному боці в пацієнтів із II стадією ХП (r = 0,27, p < 0,05).

Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disease characterized by motor and non-motor symptoms. The number of patients with PD covers 1 % of the population over the age of 60 and tends to increase with age [6]. The problem of the spread of PD is of great medical and social importance, as their clinical manifestations lead to impaired quality of life of patients already in the early stages of the disease.

It is known that patients with PD have a wide range of disorders of neurophysiological parameters in the primary motor cortex, which are correlated in direct proportion to the severity of clinical motor symptoms of PD [2,8]. Neurophysiological parameters of the central nervous system (CNS) can be assessed using transcranial magnetic stimulation (TMS) [4,10]. The method of diagnostic TMS makes it possible to assess the excitability of the nervous system using the parameters of motor evoked potential (MEP), which include latency, amplitude and duration [8].

The presence of oligobradykinesia, muscle rigidity and rest tremor significantly impairs the quality of life of patients with PD. It is a proven fact that dopaminergic therapy improves the motor activity of patients with PD and has a positive effect on neurophysiological parameters [2,8].

The availability of research on the objective assessment of the course of the disease and the effectiveness of treatment of PD determines the relevance of studying changes in neurophysiological parameters of the CNS in these patients. However, the sources that we have analyzed provide insufficient amount of often contradictory data about the diagnostic value of neurophysiological parameters of CNS excitability in patients with PD [8,9]. That is why the search for diagnostically reliable neurophysiological parameters is promising for the possibility of objective assessment of the treatment results with neurophysiological methods.

Aim

Was to identify the most informative parameters of motor evoked potential based on clinical and neurophysiological comparisons in patients with Parkinson's disease stage II.

Materials and methods

The study was conducted on the basis of the educational and scientific medical center "University Clinic" of Zaporizhzhia State Medical University. 90 patients (51 women and 39 men) aged 45 to 75 years with stage II PD according to Hoehn–Yahr were examined. The mean age was 66.22 ± 8.07 years. The average duration of the disease was 3.69 ± 2.19 years. At the onset of the disease, the predominance of motor symptoms was observed in 71 patients on the right and 19 patients on the left.

The diagnosis of Parkinson's disease was established according to the criteria of the British Society for Parkinson's Brain Bank and the Clinical Protocol (Guideline 00798), recommended by the Ministry of Health of Ukraine on 08.08.2018 and formulated according to class G20 (Extrapyramidal and other motor disorders) of the International Classification of Diseases, 10th revision. The stage of PD was determined by the classification of Hoehn–Yahr (1967). Exclusion criteria were: patients with stages I, III–V PD, other extrapyramidal disorders, inflammatory, autoimmune, cancer and mental illness; with decompensated stage of somatic pathology.

All patients who agreed to participate in the study signed an informed voluntary agreement. The study was conducted in accordance with the ethical standards of the Commission on Bioethics of Zaporizhzhia State Medical University, as well as the Helsinki Declaration of 1975 and its revised version of 2000. Levodopa/carbidopa and pramipexol were prescribed for all patients. The dose of pharmacotherapy was stabilized during 1 month before patients' including in investigation.

Examination of patients was performed according to the following scheme: clinical and neurological using the Unified Parkinson's Disease Rating Scale of the International Movement Disorders Society (Movement Disorder Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale – MDS UPDRS) and neurophysiological study. Diagnostic TMS was performed on an extended therapeutic magnetic stimulator Neuro MS/D from Neurosoft (RF) with the ability to regulate magnetic pulses from 0 to 2.2 Tl. To assess the parameters of MEP, with the registration of the muscular response in m. abductor pollicis brevis bilaterally, used the software and hardware complex of the neuromyograph Neuron-Spectrum/4MEP with transcranial magnetic stimulator Neuro MS/D. The latency, amplitude and duration of MEP were studied after 4 tests with a gradual increase of the induction of the magnetic field (1.1 Tl – 50 %, 1.32 Tl – 60 %, 1.54 Tl – 70 % and 1.76 Tl – 80 %) from the maximum possible device Neuro MS/D (2.2 Tl – 100 %). The latent period of MEP is defined as the time (in ms) from the beginning of stimulation of the premotor zones to the moment of MEP in the corresponding muscle. The amplitude of the MEP (mV) is defined as the deviation from the isoline of the positive peak to the negative peak potential. The duration of MEP (ms) is determined by the beginning of the deviation of the motor potential before its return to the isoline.

Given that our study involved 71 patients with predominantly right-sided motor symptoms and 19 patients with predominantly left-sided symptoms, for correct statistical analysis, the dominant side was considered the debut side or the side with more pronounced motor symptoms, the subdominant side was considered the opposite. A score of part III of the UPDRS scale, which reflects the severity of motor symptoms, was also used to determine the lateralization of clinical symptoms. The sum of the UPDRS Part III scores, reflecting the severity of symptoms on the dominant and subdominant side, was considered separately to assess clinical symptoms. The calculation of MEP parameters for the ipsilateral premotor cortex to the dominant and subdominant sides of motor symptoms was also calculated separately.

The results of the study were processed using the statistical package of the licensing program Statistica® for Windows 13.0 (No. JPZ8041382130ARCN10-J), as well as Microsoft Excel 2010. The nature of the variable's distribution in the variation series was determined using

the Shapiro–Wilk test. Also in the case of normal distribution of variables, the descriptive statistics is presented in the form of arithmetic mean and standard deviation (M ± SD), in case of abnormal distribution – in the form of median and interquartile range Me (Q1; Q3). The probability of discrepancies in indicators was assessed by the criteria of Mann–Whitney U test, Wilcoxon test, Kruskal–Wallis test and Friedman–Kendall test. Also correlation coefficient was calculated using Spearman coefficient. For the criteria differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Complaints of tremor were reported by 87.00 % of patients, muscle stiffness 73.33 % and slowness of movement by 62.11 % of patients. The presence of disturbances and changes in handwriting was noted by 81.11 % of patients, difficulty in getting up from a sitting position – 38.89 %, difficulty in walking and maintaining balance – 45.56 %, freezing while walking – 35.56 %. Restriction of habitual activity and hobbies due to the influence of motor symptoms of PD was noted by 65.56 % of patients, including slowness of chewing and swallowing – 44.44 %, difficulty in cooking – 52.22 %, dressing – 58.89 %, hygienic procedures – 55.56 % of patients.

In addition to motor symptoms, patients also complained of immobile symptoms: fatigue from habitual activity – 80.00 %, anxiety – 78.89 %, low mood – 73.34 %, apathy – 61.11 %, memory loss – 64.45 %, concentration – 55.56 %, frequent night awakenings – 76.67 %, daytime sleepiness – 60.00 %, frequent (imperative) urges to urinate – 58.89 %, frequent urination at night – 52.23 % and constipation – 61.12 % of patients. Less often, patients complained of dizziness – 44.44 %, increased salivation – 33.34 % and periodic benign hallucinations in 12.22 %.

Neurological examination of patients with stage II PD revealed muscle rigidity of the plastic type in the muscles of the upper extremities in all patients and in the lower extremities in 98.89 % of patients; asymmetry of muscle rigidity in the form of predominance in the right extremities in 78.89 % and in the left extremities in 21.11 % of patients; bradykinesia was detected in the right upper extremity muscle in all patients and in the left upper extremity muscle in 98.89 % of patients. Rest tremor was determined in 98.89 % of patients, including its predominance in the right extremities in 75.56 % and in the left extremities in 24.44 % of patients. Violation of the physique (stiffness and stooping) was observed in 97.78 % of patients, violation of the test with getting up from a chair without the help of hands – in 95.56 %, gait disorders – in 81.11 %, stiffness when walking – in 60.00 %, speech disorders (in the form of decreased modulation, diction and volume) – in 62.22 %, decreased facial expression – in 90.00 % of patients.

The overall score on the MDS UPDRS scale in patients with stage II PD was 76.00 (70.00; 83.00) points; score on part I (non-motor manifestations that affect everyday life) – 15.00 (13.00; 19.00) points, on part II (motor aspects that affect daily life) – 13.00 (9.00; 15.00) points and on part III (objective assessment of motor functions) – 49.00 (46.00; 52.00) points, part III dominant side – 13.00 (11.00; 14.00), part III subdominant side – 11.00 (10.00; 12.00).

According to the studied neurophysiological parameters of the premotor cortex excitability, in the examined patients when comparing 4 samples with increasing induction of magnetic stimulus there was a significant (according to Friedman test) decrease in the latent period of MEP in the ipsilateral ($P < 0.001$) premotor cortex to the predominant side of motor symptoms, but in the contralateral premotor cortex there was only a tendency to reduce the latency of MEP ($P = 0.08$) (*Table 1*).

In a pairwise comparison of MEP latency in samples with increasing magnetic stimulus, it was determined that in the contralateral premotor cortex to the predominant side of motor symptoms in pair of samples with stimulus induction 1.10–1.76 TI there was a significant decrease ($P = 0.03$) in the latent period of MEP, when comparing pairs of data samples with a stimulus intensity of 1.10–1.32 TI and 1.10–1.54 TI was insignificant ($P > 0.05$) (*Table 1*). Comparing the latent period of MEP of the ipsilateral premotor cortex to the predominant side of motor symptoms in pairs of samples with magnetic stimulus induction, significant decrease was found in all pair of samples ($P < 0.01$) (*Table 1*). The MEP latency parameters were also compared between the contra- and ipsilateral premotor cortex to the predominant side of motor symptoms: significant differences were not found in any samples of induction of magnetic stimulus (1.1 TI – $P = 0.61$; 1.32 TI – $P = 0.72$; 1.54 TI – $P = 0.86$; 1.76 TI – $P = 0.91$).

In the examined patients with samples with increasing induction of the magnetic stimulus, a significant increase in amplitude was observed according to the Friedman test in the contra- ($P < 0.001$) and ipsilateral ($P < 0.001$) premotor cortex to the predominant side of motor symptoms (*Table 2*). Comparing the amplitude of the MEP between the contra- and ipsilateral premotor cortex, interhemispheric asymmetry of the MEP amplitude was not found in any samples of magnetic stimulus induction (1.1 TI – $P = 0.12$; 1.32 TI – $P = 0.35$; 1.54 TI – $P = 0.20$; 1.76 TI – $P = 0.38$).

The duration of MEP in both premotor areas of the brain increased ($P < 0.001$) with the increase of induction of the magnetic field (*Table 3*). Comparing the amplitude of the MEP between the contra- and ipsilateral sides of the premotor cortex in all samples with increasing induction of the magnetic impulse, no significant difference between the parameters was found (1.1 TI – $P = 0.86$; 1.32 TI – $P = 0.77$; 1.54 TI – $P = 0.99$; 1.76 TI – $P = 0.26$).

To compare motor clinical symptoms with investigated neuruphysiological parameters, we calculate the Spearman's correlation coefficient between UPDRS score (UPDRS, part III total score, part III dominant side, part III subdominant side) and of MEP parameters (*Table 4*).

Significant positive moderate correlation was found between UPDRS part III total score and MEP latency in the ipsilateral premotor cortex to the dominant side of motor symptoms with samples of magnetic induction (1.1 TI – $r = 0.34$, $P < 0.05$; 1.32 TI – $r = 0.32$, $P < 0.05$; 1.76

Table 1. Latency of MEP in the contra- and ipsilateral premotor cortex to the predominant side of motor symptoms in patients with stage II PD, Me (Q1; Q3)

Parameters	Magnetic field induction				P	P^{1-2}	P^{1-3}	P^{1-4}
	1.1 TI[1]	1.32 TI[2]	1.54 TI[3]	1.76 TI[4]				
Latent period of MEP on the contralateral premotor cortex, ms	22.50 (21.60; 24.00)	22.60 (21.90; 23,70)	22.60 (21.40; 23,80)	22.45 (21.40; 23.70)	0.08	0.92	0.21	0.03
Latent period of MEP on the ipsilateral premotor cortex, ms	22.85 (21.70; 23.70)	22.60 (21.60; 23.70)	22.65 (21.50; 23.50)	22.35 (21.40; 23.30)	<0.001	0.01	0.002	<0.001

P: according to Friedman test; P^{1-2}, P^{1-3}, P^{1-4}: by Wilcoxon test.

Table 2. Amplitude of MEP in the contra- and ipsilateral premotor cortex to the predominant side of motor symptoms in patients with stage II PD, Me (Q1; Q3)

Parameters	Magnetic field induction				P	P^{1-2}	P^{1-3}	P^{1-4}
	1.1 TI[1]	1.32 TI[2]	1.54 TI[3]	1.76 TI[4]				
Amplitude of MEP on the contralateral premotor cortex, mV	0.80 (0.25; 2.12)	1.74 (0.51; 3.62)	2.71 (1.07; 4.08)	2.69 (1.43; 4.13)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Amplitude of MEP on the ipsilateral premotor cortex, mV	0.58 (0.10; 1.61)	1.45 (0.47; 3.13)	2.04 (0.82; 3.52)	2.38 (0.80; 3.93)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

P: according to Friedman test; P^{1-2}, P^{1-3}, P^{1-4}: by Wilcoxon test.

Table 3. Duration of MEP in the contra- and ipsilateral premotor cortex to the predominant side of motor symptoms in patients with stage II PD, Me (Q1; Q3)

Parameters	Magnetic field induction				P	P^{1-2}	P^{1-3}	P^{1-4}
	1.1 TI[1]	1.32 TI[2]	1.54 TI[3]	1.76 TI[4]				
Duration of MEP on the contralateral premotor cortex, ms	13.05 (10.60; 16.50)	16.10 (12.90; 19.20)	17.80 (14.80; 20.80)	20.35 (15.50; 23.30)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Duration of MEP on the ipsilateral premotor cortex, ms	12.95 (10.10; 16.50)	15.40 (12.80; 20.80)	17.75 (13.50; 22.50)	19.50 (14.80; 21.90)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

P: according to Friedman test; P^{1-2}, P^{1-3}, P^{1-4}: by Wilcoxon test.

TI – r = 0.31, P < 0.05). Also positive mild correlation was found between MEP latency in the ipsilateral premotor cortex to the subdominant side of motor symptoms and UPDRS part III total score (1.54 TI – r = 0.22, P < 0.05; 1.76 TI – r = 0.29, P < 0.05). We found mild positive correlation (r = 0.29, P < 0.05) between MEP duration of ipsilateral premotor cortex to the subdominant side of motor symptoms and UPDRS part III total score in sample with 1.54 TI magnetic induction. The MEP latency on the ipsilateral premotor cortex to dominant side positively correlates with Part III Dominant side score in the sample with 1.1 TI magnetic induction (r = 0.21, P < 0.05). The MEP duration on the ipsilateral premotor cortex to the dominant side had positive mild correlation with Part III Subominant side score (1.54 TI – r = 0.25, P < 0.05). Also \positive mild powered correlation was found between MEP duration on the ipsilateral premotor cortex to the subdominant side with Part III Subominant side score in samples with 1.32 TI (r = 0.26, P < 0.05) and 1.54 TI (r = 0.27, P < 0.05) magnetic induction. There were no statistically significant relationships between MEP amplitude and the severity of motor symptoms. It was found that UPDRS total score only correlated with Duration of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the subdominant side of motor symptoms (r = 0.29, P < 0.05).

Based on a comparative analysis using the Kruskal–Wallis test, it was found that groups of patients with different severity of motor symptoms (according to the total score of Part III UPDRS) also had significant differences in the value of MEP latency both in the premotor cortex ipsilateral to Dominant side of motor symptoms (in tests

Table 4. Spearman's correlation coefficient between UPDRS Score and parameters of MEP

Parameters	Magnetic field induction	UPDRS total score	UPDRS Part III total score	UPDRS Part III dominant side score	UPDRS Part III subdominant side score
Latency of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the dominant side of motor symptoms	1.10 TI	0.12	0.34*	0.21*	0.19
	1.32 TI	0.11	0.32*	0.19	0.13
	1.54 TI	0.01	0.17	0.08	0.02
	1.76 TI	0.14	0.31*	0.20	0.16
Latency of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the subdominant side of motor symptoms	1.10 TI	-0.04	0.10	0.00	0.00
	1.32 TI	0.04	0.13	-0.04	-0.02
	1.54 TI	0.08	0.22*	0.06	0.02
	1.76 TI	0.10	0.29*	0.11	0.12
Amplitude of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the dominant side of motor symptoms	1.10 TI	-0.13	-0.15	-0.14	-0.09
	1.32 TI	0.00	-0.11	-0.17	-0.14
	1.54 TI	-0.04	-0.09	-0.16	-0.08
	1.76 TI	-0.02	-0.02	-0.13	-0.13
Amplitude of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the subdominant side of motor symptoms	1.10 TI	0.10	-0.02	-0.05	-0.07
	1.32 TI	0.09	0.08	0.10	0.09
	1.54 TI	0.06	0.02	0.01	0.10
	1.76 TI	0.08	-0.04	-0.05	-0.02
Duration of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the dominant side of motor symptoms	1.10 TI	-0.05	-0.09	-0.08	-0.02
	1.32 TI	0.11	0.12	0.14	0.20
	1.54 TI	0.03	0.13	0.14	0.25*
	1.76 TI	-0.05	0.01	0.01	0.08
Duration of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the subdominant side of motor symptoms	1.10 TI	0.04	-0.03	-0.04	0.01
	1.32 TI	0.12	0.15	0.19	0.26*
	1.54 TI	0.29*	0.27*	0.18	0.27*
	1.76 TI	0.00	0.06	0.03	0.15

*: P < 0.05

Table 5. Motor evoked potential parameters according to the motor symptoms severity using UPDRS Scale Part III Score

Parameters	Magnetic field induction	UPDRS Scale Part III total score			
		<45 points, n = 20	46–50 points, n = 39	>50 points, n = 31	P
Latency of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the dominant side of motor symptoms	1.10 TI	22.10 (21.15; 23.40)	22.75 (21.40; 23.90)	23.20 (22.70; 24.60)	0.005
	1.32 TI	21.70 (20.75; 22.90)	22.60 (21.30; 23.50)	23.10 (22.40; 24.90)	0.008
	1.54 TI	21.85 (21.20; 23.50)	22.50 (21.40; 23.70)	22.80 (21.90; 23.60)	0.331
	1.76 TI	21.45 (20.80; 22.45)	22.45 (21.70; 23.40)	22.80 (22.10; 23.80)	0.012
Latency of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the subdominant side of motor symptoms	1.10 TI	22.50 (21.55; 23.70)	22.30 (21.00; 24.10)	22.50 (21.90; 24.20)	0.490
	1.32 TI	22.55 (21.70; 23.35)	22.25 (21.60; 23.60)	22.90 (22.00; 24.00)	0.388
	1.54 TI	22.00 (20.90; 23.15)	22.50 (20.90; 24.20)	22.90 (22.20; 24.00)	0.135
	1.76 TI	21.85 (21.10; 22.50)	22.35 (20.80; 23.60)	23.10 (21.70; 23.80)	0.027
Amplitude of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the dominant side of motor symptoms	1.10 TI	0.94 (0.28; 2.21)	0.581 (0.097; 1.610)	0.480 (0.085; 1.270)	0.026
	1.32 TI	2.11 (0.77; 3.81)	1.270 (0.299; 2.680)	1.510 (0.417; 3.480)	0.456
	1.54 TI	2.74 (1.77; 3.58)	1.550 (0.623; 3.520)	1.880 (0.483; 4.250)	0.198
	1.76 TI	3.70 (1.33; 4.70)	1.990 (1.000; 2.790)	3.110 (0.600; 4.390)	0.283
Amplitude of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the subdominant side of motor symptoms	1.10 TI	1.70 (0.33; 2.22)	0.614 (0.097; 1.520)	0.841 (0.454; 1.490)	0.144
	1.32 TI	1.64 (0.42; 3.66)	1.435 (0.453; 3.220)	1.920 (0.858; 4.070)	0.216
	1.54 TI	2.69 (1.79; 5.06)	2.170 (0.600; 3.210)	3.320 (1.980; 4.300)	0.521
	1.76 TI	3.56 (2.38; 4.67)	2.200 (0.778; 3.270)	3.160 (2.030; 4.520)	0.055
Duration of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the dominant side of motor symptoms	1.10 TI	13.55 (11.35; 16.40)	12.80 (9.490; 16.90)	12.60 (9.740; 16.70)	0.008
	1.32 TI	15.00 (11.85; 18.90)	15.35 (13.30; 20.00)	17.50 (14.40; 21.40)	0.792
	1.54 TI	16.50 (12.30; 20.65)	18.90 (13.50; 22.80)	18.90 (14.10; 22.70)	0.249
	1.76 TI	18.90 (15.00; 21.70)	20.00 (14.70; 23.90)	19.60 (15.20; 22.60)	0.415
Duration of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the subdominant side of motor symptoms	1.10 TI	12.65 (9.41; 16.80)	13.35 (11.10; 16.50)	12.60 (9.620; 16.10)	0.802
	1.32 TI	14.90 (12.40; 18.10)	16.60 (13.70; 19.00)	17.60 (13.10; 20.10)	0.880
	1.54 TI	15.30 (11.27; 17.35)	19.05 (15.80; 22.10)	20.40 (15.60; 24.20)	0.006
	1.76 TI	20.55 (12.45; 22.20)	20.75 (16.00; 24.10)	20.10 (17.60; 24.00)	0.574

P: according to Kruskal–Wallis test.

Table 6. Motor evoked potential parameters according to the motor symptoms severity on the Dominant side using UPDRS Part III Score

Parameters	Magnetic field induction	UPDRS Part III Dominant Side score		
		≤12 points (n = 56)	>13 points (n = 34)	P
Latency of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the dominant side of motor symptoms	1.10 TI	22.70 (21.50; 23.70)	23.00 (22.00; 24.00)	0.028
	1.32 TI	22.20 (21.20; 23.40)	22.60 (21.60; 23.90)	0.045
	1.54 TI	22.50 (21.50; 23.60)	22.70 (21.50; 23.50)	0.244
	1.76 TI	22.30 (21.20; 23.10)	22.40 (21.60; 23.50)	0.010
Latency of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the subdominant side of motor symptoms	1.10 TI	22.50 (21.70; 24.00)	22.50 (21.50; 24.10)	0.176
	1.32 TI	22.90 (22.00; 24.30)	22.60 (21.60; 23.70)	0.320
	1.54 TI	22.60 (21.70; 24.00)	22.60 (20.90; 23.70)	0.130
	1.76 TI	22.40 (21.40; 23.70)	22.70 (21.40; 23.80)	0.023
Amplitude of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the dominant side of motor symptoms	1.10 TI	0.56 (0.09; 1.60)	0.58 (0.09; 1.91)	0.106
	1.32 TI	1.91 (0.68; 3.14)	0.99 (0.40; 3.02)	0.223
	1.54 TI	2.36 (0.82; 3.73)	1.79 (0.62; 3.52)	0.318
	1.76 TI	2.58 (1.00; 5.11)	2.33 (0.67; 3.73)	0.362
Amplitude of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the subdominant side of motor symptoms	1.10 TI	0.79 (0.19; 2.27)	0.81 (0.27; 1.66)	0.677
	1.32 TI	1.53 (0.45; 3.62)	1.77 (0.69; 3.83)	0.597
	1.54 TI	2.70 (0.63; 4.08)	2.72 (1.17; 4.25)	0.800
	1.76 TI	3.00 (1.41; 4.44)	2.59 (1.48; 3.88)	0.746
Duration of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the dominant side of motor symptoms	1.10 TI	12.90 (10.30; 16.50)	13.00 (9.74; 16.70)	0.294
	1.32 TI	15.00 (12.00; 20.20)	16.20 (13.70; 20.90)	0.161
	1.54 TI	16.60 (12.50; 21.00)	18.90 (14.10; 22.70)	0.371
	1.76 TI	17.60 (14.50; 21.90)	19.60 (15.10; 22.50)	0.686
Duration of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the subdominant side of motor symptoms	1.10 TI	13.20 (11.10; 17.20)	12.60 (10.40; 16.10)	0.829
	1.32 TI	15.10 (12.20; 18.80)	16.30 (13.40; 19.80)	0.285
	1.54 TI	15.70 (12.60; 20.80)	18.90 (15.70; 21.10)	0.203
	1.76 TI	21.00 (11.60; 23.00)	20.10 (16.30; 23.60)	0.671

P: according to Mann–Whitney U test.

with magnetic field induction: 1.1 TI – P = 0.005; 1.32 TI – P = 0.008; 1.76 TI – P = 0.012), and in the premotor cortex ipsilateral to Subdominant side (sample 1.76 TI – P = 0.027). The MEP amplitude in the premotor cortex of the ipsilateral to Dominant side significantly decreased as the severity of motor manifestations increased (sample 1.1 TI – P = 0.026). The duration of the MEP in the premotor cortex ipsilateral to Dominant side significantly decreased with the worsening in severity of motor symptoms (sample 1.1 TI – P = 0.008), while in the premotor cortex ipsilateral to Subdominant side, on the contrary, it significantly increased as the severity of motor symptoms worsened (test 1.54 TI – P = 0.006).

Based on a comparative analysis using the Mann–Whitney test, it was found that patients with a total score of Part III UPDRS for the Dominant side of more than 13 points, had higher MEP latency values of the prefrontal cortex on the ipsilateral to Dominant side (sample 1.1 TI – P = 0.028; 1.32 TI – P = 0.045; 1.76 TI – P = 0.010), and to a lesser extent to the ipsilateral Subdominant side (sample 1.76 TI – P = 0.023) in comparison with patients who had UPDRS Part III Dominant side score 13 points and less (*Table 6*).

Based on a comparative analysis using the Mann–Whitney test, it was found that patients with a total score of Part III UPDRS for the subdominant side of more than 10 points, had higher values of the MEP duration of the prefrontal cortex of the ipsilateral subdominant side (sample 1.54 TI – P = 0.027) in comparison with patients who had a total score of Part III UPDRS for the Subdominant side 10 points and less (*Table 7*).

Discussion

Studies by K. Kolmancic et al. confirmed the change in excitability and plasticity of the sensorimotor cortex of the brain in the early stages of PD [8]. The interhemispheric imbalance and asymmetry of MEP parameters in patients with stage II PD were not found in our investigation. In M. Kojovic and K. Kolmancic researches contraversal results were found: interhemispheric asymmetry of MEP parameters depends, among other reasons, on the sex of the patient [7,8].

Dileone M. et al. analyzed the effect of TMS on CNS excitability depending on pharmacotherapeutic treatment of PD (use of levodopa and dopamine receptor agonists) and used MEP amplitude as a marker of motor cortex response in their studies [5]. Dileone M. et al. indicated that TMS induces dopamine-dependent changes in cortical excitability (increase in the amplitude of MEP) in 13 examined patients with PD [5]. However, the results of our study indicate that the amplitude of the MEP of the premotor cortex didn't correlate with clinical motor symptoms assessed by UPDRS Scale, which does not allow to be used as a diagnostically reliable parameter to assess the effectiveness of TMS therapy in patients with stage II PD. The study by A. Anzak et al. demonstrated the dependence of MEP amplitude on stimulus intensity, which is also consistent with our results on the highest MEP amplitude at the highest induction of magnetic stimulus (1.76 Tl) [1]. Also in the study of S. Casarotto it is noted that levodopa induces an asymmetric increase in motor excitability on the affected side of the brain, but in our investigation it wasn't proved [3].

Dileone M. et al. and Kolmancic K. et al. note in their studies that MEP parameters are useful objective markers of early disease progression that can be used to identify the effectiveness of disease-modified therapy [5,8]. In our study, we relied on the diagnostical significance of the studied data, using the correlation between MEP parameters with expressiveness of motor symptoms assed by UPDRS Scale, and which allowed us to clarify the data and reveal that the severity of motor symptoms, regardless of their lateralization, is more associated with the MEP latency parameter (latency of the ipsilateral premotor cortex to the dominant side of motor symptoms with a total UPDRS score and, to a lesser extent, due to the score of the part III dominant side) which is consistent to the M. Dileone et al. and K. Kolmancic et al. researches [5,8]. This fact is the reason to use the MEP latency as a marker for neurophysiological assessment of the severity of motor manifestations and monitoring the effectiveness of therapy. No significant correlations were found to the amplitude parameter and the severity of clinical symptoms. The mild correlations which were found for the MEP duration with the severity of motor symptoms draw attention, however, a positive-proportional correlation of prefrontal cortical structures ipsilateral to the subdominant side of motor symptoms with a total UPDRS score, the UPDRS motor part III on the subdominant side which also was reflected in M. Dileone et al. and K. Kolmancic et al. investigations [5,8]. It is possible to consider MEP duration as indicators markers for monitoring the progression of PD.

It should be noted that the results of the nonparametric comparative analysis were in complete agreement with the results of the correlation analysis. So, according to our results, the latent period and duration of MEP are reliable and valuable indicators of premotor cortex excitability, which allows us to use these MEP parameters to evaluate the effectiveness of treatment of PD using the method of TMS in our further research.

Table 7. Motor evoked potential parameters according to the motor symptoms severity on the Subominant side using UPDRS Part III Score

Parameters	Magnetic field induction	UPDRS Part III Subominant Side score		
		≤10 points, n = 38	>10 points, n = 52	P
Latency of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the dominant side of motor symptoms	1.10 Tl	22.70 (21.50; 23.50)	23.10 (22.00; 24.40)	0.097
	1.32 Tl	22.30 (21.20; 23.60)	22.60 (21.65; 24.05)	0.323
	1.54 Tl	22.65 (21.50; 23.60)	22.60 (21.55; 23.65)	0.980
	1.76 Tl	22.20 (21.10; 22.90)	22.70 (21.90; 23.65)	0.089
Latency of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the subdominant side of motor symptoms	1.10 Tl	22.40 (21.80; 23.90)	22.50 (21.40; 24.15)	0.806
	1.32 Tl	22.65 (21.90; 23.70)	22.60 (21.60; 23.95)	0.861
	1.54 Tl	22.45 (21.50; 23.50)	22.70 (21.25; 24.15)	0.598
	1.76 Tl	22.10 (21.40; 23.50)	22.80 (21.45; 23.95)	0.256
Amplitude of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the dominant side of motor symptoms	1.10 Tl	0.85 (0.11; 1.95)	0.45 (0.08; 1.50)	0.500
	1.32 Tl	1.85 (0.64; 3.73)	1.27 (0.40; 2.68)	0.222
	1.54 Tl	2.35 (1.01; 3.74)	1.63 (0.48; 3.17)	0.172
	1.76 Tl	2.88 (1.35; 4.29)	2.01 (0.61; 3.69)	0.098
Amplitude of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the subdominant side of motor symptoms	1.10 Tl	0.93 (0.32; 2.05)	0.74 (0.19; 2.43)	0.480
	1.32 Tl	1.64 (0.64; 3.05)	1.76 (0.50; 4.19)	0.576
	1.54 Tl	2.43 (1.53; 3.74)	2.93 (1.00; 4.29)	0.627
	1.76 Tl	2.85 (1.48; 4.12)	2.50 (1.31; 4.19)	0.674
Duration of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the dominant side of motor symptoms	1.10 Tl	13.20 (10.30; 16.50)	12.80 (9.92; 16.60)	0.806
	1.32 Tl	15.30 (12.00; 20.00)	16.05 (14.10; 20.85)	0.387
	1.54 Tl	16.60 (12.00; 19.70)	19.30 (14.15; 22.65)	0.070
	1.76 Tl	19.25 (14.90; 22.00)	19.50 (14.60; 21.80)	0.756
Duration of MEP on the ipsilateral premotor cortex to the subdominant side of motor symptoms	1.10 Tl	12.95 (9.06; 17.50)	13.05 (11.20; 15.40)	0.990
	1.32 Tl	14.90 (12.60; 17.80)	17.65 (13.65; 19.70)	0.068
	1.54 Tl	15.70 (12.60; 20.50)	19.30 (15.70; 21.60)	0.027
	1.76 Tl	20.10 (11.60; 23.20)	20.55 (17.45; 23.50)	0.323

P: according to Mann–Whitney test.

Conclusions

1. The most informative neurophysiological indicators in patients with PD stage II are the MEP latencies. The MEP latencies of the premotor cortex, which is ipsilateral to the side with more pronounced motor symptoms, have a particularly close relationship with UPDRS part III total score in the samples with 1.10–1.76 Tl magnetic inductions ($r = 0.31–0.34$, $P < 0.05$).

2. The MEP duration of premotor cortex, which is ipsilateral to the side with less pronounced motor symptoms, is most closely associated with the severity of motor manifestations on the subdominant side in patients with PD stage II ($r = 0.27$, $P < 0.05$).

Prospects for further research are to study changes in the parameters of the excitability of the premotor cortex in patients with stage II Parkinson's disease during treatment with TMS.

Funding

The study was performed within the research of Zaporizhzhia State Medical University: "Optimization of diagnosis and treatment tactics in patients with Parkinson's disease", state registration No. 0119U100453.

Конфлікт інтересів: відсутній.
Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 10.12.2021
Після доопрацювання / Revised: 14.03.2022
Прийнято до друку / Accepted: 22.03.2022

Information about authors:
Demchenko A. V., MD, PhD, DSc, Associate Professor of the Department of Family Medicine, Therapy, Cardiology and Neurology of FPE, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0002-4296-0902
Aravitska Dzh N., MD, PhD-student of the Department of Family Medicine, Therapy, Cardiology and Neurology of FPE, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0003-0057-0196

Відомості про авторів:
Демченко А. В., д-р мед. наук, доцент каф. сімейної медицини, терапії, кардіології та неврології ФПО, Запорізький державний медичний університет, Україна.
Аравіцька Дж. Н., очна аспірантка каф. сімейної медицини, терапії, кардіології та неврології ФПО, Запорізький державний медичний університет, Україна.

References

[1] Anzak, A., Tan, H., Pogosyan, A., Khan, S., Javed, S., Gill, S. S., Ashkan, K., Akram, H., Foltynie, T., Limousin, P., Zrinzo, L., Green, A. L., Aziz, T., & Brown, P. (2016). Subcortical evoked activity and motor enhancement in Parkinson's disease. *Experimental neurology*, *277*, 19-26. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.12.004

[2] Bologna, M., Guerra, A., Paparella, G., Giordo, L., Alunni Fegatelli, D., Vestri, A. R., Rothwell, J. C., & Berardelli, A. (2018). Neurophysiological correlates of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain*, *141*(8), 2432-2444. https://doi.org/10.1093/brain/awy155

[3] Casarotto, S., Turco, F., Comanducci, A., Perretti, A., Marotta, G., Pezzoli, G., Rosanova, M., & Isaias, I. U. (2019). Excitability of the supplementary motor area in Parkinson's disease depends on subcortical damage. *Brain stimulation*, *12*(1), 152-160. https://doi.org/10.1016/j.brs.2018.10.011

[4] Dagan, M., Herman, T., Mirelman, A., Giladi, N., & Hausdorff, J. M. (2017). The role of the prefrontal cortex in freezing of gait in Parkinson's disease: insights from a deep repetitive transcranial magnetic stimulation exploratory study. *Experimental brain research*, *235*(8), 2463-2472. https://doi.org/10.1007/s00221-017-4981-9

[5] Dileone, M., Carrasco-López, M. C., Segundo-Rodriguez, J. C., Mordillo-Mateos, L., López-Ariztegui, N., Alonso-Frech, F., Catalan-Alonso, M. J., Obeso, J. A., Oliviero, A., & Foffani, G. (2017). Dopamine-dependent changes of cortical excitability induced by transcranial static magnetic field stimulation in Parkinson's disease. *Scientific reports*, *7*(1), 4329. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04254-y

[6] Fisicaro, F., Lanza, G., Cantone, M., Ferri, R., Pennisi, G., Nicoletti, A., Zappia, M., Bella, R., & Pennisi, M. (2020). Clinical and Electrophysiological Hints to TMS in De Novo Patients with Parkinson's Disease and Progressive Supranuclear Palsy. *Journal of personalized medicine*, *10*(4), 274. https://doi.org/10.3390/jpm10040274

[7] Kojovic, M., Kassavetis, P., Bologna, M., Pareés, I., Rubio-Agusti, I., Berardelli, A., Edwards, M. J., Rothwell, J. C., & Bhatia, K. P. (2015). Transcranial magnetic stimulation follow-up study in early Parkinson's disease: A decline in compensation with disease progression?. *Movement disorders*, *30*(8), 1098-1106. https://doi.org/10.1002/mds.26167

[8] Kolmancic, K., Perellón-Alfonso, R., Pirtosek, Z., Rothwell, J. C., Bhatia, K., & Kojovic, M. (2019). Sex differences in Parkinson's disease: A transcranial magnetic stimulation study. *Movement disorders*, *34*(12), 1873-1881. https://doi.org/10.1002/mds.27870

[9] Lee, Y. Y., Li, M. H., Tai, C. H., & Luh, J. J. (2020). Corticomotor Excitability Changes Associated With Freezing of Gait in People With Parkinson Disease. *Frontiers in human neuroscience*, *14*, 190. https://doi.org/10.3389/fnhum.2020.00190

[10] Van den Noort, M., Bosch, P., Yeo, S., & Lim, S. (2015). Transcranial Magnetic Stimulation for Parkinson's Disease. *Movement disorders*, *30*(14), 1973. https://doi.org/10.1002/mds.26439

UDC 616.831:577.15}-092.9-091.8-074/-078
DOI: 10.14739/2310-1237.2022.1.251248

Immunohistochemical study of the brain glutamine synthetase expression in the rat septic model

T. V. Shulyatnikova *A,B,C,D, **V. O. Tumanskyi** A,E,F

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

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

Severe sepsis is accompanied by multiple organ dysfunction where acute liver failure (ALF) plays one of the most critical roles. The principal sign of acute hepatic encephalopathy accompanying ALF is ammonia induced edema of astrocytes. In case of ALF in sepsis, one can suppose increase in systemic and brain ammonia. Astroglia are target cells for ammonia metabolism as they are principal source of glutamine-synthetase (GS). Previous studies have reported that ALF stimulates increase in astroglial GS which correlates with deterioration of the animal state.

The aim of the study was to determine the level of glutamine synthetase expression in different brain regions of rats in the conditions of experimental sepsis.

Materials and methods. The study was conducted in Wistar rats: 5 sham-operated (control) animals and 20 rats with cecum ligation and puncture (CLP) septic model. Immunohistochemical study of GS expression was performed in the cortex, white matter, hippocampus, thalamus, caudate nucleus/putamen in the period of 20–48 h after CLP.

Results. Starting at 12th h after CLP, operated animals displayed progressive impairment finished by profound lethargy and respiratory failure. Between 20–38 h, 9 animals expressed final mentioned symptoms and were euthanized (CLP-B, non-survived), 11 rats displayed less expressed suffering up to 48 h (CLP-A, survived). At 23 h in CLP-B and 48 h in CLP-A rats, liver tissue displayed morphological signs of the focal irreversible damage which was aggravated with time after CLP which could be observed dynamically in non-survived group. Both CLP-A and CLP-B rats showed gradual elevation of GS in all studied brain regions. From 24 to 38 h after CLP, non-survived animals showed significant region-specific dynamic increase in GS expression: in the cortex – by 69.35 %, hippocampus – by 53.6 %, thalamus – by 50.0 %; with the most substantive elevation in the cortex – 1.69-fold increase compared to control.

Conclusions. In CLP model, 24 h after operation there is significant dynamic increase in GS level in the cortical, hippocampal and thalamic regions of the rat brain with the most prominent in the cortex. Heterogeneous increase in GS indicates regions more or less vulnerable for incoming systemic agents as well as region-specific reactiveness of the brain tissue, including local astroglia, to these factors in septic conditions. Morphological signs of sepsis-associated liver damage preceding significant increase in the brain GS by 1 h, might suppose addition of the liver failure to the course of sepsis which is accompanied by increased level of hepatogenic toxins (presumably including ammonia) in the blood and in the brain parenchyma by 23 h after CLP. The latter might propose an active implication of hepatogenic detrimental agents in sepsis pathophysiology and involvement of reactively increased brain GS levels in the complex mechanisms of sepsis-associated encephalopathy.

Key words: sepsis-associated encephalopathy, astroglial reactivity, GS.

Pathologia 2022; 19 (1), 47-52

***E-mail:** shulyatnikova.tv@gmail.com

Імуногістохімічне дослідження експресії глутамінсинтетази в головному мозку щурів в умовах моделі сепсису

Т. В. Шулятнікова, В. О. Туманський

Тяжкий перебіг сепсису супроводжується синдромом поліорганної недостатності, в якому гостра печінкова недостатність (ГПН) відіграє одну з найважливіших ролей. Головна ознака гострої печінкової енцефалопатії, що супроводжує ГПН, – набряк астроцитів, індукований аміаком. У разі розвитку ГПН під час сепсису можна також припустити підвищення рівнів системного та мозкового аміаку. Астроцити – ключові клітини для метаболізму аміаку в мозку, оскільки є основним джерелом глутамінсинтетази (GS). Попередні дослідження показали: ГПН призводить до підвищення рівнів астрогліальної GS, що корелює з погіршенням стану експериментальних тварин.

Мета роботи – визначення рівня експресії глутамінсинтетази в різних відділах мозку щурів в умовах експериментального сепсису.

Матеріали та методи. Дослідження здійснили на щурах лінії Вістар: 5 хибнооперованих (контрольних) і 20 тварин із септичною моделлю перев'язки та пункції сліпої кишки (CLP). Імуногістохімічне дослідження експресії GS виконали в корі, білій речовині, гіпокампі, таламусі, хвостатому ядрі/лушпині в період між 20 і 48 год після CLP.

Результати. Починаючи з 12 години після CLP, у прооперованих тварин спостерігали погіршення стану, що прогресувало. У 9 тварин між 20 і 38 год клінічний перебіг завершився розвитком летаргії та важких респіраторних порушень; вони були евтаназовані – група «тварин,які загинули», CLP-B. В 11 щурів спостерігали менш виражені порушення стану до 48 год – група «тих, які вижили», CLP-A. Через 23 год у щурів групи CLP-B, а також через 48 год у тварин групи CLP-A у тканині печінки виявили морфологічні ознаки вогнищевого незворотного пошкодження, що мало тенденцію до прогресування з часом після CLP-процедури. У CLP-A і CLP-B щурів спостерігали поступове підвищення рівня GS

Ключові слова: сепсис-асоційована енцефалопатія, астрогліальна реактивність, GS.

Патологія. 2022. Т. 19, № 1(54). С. 47-52

у всіх ділянках мозку, що дослідили. Від 24 до 38 год після CLP у групі CLP-B визначили вірогідне регіон-специфічне динамічне збільшення експресії GS: у корі – на 69,35 %, гіпокампі – на 53,6 %, таламусі – на 50,0 %; найістотніше підвищення – в корі, збільшення в 1,69 раза порівняно з контролем.

Висновки. У моделі CLP через 24 години після операції спостерігали вірогідне динамічне підвищення рівня GS у корковій, гіпокампальній і таламічній ділянках мозку щура, найсуттєвіше підвищення – в корі. Гетерогенне підвищення рівнів GS вказує на регіони мозку, що більше чи менше вразливі до системних нейротоксичних чинників, а також підтверджує регіональну специфічність реактивності мозкової тканини, в тому числі місцевої астроглії, до системних впливів в умовах сепсису. Морфологічні ознаки сепсис-асоційованого пошкодження печінки, що на 1 годину передують вірогідному збільшенню GS в мозку, можуть вказувати на приєднання печінкової недостатності до перебігу сепсису з підвищенням рівня гепатогенних токсинів (імовірно, включаючи аміак) у крові та мозковій тканині через 23 години після CLP. Отже, можна припустити активну участь гепатогенних шкідливих молекул у патофізіології сепсису, а також це свідчить про залучення реактивно підвищених рівнів мозкової GS у комплексних механізмах сепсис-асоційованої енцефалопатії.

In 2016, sepsis was defined as a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection [1]. Sepsis-associated encephalopathy (SAE) – is an acute brain dysfunction ranging from delirium to coma and accompanies sepsis in up to 70 % of ICU patients [2].

Mechanisms of SAE are complex and still need to be clarified. Current knowledge about SAE is focused on neurotransmitter imbalance, blood-brain barrier breakdown, neuroinflammation, ischemic focal lesions, excessive/deficient glial reactivity, selective neuronal death, alteration of water homeostasis and brain edema [3]. Severe course of sepsis is often accompanied by multiple organ dysfunction syndrome where acute liver failure (ALF) plays one of the most critical roles [4]. It was evidenced decades ago, that ALF also determines high mortality rates in ICU departments, including patients with sepsis [5]. The principal sign of acute hepatic encephalopathy (AHE) accompanying ALF is ammonia induced cytotoxic edema of astrocytes leading to generalized brain edema-swelling [6]. Astrocytes, the main homeostatic cellular population in the brain, are responsible for constant supporting of all mentioned fundamental processes on physiological level. Representing the most numerous cell population in the brain, in pathological state they might cause deep failure of the tissue homeostasis in diverse spectrum and lead to progressive brain dysfunction [7,8].

In case of SAE astrocytes rapidly became reactive performing heterogeneous morpho-functional phenotypes in region- and time-dependent manner as was shown in our recent study [9]. In case of ALF development in sepsis, one can suppose increase of systemic and brain ammonia levels. Astroglia are the target cells responsible for ammonia metabolism inside the brain as they are the principal cellular pool expressing glutamine-synthetase (GS) – enzyme essential to convert ammonia and glutamate to glutamine [10]. As was shown in our previous yet not published study, in rat acetaminophen-induced acute liver failure (AILF) model there was substantive region- and time-dependent increase in astroglial GS expression which correlated with deterioration of the animal state up to coma in non-survived animals during first 24 hours after acetaminophen overdosing. Considering high heterogeneity of astroglial population through the brain regions in healthy and diseased brain, it seems rational to study characteristic features of GS expression alteration in the same brain regions to estimate astroglial reactiveness in the conditions of severe sepsis model reflecting a similar state in human sepsis.

Aim

The aim was to determine the immunohistochemical level of glutamine synthetase expression in different brain regions of rats in the conditions of experimental sepsis.

Materials and methods

The study was performed in Wistar rats, 200–300 g ("Biomodelservice", Kyiv, Ukraine). All experimental procedures were ruled in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 18 March 1986; ETS No. 123) and the Directive 2010/63/EU. Animals were subjected to the cecal ligation and puncture (CLP) model of sepsis. Rats were divided into 2 groups: CLP group (n = 20) and sham-operated (control) group (n = 5). All further experimental stages were conducted according to previously displayed manner [11].

After CLP-procedure, rats were routinely observed up to 48 h after operation. Beginning from the 12th hour the following clinical signs as periorbital exudation, piloerection, diarrhea, fever/hypothermia, social isolation, deep lethargy and severe respiratory disorders dynamically increased in animals. During the period of 20-38 h after CLP-procedure, 9 rats showed highly expressed mentioned clinical symptoms and were euthanized ("CLP-B" – non-survived/lethal), 11 animals with less expressed symptoms survived until 48 h – end-point of the experiment ("CLP-A" – survived). Sham-operated rats ("CLP-C") showed no lethal outcomes. All animals from CLP-A and CLP-C groups were sacrificed at 48 h after CLP-procedure by intraperitoneal overdosing of sodium thiopental.

Samples of the brain and liver tissue were processed according to standard procedures with formation of paraffin blocks. For general histopathological analysis hematoxylin-eosin stained sections were used. Immunohistochemical (IHC) study involved detection of immunopositive labels using rabbit polyclonal anti-GS primary antibody (Thermo Scientific, USA) and Ultra Vision Quanto Detection imaging system with diaminobenzidine (Thermo Scientific Inc., USA). The results of IHC reaction were assessed at magnification x200 in a standardized field of view (SFV) of the microscope Scope. A1 "Carl Zeiss" (Germany) using Jenoptik Progres Gryphax 60N-C1"1,0x426114 (Germany) camera and the program Videotest-Morphology 5.2.0.158 (Video Test LLC, RF). The expression of GS was assessed as a percentage of the relative area (S rel., %) of immunopositive labels

Table 1. The indicators of GS expression in different brain regions in animals of different experimental groups expressed in the percent of immune-positive labels in the SFV, Me (Q1; Q3)

Brain region	CLP-A	CLP-B	CLP-C
Cortex	4.25 (4.12; 5.25)*	5.25 (4.23; 5.72)*	3.10 (2.56; 3.85)
Subcortical white matter	0.38 (0.29; 1.20)	0.42 (0.32; 1.39)	0.34 (0.27; 0.41)
Hippocampus	1.72 (1.63; 2.03)*	1.92 (1.74; 2.11)*	1.25 (0.72; 1.52)
Thalamus	1.68 (1.53; 2.11)*	1.71 (1.65; 2.25)*	1.14 (0.38; 1.34)
Caudate/putamen	0.97 (0.48; 1,67)	1.04 (0.52; 1.76)	0.92 (0.47; 1.52)

***:** significant differences in indicators compared to control group ($P < 0.05$) are marked with an asterisk; **CLP-A:** survived group; **CLP-B:** non-survived group; **CLP-C:** control.

to the total area of the tissue section in the SFV. For the comparative analysis of the GS expression sensorimotor cortex, subcortical white matter, hippocampus, thalamus and caudate nucleus/putamen regions were selected. Five SFV of each noted region were analyzed for each animal.

Data were statistically processed using Statistica® for Windows 13.0 (StatSoft Inc., license No. JPZ804I382130ARCN10-J) with evaluating median (Me), lower and upper quartiles (Q1; Q3). For data comparison between two and more than two groups, Mann–Whitney and Kruskal–Wallis tests were used. The results were considered significant at 95 % ($P < 0.05$).

Results

Starting from the 12th hour after CLP-procedure, all operated animals displayed progressive impairment in periorbital exudation, piloerection, fever-/hypothermia, diarrhea, social isolation, lethargy, and respiratory impairment. Between 20 and 38 h, 9 animals expressed pronounced mentioned symptoms and were euthanized ("CLP-B"), while 11 rats survived until 48 h of the experiment ("CLP-A"). From 23 h in non-survived, as well as 48 h in survived animals, pathohistological study of the liver tissue revealed signs of spread ballooning degeneration of hepatocytes of presumably centrilobular localization with selective coagulative necrosis of individual hepatocytes, as well as foci of centrilobular necrosis of lobules, neutrophilic infiltration and signs of moderate cholestasis. Mentioned changes were aggravated with time after CLP-procedure in case of non-survived group.

At 24 h control brains showed heterogeneous GS expression among different regions with the highest level in the sensorimotor cortex – 3.10 (2.56; 3.85) % and the lowest in the subcortical white matter region – 0.34 (0.27; 0.41) % (*Table 1*). GS labeling in all brain regions of control animals was predominantly associated with the vascular astroglial endfeet and in the lesser degree was related to parenchymal astrocytic processes (*Fig. 1*).

IHC analyses of all studied brain regions of rats in CLP-A and CLP-B groups revealed enhanced GS staining. In the sensorimotor cortex, GS^+ staining predominantly was related to the superficial first two layers and was associated with perikaryons of hypertrophically changed astrocytic bodies as well as equally distributed over cytoplasm of diverse types of cellular processes. Such distribution led to neuropil diffuse-focal GS^+ staining (*Fig. 2*).

In the CLP animals, the alteration of GS expression was characterized by heterogenous mode among different brain regions. The highest elevation of the GS expression was detected in the cortex and the lowest – in the caudate nucleus/putamen region. Interestingly, both CLP-A and CLP-B animals were noted by significant (compared to control) elevation in GS expression only in the cortex, hippocampus and thalamus, whereas subcortical white matter and caudate/putamen regions showed insignificant rise (*Table 1*). Increased values of GS expression in all studied regions had no significant difference between CLP-A and CLP-B groups ($P > 0.05$), although CLP-B values were higher compared to CLP-A indicators (*Table 1*).

In the CLP-B group, the relative area of GS expression displayed the most prominent increase in the cortex compared to control: 5.25 (4.23; 5.72) % and 3.10 (2.56; 3.85) %, respectively, $P < 0.05$, which was equal to 69.35 % or 1.69-fold increase if compare medians of indicators. At 48 h of the experiment, CLP-A group both showed significant increase in cortical GS expression – 4.25 (4.12; 5.25) % (*Table 1*).

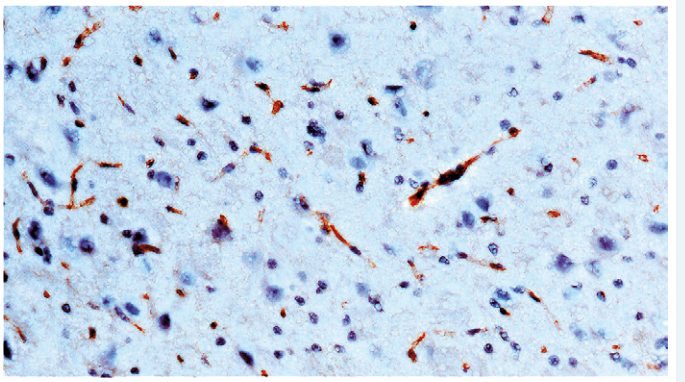


Fig. 1. GS expression in the cortex of the control rat (CLP-C group) 48 h after the sham operation (anti-GS, Thermo Scientific, USA). ×200.

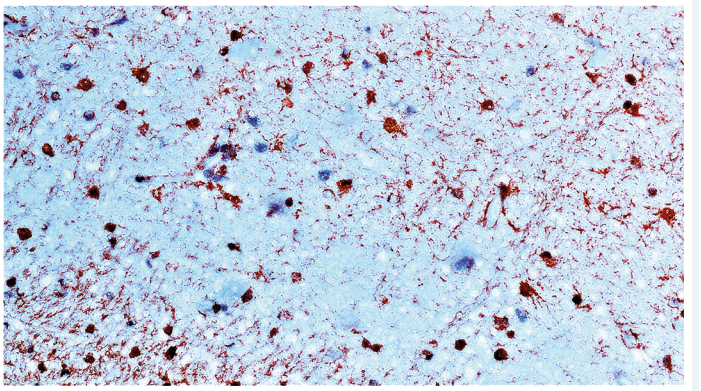


Fig. 2. GS expression in the cortex of the non-survived rat (CLP-B group) 38 h after the CLP procedure (anti-GS, Thermo Scientific, USA). ×200.

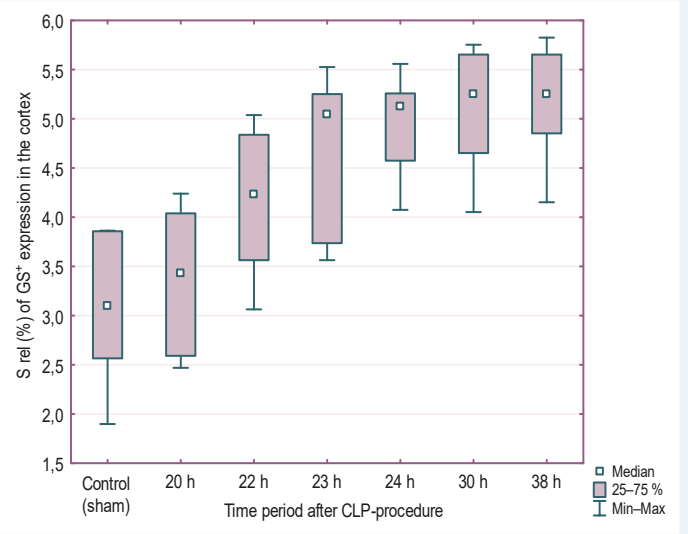


Fig. 3. Dynamics of the GS expression in the cortex of CLP-B rats after CLP-procedure.

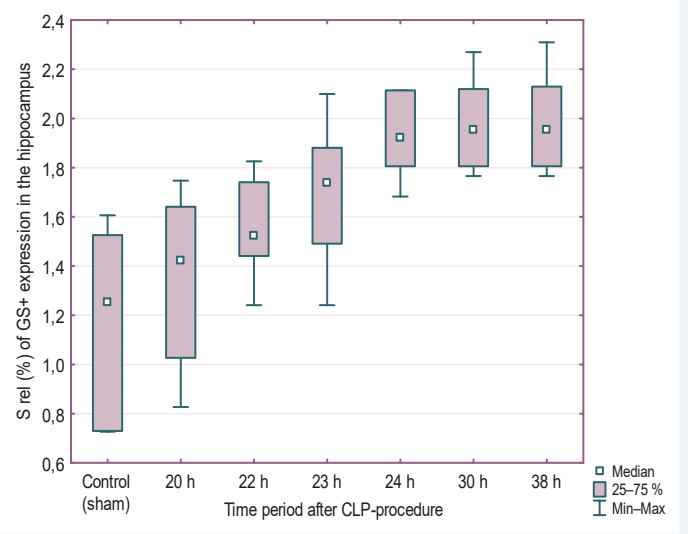


Fig. 4. Dynamics of the GS expression in the hippocampus of CPL-B rats after CLP-procedure.

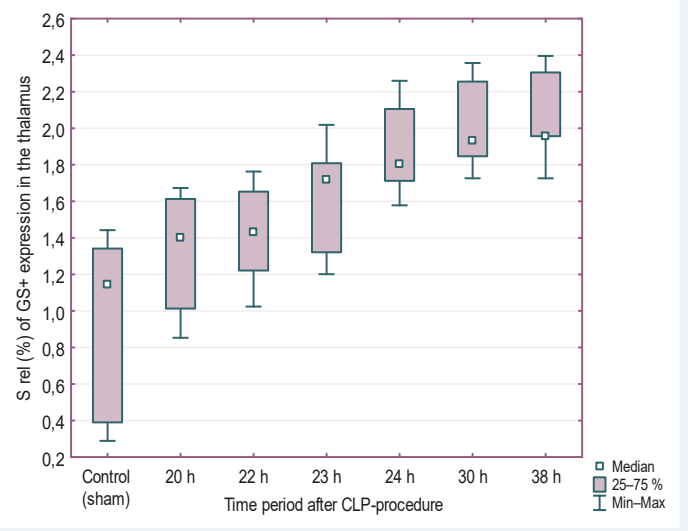


Fig. 5. Dynamics of the GS expression in the thalamus of CLP-B rats after CLP-procedure.

The next highest growth in GS values was revealed in hippocampus and thalamus of CLP-B group: 1.92 (1.74; 2.11) % (1.53-fold or 53.6 % compared medians to control) and 1.71 (1.65; 2.25) % (1.5-fold or 50 % compared to control), respectively. In CLP-A group, hippocampal and thalamic expression also demonstrated significant increase compared to control, however values did not differ from CLP-B group ($P > 0.05$), (*Table 1*).

Less pronounced GS level alteration in CLP-B animals was related to subcortical white matter and caudate/putamen region: 0.42 (0.32; 1.39) % (1.23-fold/23 % compared medians to control) and 1.04 (0.52; 1.76) % (1.13-fold/13.04 % compared medians to control), respectively. Nevertheless, the revealed excess in indicators had no significance compared to control ($P > 0.05$).

From the 20th h after operation, non-survived animals performed dynamic elevation in GS expression in all studied brain regions. Interestingly, the significant increase in indicators was found only in animals died starting from 24 h after CLP-procedure with the maximal values in all studied brain regions at 38 h – the time-point when the last CLP-B animal was euthanized due to decompensated state (*Figs. 3–5*).

In sum, in the postoperative period of CLP-procedure, the highest GS expression was typical for the CLP-B animals in all studied brain regions with the most substantial and significant compared to control elevation in the cortical, hippocampal and thalamic regions. Furthermore, in the latter regions, significant and dynamic rising of GS was revealed only starting from 24 h after CLP-procedure and reached maximum at 38 h.

Discussion

In sepsis, besides the brain damage conditioned by the action of systemic neurotoxins and products of dysregulated immune response, in case of sepsis-associated liver dysfunction development, one can suppose the influence of the additional detrimental factors caused by the failure of detoxifying and other functions of the liver.

Current concepts on pathogenesis of the brain damage in SAE and AHE indicate the presence of similar links in their mechanisms, including neuroinflammation, abnormal glial reactivity, neurotransmitter imbalance, disturbed water metabolism, brain edema, etc. [2,12].

Among sequences of ALF, systemic and brain hyperammonemia have been considered to be principal factors in the mechanisms of acute hepatic encephalopathy. The target cell population in the brain for ammonia exposure are astroglia as they are primarily ones containing glutamine synthetase and metabolize ammonia [10]. Our recent animal studies used CLP model of sepsis and acetaminophen-induced liver failure (AILF) model of ALF, have revealed the early astroglial reactive changes in the cortical, white matter, hippocampal, thalamic and caudate nucleus/putamen regions of the rat brain. In sepsis model, dynamic significant increase in GFAP protein expression in the cortex, white matter and hippocampus was found as early as 20 h after CLP-procedure [9], while in AILF-model, the trend of GFAP alterations was represented by the form of a dynamic downward curve from 16 to 24 h after acetaminophen treatment (yet unpublished data). These

results suggest high and fast responsiveness of astroglia both on systemic inflammatory challenge and on hepatogenic toxemia which demonstrates contrary effects on protein expression.

Studies on GS, another principal player of astroglial metabolism and functions including reactive astrogliosis, have demonstrated in AILF-model pronounced but heterogeneous increase in GS expression in the cortex, white matter, hippocampus, thalamus and caudate/putamen 16 h after acetaminophen treatment and maximal values at 24 h [13]. The latter fact potentially could indicate brain regions more or less permeable for ammonia and other toxic agents as well as heterogeneous sensitivity of different brain regions to damage factors in conditions of ALF. Coincidence of the high GS expression with the period of animal's decompensation might indicate close involvement of high GS levels in the development of AHE.

GS is known to be a central enzyme in the regulation of neurotransmitters glutamate and GABA homeostasis and therefore, supporting functionality of synapses and neuronal circuicity [14]. SAE is characterized by the violation of the neurotransmitter tone in the nervous tissue, leading to pronounced brain dysfunction up to coma state [3]. The present study has demonstrated the dynamic increase in GS expression in the CLP-rat brains with slightly higher rates in the non-survived animals (likewise it was observed in AILF-model of the acute liver failure) [13], although the rise of expression in CLP-study was less significant than in AILF and was significant only 24 h after the procedure. The appearance of morphological signs of focal irreversible liver damage, which preceded significant increase in GS expression by 1 hour, might suppose addition of the liver failure of a certain degree to a course of sepsis with increased levels of hepatogenic toxins (presumably including ammonia) in the blood and directly in the brain parenchyma by 23 h after CLP-procedure.

The highest increase in GS expression in the cortex potentially might indicate the brain region most exposed to detrimental systemic incoming agents, as well as specificity of the local astroglial reactivity in given complex condition. The significant rise in GS expression from 24 to 38 h, demonstrate implication of high levels of GS protein expression in the mechanisms of SAE progression and suppose involvement of hepatogenic detrimental influence among mechanisms of sepsis decompensation. Although, the absence of a significant difference between GS expression values in survived and non-survived animals, as well as positive correlation between GS expression level and animal survival, may indicate that the severity of the putative liver failure is insufficient to significantly influence the mechanisms of thanatogenesis in the CLP-model of sepsis.

Conclusions

1. In the conditions of CLP sepsis, as soon as 24 h after operation, there is significant dynamic increase in GS level in the cortical, hippocampal and thalamic regions of the rat brain with the most prominent in the cortex. Heterogeneous alteration in GS expression potentially indicates zones more or less acceptable for incoming systemic agents as well as region-specific reactiveness of the brain tissue, including local astroglial populations, to these factors in the conditions of sepsis.

2. Revealed morphological signs of sepsis-associated liver damage preceding significant increase in the brain GS by 1 h, might suppose addition of the liver failure of a certain degree to the course of sepsis, which is accompanied by increased level of hepatogenic toxins (presumably including ammonia) in the blood and in the brain tissue by 23 h after CLP. The latter might propose active implication of hepatogenic detrimental agents in sepsis pathophysiology and involvement of reactively increased brain GS levels in the complex mechanisms of SAE.

Prospects for further research. Pathophysiology of SAE still needs further clarifying. Considering growing body of evidence for central role of glial responsibility and/or functional disability in suspected mechanisms, it is highly expected to continue further research in the field of glial reactivity to systemic endotoxic challenge of different origin.

Funding
This study was conducted in the framework of the scientific research work of Zaporizhzhia State Medical University "The morphogenesis of destructive-reparative processes of the brain in the diseases of vascular and toxic-metabolic origin", No. of state registration 0118U004253.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.
Конфлікт інтересів: відсутній.

Надійшла до редакції / Received: 17.01.2022
Після доопрацювання / Revised: 31.01.2022
Прийнято до друку / Accepted: 04.02.2022

Information about authors:
Shulyatnikova T. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0002-0196-9935
Tumanskyi V. O., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Vice-Rector for Research, Zaporizhzhia State Medical University, Honorary Scientist and Engineering Worker of Ukraine.
ORCID ID: 0000-0001-8267-2350

Відомості про авторів:
Шулятнікова Т. В., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медичний університет, Україна.
Туманський В. О., д-р мед. наук, професор каф. патологічної анатомії і судової медицини, проректор з наукової роботи, Запорізький державний медичний університет, заслужений діяч науки і техніки України.

References

[1] Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Coopersmith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J. L., & Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, *315*(8), 801-810. https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287

[2] Mazeraud, A., Righy, C., Bouchereau, E., Benghanem, S., Bozza, F. A., & Sharshar, T. (2020). Septic-Associated Encephalopathy: a Comprehensive Review. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *17*(2), 392-403. https://doi.org/10.1007/s13311-020-00862-1

[3] Chung, H. Y., Wickel, J., Brunkhorst, F. M., & Geis, C. (2020). Sepsis-Associated Encephalopathy: From Delirium to Dementia? *Journal of clinical medicine*, *9*(3), 703. https://doi.org/10.3390/jcm9030703

[4] Woźnica, E. A., Inglot, M., Woźnica, R. K., & Łysenko, L. (2018). Liver dysfunction in sepsis. *Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University*, *27*(4), 547-551. https://doi.org/10.17219/acem/68363

[5] Warrillow, S., & Bellomo, R. (2015). Intensive Care Management of Severe Acute Liver Failure. *Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine 2015*, *2015*, 415-430. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13761-2_30

[6] Liotta, E. M., & Kimberly, W. T. (2020). Cerebral edema and liver disease: Classic perspectives and contemporary hypotheses on mechanism. *Neuroscience letters*, *721*, 134818. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134818

[7] Verkhratsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiological Reviews, 98*, 239-389. https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016

[8] Zorec, R., Županc, T. A., & Verkhratsky, A. (2019). Astrogliopathology in the infectious insults of the brain. *Neuroscience letters*, *689*, 56-62. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.08.003

[9] Shulyatnikova, T., & Tumanskiy, V. (2021). Immunohistochemical analysis of GFAP expression in the experimental sepsis-associated encephalopathy. *Pathologia, 18*(3), 295-302. https://doi.org/10.14739/2310-1237.2021.3.240033.

[10] Zhou, Y., Eid, T., Hassel, B., & Danbolt, N. C. (2020). Novel aspects of glutamine synthetase in ammonia homeostasis. *Neurochemistry international*, *140*, 104809. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104809

[11] Shulyatnikova, T. V., & Shavrin, V. A. (2021). Mobilisation and redistribution of multivesicular bodies to the endfeet of reactive astrocytes in acute endogenous toxic encephalopathies. *Brain research*, *1751*, 147174. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147174

[12] Shulyatnikova, T. V., & Shavrin, V. A. (2017). Modern view on hepatic encephalopathy: basic terms and concepts of pathogenesis. *Pathologia*, *14*(3), 371-380. https://doi.org/10.14739/2310-1237.2017.3.118773

[13] Shulyatnikova, T. & Tumanskiy, V. (2021). Glutamine synthetase expression in the brain during experimental acute liver failure (immunohistochemical study). *Journal of Education, Health and Sport*, *11*(10), 342-356. https://doi.org/10.12775/JEHS.2021.11.10.033

[14] Walls, A. B., Waagepetersen, H. S., Bak, L. K., Schousboe, A., & Sonnewald, U. (2015). The glutamine-glutamate/GABA cycle: function, regional differences in glutamate and GABA production and effects of interference with GABA metabolism. *Neurochemical research*, *40*(2), 402-409. https://doi.org/10.1007/s11064-014-1473-1

УДК 616-018.4-053.31/.32-055.76-073.432.19
DOI: 10.14739/2310-1237.2022.1.252562

Кількісне ультразвукове оцінювання стану кісткової тканини в недоношених новонароджених близнюків

А. Ю. Цимбал*[B,C,D], Ю. В. Котлова[A,E,F]

Запорізький державний медичний університет, Україна

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

Багатоплідна вагітність пов'язана з високим ризиком народження недоношених новонароджених близнюків (ННБ) та формуванням у них зменшеної кісткової маси. Визначення стану кісткової тканини (КТ) після народження важливе для розуміння динаміки її змін у зростанні ННБ.

Мета роботи – проаналізувати результати кількісного ультразвукового оцінювання стану кісткової тканини у ННБ.

Матеріали та методи. Обстежили 24 пари близнюків раннього неонатального віку, а також 39 дітей від одноплідної вагітності (ОВ) в гестаційному віці (ГВ) народження 30–36 тижнів. Залучали пари близнюків з різницею в масі тіла 5 % і більше. Стан КТ визначали ультразвуковим денситометром «Sunlight Omnisense 9000», вимірюючи швидкість проходження ультразвуку (SOS, м/с).

Результати. У ГВ до 34 тижнів формування КТ за SOS у близнюків не відрізнялися ні між собою, ні від новонароджених від ОВ відповідного ГВ. У ННБ, починаючи з 34 тижня гестації та більше, SOS збільшувався ($p < 0,05$) у сибсів із меншою масою тіла проти більших за масою тіла – 2925 (2887; 3036) м/с та 2866 (2801; 2895) м/с відповідно. За кореляційними зв'язками масу тіла ННБ не визначили як суттєвий фактор, що впливав на стан КТ. SOS у ННБ мав слабку позитивну кореляційну залежність ($R = 0,29$, $p < 0,05$) від їхнього ГВ, а в новонароджених від ОВ виявили сильний прямий кореляційний зв'язок ($R = 0,78$, $p < 0,05$).

Серед чинників, що впливали на стан КТ за SOS у ННБ, визначили зворотні середні кореляційні зв'язки з фактором збільшення кількостей вагітностей ($R= -0,59$, $p < 0,05$) та з народженням від монохоріальної багатоплідної вагітності ($R= -0,57$, $p < 0,05$).

Висновки. SOS у дітей, народжених у ГВ 34 тижні та більше, становив 2925 (2887; 3036) м/с у ННБ, менших за масою тіла в парах. Цей показник вищий ($p < 0,05$), ніж у більших за масою тіла сибсів і ННБ, народжених у ГВ менше ніж 34 тижні. SOS у ННБ мав слабкий кореляційний зв'язок ($p < 0,05$) із їхнім ГВ на відміну від дітей, народжених у тому самому ГВ від ОВ, і не мав кореляційного зв'язку з масою тіла близнюків. Виявили середній кореляційний зв'язок ($p < 0,05$) між низьким SOS у ННБ і кількістю попередніх вагітностей, а також із народженням від монохоріальної багатоплідної вагітності.

Ключові слова: недоношені новонароджені, близнюки, ультразвукова денситометрія.

Патологія. 2022. Т. 19, № 1(54). С. 53-57

***E-mail:** annatsimbal26@gmail.com

Quantitative ultrasound assessment of bone tissue in premature newborn twins

A. Yu. Tsymbal, Yu. V. Kotlova

Multiple pregnancy is associated with a high risk premature newborn twins (PNT) birth and the formation of low bone mass. Determining the state of bone tissue (BT) after birth is important for understanding the dynamics of its changes in the PNTs' growth.

Aim: to conduct and analyze the results of quantitative ultrasound assessment of BT in PNT.

Materials and methods. In the early neonatal age, 24 pairs of twins and 39 children from singleton pregnancies (SP) born at gestational age (GA) of 30–36 weeks were examined. Pair of twins with a difference in body weight of 5% or more were involved. BT status was determined with an ultrasonic densitometer "Sunlight Omnisense 9000", measuring SOS, m/s.

Results. In GA up to 34 weeks SOS of BT in both twins did not differ from each other or from newborns from SP of the corresponding GA. In PNT, from 34 weeks of gestation and more, SOS increased ($P < 0.05$) in siblings with lower body weight compared to bigger one – 2925 (2887; 3036) m/s and 2866 (2801; 2895) m/s, respectively. According to correlations, the body weight of PNT was not determined as a significant factor influencing the state of BT. SOS in PNT had a weak positive correlation ($R = 0.29$, $P < 0.05$) with their GA in contrast to the strong direct correlation ($R = 0.78$, $P < 0.05$) in newborns from SP.

Among the factors influencing the state of BT according to SOS in PNT, the inverse correlations with the factor of increasing the number of pregnancies ($R = -0.59$, $P < 0.05$) and with birth from monochorionic multiple pregnancies ($R = -0.57$, $P < 0.05$) were determined.

Conclusions. SOS in children born in GA of 34 weeks and older was 2925 (2887; 3036) m/s in PNT with lower body weight in pairs. This value was higher ($P < 0.05$) than in bigger siblings and PNT born in GA less than 34 weeks. SOS in PNT had a weak correlation ($P < 0.05$) with their GA in contrast to children born in the same GA from SP and had no correlation with the body weight of twins. The average correlation ($P < 0.05$) between low SOS in PNT and the number of previous pregnancies, as well as with birth from monochorionic multiple pregnancies.

Key words: premature infants, twins, ultrasonic densitometry.

Pathologia 2022; 19 (1), 53-57

В останні десятиліття майже вдвічі збільшилася поширеність багатоплідних вагітностей, що становить 3–4 % від усіх вагітностей завдяки розвитку допоміжних репродуктивних технологій і, ймовірно, пізнього материнства [1,2,4]. Порівняно з одноплідною вагітністю багатоплідна пов'язана з істотно вищим ризиком недоношеності, а отже несприятливими перинатальними результатами, що пов'язані з недоношеністю, як-от із розвитком остеопенії в передчасно народжених дітей [3,5].

У науковій літературі висвітлено закономірності формування кісткової маси у недоношених новонароджених. Виявили, що збільшення кісткової маси прямо пропорційне лінійному збільшенню маси тіла плода зі збільшенням терміну гестації [6–8]. Але немає достатньо наукових даних щодо формування кісткової маси в передчасно народжених дітей при багатоплідних вагітностях, хоча саме у таких сибсів можна очікувати особливості мінералізації кісток і у зв'язку з передчасним народженням, і внаслідок внутрішньоутробного формування кількох організмів одночасно.

Мета роботи

Проаналізувати результати кількісного ультразвукового оцінювання стану кісткової тканини у недоношених новонароджених близнюків.

Матеріали і методи дослідження

Когортне дослідження здійснили на базі КНП «Обласний перинатальний центр» ЗОР (м. Запоріжжя) у відділеннях реанімації та інтенсивної терапії новонароджених, постінтенсивного догляду та виходжування новонароджених у січні – грудні 2020 р.

Публікація матеріалів погоджена Комісією з біоетики Запорізького державного медичного університету. Дослідження здійснили після отримання письмової інформативної згоди батьків пацієнта та відповідно до принципів Гельсінської декларації.

У дослідження залучали недоношених дітей у гестаційному віці 30–36 тижнів, народжених від багато- та одноплідної вагітності, різниця маси між сибсами в парах близнюків – більша за 5 %; обов'язкова наявність письмової згоди батьків пацієнта на участь.

Критерії виключення – ЗВУР у плода, народження в терміні 37 тижнів і більше, вади розвитку, судомний синдром, діагностовані патології ендокринних залоз, захворювання печінки, гіпербілірубінемія понад 200 мкмоль/л, НЕК, синдром мальабсорбції, наявність в анамнезі матерів захворювань опорно-кісткового апарату, ендокринопатій, автоімунних захворювань; незгода батьків пацієнта брати участь у дослідженні з будь-якої причини.

Загалом у дослідження залучили 87 передчасно народжених дітей неонатального віку: 24 пари передчасно народжених близнюків (n = 48) (67 % дівчат і 33 % хлопців) і 39 дітей від одноплідних вагітностей (43 % дівчат і 57 % хлопців).

У групу А включили 10 пар близнюків (20 дітей), які народжені в гестаційному віці менше ніж 34 тижні (32 (31; 33) тижні). Новонароджені з меншою масою тіла (1750 (1370; 1860) г) сформували групу А-1, з більшою масою (1880 (1800; 1970) г) – групу А-2.

У групу В залучили 14 пар близнюків (28 дітей) із гестаційним віком ≥34 тижні (35 (34; 36) тижнів). Дітей із меншою масою тіла з-поміж двох близнюків (1970 (1880; 2200) г) включили в групу В-1, дітей із більшою масою (2315 (2070; 2530) г) – у групу В-2.

У групу С (група порівняння) включили 39 передчасно народжених дітей від одноплідних вагітностей. Групу СА сформували 19 новонароджених із гестаційним віком <34 тижні (32 (31; 33) тижні), народжені з масою тіла 1600 (1300; 1820) г; групу СВ (n = 20) – діти, народжені в гестаційному віці ≥34 тижні (35 (34; 36) тижнів), маса тіла – 2280 (1800; 2600) г.

Антропометричні показники розвитку оцінювали одразу після народження за таблицями T. R. Fenton, J. H. Kim (2013) [9].

Усі діти групи А (100 %) народжені від других і більше пологів, вік більшості матерів (n = 7, 70 %) – понад 31 рік. У групі В 7 (50 %) пар близнюків народжені від других пологів, вік більшості матерів (n = 8, 57 %) не перевищував 30 років (p > 0,05). Розвиток монохоріальних багатоплідних вагітностей спостерігали у 6 (60 %) жінок групи А та 10 (71 %) осіб групи В (p > 0,05). Екстрагенітальні патології (хронічні захворювання серцево-судинної системи, шлунково-кишкового тракту, ЛОР-органів) діагностували в матерів і групи А (40 %), і групи В (64 %), гестози діагностували в 50 % матерів груп А та В (p > 0,05).

Кількісне ультразвукове оцінювання стану кісткової тканини у недоношених новонароджених близнюків здійснювали за показником швидкості проходження ультразвуку (SOS, м/с) через діафіз великогомілкової кістки. Ультразвуковий зонд CS (контактна поверхня 2,5 × 1,0 см) сонометра «Sunlight Omnisense 9000» (Ізраїль), який затверджений FDA США та сертифікований для використання в Україні (UA 1.001.020758-19), розташовували на медіальному боці середньої частини діафізу великогомілкової кістки. Використовували абсолютне значення SOS (м/с). Дослідження здійснили в перші 7 діб життя для отримання вимірювань, максимально наближених до внутрішньоутробної мінералізації кістки, що найменше змінені післяпологовим впливом харчування та/або хвороби.

Результати статистично опрацювали за допомогою програмного забезпечення Statistica 13.0 (StatSoft Inc., № JPZ804I382130ARCN10-J). Після перевірки на відповідність закону нормального розподілу Гауса за критерієм Шапіро–Вілка використали непараметричні методи: описові (числові дані наведені як медіана (Me), межі квартильних відрізків (Q25 %; Q75%), категоріальні змінні – як абсолютна кількість випадків (n) у групі та частота у відсотках (%)), порівняння кількісних ознак у непов'язаних вибірках здійснили за допомогою критерію Манна–Вітні (U-Test), оцінювання взаємозв'язків між показниками – методом рангової кореляції Спірмена (R). Зв'язок між двома параметрами оцінювали як сильний при R, що перевищував 0,7, середній – 0,3–0,7, слабкий – 0,2–0,3. Статистично значуща різниця – при p < 0,05.

Результати

Показники швидкості ультразвуку в передчасно народжених дітей наведені на *рис. 1*.

У новонароджених групи А встановили кількісні показники SOS, що не мали статистично значущої різниці ($p > 0,05$) ні між сибсами груп А1 (2836 (2697; 2908) м/с) і А2 (2804 (2731; 2898) м/с), ні між ними та групою порівняння СА (2797 (2713; 2845) м/с).

У сибсів групи В визначили статистично значущу відмінність ($p < 0,05$) кількісного показника SOS у дітей груп В1 (2925 (2887; 3036) м/с) і В2 (2866 (2801; 2895) м/с) на 59 м/с, тобто швидкість проходження ультразвуку через діафіз великогомілкової кістки у дітей меншої маси тіла (група В1) більша, ніж у сибсів із більшою масою тіла при народженні. Водночас кількісний показник SOS у близнюків із меншою масою тіла при народженні (група В1) не мав статистично значущих відмінностей ($p > 0,05$) від показника SOS групи порівняння СВ (2979 (2898; 3000) м/с). Кількісний показник SOS у сибсів більшої маси із пар близнюків (група В2) статистично значущо нижчий ($p < 0,05$), ніж у дітей відповідного гестаційного віку від одноплідних вагітностей (група СВ), не мав статистично значущих відмінностей ($p > 0,05$) від менших за гестаційним віком при народженні малюків від одноплідних вагітностей (група СА).

У дітей-сибсів (групи А та В) визначили слабку статистично значущу кореляційну залежність ($R = 0,29$, $p < 0,05$) кількісного показника SOS від гестаційного віку народження недоношених дітей. У новонароджених груп порівняння (СА та СВ) залежність SOS від гестаційного віку мала сильний прямий статистично значущий кореляційний зв'язок ($R = 0,78$, $p < 0,05$). У них виявили також середній прямий кореляційний зв'язок ($R = 0,53$, $p < 0,05$) між кількісним показником SOS і масою тіла при народженні. Тому аналізували залежність кількісних показників SOS у новонароджених близнюків від маси тіла сибсів при народженні. В жодній із груп близнюків (А1, А2, В1, В2) не виявили значущі кореляційні залежності між кількісним показником SOS і масою тіла дітей ($R < 0,2$, $p > 0,05$).

Проаналізували особливості пренатального розвитку недоношених новонароджених близнюків. Визначили статистично значущі середні кореляційні зв'язки між низькими кількісними показниками SOS і народженням дітей від монохоріальних багатоплідних вагітностей у групі А ($R = -0,57$, $p < 0,05$), між зниженими кількісними показниками SOS і народженням дітей від другої та наступних вагітностей – для немовлят групи В ($R = -0,59$, $p < 0,05$).

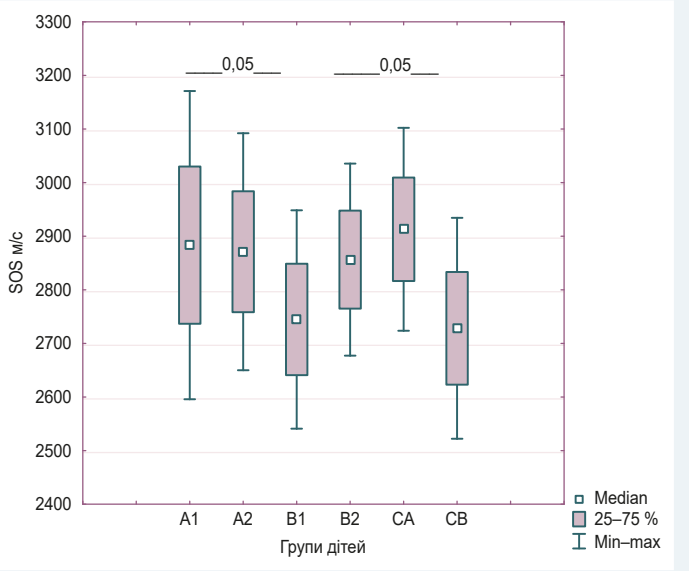


Рис. 1. Порівняння показників швидкості проходження ультразвуку через діафіз великогомілкової кістки в недоношених новонароджених.

Обговорення

За даними наукової літератури, внутрішньоутробний процес нарощування кісткової маси в плода спостерігають з третього триместру вагітності [10–12]. Недоношені діти позбавлені періоду накопичення мінеральних складових для кісток. Після народження малюки мають період «навздогінного» зростання з підвищеними потребами в використанні мінеральних компонентів і водночас відмінний від внутрішньоутробного шлях надходження мінеральних і поживних речовин, непритаманний природному для цього гестаційного віку, тому малюки схильні до розвитку остеопенічних станів від деформації кісток черепа, грудної клітки до переломів трубчатих кісток навіть у неонатальному періоді [10–12]. Коли ж передчасно народжені діти народжуються від багатоплідної вагітності, то ризики змін формування кісткової тканини непередбачувані [13], тому визначення стартових показників кісткової маси при народженні у близнюків є особливо важливим.

За результатами досліджень M. S. Fewtrell et al., процес формування кісткової маси у передчасно народжених дітей прямопропорційно пов'язаний із гестаційним віком [15]. У результаті нашої роботи підтверджено факт кореляційної залежності кількісного показника SOS у недоношених новонароджених від терміну гестації та характеристики плідності вагітності. Сильний кореляційний зв'язок спостерігали при одноплідній вагітності на відміну від багатоплідної, коли виявили слабку кореляцію між терміном гестації при народженні та показниками SOS; найімовірніше, це зумовлено одночасним остеогенезом плодів.

Виявили також певні особливості формування кісткової маси в дітей від багатоплідної вагітності, народжених у різному гестаційному віці.

У близнюків, народжених у термін до 34 тижнів вагітності, швидкість проходження ультразвуку через діафіз великогомілкової кістки статистично вірогідно не відрізнялася ($p > 0,05$) ні між сибсами, включеними в різні групи залежно від маси тіла при народженні, ні між близнюками та новонародженими відповідного гестаційного віку від одноплідних вагітностей. Зіставні висновки зробили Semra Kara et al., які також визначили: в близнюків у гестаційному віці до 34 тижнів маса тіла при народженні не є значущим фактором, що впливає на кількісний показник SOS [14]. Такі закономірності, імовірно, показують фізіологічний процес внутрішньоутробного формування кісткової маси – повільний темп формування кісткової маси плодів у терміні вагітності до 34 тижнів гестації.

Зі збільшенням терміну внутрішньоутробного розвитку після 34 тижнів гестації кількісний показник SOS статистично вірогідно ($p < 0,05$) вищий, найбільший – у сибсів із меншою масою тіла в парах близнюків; цей показник дорівнював даним новонароджених аналогічного гестаційного віку від одноплідних вагітностей. Після 34 тижнів внутрішньоутробного розвитку у більших за масою тіла дітей із пар близнюків кількісний показник SOS був меншим, ніж у їхніх сибсів, статистично вірогідно не відрізнявся ($p < 0,05$) від показників дітей меншого гестаційного віку, народжених від одноплідної вагітності (група порівняння СА).

Отже, у недоношених новонароджених близнюків визначили різні терміни та темпи формування кісткової маси: починаючи з 34 тижня гестації, у більших за масою дітей із пар близнюків кісткоутворення ставало менш інтенсивним, ніж у менших за масою сибсів. Формування кісткової маси в умовах рівномірного надходження мінеральних речовин із плацентарного кровообігу було ефективнішим у менших за масою тіла дітей із пар близнюків. Саме термін вагітності зумовлював у них більш інтенсивний етап формування кісткової маси.

Більшість науковців, спостерігаючи за формуванням кісткової маси в недоношених дітей, котрі народжені від одноплідних вагітностей, виявили прямі кореляційні зв'язки, асоційовані зі збільшенням маси тіла плодів [6–8]. У нашому дослідженні не виявили значущі кореляційні зв'язки між швидкістю поширення ультразвуку в кістковій тканині великої гомілки та масою тіла саме близнюків. У дітей від одноплідних вагітностей також встановили середні прямі статистично значущі кореляційні зв'язки ($p < 0,05$). Отже, масу тіла при народженні не визначили як істотний фактор, що впливав на внутрішньоутробну мінералізацію кістки у дітей-близнюків.

На процес гальмування формування кісткової тканини у новонароджених впливають фактори внутрішньоутробного розвитку плода, стан здоров'я матері перед і під час вагітності. За даними Semra Kara et al., які досліджували близнюків, найбільш впливовим є факт застосування наркотичних засобів матір'ю під час вагітності [14]. За результатами кореляційного аналізу в нашій когорті дітей-близнюків, нижчі показники швидкості проходження ультразвуку спостерігали при збільшенні кількості попередніх вагітностей у матерів і народження від монохоріальної багатоплідної вагітності. На наш погляд, це може бути зумовлено фетоплацентарними особливостями надходження кальцію та зменшенням його депо в матері, що пов'язано з попередніми вагітностями.

Висновки

1. Кількісний показник SOS у дітей, народжених у ГВ 34 тижні та більше, становив 2925 (2887; 3036) м/с у близнюків, менших за масою тіла в парах, і статистично вірогідно ($p < 0,05$) не відрізнявся від дітей групи порівняння. Цей показник статистично значущо вищий ($p < 0,05$), ніж у більших за масою тіла сибсів відповідного гестаційного віку та близнюків, народжених у ГВ менше ніж 34 тижні.

2. Кількісний показник SOS у недоношених дітей-близнюків мав слабкий статистично значущий кореляційний зв'язок ($R = 0,29$, $p < 0,05$) із терміном гестації при народженні, на відміну від дітей, народжених від одноплідної вагітності ($R = 0,78$, $p < 0,05$), не мав кореляційного зв'язку з масою тіла близнюків при народженні, на відміну від дітей, народжених від одноплідної вагітності ($R = 0,53$, $p < 0,05$).

3. Встановили статистично значущий середній кореляційний зв'язок між низькими кількісними показниками SOS у недоношених новонароджених близнюків і кількістю попередніх вагітностей у матері ($R = -0,57$, $p < 0,05$), а також із народженням дітей від монохоріальної багатоплідної вагітності ($R = -0,59$, $p < 0,05$).

Перспективи подальших досліджень. Отже, науковий пошук і висвітлення особливостей формування кісткової тканини при багатоплідній вагітності, особливо в разі передчасних пологів, – описова складова в розумінні процесів формування кісткової тканини в недоношених новонароджених близнюків, підготовка до виявлення та профілактики в них метаболічних порушень кісткової тканини. Це проблема потребує продовження вивчення.

Фінансування
Дослідження виконане в рамках НДР Запорізького державного медичного університету «Оптимізація ранньої діагностики остеопенії та оцінювання ризиків її прогресування у передчасно народжених дітей», № держреєстрації 0120U101143.

Конфлікт інтересів: відсутній.
Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 08.02.2022
Після доопрацювання / Revised: 11.03.2022
Прийнято до друку / Accepted: 30.03.2022

Відомості про авторів:
Цимбал А. Ю., очний аспірант каф. дитячих хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0002-6125-2776
Котлова Ю. В., канд. мед. наук, доцент каф. дитячих хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0003-2202-0873

Information about authors:
Tsymbal A. Yu., PhD student of the Department of Pediatric Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
Kotlova Yu. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pediatric Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Список літератури

[1] Births: Final Data for 2018 / J. A. Martin, B. E. Hamilton, M. Osterman, A. K. Driscoll. National vital statistics reports : from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System, 2019. Vol. 68, Iss. 13. P. 1-47.
[2] Ткаченко А. В. Порівняльний аналіз перебігу вагітності, пологів і стану новонароджених при двійнях з монохоріальним типом плацентації. Здоровье женщины. 2019. № 4. С. 46-49. https://doi.org/10.15574/hw.2019.140.46
[3] The impact of fetal gender on prematurity in dichorionic twin gestations after in vitro fertilization / A. Weghofer, K. Klein, M. Stammler-Safar et al. Reproductive Biology and Endocrinology. 2010. Vol. 8. P. 57. https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-57

[4] Intrauterine growth restriction and congenital malformations: a retrospective epidemiological study / G. Puccio, M. Giuffré, M. Piccione et al. Italian Journal of Pediatrics. 2013. Vol. 39, Iss. 1. P. 23. https://doi.org/10.1186/1824-7288-39-23
[5] Tong L., Gopal-Kothandapani J. S., Offiah A. C. Feasibility of quantitative ultrasonography for the detection of metabolic bone disease in preterm infants – systematic review. Pediatric Radiology. 2018. Vol. 48, Iss. 11. P. 1537-1549. https://doi.org/10.1007/s00247-018-4161-5
[6] Mihatsch W., Thome U., Saenz de Pipaon M. Update on Calcium and Phosphorus Requirements of Preterm Infants and Recommendations for Enteral Mineral Intake. Nutrients. 2021. Vol. 13, Iss. 5. P. 1470. https://doi.org/10.3390/nu13051470
[7] Developmental outcomes in small for gestational age twins using a singleton versus twin birthweight reference in Upstate KIDS / J. L. Gleason, E. Yeung, R. Sundaram et al. American Journal of Obstetrics & Gynecology MFM. 2021. Vol. 3, Iss. 6. P. 100465. https://doi.org/10.1016/j.ajogmf.2021.100465
[8] Dichorionic twin trajectories: the NICHD Fetal Growth Studies / K. L. Grantz, J. Grewal, P. S. Albert et al. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2016. Vol. 215, Iss. 2. P. 221.e1-221.e16. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.04.044
[9] Fenton T. R., Kim J. H. A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants. BMC pediatrics. 2013. Vol. 13. P. 59. https://doi.org/10.1186/1471-2431-13-59
[10] Early life vitamin D depletion alters the postnatal response to skeletal loading in growing and mature bone / S. A. Borg, H. Buckley, R. Owen et al. PloS one. 2018. Vol. 13, Iss. 1. P. e0190675. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190675
[11] Intrauterine Growth Restriction in Twin Pregnancies: Incidence and Associated Risk Factors / N. Fox, A. Rebarber, C. Klauser et al. American Journal of Perinatology. 2010. Vol. 28, Iss. 04. P. 267–272. https://doi.org/10.1055/s-0030-1270116
[12] Diagnostic accuracy of ultrasound in predicting birth-weight discordance in twin pregnancy: systematic review and meta-analysis / M. Leombroni, M. Liberati, F. Fanfani et al. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology. 2017. Vol. 50, Iss. 4. P. 442-450. https://doi.org/10.1002/uog.17348
[13] Determinants of bone mineral density through quantitative ultrasound screening of healthy children visiting ambulatory paediatric clinics / A. E. Al-Agha, Y. O. Kabli, M. G. AlBeiruty, A. A. Milyani. Saudi Medical Journal. 2019. Vol. 40, Iss. 6. P. 560-567. https://doi.org/10.15537/smj.2019.6.24234
[14] Evaluation of bone metabolism in newborn twins using quantitative ultrasound and biochemical parameters / S. Kara, N. Güzoğlu, E. Göçer et al. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. 2015. Vol. 29, Iss. 6. P. 944-948. https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1025743
[15] Quantitative ultrasound (QUS): a useful tool for monitoring bone health in preterm infants? / M. S. Fewtrell, K. L. Loh, S. Chomtho et al. Acta Paediatrica. 2008. Vol. 97, Iss. 12. P. 1625-1630. https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.00992.x

References

[1] Martin, J. A., Hamilton, B. E., Osterman, M., & Driscoll, A. K. (2019). Births: Final Data for 2018. National vital statistics reports : from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System, 68(13), 1-47.
[2] Tkachenko, A. (2019). Porivnialnyi analiz perebihu vahitnosti, polohiv i stanu novonarodzhenykh pry dviiniakh z monokhorialnym typom platsentatsii [Comparative analysis of the pregnancy, labour and condition of newborn twins with monochorionic type of placentation]. Zdorov'e zhenshchiny – Health of woman, (4), 46-49. https://doi.org/10.15574/hw.2019.140.46
[3] Weghofer, A., Klein, K., Stammler-Safar, M., Worda, C., Barad, D., Husslein, P., & Gleicher, N. (2010). The impact of fetal gender on prematurity in dichorionic twin gestations after in vitro fertilization. Reproductive Biology and Endocrinology, 8(1), 57. https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-57
[4] Puccio, G., Giuffré, M., Piccione, M., Piro, E., Rinaudo, G., & Corsello, G. (2013). Intrauterine growth restriction and congenital malformations: a retrospective epidemiological study. Italian Journal of Pediatrics, 39(1), 23. https://doi.org/10.1186/1824-7288-39-23
[5] Tong, L., Gopal-Kothandapani, J., & Offiah, A. (2018). Feasibility of quantitative ultrasonography for the detection of metabolic bone disease in preterm infants – systematic review. Pediatric Radiology, 48(11), 1537-1549. https://doi.org/10.1007/s00247-018-4161-5
[6] Mihatsch, W., Thome, U., & Saenz de Pipaon, M. (2021). Update on Calcium and Phosphorus Requirements of Preterm Infants and Recommendations for Enteral Mineral Intake. Nutrients, 13(5), 1470. https://doi.org/10.3390/nu13051470
[7] Gleason, J. L., Yeung, E., Sundaram, R., Mendola, P., Bell, E. M., Vafai, Y., Robinson, S. L., Putnick, D. L., & Grantz, K. L. (2021). Developmental outcomes in small-for-gestational age twins using a singleton vs twin birthweight reference. American journal of obstetrics & gynecology MFM, 3(6), 100465. https://doi.org/10.1016/j.ajogmf.2021.100465
[8] Grantz, K. L., Grewal, J., Albert, P. S., Wapner, R., D'Alton, M. E., Sciscione, A., Grobman, W. A., Wing, D. A., Owen, J., Newman, R. B., Chien, E. K., Gore-Langton, R. E., Kim, S., Zhang, C., Buck Louis, G. M., & Hediger, M. L. (2016). Dichorionic twin trajectories: the NICHD Fetal Growth Studies. American journal of obstetrics and gynecology, 215(2), 221.e1-221.e16. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.04.044
[9] Fenton, T. R., & Kim, J. H. (2013). A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants. BMC pediatrics, 13, 59. https://doi.org/10.1186/1471-2431-13-59
[10] Borg, S. A., Buckley, H., Owen, R., Marin, A. C., Lu, Y., Eyles, D., Lacroix, D., Reilly, G. C., Skerry, T. M., & Bishop, N. J. (2018). Early life vitamin D depletion alters the postnatal response to skeletal loading in growing and mature bone. PloS one, 13(1), e0190675. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190675
[11] Fox, N., Rebarber, A., Klauser, C., Roman, A., & Saltzman, D. (2010). Intrauterine Growth Restriction in Twin Pregnancies: Incidence and Associated Risk Factors. American Journal Of Perinatology, 28(04), 267-272. https://doi.org/10.1055/s-0030-1270116
[12] Leombroni, M., Liberati, M., Fanfani, F., Pagani, G., Familiari, A., Buca, D., Manzoli, L., Scambia, G., Rizzo, G., & D'Antonio, F. (2017). Diagnostic accuracy of ultrasound in predicting birth-weight discordance in twin pregnancy: systematic review and meta-analysis. Ultrasound in obstetrics & gynecology, 50(4), 442-450. https://doi.org/10.1002/uog.17348
[13] Al-Agha, A. E., Kabli, Y. O., AlBeiruty, M. G., & Milyani, A. A. (2019). Determinants of bone mineral density through quantitative ultrasound screening of healthy children visiting ambulatory paediatric clinics. Saudi medical journal, 40(6), 560-567. https://doi.org/10.15537/smj.2019.6.24234
[14] Kara, S., Güzoğlu, N., Göçer, E., Arıkan, F. I., Dilmen, U., & Dallar Bilge, Y. (2016). Evaluation of bone metabolism in newborn twins using quantitative ultrasound and biochemical parameters. The journal of maternal-fetal & neonatal medicine, 29(6), 944-948. https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1025743
[15] Fewtrell, M. S., Loh, K. L., Chomtho, S., Kennedy, K., Hawdon, J., & Khakoo, A. (2008). Quantitative ultrasound (QUS): a useful tool for monitoring bone health in preterm infants?. Acta paediatrica, 97(12), 1625-1630. https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.00992.x

UDC 616.333-008.6-06:616.333-007.43]-072.1
DOI: 10.14739/2310-1237.2022.1.252191

Endoscopic signs of gastroesophageal reflux disease with different hiatal hernias types

A. O. Nykonenko[E,F], **Ye. I. Haidarzhi***[A–F], **O. M. Kiosov**[A,B,C,E,F]

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

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

Key words: gastroesophageal reflux disease, hiatal hernia, endoscopy digestive system.

Pathologia 2022; 19 (1), С. 58-64

***E-mail:** eig1981@yahoo.com

A hiatal hernia occurs in 83–94 % of patients with gastroesophageal reflux disease (GERD). Difficulties in diagnosing endoscopic signs of gastroesophageal reflux with combination of the most common hiatal hernia types remain relevant. Untimely and inaccurate endoscopic interpretation of these pathological changes significantly reduces the effectiveness of treatment.

The aim of the research was to study the endoscopic signs of gastroesophageal reflux disease with the most common hiatal hernia type I and type III.

Materials and methods. The examination results of 153 patients with GERD and the most common hiatal hernia type I and type III at the stage of preparation for antireflux surgical treatment were analyzed. The age was 54.5 ± 11.3, there were 48 (31.4 %) men, 105 (68.6 %) women. In Group I – 85 patients with GERD and type I hiatal hernia, in Group II – 68 patients with GERD and type III hiatal hernia. A complete preoperative examination necessarily included endoscopy with chromoendoscopy (mainly NBI or FICE), biopsy from suspicious foci of the gastric mucosa and the lower third of the esophagus followed by histological analysis. Statistical processing and mathematical analysis of the obtained results were performed using the Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., No. JPZ804I382130ARCN10-J). For comparative analysis the arithmetic mean and standard deviation were calculated and presented as M ± s. Differences between groups were assessed using the sub-module "Difference tests" in the module "Basic statistics and tables". Differences at $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results. In both groups, non-erosive forms of gastroesophageal reflux disease prevailed: 57 (67.1 %) and 39 (57.4 %) patients respectively. Both in Groups I and II, among the erosive forms there were mainly LA A stages of esophagitis – 20 (23.5 %) and 17 (25.0 %). CLE signs of the esophageal mucosa prevailed in Group I – 16 (18.8 %) patients, in Group II – 5 (7.4 %) patients. The proximal edges of the gastric folds, which are visualized in all patients, were considered the reference point for the true esophageal-gastric junction. Complicated course of GERD was noted in both groups of patients.

Conclusions. Endoscopic signs of GERD with hiatal hernia type I or type III have characteristic features, the severity of which manifestation does not depend on the type. A reliable indicator of the true esophageal-gastric junction location is the proximal edge of the gastric folds. Complicated course of GERD occurs in both groups: Barrett's esophagus and Schatzki's ring predominate in the Group I, strictures and ulcers of the esophagus – in the Group II.

Ключові слова: гастроезофагеальна рефлюксна хвороба, грижа стравохідного отвору діафрагми, ендоскопічні дослідження травної системи.

Патологія. 2022. Т. 19, № 1(54). С. 58-64

Ендоскопічні ознаки гастроезофагеальної рефлюксної хвороби при різних типах грижі стравохідного отвору діафрагми

А. О. Никоненко, Є. І. Гайдаржі, О. М. Кіосов

Грижі стравохідного отвору діафрагми виявляють у 83–94 % пацієнтів із гастроезофагеальною рефлюксною хворобою (ГЕРХ). Проблеми діагностики ендоскопічних ознак шлунково-стравохідного рефлюксу при поєднанні з найпоширенішими I та III типами гриж стравохідного отвору діафрагми залишаються актуальними. Несвоєчасна та неточна ендоскопічна інтерпретація цих патологічних змін істотно знижує ефективність лікування.

Мета роботи – вивчити ендоскопічні ознаки гастроезофагеальної рефлюксної хвороби при найпоширеніших I та III типах грижі стравохідного отвору діафрагми на етапі підготовки до хірургічного лікування.

Матеріали та методи. Обстежили 153 пацієнтів із ГЕРХ і найпоширенішими I та III типами гриж стравохідного отвору діафрагми під час підготовки до лапароскопічної антирефлюксної операції. Середній вік – 54,5 ± 11,3 року, 48 (31,4 %) чоловіків, 105 (68,6 %) жінок. У I групі – 85 пацієнтів із ГЕРХ і грижею стравохідного отвору діафрагми I типу; у II групі – 68 хворих на ГЕРХ і з грижею стравохідного отвору діафрагми III типу. Повне передопераційне обстеження обов'язково передбачало ендоскопію з хромоендоскопією (передусім NBI або FICE), біопсією з підозрілих вогнищ слизової оболонки шлунка та нижньої третини стравоходу, гістологічний аналіз. Статистичне опрацювання та математичний аналіз результатів виконали, використавши пакет прикладних програм Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., № JPZ804I382130ARCN10-J). Для порівняльного аналізу розрахували середнє арифметичне та середнє квадратичне відхилення – M ± s. Розбіжності між групами оцінювали за допомогою підмодуля «Диференціальні тести» в модулі «Основні статистики та таблиці». Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати. В обох групах переважали неерозивні форми ГЕРХ: 57 (67,1 %) та 39 (57,4 %) хворих відповідно у групах. З-поміж ерозивних форм виявляли переважно LA A стадії езофагіту – 20 (23,5 %) та 17 (25,0 %) у I та II групі відповідно. CLE ознаки слизової оболонки стравоходу переважали в I групі – у 16 (18,8 %), у II – у 5 (7,4 %) хворих. Орієнтиром

справжнього стравохідно-шлункового з'єднання вважали проксимальні краї шлункових складок, візуалізовані в усіх хворих. Ускладнений перебіг ГЕРХ визначили в обох групах хворих.

Висновки. Ендоскопічні ознаки ГЕРХ при I та III типах гриж стравохідного отвору діафрагми мають характерні особливості, ступінь прояву яких не залежить від типу грижі. Надійна ознака розташування справжнього стравохідно-шлункового з'єднання – проксимальний край шлункових складок. Ускладнений перебіг ГЕРХ виявили в обох групах: стравохід Баррета та кільце Шацького переважають у I, стриктури та виразки стравоходу – у II групі.

Gastroesophageal reflux disease (GERD) is one of the most common gastroenterological diseases. In the general population, the incidence of this disease reaches 20 % and continues to increase [1–3]. Along with multichannel pH-impedance-monitoring, video-esophagogastroduodenoscopy plays an essential and sometimes decisive role in the successful diagnosis of both complicated and uncomplicated GERD [4–7]. The widespread and rapid increasing of GERD is becoming threatening, primarily due to the development of such dangerous complications as erosive and ulcerative esophagitis, peptic strictures of the esophagus, Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma [8–11]. Untimely and inaccurate endoscopic diagnosis of these complications significantly reduces the effectiveness of treatment [5,12–15]. Considering that hiatal hernia (HH) occurs in 83–94% of patients with GERD and the most common types of them are type I and type III difficulties in determining pathological changes in the esophageal mucosa as well as some key endoscopic landmarks of the true esophagogastric junction, Z-line, borders of segments of cell metaplasia with GERD in combination with these hernias types remain relevant [2,3,5,12,16–19]. All of the above requires continued work in the direction of studying the endoscopic signs features of GERD associated with the most common hiatal hernia types, which will improve the diagnosis and treatment efficiency of this disease.

Aim

The aim of the research was to study the endoscopic signs of gastroesophageal reflux disease with the most common hiatal hernia I and III types at the preparation stage for surgical treatment.

Materials and methods

The work carried out a detailed analysis of the endoscopic examination results of 153 patients with GERD associated with type I or type III hiatal hernia. Criteria for inclusion in the study were confirmed GERD, the presence of type I or type III hiatal hernia, consent to surgical treatment and the absence of general contraindications for surgery. Exclusion criteria – absence of GERD, other rare types (II or IV) of hiatal hernia, other chronic gastroenterological diseases in the acute stage, acute surgical pathology, refusal of surgical treatment. The age was 54.5 ± 11.3, there were 48 men (31.4 %), 105 women (68.6 %).

Patients were divided into two groups depending on the hiatal hernia types [3,5,17,18]. Group I consisted of 85 patients with GERD and hiatal hernia type I (the most common sliding hiatal hernia with gastroesophageal junction displacement proximally up through the esophageal opening and the stomach positioning alongside the longitudinal axis with the esophagus while the fundus of the stomach remains below the diaphragm). Group II consisted of 68 patients with GERD caused by hiatal hernia type III (the most common paraesophageal hiatal hernia when the gastroesophageal junction and a part of the stomach (fundus, body) herniate through the hiatus into the mediastinum but gastroesophageal junction displaces alongside the longitudinal axis as in type I and the most proximal stomach part herniate into the mediastinum and location above the gastroesophageal junction). The groups of patients were comparable in terms of age, sex and comorbidities.

All patients underwent a complete preoperative examination and were preparing for laparoscopic antireflux surgery. To diagnose GERD all patients were interviewed by valid diagnostic questionnaires and scales, and polypositional video esophagogastroduodenoroentgenography with passage of a water-soluble contrast agent with daily intraesophageal pH or pH-impedance monitoring were performed. The hiatal hernia type was determined by polypositional X-ray examination with water-soluble contrast agent (barium) swallow in the Trendelenburg position with a routine Valsalva maneuver obligatory performed by "Opera T 90cex", "General Medical Merate S.p.A.", Italy.

Esophagogastroduodenoscopy was performed by modern endoscopical equipment "Evis Exera III, scope HQ 190" ("Olympus", Japan) in the first half of the day, on an empty stomach, under local anesthesia with lidocaine. Endoscopic evaluation began with examination of the tongue, pharynx, epiglottis, larynx, glottis with vocal cords. Next, we examined the orifice of the esophagus, the esophago-pharyngeal junction with thinned pharyngeal pockets – the piriform sinuses, then the bronchial and diaphragmatic constriction, the esophageal-gastric junction, the lumen of the stomach, the pylorus, the bulb of the duodenum, the upper duodenal flexure, the descending duodenum (to exclude other pathologies – peptic ulcers of the stomach, gastritis, stomach cancer). Changes in the shape and diameter of the esophagus, the state of the esophageal mucosa, esophagogastric junction, stomach, and duodenum were assessed. Pay attention to the remains of food in the esophagus or stomach. The lumen of the esophagus was examined for the presence of strictures, fungal infections, erosions, ulcers, rings, diverticula. During inversion examination the state of the mucous membrane of the lesser curvature of the stomach body, cardia and fundus was assessed. Mucosal examination was always performed using chromoendoscopy (mainly using NBI or FICE spectral analysis techniques) for a more sensitive differentiation of pathological changes. Assessed for signs of Barrett's esophagus or adenocarcinoma. A mandatory stage of endoscopic examination was a biopsy from suspiciously altered foci of the gastric mucosa, Z-line, esophagus for

Table 1. Characteristics of the esophageal mucosal layer in both groups

Color	Group I (n = 85)	Group II (n = 68)	P
Pink/pale pink	61 (71.8 %)	57 (83.8 %)	0.0791
Hyperemic	17 (20.0 %)	7 (10.3 %)	0.1012
Whitish	7 (8.2 %)	4 (5.9 %)	0.5839
Total	85 (100.0 %)	68 (100.0 %)	–

P: value of statistical significance.

Table 2. Distribution of patients in Groups I and II according to the severity of esophagitis according to the Los Angeles classification

Degree of esophagitis	Group I (n = 85)	Group II (n = 68)	P
NERD	57 (67.1 %)	39 (57.4 %)	0.3332
LA A	20 (23.5 %)	17 (25.0 %)	0.9154
LA B	8 (9.4 %)	8 (11.8 %)	0.8761
LA C	–	4 (5.8 %)	–
LA D	–	–	–

P: value of statistical significance.

Table 3. Erosion length characteristic in both groups with erosive esophagitis

Degree of esophagitis	Group I (n = 85)		Group II (n = 68)		
	n	length, mm	n	length, mm	P
LA A	20 (23.5 %)	3.73 ± 0.7	17 (25.0 %)	3.7 ± 0.9	0.9099
LA B	8 (9.4 %)	6.7 ± 1.9	8 (11,8 %)	8.7 ± 3.4	0.1684
LA C	–	–	4 (5.9 %)	7.8 ± 3.1	
LA D					

P: value of statistical difference.

Table 4. Number of patients with CLE signs of the esophageal mucosa depending on the severity of esophagitis in both groups

Degree of esophagitis	Group I (n = 85)	Group II (n = 68)	P
NERD	11 (12.9 %)	3 (4.4 %)	0.6776
LA A	2 (2.4 %)	2 (2.9 %)	0.9752
LA B	3 (3.5 %)	–	–
LA C	–	–	–
LA D	–	–	–
Total	16 (18.8 %)	5 (7.4 %)	0.5448

P: value of statistical significance.

subsequent histological analysis. During the study photo and video recording were performed for a more detailed review and analysis after the diagnosis. The most significant details of the study were recorded in the protocol and kept in the archive [4,7,18,20,21].

Statistical processing and mathematical analysis of the obtained results were performed using the Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., No. JPZ804I382130ARCN10-J). For comparative analysis the arithmetic mean and standard deviation were calculated and presented as M ± s. Differences between groups were assessed using the sub-module "Difference tests" in the module "Basic statistics and tables". Differences at $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Visual analysis of the esophagus mucosa of GERD patients showed that in both groups the mucosa was mostly pink or pale pink, which is typical for healthy mucosa.

Hyperemic and whitish coloration was found in lesser quantities (*Table 1*).

However according to the data of endoscopic color signs the groups regardless of the hiatal hernia type did not significantly differ from each other.

In both groups of patients regardless of the hiatal hernia type non-erosive forms of GERD prevailed – 57 (67.1 %) and 39 (57.4 %), respectively.

The erosive form of GERD was detected in 28 (32.9 %) patients in Group I, while in Group II – in 29 (42.6 %) patients.

The severity of reflux esophagitis was assessed according to the Los Angeles classification, according to which only A and B degrees of esophagitis severity were diagnosed in Group I, while A, B and C degrees were presented in Group II [5].

As can be seen from *Table 2*, the groups of patients also did not differ from each other in degree A and B of the esophagitis severity, however, the presence of reflux esophagitis with degree C in Group II may indicate more severe course of GERD in patients with type III hiatal hernia.

The length of erosions also did not differ statistically in both groups with A and B degrees of the esophagitis (*Table 3*).

In Group I, the length of erosions in grade A esophagitis was 3.73 ± 0.7 mm, grade B – 6.7 ± 1.9 mm. In Group II, with degree A – 3.7 ± 0.9 mm, degree B – 8.7 ± 3.4 mm, degree C – 7.8 ± 3.1 mm.

Routine use of chromoendoscopy (mainly NBI, FICE spectral analysis) in all patients made it possible to diagnose columnar epithelium (Columnar Lined Esophagus (CLE)) in 21 (13.7 %) patients in both groups totally (*Fig. 1*).

In Group I CLE signs of the mucosa prevailed and occurred in 16 (18.8 %) patients, while in Group II – only in 5 (7.4 %) patients, but without significant difference (*Table 4*).

At the same time both in Group I and in Group II CLE-esophagus is more common in NERD.

Length analysis of the circular (C) and maximum (M) segments of the CLE-esophagus in groups is presented in *Table 5*.

The length of the circular segments in both groups did not differ, while the maximum segment was significantly longer in the Group II of patients with type III hiatal hernia.

An important step in the endoscopic diagnosis of GERD was the determination of the true area of gastroesophageal junction, the key point of which is the diagnosis of the Z-line. The Z-line was not diagnosed in all patients: in Group I in 79 (92.9 %), in Group II – in 53 (77.9 %) patients. In Group I of patients with type I hiatal hernia the Z-line was diagnosed significantly more often than in the Group II with the type III hiatal hernia (P = 0.0123).

Palisade vessels were also visualized not in all patients in both groups: in 50 (58.8 %) patients of Group I and in 30 (44.1 %) patients of Group II, however without a statistically significant difference (P = 0.2020) (*Fig. 2*).

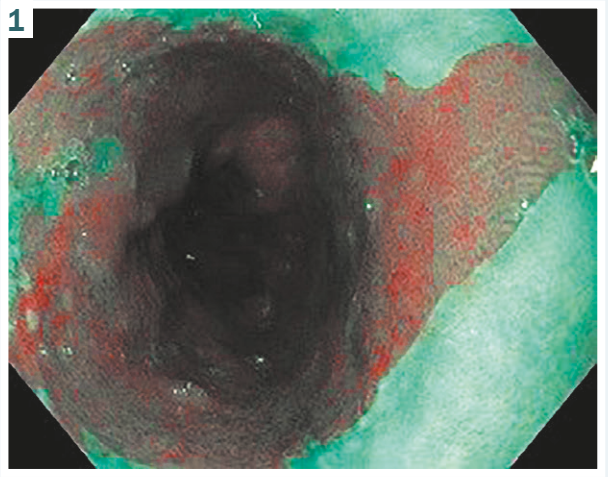
The main landmarks of the true gastroesophageal junction were considered to be the proximal edges of the gastric folds.

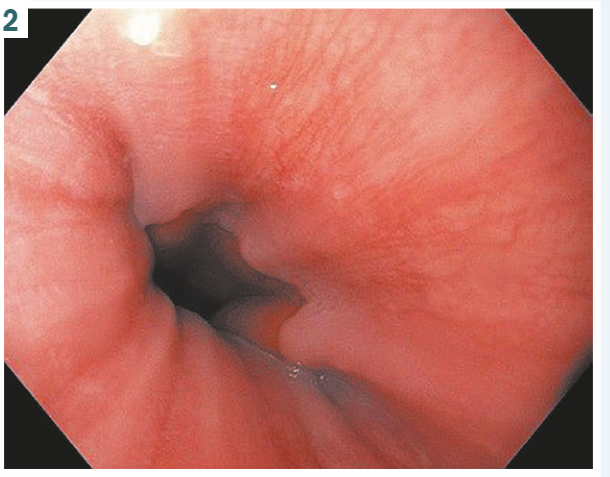
In Group I the proximal edge of the gastric folds was determined at a distance of 39.9 ± 1.3 cm from the incisor teeth, in Group II – at a distance of 39.5 ± 2.6 cm,

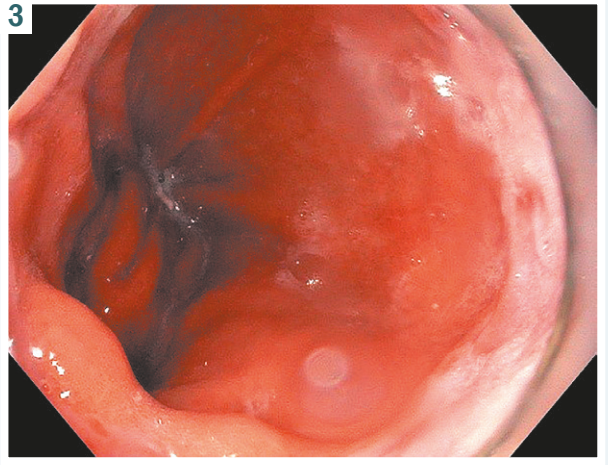
Table 5. Length characteristics of C and M segments in both groups depending on the severity of esophagitis

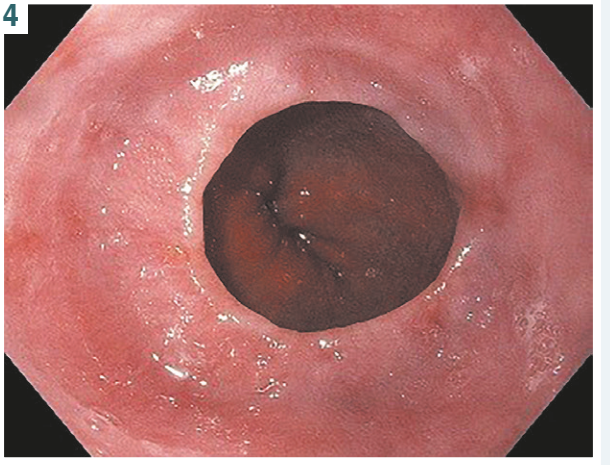
Degree of esophagitis	Group I (n = 85)	Group II (n = 68)	Value of difference	Group I (n = 85)	Group II (n = 68)	Value of significance
	C, mm	C, mm	P	M, mm	M, mm	P
NERD	1.7 ± 1.4	1.6 ± 1.2	0.9125	2.8 ± 1.5	3.5 ± 0.7	0.4572
LA A	2.0 ± 1.4	2.7 ± 1.2	0.6451	2.5 ± 2.1	5.0 ± 1.4	0.2963
LA B	4.0 ± 1.7	–	–	5.3 ± 2.1	–	–
LA C	–	–	–	–	–	–
LA D	–	–	–	–	–	–

P: value of statistical significance.









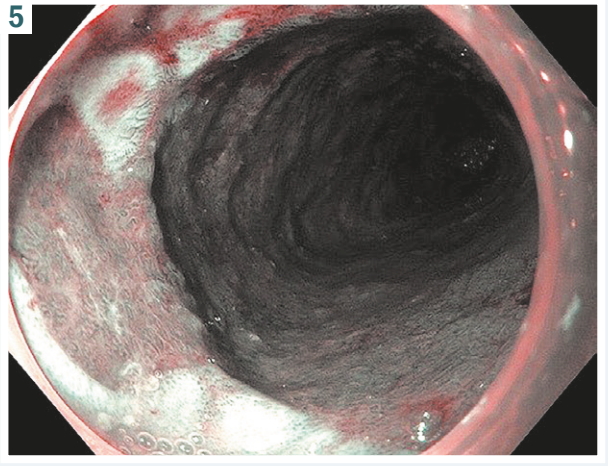


Fig. 1. CLE-esophagus (narrow binding imagine).

Fig. 2. Endoscopic view of palisade vessels.

Fig. 3. Endoscopic view of the gastric folds proximal edge location and the Z-line.

Fig. 4. Endoscopic diagnosis of GERD complication (Schatzki's ring).

Fig. 5. Barrett's esophagus (NBI).

Table 6. Distance of the proximal edge of the gastric folds and Z-line from the incisor teeth

Distance name	Group I (n = 85)	Group II (n = 68)	P
Distance of the proximal edge of the gastric folds from the incisors, cm	39.9 ± 1.3	39.5 ± 2.6	0.2174
Z-line distance from incisors, cm	36.6 ± 2.2	34.8 ± 2.6	0.0001
P	0.0001	0.0001	–

P: value of statistical significance.

Table 7. Characteristics of complicated forms of GERD

Complication	Group I (n = 85)	Group II (n = 68)
Schatzki's ring	4 (4.7 %)	–
Esophageal ulcer	–	4 (5.9 %)
Esophageal stricture	–	4 (5.9 %)

Table 8. Characteristics of patients with biopsy and Barrett's esophagus in both groups

Biopsy and Barrett's esophagus	Group I (n = 85)	Group II (n = 68)	P
Biopsy	49 (57.6 %)	37 (54.4 %)	0.6918
Barrett 0146s esophagus	16 (18.8 %)	3 (4.4 %)	0.0072

P: value of statistical significance.

which corresponded to the norm. Whereas the Z-line was displaced proximally in both groups and was determined at a distance of 36.6 ± 2.2 cm from the incisor teeth in the Group I and at a distance of 34.8 ± 2.6 cm in the Group II (*Table 6*).

As can be seen from the presented *Table 6*, the distance of the proximal edge of the gastric folds from the incisors practically does not differ between groups and corresponds to the endoscopic norm, while it differs statistically from the location of the Z-line. At the same time, the distance of the Z-line also differs between groups and is located more proximally in the Group II of patients with type III hiatal hernia. The distance between the proximal edge of the upper gastric folds and the Z-line was 3.7 ± 1.3 cm in Group I, while in Group II it was 5.0 ± 1.6 cm and statistically significantly differed between the groups (P = 0.0001) (*Fig. 3*).

The complicated course of GERD presented by esophageal strictures, ulcers and Schatzki's rings. The Schatzki's ring is shown in *Fig. 4*.

In Group II there is a predominance of complicated forms of GERD presented by strictures – 4 (5.9 %) and ulcers – 4 (5.9 %) of the esophagus. Schatzki's ring is observed in 4 patients (4.7 %) only in Group I (*Table 7*).

All analyzed patients underwent chromoendoscopy (mainly NBI and FICE) for more accurate identification of pathological changes in the mucosal layer and targeted biopsy. As a result in Group I targeted biopsy of the lower third mucosal layer of the esophagus was performed in 57.6 % patients, in the Group II – in 54.4 % patients (*Table 8*).

As a result, in the Group I Barrett's esophagus was confirmed in 16 (18.8 %) patients and significantly differs from the results obtained in the Group II in which Barrett's esophagus was diagnosed only in 3 (4.4 %) patients with GERD (*Fig. 5*).

Discussion

Thus, during visual endoscopic examination in both groups, pink and pale pink mucosa of the esophagus is predominantly found, which corresponds to the physiological norm. The groups do not differ from each other and according to other color characteristics of the mucosa (*Table 1*). Therefore, this sign, as well as visual endoscopic examination in general, in a large number of cases does not allow to make a convincing conclusion about the presence or absence of GERD, the intensity of reflux, the depth of the mucosal lesion or the type of hiatal herniation [2,5,16].

This is supported by the data obtained on the predominance of non-erosive forms of gastroesophageal reflux disease in both groups (*Table 2*). As for erosive forms, the appearance of patients with stage C in Group II may indicate a more severe course of the disease with type III hiatal hernia. Although the groups do not differ in degree A or B and in the length of erosions (*Tables 2, 3*). Statistically, the groups also do not differ in the frequency of determining signs of CLE-esophagus (*Table 5*). But clinically there are more patients with CLE-esophagus in Group I, despite the fact that this group is represented by patients with type I hiatal hernia (18.8 % to 7.4 %, respectively). At the same time, this trend is expressed in patients with non-erosive form of reflux disease, when, it would seem, there are no obvious endoscopic signs of GERD.

An analysis of the circular (C) and maximum (M) segments length in both groups also did not show statistically significant differences. Although clinically the length of the maximum segment in the Group II of patients was twice a long with grade A of esophagitis than in the Group I (2.5 ± 2.1 mm to 5.0 ± 1.4 mm, respectively).

An important step in the endoscopic diagnosis of GERD was the determination of the true esophageal-gastric junction zone, the key points of which are the determination of the Z-line, the boundaries of the palisade vessels disappearance and the location of the gastric folds proximal edge. Analysis of the Z-line visualization in both groups showed a statistically significant predominance of successful determination of the Z-line in the Group I with type I hiatal hernia, which was determined in almost all patients of this group – 92.9 % patients. In the Group II the number of patients was slightly less – 77.9 % respectively.

The border of the palisade vessels disappearance is also a landmark of the esophagogastric junction. However, unfortunately, palisade vessels were not detected in all patients in both groups and did not show a statistically significant difference between the groups (58.8 % to 44.1 %, respectively, P = 0.2020). At the same time, the proximal border of the gastric folds was visualized in all patients of both groups. In this regard, its location was considered the most significant border of the true esophageal-gastric junction and the most reliable sign of the border between the stomach and esophagus. The analysis of this sign provided interesting data. Thus, the distance of the proximal border of the gastric folds from the incisor teeth did not differ from the norm between groups and was 39.9 ± 1.3 cm in Group I, 39.5 ± 2.6 cm in Group II. A similar, almost physiological, location of the proximal edge of the gastric folds in both groups is explained as follows.

The hiatal hernia type was determined by polypositional X-ray examination, when the patient was necessarily examined in the Trendelenburg position with a routine Valsalva maneuver, and the type of fixation of the hernia, and, consequently, the type of migration of the stomach into the mediastinum were variable. Whereas endoscopic examination was performed only in a horizontal position without performing a Valsalva maneuver and the associated possible displacement of the stomach fundus, which was the reason for obtaining the above results. Concerning the Z-line location and the gastric folds proximal edge border the analysis of the obtained data showed a statistically significant shift of the Z-line proximal to the upper edge of the gastric folds in both groups, with a predominance of the shift in the Group II with the type III of the hiatal hernia. This confirms the presence of pathological reflux in all patients and the associated displacement of the Z-line in the proximal direction above the true border of the esophageal-gastric junction caused by the migration of the columnar gastric epithelium due to the gastric contents reflux into the esophagus [2,5,18]. And the significant predominance of the Z-line shift in the Group II to the gastric fold proximal edge and incisor teeth may be a sign of a more severe and prolonged course of GERD in the Group II of patients with type III hiatal hernia. A fact confirming this position is the predominance of complicated forms of GERD in the form of ulcers and esophageal strictures of the esophagus in the Group II of patients (*Table 7*). Although, in contrast to this situation, the proportion of confirmed Barrett's esophagus cases was higher in Group I in patients with type I hiatal hernia with proven statistical significance (P = 0.0072).

Thus, the analysis of the above endoscopic signs of GERD in patients with the most common varying types (I and III) of hernia showed a variety of their manifestations and the absence of a convincing dependence of the severity of one or another sign on the type of the hernia. This confirms the need for an individual approach to the implementation of videoesophagogastroduodenoscopy in GERD associated with a hiatal hernia and a differentiated interpretation of the obtained results taking into account other diagnostic data.

Conclusions

1. Endoscopic signs of gastroesophageal reflux disease with types I or III hiatal hernias have characteristic features the severity of which does not directly depend on the hernia type.

2. The most reliable sign of the true esophageal-gastric junction location in gastroesophageal reflux disease associated with type I or III of hiatal hernias is the proximal edge of the gastric folds.

3. The location of the Z-line in gastroesophageal reflux disease is not a reliable criterion for the esophageal-gastric junction border and can be displaced in the proximal direction at different distances in patients with type I or type III of hiatal hernia.

4. Complicated course of gastroesophageal reflux disease presented by esophageal strictures and ulcers prevails in patients with type III hiatal hernia, while Barrett's esophagus is more common in patients with type I hiatal hernia.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.
Конфлікт інтересів: відсутній.

Надійшла до редакції / Received: 31.01.2022
Після доопрацювання / Revised: 23.03.2022
Прийнято до друку / Accepted: 04.04.2022

Information about authors:
Nykonenko A. O., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Hospital Surgery, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0002-5720-2602
Haidarzhi Ye. I., MD, PhD, DSc, Associate Professor of the Department of Hospital Surgery, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0001-7211-1795
Kiosov O. M., MD, Assistant of the Department of Faculty Surgery, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0002-0212-1549

Відомості про авторів:
Никоненко А. О., д-р мед. наук, професор, зав. каф. госпітальної хірургії, Запорізький державний медичний університет, Україна.
Гайдаржі Є. І., канд. мед. наук, доцент каф. госпітальної хірургії, Запорізький державний медичний університет, Україна.
Кіосов О. М., асистент каф. факультетської хірургії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

References

[1] Dent, J., El-Serag, H. B., Wallander, M. A., & Johansson, S. (2005). Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut*, *54*(5), 710-717. https://doi.org/10.1136/gut.2004.051821
[2] Schoppmann, S. F., & Riegler, M. (Eds.). (2021). *Multidisciplinary Management of Gastroesophageal Reflux Disease*. Springer, Cham. http://doi.org/10.1007/978-3-030-53751-7
[3] Fomin, P. D., Grubnik, V. V., Nikishaev, V. I., & Malinovskii, A. V. (2008). *Neopukholevye zabolevaniya pishchevoda* [Non-neoplastic diseases of the esophagus]. Kyiv: Biznes-Intellekt. [in Russian].
[4] Shaheen, N. J., Weinberg, D. S., Denberg, T. D., Chou, R., Qaseem, A., Shekelle, P., & Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians (2012). Upper endoscopy for gastroesophageal reflux disease: best practice advice from the clinical guidelines committee of the American College of Physicians. *Annals of internal medicine*, *157*(11), 808-816. https://doi.org/10.7326/0003-4819-157-11-201212040-00008
[5] Ashraf, Memon Muhammed (Ed.). (2018). *Hiatal Hernia Surgery. An Evidence Based Approach*. Springer International Publishing AG. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64003-7
[6] Tutuian R. (2006). Update in the diagnosis of gastroesophageal reflux disease. *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD*, *15*(3), 243-247.
[7] McKinley, S. K., Dirks, R. C., Walsh, D., Hollands, C., Arthur, L. E., Rodriguez, N., Jhang, J., Abou-Setta, A., Pryor, A., Stefanidis, D., & Slater, B. J. (2021). Surgical treatment of GERD: systematic review and meta-analysis. *Surgical endoscopy*, *35*(8), 4095-4123. https://doi.org/10.1007/s00464-021-08358-5
[8] Mamazza, J., Schlachta, C. M., & Poulin, E. C. (1998). Surgery for peptic strictures. *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America*, *8*(2), 399-413.
[9] ASGE Standards of Practice Committee, Evans, J. A., Early, D. S., Chandraskhara, V., Chathadi, K. V., Fanelli, R. D., Fisher, D. A., Foley, K. Q., Hwang, J. H., Jue, T. L., Pasha, S. F., Sharaf, R., Shergill, A. K., Dominitz, J. A., Cash, B. D., & American Society for Gastrointestinal Endoscopy (2013). The role of endoscopy in the assessment and treatment of esophageal cancer. *Gastrointestinal endoscopy*, *77*(3), 328-334. https://doi.org/10.1016/j.gie.2012.10.001
[10] Milind, R., & Attwood, S. E. (2012). Natural history of Barrett's esophagus. *World journal of gastroenterology*, *18*(27), 3483-3491. https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i27.3483
[11] Genta, R. M., Spechler, S. J., & Kielhorn, A. F. (2011). The Los Angeles and Savary-Miller systems for grading esophagitis: utilization and correlation with histology. *Diseases of the esophagus*, *24*(1), 10-17. https://doi.org/10.1111/j.1442-2050.2010.01092.x
[12] Horgan, S., & Fuchs, K. -H. (2020). *Management of Gastroesophageal Reflux Disease. Surgical and Therapeutic Innovations*. Springer Nature Switzerland AG. http://doi.org/10.1007/978-3-030-48009-7

[13] Eusebi, L. H., Cirota, G. G., Zagari, R. M., & Ford, A. C. (2021). Global prevalence of Barrett's oesophagus and oesophageal cancer in individuals with gastro-oesophageal reflux: a systematic review and meta-analysis. *Gut*, *70*(3), 456-463. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321365

[14] Zagari, R. M., Fuccio, L., Wallander, M. A., Johansson, S., Fiocca, R., Casanova, S., Farahmand, B. Y., Winchester, C. C., Roda, E., & Bazzoli, F. (2008). Gastro-oesophageal reflux symptoms, oesophagitis and Barrett's oesophagus in the general population: the Loiano-Monghidoro study. *Gut*, *57*(10), 1354-1359. https://doi.org/10.1136/gut.2007.145177

[15] Hvid-Jensen, F., Pedersen, L., Drewes, A. M., Sørensen, H. T., & Funch-Jensen, P. (2011). Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus. *The New England journal of medicine*, *365*(15), 1375-1383. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103042

[16] Fadeenko, G. D., & Gridnev, A. E. (2014). *Gastroezofagealnaia refliuksnaia bolezn: pishchevodnye i vnepishchevodnye proiavleniia i komorbidnost* [Gastroesophageal reflux disease: esophageal, extra-esophageal manifestations and comorbidity]. Kiev: Biblioteka «Zdorov'e Ukrainy». [in Russian].

[17] Grubnik, V. V., & Malinovsky, A. V. (2015) *Kriticheskie aspekty laparoskopicheskoi chirurgii gastroezofageal'noy reflyuksnoy bolezni i gryzh pishchevodnogo otverstiya diafragmy* [Critical aspects of laparoscopic surgery for gastroesophageal reflux disease and hiatal hernia: monograph]. Odessa: VMV-typography. [in Russian].

[18] Swanstrom, L. L., & Dunst, C. M (Eds.) (2015). *Antireflux Surgery*. Springer-Verlag New York. http://doi.org/10.1007/978-1-4939-1749-5

[19] Fuchs, K. H., Lee, A. M., Breithaupt, W., Varga, G., Babic, B., & Horgan, S. (2021). Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease – which factors are important? *Translational gastroenterology and hepatology*, *6*, 53. https://doi.org/10.21037/tgh.2020.02.12

[20] Aye, R. W., & Hunter, J. G. (Eds.). (2016). *Fundoplication Surgery*. Springer International Publishing. http://doi.org/10.1007/978-3-319-25094-6

[21] Slater, B. J., Dirks, R. C., McKinley, S. K., Ansari, M. T., Kohn, G. P., Thosani, N., Qumseya, B., Billmeier, S., Daly, S., Crawford, C., P Ehlers, A., Hollands, C., Palazzo, F., Rodriguez, N., Train, A., Wassenaar, E., Walsh, D., Pryor, A. D., & Stefanidis, D. (2021). SAGES guidelines for the surgical treatment of gastroesophageal reflux (GERD). *Surgical endoscopy*, *35*(9), 4903-4917. https://doi.org/10.1007/s00464-021-08625-5

УДК 616.366-002-003.7-072.1-089.878.168-092-07
DOI: 10.14739/2310-1237.2022.1.254270

Зміни резервуарної та моторно-евакуаторної функції жовчного міхура у хворих на безсимптомний холецистолітіаз після органозберігальної операції – лапароскопічної холецистолітотомії

Д. В. Сиволап*

Запорізький державний медичний університет, Україна

Сонографічне оцінювання структури та функції жовчного міхура у хворих на жовчнокам'яну хворобу потребує удосконалення не тільки для уточнення показань до органозберігальних операцій, як-от лапароскопічної холецистолітотомії, але й покращення результатів хірургічного лікування безсимптомного холецистолітіазу шляхом прогнозування імовірного відновлення моторно-евакуаторної функції жовчного міхура та зменшення кількості рецидивів холецистолітіазу.

Мета роботи – дослідити зміни структури та функції жовчного міхура у хворих на безсимптомний холецистолітіаз до та після лапароскопічної холецистолітотомії.

Матеріали та методи. У дослідження залучили 33 хворих на безсимптомний холецистолітіаз. Переважна більшість хворих – жінки (82 %, n = 27) віком від 23 до 54 років, середній вік – 48,0 ± 11,9 року; решта – чоловіки (18 %, n = 6) віком 25–58 років, середній вік – 46,2 ± 12,4 року. Ультразвукове дослідження органів черевної порожнини виконали всім хворим на апаратах «Philips» № MA2540R і «LOGIQ General Electric» Ser № 52993WX3 до та після лапароскопічної холецистолітотомії.

Під час обстеження здійснили сонографічне оцінювання форми, розмірів, контурів, товщини стінки жовчного міхура, а також його зв'язків із навколишніми органами та судинними структурами. Цілеспрямовано визначали розміри холедоху, кількість і розміри конкрементів у порожнині жовчного міхура, його моторно-евакуаторну функцію. Статистично результати опрацювали за допомогою Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., № JPZ804I382130ARCN10-J).

Результати. Показники резервуарної функції жовчного міхура до та після лапароскопічної холецистолітотомії вірогідно не відрізнялись. Виявили вірогідне збільшення фракції викиду жовчного міхура з 54,5 ± 2,1 % до 64,4 ± 2,9 % (p = 0,0001) та скорочення «латентного періоду» з 15,6 ± 2,5 хв до 8,3 ± 1,7 хв (p = 0,001).

Висновки. Дотримання сонографічних показань (поодинокі конкременти жовчного міхура, товщина його стінки менша за 3 мм та фракція викиду понад 50 %) під час відбору хворих на безсимптомний холецистолітіаз для лапароскопічної холецистолітотомії дає змогу не тільки зберегти резервуарну, але й поліпшити моторно-евакуаторну функцію невидаленого під час операції жовчного міхура. Це знижує ризики імовірного рецидивного каменеутворення в наближеному та віддаленому періодах спостереження.

Ключові слова: безсимптомні хвороби, холецистолітіаз, резервуарна функція жовчного міхура, моторно-евакуаторна функція жовчного міхура, холецистолітотомія, лапароскопія, ультрасонографія.

Патологія. 2022. Т. 19, № 1(54). С. 65-69

***E-mail:** sivolap@vitacenter.com.ua

Changes in reservoir and motor-evacuatory function of the gallbladder in patients with asymptomatic cholecystolithiasis after organ-sparing surgery – laparoscopic cholecystolithotomy

D. V. Syvolap

Sonographic assessment of gallbladder structure and function in patients with gallstone disease needs further improvement not only to clarify the indications for organ-sparing operations such as laparoscopic cholecystolithotomy, but also to improve the results of surgical treatment of asymptomatic cholecystolithiasis by predicting probable restoration of motor-evacuatory function of the gallbladder and reduction of the number of recurrences of cholecystolithiasis.

The aim of the study was to investigate changes in gallbladder structure and function in patients with asymptomatic cholecystolithiasis before and after laparoscopic cholecystolithotomy.

Materials and methods. The study involved 33 patients with asymptomatic cholecystolithiasis. The majority of patients are women 82 % (n = 27), aged 23 to 54 years, mean age 48.0 ± 11.9 years. And there were 18 % of men (n = 6), aged 25 to 58 years, mean age 46.2 ± 12.4 years. Ultrasound examination of the abdominal organs was performed in all patients using Philips No. MA2540R and LOGIQ General Electric Ser No. 52993WX3 before and after laparoscopic cholecystolithotomy. During the examination, a sonographic assessment of the shape, size, contours, thickness of the gallbladder wall, as well as its relation with surrounding organs and vascular structures was performed. The size of the common bile duct, the number and size of stones in the gallbladder cavity, as well as its motor-evacuatory function were purposefully determined. Statistical processing of the material was performed using the Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., No. JPZ804I382130ARCN10-J).

Results. Indicators of gallbladder reservoir function before and after laparoscopic cholecystolithotomy did not differ significantly. There was a significant increase in the ejection fraction of the gallbladder from 54.5 ± 2.1 % to 64.4 ± 2.9 % (P = 0.0001) and a reduction in the "latency period" from 15.6 ± 2.5 min to 8.3 ± 1.7 min (P = 0.001).

Conclusion. Adherence to sonographic indications (single gallstones, less than 3 mm wall thickness and ejection fraction over 50 %) in the selection of patients with asymptomatic cholecystolithiasis for laparoscopic cholecystolithotomy allows not only to preserve the reservoir and also improve the motor-evacuatory function of it, which reduces the risk of possible recurrent stone formation in close and long-term periods of observation.

Key words: asymptomatic diseases, cholecystolithiasis, gallbladder reservoir function, gallbladder motor-evacuatory function, cholecystolithotomy, laparoscopy, ultrasonography.

Pathologia 2022; 19 (1), 65-69

Більшість популяційних досліджень щодо захворюваності європейського населення на жовчнокам'яну хворобу (ЖКХ) вказують на високу частоту нових випадків – у межах 0,60–1,39 % на рік [7]. У структурі ЖКХ хворі на солітарний безсимптомний холецистоліаз (ХЛЗ) становлять майже 70 %, цю патологію виявляють у 5–10 % населення. Кожна п'ята жінка і кожен десятий чоловік із ЖКХ мають камені в жовчному міхурі та є потенційними пацієнтами хірургічних стаціонарів [6].

Результати метааналізу [8] показали, що лапароскопічна холецистолітотомія (ЛХЛТ) може бути кращим за лапароскопічну холецистектомію методом лікування хворих на ЖКХ, оскільки пацієнти одужують швидше та мають менше ускладнень, особливо коли функція жовчного міхура залишається збереженою.

Питання про те, чи впливає моторна функція жовчного міхура на симптоми та/або розвиток хвороби, залишається відкритим, його активно обговорюють у науковій літературі [1]. Більшість дослідників вважають, що утворення холестеринових каменів у жовчному міхурі спричиняють кілька механізмів: збільшення насичення жовчі холестерином, зміни кишково-печінкового кровообігу, зокрема через втрату жовчних кислот або порушення поглинання вторинних жовчних кислот, що виробляються мікробіотою товстої кишки, а також порушення моторної функції жовчного міхура [6].

Попри відсутність єдиного погляду щодо ролі моторної функції жовчного міхура в розвитку ЖКХ, вона має беззаперечне значення під час вибору хірургічної тактики лікування безсимптомного холецистолітіазу – видаляти жовчний міхур чи зберігати орган.

Для визначення можливості виконання лапароскопічної холецистолітотомії пропонують такі діагностичні сонографічні критерії: поодинокі конкременти діаметром від 0,5 до 2,0 см, що легко зміщуються в порожнині жовчного міхура; розміри жовчного міхура – довжина не більше ніж 80 мм, ширина не більше ніж 40 мм; товщина стінки жовчного міхура – 1–2 мм; об'єм жовчного міхура – до 70 см^3; ефективність жовчовиділення щодо моторно-евакуаторної функції жовчного міхура – від 40 % до 80 % від вихідного об'єму [10]. Чітке дотримання критеріїв відбору дає змогу запобігти розвитку інтра- та післяопераційних ускладнень, покращити наближені та віддалені результати хірургічного лікування ЖКХ, запобігти рецидиву каменеутворення після холецистолітотомії [10].

Відкритим залишається питання і про те, чи сприятиме видалення каменів із жовчного міхура поліпшенню його моторно-евакуаторної функції.

Отже, сонографічне оцінювання структури та функції жовчного міхура у хворих на жовчнокам'яну хворобу потребує удосконалення не тільки для уточнення показань до органозберігальних операцій, як-от лапароскопічної холецистолітотомії, але й покращення результатів хірургічного лікування безсимптомного холецистолітіазу шляхом прогнозування ймовірного відновлення моторно-евакуаторної функції жовчного міхура та зменшення кількості рецидивів холецистолітіазу.

Мета роботи

Дослідити зміни структури та функції жовчного міхура у хворих на безсимптомний холецистолітіаз до та після лапароскопічної холецистолітотомії.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження здійснили на клінічній базі кафедри факультетської хірургії Запорізького державного медичного університету, що розташована на базі хірургічного відділення багатопрофільної лікарні ТОВ «ВІТАЦЕНТР». Після підписання інформованої згоди на участь у дослідження залучили 33 хворих на безсимптомний холецистолітіаз. Переважна більшість пацієнтів – жінки (82 %, n = 27) віком від 23 до 54 років, середній вік – 48,0 ± 11,9 року; решта – чоловіки (18 %, n = 6) віком 25–58 років, середній вік – 46,2 ± 12,4 року. Найчастіші коморбідні патології: гіпертонічна хвороба (18,2 %, n = 6), виразкова хвороба (15,2 %, n = 5), сечокам'яна хвороба (15,2 %, n = 5), ішемічна хвороба серця (12,1 %, n = 4), хронічний обструктивний бронхіт (12,1 %, n = 4). У деяких пацієнтів діагностували більше ніж одне супутнє захворювання.

Ультразвукове дослідження органів черевної порожнини виконали всім хворим на апаратах «Philips» № MA2540R і «LOGIQ General Electric» Ser. № 52993WX3 до та після лапароскопічної холецистолітотомії.

Під час обстеження здійснили сонографічне оцінювання форми, розмірів, контурів, товщини стінки жовчного міхура, а також його зв'язків із навколишніми органами та судинними структурами. Цілеспрямовано визначали розміри холедоху, кількість і розміри конкрементів у порожнині жовчного міхура, його моторно-евакуаторну функцію.

Для оцінювання об'єму жовчного міхура пацієнт був повинен не курити та не вживати їжу впродовж кількох годин до початку дослідження. Обстеження виконали в положенні пацієнта на лівому боці з кутом нахилу тулуба 15–30°. Частотний діапазон конвексного датчика – 3,5–5,0 МГц. Об'єм жовчного міхура до і після його скорочення визначали за допомогою методу спрощеного еліпсоїда. Використовували просту тестову їжу з шоколадом (50 г) або стандартну їжу (700 ккал), що складалася з 20 г яєчного жовтка та 14 г жиру. Після приймання тестової їжі об'єми постпрандіального жовчного міхура фіксували на 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60 хвилинах. Визначали час «латентного періоду» (норма – до 3 хв), час максимального скорочення (норма – 20–40 хв). Моторно-евакуаторну функцію оцінювали за стандартною методикою [5]. Найменший об'єм жовчного міхура вважали залишковим (GB-RV). Фракцію викиду жовчного міхура (GB-EF) розраховували за формулою: GB-EF = (1 – GB-RV [мл] / GB-NV [мл]) × 100 %, де GB-EF – фракція викиду жовчного міхура, GB-NV – початковий об'єм жовчного міхура, GB-RV – залишковий об'єм жовчного міхура.

Нормальний об'єм жовчного міхура становить від 50 см^3 до 70 см^3, нормальне постпрандіальне зниження об'єму жовчного міхура – не менше ніж 50 %, відновлення максимального об'єму жовчного міхура – приблизно через 1,5–2,0 години після його скорочення [2].

Таблиця 1. Лінійні й об'ємні показники жовчного міхура у хворих на холецистолітіаз до та після операції холецистолітотомії, M ± SD

Показник, одиниці вимірювання	До операції			Після операції		
	До жовчогінного сніданку, n = 33	Після жовчогінного сніданку, n = 33	p	До жовчогінного сніданку, n = 33	Після жовчогінного сніданку, n = 33	p
Довжина жовчного міхура, мм	73,0 ± 2,3	70,8 ± 2,2	0,0001	73,7 ± 1,8	71,1 ± 2,0	0,0001
Ширина жовчного міхура, мм	29,2 ± 1,0	20,0 ± 0,9	0,0001	29,1 ± 1,0	17,6 ± 0,7	0,0001
Об'єм жовчного міхура, мл	32,5 ± 2,2	14,8 ± 1,3	0,0001	32,6 ± 2,1	11,6 ± 0,9	0,0001

Таблиця 2. Фракція викиду жовчного міхура та тривалість «латентного періоду» до та після холецистолітотомії

Показник, одиниці вимірювання	До операції холецистолітотомії, n = 33	Після операції холецистолітотомії, n = 33	p
Фракція викиду жовчного міхура, %	54,5 ± 2,1	64,4 ± 2,9	0,0001
Латентний період, хв	15,6 ± 2,5	8,3 ± 1,7	0,001

Статистичне опрацювання матеріалу виконали за допомогою Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., № JPZ804I382130ARCN10-J). Гіпотезу щодо нормальності розподілу кількісних показників аналізували, використовуючи Shapiro–Wilk test. Показники кількісних ознак наведені як середнє арифметичне (M) та стандартне відхилення (SD), якщо розподіл нормальний, або як медіана (Me) та міжквартильний розмах (Q_{25}; Q_{75}), при відхиленні від закону нормального розподілу. Показники якісних ознак наведені як абсолютні та відносні частоти. Відповідно до характеру розподілу різницю в групах за кількісними показниками визначали методами параметричної статистики (за критерієм Стьюдента), непараметричної статистики (за критерієм Mann–Whitney U test); за якісними показниками – за критеріями χ^2, Post-hoc аналізу.

Статистичну розбіжність показників визначили на рівні $p < 0,05$, усі тести двобічні.

Результати

За результатами ультразвукового дослідження та загальноклінічних обстежень, у всіх хворих діагностували безсимптомний холецистолітіаз без будь-яких ознак гострого запалення. За кількістю конкрементів у жовчному міхурі та морфологічних змін його стінок хворі зіставні: 90,9 % (n = 30) пацієнтів мали 1 конкремент; 9,1 % (n = 3) – 2–3 конкременти. Жоден обстежений не мав більше ніж 3 конкременти в порожнині жовчного міхура. Товщина стінки жовчного міхура в 78,8 % (n = 26) хворих не перевищувала 2 мм, у 21,2 % (n = 7) пацієнтів – 2–3 мм.

Динамічне ультразвукове дослідження гепатобіліарної системи показало: в післяопераційному періоді моторно-евакуаторна функція жовчного міхура вірогідно поліпшилася порівняно з доопераційними показниками (*табл. 1, 2*).

За даними, що наведені в *таблицях 1, 2*, показники резервуарної функції жовчного міхура до та після операції вірогідно не відрізнялися. Визначили вірогідне збільшення фракції викиду жовчного міхура з 54,5 ± 2,1 % до 64,4 ± 2,9 % (p = 0,0001) та скорочення «латентного періоду» з 15,6 ± 2,5 хв до 8,3 ± 1,7 хв (p = 0,001).

Результати, що одержали, свідчать про можливість і доцільність виконання хворим на безсимптомний холецистолітіаз із вихідною фракцією викиду жовчного міхура понад 50 % органозберігальної операції – лапароскопічної холецистолітотомії. Видалення конкрементів із порожнини жовчного міхура сприяє додатковому поліпшенню його моторно-евакуаторної функції внаслідок збільшення фракції викиду.

Обговорення

Використання методики лапароскопічної холецистолітотомії з дотриманням показань до її виконання має переваги над лапароскопічною холецистектомією [9]. Використання цієї методики дає змогу отримати хороший косметичний ефект завдяки мініінвазивній методиці виконання оперативного втручання, зберегти жовчний міхур, що функціонує. Методику можна використовувати у хворих на ЖКХ із будь-яким типом каменів розмірами до 2 см і кількістю не більше ніж 3, навіть якщо є супутня патологія печінки, нирок. Після процедури в жовчному міхурі не залишається фрагментів конкрементів, згустків, слизу, білка та пігментних гранул, що можуть стати в майбутньому ядрами рецидивного літоґенезу. В разі розвитку рецидиву холецистолітіазу завжди можливе здійснення або повторна холецистолітотомія/холецистектомія [10].

Безсумнівно, є певний ризик рецидиву холецистолітіазу після видалення каменів із жовчного міхура. Рецидив утворення нових каменів, на жаль, залишається важливою проблемою, що обмежує широке застосування методики лапароскопічної холецистолітотомії. За даними [8], лише у 3 % хворих на ЖКХ після холецистолітотомії впродовж 4 років виник рецидив каменеутворення; віддалена (понад 15 років) частота рецидивів холецистолітіазу становила 10,11 % [4].

Фактори, що визначають рецидив каменеутворення, остаточно не з'ясовані. Метааналіз 8 досліджень [3] дав змогу встановити фактори ризику рецидиву утворення каменів після лапароскопічної холецистолітотомії. Не виявили суттєвий вплив віку, статі чи цукрового діабету на ймовірність рецидивного холецистолітіазу після ЛХЛТ. Натомість високий ризик рецидиву каменеутворення у збереженому жовчному міхурі після ЛХЛТ мали пацієнти з сімейним анамнезом жовчнокам'яної хвороби, а також особи, які віддавали перевагу жирній їжі, хворі з множинними конкрементами. Частота рецидиву каменеутворення після ЛХЛТ майже в 4,24 раза вища в пацієнтів із множинними конкрементами, ніж у тих, хто мав поодинокі камені

жовчного міхура до видалення [3]. У цьому метааналізі доведено також, що істотне збільшення частоти рецидивів каменеутворення пов'язане з дисфункцією жовчного міхура.

Порушення функції жовчного міхура проявляється передусім подовженням часу діастоли жовчного міхура і часу його скорочення, тобто зниженням швидкості розслаблення та скорочення. Внаслідок цього евакуація жовчі затримується, що призводить до утворення жовчних каменів. Збільшення сонографічної товщини стінки жовчного міхура понад 3 мм вірогідно асоціювалося з високим ризиком рецидиву каменеутворення після ЛХЛТ. Нині вивчають гіпотезу щодо основного механізму рецидиву холецистолітіазу при збільшенні товщини стінки жовчного міхура. Вважають, що потовщення стінки жовчного міхура спричиняє зростання поглинання холатів, призводячи до зниження їхньої концентрації в жовчі, з паралельним переходом холестерину жовчі в перенасичений стан, через що останній легко випадає в осад і кристалізується. Ба більше, змінена стінка жовчного міхура полегшує відкладання компонентів жовчі на клітинах, що злущуються під час запалення та утворюють ядра наступної кристалізації. Тому лікування запалення жовчного міхура, що може відновити його скоротливу здатність після холецистолітотомії, має бути ключовим заходом для запобігання рецидиву каменеутворення [1].

Щодо резервуарної функції слід зауважити: конкременти займають певний, іноді чималий, об'єм міхура, а їх видалення додатково збільшує об'єм порожнини міхура навіть без змін його розмірів. На підтвердження наводимо доволі прості розрахунки. Припустімо, що в порожнині жовчного міхура є солітарний конкремент діаметром 3 см, радіус такого конкременту становитиме 1,5 см. Згідно з формулою ($V = 4/3\pi r^3$), об'єм конкремента становитиме $4/3 \times 3{,}14 \times (1{,}5)^3 = 14{,}14$ см^3, або 14,14 мл. Враховуючи, що нормальний об'єм жовчного міхура становить 50–70 мл, то такий конкременту займає 20–29 % його об'єму. Очевидно, що видалення такого конкременту збільшуватиме резервуарну функцію в межах 30 % від вихідного рівня без додаткового розтягнення жовчного міхура.

Отже, лапароскопічна холецистолітотомія, виконана хворим на безсимптомний холецистолітіаз зі збереженою вихідною фракцією викиду жовчного міхура, дає змогу зберегти (можливо, і покращити) його резервуарну та поліпшити моторно-евакуаторну функцію. Це є запорукою зниження ризику рецидиву утворення нових конкрементів.

Ці факти мають важливе значення під час відбору та для встановлення показань до органозберігальної операції, що базуються на збереженні фізіологічних механізмів кумуляції та безперешкодного надходження жовчі у дванадцятипалу кишку.

Висновки

Дотримання сонографічних показань (поодинокі конкременти жовчного міхура, товщина його стінки менша за 3 мм та фракція викиду понад 50 %) під час відбору хворих на безсимптомний холецистолітіаз для лапароскопічної холецистолітотомії дає змогу не тільки зберегти резервуарну, але й поліпшити моторно-евакуаторну функцію невидаленого під час операції жовчного міхура. Це знижує ризики ймовірного рецидивного каменеутворення в наближеному та віддаленому періодах спостереження.

Перспективи подальших досліджень полягають у з'ясуванні віддалених (5 років) результатів лапароскопічної холецистолітотомії – частоти рецидиву холецистолітіазу та встановлення факторів ризику його виникнення.

Конфлікт інтересів: відсутній.
Conflicts of interest: author has no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 21.02.2022
Після доопрацювання / Revised: 29.03.2022
Прийнято до друку / Accepted: 04.04.2022

Відомості про автора:
Сиволап Д. В., канд. мед. наук, асистент каф. факультетської хірургії, Запорізький державний медичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0001-5829-2139

Information about author:
Syvolap D. V., MD, PhD, Assistant of the Department of Faculty Surgery, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Список літератури

[1] Usefulness of gallbladder ejection fraction estimation to predict the recurrence of biliary pain in patients with symptomatic gallstones who did not undergo cholecystectomy / S. N. Hong, J. K. Lee, K. T. Lee et al. *Digestive diseases and sciences*, 2004. Vol. 49, Iss. 5. P. 820-827. https://doi.org/10.1023/b:ddas.0000030094.84619.22

[2] Ultrasound evaluation of gallbladder dyskinesia: comparison of scintigraphy and dynamic 3D and 4D ultrasound techniques / A. Irshad, S. J. Ackerman, K. Spicer et al. *AJR. American journal of roentgenology*. 2011. Vol. 197, Iss. 5. P. 1103-1110. https://doi.org/10.2214/AJR.10.5391

[3] Risk factors for the recurrence of stones after endoscopic minimally invasive cholecystolithotomy in China: a meta-analysis / W. Li, P. Huang, P. Lei et al. *Surgical endoscopy*. 2019. Vol. 33, Iss. 6. P. 1802-1810. https://doi.org/10.1007/s00464-018-6455-y

[4] Liu J., Li J., Zhao Q. The analyses of the results of 612 cases with gallbladder stones who underwent fibrocholedocoscope cholecystectomy for removal of caculas and preservation of gallbladder. *Mag. Chin. Surg.* 2009. Vol. 47. P. 279-281. [in English].

[5] Measurements of gallbladder motor function by ultrasonography: towards standardization / P. Portincasa, A. Moschetta, A. Colecchia et al. *Digestive and liver disease.* 2003. Vol. 35, Suppl 3. P. S56-S61. https://doi.org/10.1016/s1590-8658(03)00096-3

[6] Shabanzadeh D. M., Sørensen, L. T., Jørgensen T. Determinants for gallstone formation – a new data cohort study and a systematic review with meta-analysis. *Scandinavian journal of gastroenterology.* 2016. Vol. 51, Iss. 10. P. 1239-1248. https://doi.org/10.1080/00365521.2016.1182583

[7] Shabanzadeh D. M. Incidence of gallstone disease and complications. *Current opinion in gastroenterology.* 2018. Vol. 34, Iss. 2. P. 81-89. https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000418

[8] Endoscopic minimal invasive cholecystolithotomy vs laparoscopic cholecystectomy in treatment of cholecystolithiasis in China: a meta-analysis / L. Ye, J. Liu, Y. Tang et al. *International journal of surgery.* 2015. Vol. 13. P. 227-238. https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2014.12.014

[9] Endoscopic-Laparoscopic Cholecystolithotomy in Treatment of Cholecystolithiasis Compared With Traditional Laparoscopic Cholecystectomy / Y. Zhang, J. Peng, X. Li, M. Liao. *Surgical laparoscopy, endoscopy & percutaneous techniques*. 2016. Vol. 26, Iss. 5. P. 377-380. https://doi.org/10.1097/SLE.0000000000000305

[10] Шевченко Б. Ф., Бабий А. М., Шуляренко Н. М. Оценка эффективности органосохраняющих операций при неосложненном холецистолитиазе. *GISAP. Medical science, pharmacology*. 2014. № 3. С. 18-21.

References

[1] Hong, S. N., Lee, J. K., Lee, K. T., Heo, J. S., Choi, S. H., Rhee, P. L., Paik, S. W., Yoo, B. C., & Rhee, J. C. (2004). Usefulness of gallbladder ejection fraction estimation to predict the recurrence of biliary pain in patients with symptomatic gallstones who did not undergo cholecystectomy. *Digestive diseases and sciences*, *49*(5), 820-827. https://doi.org/10.1023/b:ddas.0000030094.84619.22

[2] Irshad, A., Ackerman, S. J., Spicer, K., Baker, N. L., Campbell, A., Anis, M., & Shazly, M. (2011). Ultrasound evaluation of gallbladder dyskinesia: comparison of scintigraphy and dynamic 3D and 4D ultrasound techniques. *AJR. American journal of roentgenology*, *197*(5), 1103-1110. https://doi.org/10.2214/AJR.10.5391

[3] Li, W., Huang, P., Lei, P., Luo, H., Yao, Z., Xiong, Z., Liu, B., & Hu, K. (2019). Risk factors for the recurrence of stones after endoscopic minimally invasive cholecystolithotomy in China: a meta-analysis. *Surgical endoscopy*, *33*(6), 1802-1810. https://doi.org/10.1007/s00464-018-6455-y

[4] Liu, J., Li, J., & Zhao, Q. (2009). The analyses of the results of 612 cases with gallbladder stones who underwent fibrocholedocoscope cholecystectomy for removal of caculas and preservation of gallbladder. *Mag Chin Surg*, *47*, 279-281. [in English].

[5] Portincasa, P., Moschetta, A., Colecchia, A., Festi, D., & Palasciano, G. (2003). Measurements of gallbladder motor function by ultrasonography: towards standardization. *Digestive and liver disease*, *35 Suppl 3*, S56-S61. https://doi.org/10.1016/s1590-8658(03)00096-3

[6] Shabanzadeh, D. M., Sørensen, L. T., & Jørgensen, T. (2016). Determinants for gallstone formation – a new data cohort study and a systematic review with meta-analysis. *Scandinavian journal of gastroenterology*, *51*(10), 1239-1248. https://doi.org/10.1080/00365521.2016.1182583

[7] Shabanzadeh, D. M. (2018). Incidence of gallstone disease and complications. *Current opinion in gastroenterology*, *34*(2), 81-89. https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000418

[8] Ye, L., Liu, J., Tang, Y., Yan, J., Tao, K., Wan, C., & Wang, G. (2015). Endoscopic minimal invasive cholecystolithotomy vs laparoscopic cholecystectomy in treatment of cholecystolithiasis in China: a meta-analysis. *International journal of surgery*, *13*, 227-238. https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2014.12.014

[9] Zhang, Y., Peng, J., Li, X., & Liao, M. (2016). Endoscopic-Laparoscopic Cholecystolithotomy in Treatment of Cholecystolithiasis Compared With Traditional Laparoscopic Cholecystectomy. *Surgical laparoscopy, endoscopy & percutaneous techniques*, *26*(5), 377-380. https://doi.org/10.1097/SLE.0000000000000305

[10] Shevchenko, B., Babiy, A., & Shularenko, N. (2014). Otsenka effektivnosti organosokhranyayushchikh operatsii pri neoslozhnennom kholetsistolitiaze [Assessment of efficiency of organ-preserving operations at uncomplicated cholecystostolithiasis]. *GISAP: Medical Science, Pharmacology*, (3), 18-21. [in Russian].

УДК 611.013.395:576.5:[616-001.4-002.32-08]-092.9
DOI: 10.14739/2310-1237.2022.1.247230

Морфологічне обґрунтування місцевого застосування мезенхімальних стовбурових клітин у лікуванні експериментальних хронічних гнійно-некротичних ран

С. В. Слободяник*[A,B,D], С. Д. Хіміч[C,E], С. В. Вернигородський[E,F], В. С. Школьніков[E,F]

Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна

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

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини, хронічні гнійно-некротичні рани, лікування, морфологічні зміни, загоєння ран, імуногістохімія.

Патологія. 2022. Т. 19, № 1(54). С. 70-78

***E-mail:** s3000000003@gmail.com

Мета роботи – вивчення морфологічних параметрів загоєння хронічних гнійно-некротичних ран у білих щурів при місцевому застосуванні 0,025 % розчину декаметоксину та мезенхімальних стовбурових клітин.

Матеріали та методи. Експериментальне дослідження виконали на 120 щурах, яких поділили на групи: I – контроль (без лікування); II – «класичне» лікування ран з використанням антисептика (0,025 % розчин декаметоксину); III – застосування мезенхімальних стовбурових клітин із пупкового канатика; IV – застосування мезенхімальних стовбурових клітин, клонованих в інертних газах. Для оцінювання морфологічних змін із країв ран вирізали фрагменти розмірами 0,5 см × 1,0 см × 1,0 см, фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну та заливали парафіном. Гістологічні зрізи завтовшки 5–7 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином, основним коричневим, пікрофуксином за ван Гізоном, трихромом за Масоном.

Для імуногістохімічних досліджень використовували моноклональні антитіла компанії DAKO: до проміжних філаментів, мезенхімальних клітин і міофібробластів – Vimentin (Clone V9), гладком'язового актину (αSMA, Clone 1A4), трансмембранного білка ендотеліальних клітин, стовбурових і ембріональних фібробластів – CD34 (Clone QBEnd 10), а також систему візуалізації En VisionTMFLEX.

Результати. Позитивну динаміку загоєння хронічних ран у разі застосування 0,025 % розчину декаметоксину спостерігали тільки на ранніх термінах (3–7 доба), зокрема виявили зменшення запальної клітинної інфільтрації порівняно з МСК і МСК-ІГ. Останні були ефективними на всіх етапах дослідження, що підтверджувалося швидшим очищенням поверхні рани від гнійно-некротичних тканин, зменшенням площі, прискоренням формування грануляційної тканини та епітелізації рани.

Висновки. Використання МСК і МСК-ІГ створюють сприятливі умови для нормального перебігу регенераторних процесів та епітелізації ран з активацією фібробластів, що підвищує ефективність загоєння хронічних ран.

Key words: mesenchymal stem cells, chronic purulent-necrotic wounds, treatment, morphological changes, wound healing, immunohisto-chemistry.

Pathologia 2022; 19 (1), 70-78

Morphological rationale of mesenchymal stem cells in the local treatment of experimental chronic purulent-necrotic wounds

S. V. Slobodianyk, S. D. Khimich, S. V. Vernygorodskyi, V. S. Shkolnikov

Aim: to study morphological changes in healing of chronic purulent-necrotic wounds in rats with local use of 0.025 % decamethoxine solution and mesenchymal stem cells.

Materials and methods. The experimental study was performed on 120 rats, which were divided into the following groups: I – control (without treatment); II – the use of classical wound healing (0.025 % decamethoxine); III – the use of clones of mesenchymal stem cells from the umbilical cord; IV – the use of clones of mesenchymal stem cells (cloned in inert gases). To assess morphological changes in chronic wounds, fragments measuring 0.5 cm × 1.0 cm × 1.0 cm were cut from the edges, followed by fixation in 10 % solution of neutral formalin. The microspeciments were prepared according to standard methods, histological sections 5–7 μm thick were stained with hematoxylin and eosin, basic brown, picrofuchsin according to van Gieson, Masson trichrome. The monoclonal antibodies (DAKO) with markers of intermediate filaments, mesenchymal cells and myofibroblasts – Vimentin (Clone V9), smooth muscle actin (αSMA, Clone 1A4), transmembrane protein of endothelial, stem cells and embryonic fibroblasts CD34 (Clone QBEnd 10) were used for immunohistochemistry.

Results. The positive dynamics of chronic wounds healing, with the usage of 0.025 % decamethoxine solution only in the early stages (3–7 days) was determined with a decrease in inflammatory cellular infiltration, while MSC and MSC-IG were effective at all stages of research and confirmed by more intensive purification of the wound's surface from purulent and necrotic tissues, area of the wound reduction, granulation tissue formation and epithelialization acceleration.

Conclusions. The use of MSCs and MSCs-IG creates favorable conditions for the normal course of regenerative processes and epithelialization of wounds with the activation of fibroblasts, which increases the effectiveness of chronic wound healing.

Пацієнти з рановою інфекцією становлять майже 40 % хворих усього хірургічного профілю [1]. Ризик генералізації інфекції є при будь-якому, навіть невеликому за розмірами, осередку. Лікування хірургічних інфекційних захворювань і післяопераційних інфекційних ускладнень потребує істотних трудових і матеріальних витрат, а летальність при інфекційних ускладненнях у післяопераційному періоді сягає 30 % [1].

Незважаючи на появу нових високотехнологічних методів діагностики, високоефективних лікарських препаратів, постійне удосконалення оперативної техніки, з кожним роком спостерігають збільшення кількості хворих саме з хронічною рановою інфекцією [1,2]. Це пов'язано не тільки зі збільшенням кількості хворих із гнійними ранами, але й з відсутністю універсального засобу чи методу лікування ран. Традиційні засоби і методи лікування ускладнених ран часто малоефективні та не завжди запобігають розвитку різних ускладнень. Це визначає необхідність продовження пошуку нових і удосконалення відомих засобів, методів лікування, що стимулюють репаративні процеси в ускладнених ранах, а також поглибленого вивчення механізмів їхньої дії, зокрема застосовуючи морфологічні методи дослідження [3]. Перспективні напрями досліджень щодо цієї патології – вивчення доцільності розширення показань до застосування хірургічних методів та удосконалення способів місцевого впливу на рановий процес [4].

Прогресивним методом лікування ранових дефектів є трансплантація алогенних мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) жирових тканин, що одержані *in vitro*. Доведено, що введення МСК у післяопікові рани призводить до прискорення процесів васкуляризації та епітелізації, поліпшуючи процес загоєння ран. Ці ефекти досягаються завдяки секреції МСК низки цитокінів, хемокінів, факторів росту, що мають імуносупресорну, протизапальну та антибактеріальну дії [5]. Незважаючи на різноманіття запропонованих методів, можливості підвищення ефективності лікування ранового процесу до кінця не вичерпано, що визначає доцільність продовження досліджень у цьому напрямі.

Мета роботи

Вивчення морфологічних параметрів загоєння хронічних гнійно-некротичних ран у білих щурів при місцевому застосуванні 0,025 % розчину декаметоксину та мезенхімальних стовбурових клітин.

Матеріали і методи дослідження

Експериментальне дослідження здійснили на 120 щурах на базі ветеринарної клініки (віварію) Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова. Тварин поділили на групи: I – контроль (без лікування); II – «класичне» лікування ран з використанням антисептика (0,025 % розчин декаметоксину); III – застосування мезенхімальних стовбурових клітин із пупкового канатика; IV – застосування мезенхімальних стовбурових клітин, клонованих в інертних газах. Хронічну рану моделювали за оригінальною методикою автора [6]: під час формування стандартного дефекту шкіри в міжлопатковій ділянці щура діаметром 1 см на прилеглі тканини накладали ішемізуючу металоконструкцію для зменшення кровотоку в ділянці рани, що призводило до суттєвого уповільнення термінів загоєння. Лікування починали від 28 доби від нанесення ран, що клінічно та гістологічно відповідало хронізації ранового процесу.

МСК Вартонова студня (МСК-ВС) людини отримали з Інституту молекулярної біології та генетики НАН України згідно з договором. У цьому досліді використали МСК-ВС, культивовані за стандартних умов CO_2-інкубатора, при зниженій концентрації кисню (в герметичній камері, 3 % кисню, 92 % азоту, 5 % вуглекислий газ – в інертних газах). МСК-ВС уводили локально одноразово на 28 добу з часу моделювання хронічної рани методом циркулярного ін'єкційного внутрішньошкірного нагнітання в краї рани 500 тис. клітин у 0,5 мл фізіологічного розчину; 0,025 % розчин декаметоксину застосовували місцево методом накладання просоченої ним стерильної марлевої пов'язки під час щоденних перев'язок.

Дослідження виконали згідно з міжнародними конвенціями щодо захисту тварин, яких застосовують з експериментальними та іншими науковими цілями (Страсбург, 1985), а також відповідно до положень комітету з біоетики Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова МОЗ України.

Для оцінювання морфологічних змін із країв ран вирізали фрагменти розмірами 0,5 см × 1,0 см × 1,0 см, фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну та заливали парафіном. Гістологічні зрізи завтовшки 5–7 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином, основним коричневим, пікрофуксином за ван Гізоном, трихромом за Масоном та комбінацією основного коричневого та міцного зеленого барвника [7]. Мікроскопію та фотографування гістологічних препаратів виконали за допомогою світлового мікроскопа OLIMPUS BX 41 при збільшеннях у 40, 100, 200 і 400 разів. Під час мікроскопії оцінювали стан і клітинний склад хронічних ран, наявність і характер репаративних змін. Морфометрію та статистичне опрацювання даних виконали за допомогою програми Quick PHOTO MICRO 2.3. Вміст клітинних елементів визначали з розрахунку на одиницю умовної площі (0,1 мм^2) [8].

Імуногістохімічне дослідження здійснили, використавши моноклональні антитіла компанії DAKO: до проміжних філаментів, мезенхімальних клітин і міофібробластів – Vimentin (Clone V9), гладком'язового актину (αSMA, Clone 1A4), трансмембранного білка ендотеліальних клітин, стовбурових і ембріональних фібробластів – CD34 (Clone QBEnd 10), а також систему візуалізації En VisionTMFLEX.

Результати дослідження оцінювали, враховуючи розподіл експресії віментину, αSMA та CD34 в клітинах, інтенсивність реакції та характер взаємодії з іншими структурними елементами. Імуногістохімічну реакцію оцінювали в 10 полях зору при 200 та 400-разовому збільшенні. Інтенсивність експресії визначали напівкількісним методом на основі виразності та цілісності забарвлення цитоплазми за градацією: низька, помірна та сильна. Як контроль використали шматочки ран, що одержані від експериментальних тварин без коригувальної терапії. Виразність експресії вімента-

Таблиця 1. Щільність розташування клітинних елементів та інтенсивність експресії αSMA, CD34, віментину (з розрахунку на 0,1 мм^2) під час лікування хронічних гнійно-некротичних ран на 7 добу експерименту

Клітинний склад	Експериментальні групи			
	Контроль	Декаметоксин	МСК	МСК-ІГ
ПЯЛ	798,00 ± 5,33	689,00 ± 4,06*	675,00 ± 7,78*	349,00 ± 17,47*
Плазмоцити	80,00 ± 3,33	69,00 ± 4,33#	60,00 ± 3,33*	56,00 ± 2,66*#
Лімфоцити	154,00 ± 5,61	94,00 ± 4,52#	84,00 ± 2,21*	77,00 ± 2,13*#
Макрофаги	132,00 ± 4,42	95,00 ± 3,07*	79,00 ± 3,14*	55,00 ± 4,01*
Мастоцити	9,00 ± 0,44	6,10 ± 0,27*^	5,40 ± 0,37*^	5,50 ± 0,41*^
Фібробласти	110,00 ± 4,22	149,00 ± 5,04*	171,00 ± 5,05*	208,00 ± 3,88*
αSMA	0,75 ± 0,04	0,81 ± 0,05^	0,79 ± 0,02^	1,11 ± 0,12*#
CD34	0,22 ± 0,01	0,28 ± 0,03^	0,29 ± 0,04^	0,73 ± 0,07*
Віментин	1,50 ± 0,14	1,61 ± 0,12^	2,04 ± 0,03*	2,34 ± 0,07*

ПЯЛ: поліморфноядерні лейкоцити; **МСК:** мезенхімальні стовбурові клітини; **МСК-ІГ:** мезенхімальні стовбурові клітини, клоновані в інертних газах; ***:** p < 0,001 порівняно з контролем; **#:** p < 0,05 порівняно з декаметоксином; **^:** p > 0,05 порівнюючи групи спостереження.

ну, гладком'язового актину та CD34 градуювали на 4 категорії: 0 (-) – негативна реакція (забарвлення <5 % клітин); 1 (+) – слабке забарвлення (позитивно забарвлені 10–30 % клітин); 2 (++) – помірно виражена реакція (більша частина позитивно забарвлених клітин – 31–60 %); 3 (+++) – інтенсивне забарвлення (>60 % клітин або майже всі клітини позитивно забарвлені). Коефіцієнт експресії (КЕ) розраховували для кожного спостереження за формулою: КЕ = Σ (i × v) / 100, де i – інтенсивність забарвлення в балах (від 0 до 3), v – відсоток забарвлених клітин (від 0 % до 100 % з найбільш вираженою реакцією у 10 полях зору при ×400) для кожного значення [9].

Статистичне опрацювання морфометричних параметрів здійснили за допомогою стандартного програмного пакета Statistica 6.1 фірми StatSoft (НДЦ ВНМУ імені М. І. Пирогова, ліцензійний № BXXR901E246022FA) та Excel. Відмінності між вибірками визначали за допомогою t-критерію Стьюдента, також обраховували середні значення за кожною ознакою та їхні стандартні відхилення. Рівень p < 0,05 визначили як вірогідний у всіх тестах.

Результати

На 28 добу експерименту рани у 97,0 % білих щурів характеризувалися класичними морфологічними ознаками хронічного гнійно-некротичного запалення: наявністю в центрі чималої зони фібриноїдного некрозу з домішками поліморфноядерних лейкоцитів (ПЯЛ), макрофагів, лімфоцитів, плазматичних клітин і мастоцитів. І в центральних відділах (дні), і на краях рани багатошаровий плоский зроговілий епітелій майже не визначили через істотні некротичні зміни епітеліоцитів (*рис. 1*).

На 3 добу експерименту (31 добу спостереження) вірогідне збільшення кількості ПЯЛ у контрольній групі підтверджено результатами морфометричного дослідження: кількість ПЯЛ становила 967,00 ± 5,97 на 0,1 мм^2 порівняно з групами, де використовували декаметоксин, МСК і МСК, клоновані в інертних газах (МСК-ІГ) – 837,00 ± 9,78, 869,00 ± 12,68, 845,00 ± 12,04 (p < 0,001) відповідно.

Морфологічні зміни другої групи (із застосуванням декаметоксину) на третю добу експерименту характеризувалися наявністю всіх фаз запальної відповіді: альтерації, ексудації та проліферації. Порівняно з першою групою (967,00 ± 5,97) інтенсивність лейкоцитарної інфільтрації в цих щурів була меншою (837,00 ± 9,78, p < 0,001), але шар фібриноїдного некрозу залишався майже незмінним. У дні рани виявили зменшення некрозу поперечнопосмугованої мускулатури. Поряд зі зменшенням кількісного складу ПЯЛ у групі МСК та, особливо, МСК-ІГ лейкоцитарно-фібринозний шар у кілька разів менший порівняно з контрольною групою та групою декаметоксину. Слід зазначити, що в групах із застосуванням декаметоксину, МСК і МСК-ІГ вже на третю добу лікування в дні та краях ран зафіксували появу вузького пласта з вірогідно збільшеною кількістю віментин-позитивних фібробластів (*рис. 2*), αSMA-позитивних клітин і CD34-позитивних ендотеліальних клітин. У групі контролю кількість цих клітин становила: αSMA-позитивні клітини – 0,68 ± 0,02, CD34-позитивні ендотеліальні клітини – 0,09 ± 0,01, віментин-позитивні фібробласти – 1,21 ± 0,11. За результатами морфометричних досліджень, у групах із застосуванням декаметоксину, МСК і МСК-ІГ вірогідно збільшувалася кількість αSMA-позитивних міофібробластів (декаметоксин – 0,73 ± 0,02; МСК – 0,85±0,03; МСК-ІГ – 0,93 ± 0,03), CD34-позитивних ендотеліальних клітин (декаметоксин – 0,11 ± 0,01; МСК – 0,130 ± 0,015; МСК-ІГ – 0,140 ± 0,007), мезенхімальних віментин-позитивних клітин (декаметоксин – 1,28 ± 0,13; МСК – 1,64 ± 0,12; МСК-ІГ – 1,78 ± 0,11), особливо в групі з МСК-ІГ (p < 0,001).

На 7 добу експерименту морфологічні зміни в хронічних гнійно-некротичних ранах контрольної групи відповідали попередньо встановленим із незначним зменшенням товщини гнійно-некротичного шару та великою кількістю хаотично розташованих фібробластів, мастоцитів, макрофагів, лімфоцитів і плазматичних клітин. Ці спостереження підтверджені результатами морфометричного та імуногістохімічного досліджень (*табл. 1*).

У групі МСК-ІГ щільність розташування ПЯЛ порівняно з контрольною групою та групою декаметоксину (p < 0,001) істотно менша (*табл. 1*). Крім того, у цій групі (МСК-ІГ) порівняно з групами декаметоксину та МСК кількість лімфоцитів і макрофагів (77,00 ± 2,13 та 55,00 ± 4,01 відповідно) вірогідно менша (p < 0,05 та p < 0,001 відповідно). Зменшення кількості мастоцитів щодо контролю в цей термін дослідження вірогідне (p < 0,001) в усіх групах із коригувальною терапією, але недостовірне, якщо порівнювати групи (p > 0,05). За даними, що наведені в *таблиці 1*, кількість фібробластів збільшувалася в усіх експериментальних групах щодо показників контролю (p < 0,001), найкращі показники встановили у групі МСК-ІГ (p < 0,001) порівняно з групами декаметоксину та МСК.

Особливість цього періоду спостереження в групах з коригувальним лікуванням МСК і МСК-ІГ – вірогідне зменшення клітин мононуклеарного ряду попри збільшення кількості клітин мезенхімального походження з активним васкуло'генезом. Це підтверджено результатами імуногістохімічного аналізу (*табл. 1*), перед-

усім у групі МСК-ІГ, де одержали вірогідні показники ($p < 0,001$) порівняно з контролем та іншими групами. Але експресія αSMA та CD34 у тварин, які отримували для лікування декаметоксин і МСК, не вірогідна ($p > 0,05$) щодо показника групи без лікування.

У контрольній групі в цей термін експерименту в мікропрепаратах визначали виражений набряк, скупчення лімфоцитів, лейкоцитів, макрофагів і в поверхневих відділах, і в незрілій грануляційній тканині. Під час гістологічного дослідження виявили клітинний детрит, оточений добре вираженою піогенною мембраною, що рясно інфільтрована лейкоцитами. Після забарвлення на колагенові волокна спостерігали розпушення волокнистих структур з інфільтрацією нейтрофільними лейкоцитами, великою кількістю лімфоцитів, макрофагів (*табл. 1*). Зберігалося повнокров'я судин із розширенням, потовщенням їхніх стінок внаслідок набряку.

У групах із застосуванням декаметоксину, МСК і МСК-ІГ на 7 добу експерименту набряк і гіперемія судин порівняно з показниками на 3 добу істотно зменшені. Коагуляційний некроз у центрі рани став однорідним, еозинофільним, гомогенним, у результаті втрати рідини й усихання в ньому з'явилися щілини, подекуди вкриті ендотелієм. У зоні некрозу виявили судини з сегментарно зруйнованими стінками, аглютинованими еритроцитами й тромбами з ознаками початкової організації. По периферії некротизованих ділянок визначили чималу кількість макрофагів, що мають вигляд «зернистих куль», у зоні резорбції вогнищ крововиливів – безліч сидерофагів і новоутворених судин мікроциркуляторного русла.

На 14 добу експерименту під час гістологічного аналізу шкіри в зоні хронічної рани встановили: у першій дослідній групі зберігалися однотипні ознаки загострення хронічного запалення, як-от інфільтрація нейтрофільними гранулоцитами та некроз. Клітинний склад зазнав істотних змін. Так, суттєво зросла кількість фібробластів, що замінили макрофагальні елементи. Щільність розташування клітинних елементів для ПЯЛ становила 518,00 ± 6,46, плазмоцитів – 125,00 ± 3,07, лімфоцитів – 168,00 ± 5,12, макрофагів – 104,00 ± 4,00, мастоцитів – 7,10 ± 0,37, фібробластів 109,00 ± 3,48 у полі зору; це вірогідно менше ($p < 0,001$), ніж у групах із коригувальною терапією (*табл. 2*). Показники щільності розташування ПЯЛ ($p < 0,001$), плазмоцитів ($p < 0,05$) і макрофагів ($p < 0,05$) кращі у тварин, які отримували МСК і МСК-ІГ порівняно з групою декаметоксину; щодо лімфоцитів, то найбільш вірогідні показники встановлені у групі МСК-ІГ. Експериментальні групи в порядку зростання інтенсивності фібробластичної реакції: МСК-ІГ > МСК > декаметоксин (*табл. 2*).

У групах МСК-ІГ і МСК на 14 добу у 80 % та 70 % піддослідних тварин спостерігали майже повне очищення ран від гнійно-некротичного детриту та формування сполучнотканинного рубця з епітелізацією (*рис. 3*). Аналогічні зміни в цей термін виявили у контрольній групі тільки в 10,0 % щурів, у групі декаметоксину – в 60,0 %.

Після лікування із застосуванням декаметоксину та МСК-ІГ спостерігали затихання дистрофічних і де-

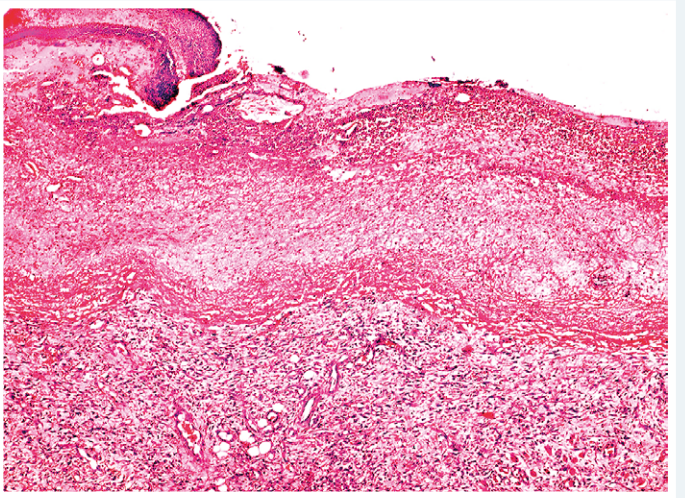


Рис. 1. Край хронічної рани на 28 добу експерименту (без лікування) з некрозом епітеліоцитів, фібриноїдним некрозом і лейкоцитарною інфільтрацією. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. ×100.

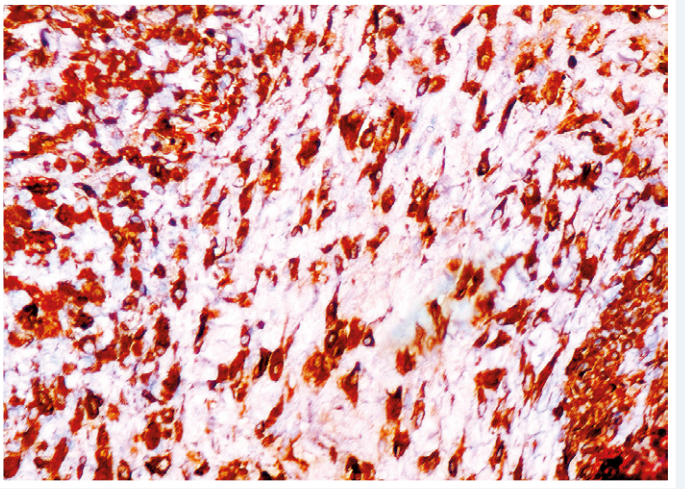


Рис. 2. Пласти віментин-позитивних фібробластів у дні хронічної рани на 3 добу лікування МСК-ІГ (31 доба спостереження). ІГХ: Vimentin (Clone V9). Зб. ×200.

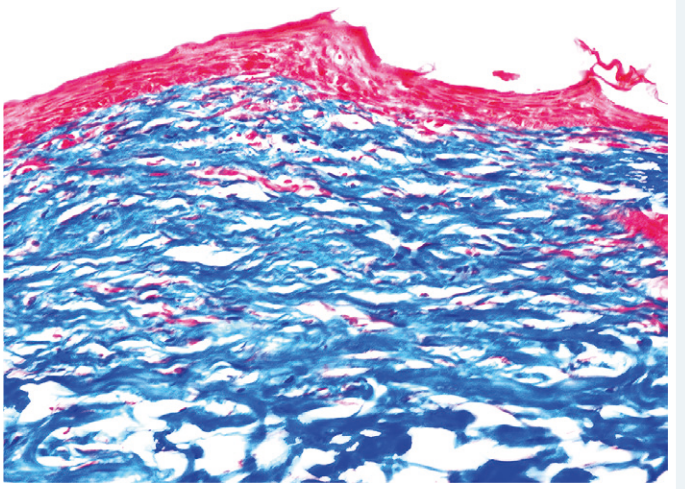


Рис. 3. Сформована сполучна тканина (синього кольору) з епітелізацією на місці хронічної рани на 14 добу лікування МСК-ІГ (42 доба спостереження). Забарвлення – трихром за Масоном. Зб. ×200.

Таблиця 2. Щільність розташування клітинних елементів та інтенсивність експресії αSMA, CD34, віментину (з розрахунку на 0,1 мм^2) під час лікування хронічних гнійно-некротичних ран на 14 добу експерименту

Клітинний склад	Експериментальні групи			
	Контроль	Декаметоксин	МСК	МСК-ІГ
ПЯЛ	518,00 ± 6,46	368,00 ± 13,64^	339,00 ± 9,59*	225,00 ± 6,54*
Плазмоцити	125,00 ± 3,07	98,00 ± 3,59^	89,00 ± 4,06*	78,00 ± 2,90*
Лімфоцити	168,00 ± 5,12	118,00 ± 4,16*	95,00 ± 3,72*	88,00 ± 2,90*#
Макрофаги	104,00 ± 4,00	85,00 ± 2,68*	80,00 ± 3,65*#	52,00 ± 2,00*#
Мастоцити	7,10 ± 0,37	4,10 ± 0,37*	4,00 ± 0,33*	3,80 ± 0,48*
Фібробласти	109,00 ± 3,48	157,00 ± 4,22*	219,00 ± 6,40*	346,00 ± 7,18*
αSMA	0,76 ± 0,02	0,84 ± 0,05*	0,86 ± 0,03*	0,98 ± 0,09*
CD34	0,27 ± 0,03	0,33 ± 0,05^	0,38 ± 0,05*	0,66 ± 0,06*#
Віментин	1,41 ± 0,11	1,55 ± 0,12*	1,87 ± 0,02*	1,92 ± 0,05*#

ПЯЛ: поліморфноядерні лейкоцити; **МСК:** мезенхімальні стовбурові клітини; **МСК-ІГ:** мезенхімальні стовбурові клітини, клоновані в інертних газах; ***:** p < 0,001 порівняно з контролем; **#:** p < 0,05 порівняно з декаметоксином; **^:** p > 0,05 порівнюючи групи спостереження.

Таблиця 3. Щільність розташування клітинних елементів та інтенсивність експресії αSMA, CD34, віментину (з розрахунку на 0,1 мм^2) під час лікування хронічних гнійно-некротичних ран на 30 добу експерименту

Клітинний склад	Експериментальні групи			
	Контроль	Декаметоксин	МСК	МСК-ІГ
ПЯЛ	389,00 ± 14,56	187,00 ± 14,53*	136,00 ± 10,56*	81,00 ± 4,58*
Плазмоцити	120,00 ± 3,94	94,00 ± 2,66*	86,00 ± 3,05*	63,00 ± 2,60*
Лімфоцити	152,00 ± 3,26	108,00 ± 4,16*	87,00 ± 2,13*	53,00 ± 3,00*
Макрофаги	107,00 ± 3,66	67,00 ± 2,60*	63,00 ± 4,22*	34,00 ± 2,66*
Мастоцити	5,80 ± 0,33	3,30 ± 0,49*	3,70 ± 0,50*	1,90 ± 0,37*#
Фібробласти	140,00 ± 4,21	182,00 ± 9,40*	262,00 ± 6,96*	288,00 ± 4,89*#
αSMA	0,61 ± 0,05	0,76 ± 0,02#	0,78 ± 0,06#	0,91 ± 0,03*
CD34	0,23 ± 0,01	0,41 ± 0,06#	0,37 ± 0,05#	0,40 ± 0,05#
Віментин	1,36 ± 0,10	1,51 ± 0,11^	1,79 ± 0,07#	1,85 ± 0,09*#

ПЯЛ: поліморфноядерні лейкоцити; **МСК:** мезенхімальні стовбурові клітини; **МСК-ІГ:** мезенхімальні стовбурові клітини, клоновані в інертних газах; ***:** p < 0,001 порівняно з контролем; **#:** p < 0,05 порівняно з декаметоксином; **^:** p > 0,05 порівнюючи групи спостереження.

генеративних змін колагенових волокон. Але в групі МСК-ІГ у цей термін спостереження визначили вірогідне зменшення дистрофічних змін у гладких міоцитах і збільшення кількості гладком'язових елементів. Це підтверджено результатами імуногістохімічного дослідження з використанням SMA (*табл. 2*).

У цей термін спостереження маркери експресії міофібробластів, ендотеліальних і мезенхімальних клітин достовірно вищі в групах МСК і МСК-ІГ порівняно з контролем (p < 0,001), крім CD34 у групі декаметоксину, посилення забарвлення якого не було вірогідним. Найвищі імуногістохімічні показники встановили в експериментальних тварин, які отримували лікування МСК-ІГ.

На 30 добу експерименту (58 добу спостереження) в групі контролю у 70 % щурів епітелій, що наростав на краю хронічної рани, нерідко некротизувався та був пронизаний лейкоцитами. Однак епітеліальні вирости в грануляційній тканині, іноді доволі глибокі, зберігалися та могли бути джерелом нового, повторного росту епітелію на поверхні рани. В ранах деяких щурів контрольної групи в ділянках, що ближчі до інтактної тканини навколо судин мікроциркуляторного русла, передусім у дермі навколо судин, виявляли дегранулюючі мастоцити, розташовані поодиноко або малими групами. Це майже не спостерігали або їх виявляли в незначній кількості у групах із коригувальним лікуванням (*табл. 3*).

Отже, на 30 добу експерименту у 70 % піддослідних тварин у групі контролю не відбувалася епітелізація рани, заміщення грануляційної тканини на фіброзну. Це свідчило про прогресування гнійного запалення та пролонгацію першої фази загоєння ран. У дні та на краях хронічної рани щурів контрольної групи виявили молоду сполучну тканину, що містила численні клітинні елементи: макрофаги, фібробласти, лімфо- та плазмоцити, невелику кількість нейтрофільних гранулоцитів. Деякі з кровоносних судин, що тут виявляли, розширені. У венулах нерідко спостерігали явища стазу. У сполучній тканині в цей термін визначили невелику кількість нейтрофільних гранулоцитів. Порівняно з експериментальними групами тварин, що отримували медикаментозну корекцію, тут суттєво збільшена кількість макрофагів, фібробластів, мастоцитів (*табл. 3*). У складі інфільтрату з розрахунку на 0,1 мм^2 виявляли ПЯЛ – 389,00 ± 14,56, плазмоцити – 120,00 ± 3,94, лімфоцити – 152,00 ± 3,26, макрофаги – 107,00 ± 3,66, мастоцити – 5,80 ± 0,33. Кількість фібробластів також вірогідно відрізнялася в усіх групах від контролю, але у щурів, в яких застосували МСК і МСК-ІГ, фібробластична реакція інтенсивніша порівняно з групою декаметоксину (p < 0,001).

За даними, що наведені в *таблиці 3*, в контрольній групі кількість ПЯЛ удвічі більша, ніж у разі застосування декаметоксину та МСК, учетверо більша, ніж у групі з використанням МСК-ІГ. На нашу думку, це може впливати на перебіг і вираженість процесу репаративної регенерації, який кількісно прямо пропорційний інтенсивності запалення. В контрольній групі у дні хронічної рани часто виявляли лімфоцити та плазмоцити. Порівнюючи морфологічні зміни в хронічних ранах першої та третьої груп, зазначимо: у третій групі грануляційна тканина містить нечисленні макрофаги, лімфоцити, плазмоцити, мастоцити, а також новоутворені капіляри. У третій експериментальній групі в краях хронічної рани, як і в першій групі, визначили певну нерівномірність диференціювання сполучнотканинних елементів. Виявили ділянки, що містять доволі велику кількість фібробластів, мастоцитів, макрофагів і лімфоцитів; інші ділянки – в стані фіброзу. У таких зонах наявні товсті колагенові пучки та нечисленні кровоносні судини. Часто серед фіброзної тканини виявляли дрібні осередкові скупчення лімфоцитів. Фібробласти здебільшого характеризувалися підвищеною базофілією цитоплазми, наявністю великих ядер і ядерець.

На відміну від першої групи, у групах тварин із використанням декаметоксину, МСК і МСК-ІГ запальної клітинної реакції майже не було, що підтверджено кількісним аналізом клітинних елементів у зоні хронічної рани (*табл. 3*). Порівнюючи активність фібрилогенезу, виявили: у групі з МСК-ІГ фібробластична реакція стабілізувалася на 30 добу (288,00 ± 4,89, p < 0,001) порівняно з попередніми термінами (*табл. 3*). У контрольній групі спостерігали затримку дозрівання сполучної тканини, про що свідчили залишки грануляційної тканини в ділянці рани. На відміну від контрольної групи, в разі застосування декаметоксину, МСК і МСК-ІГ грануля-

ційну тканину в цей термін спостереження майже не виявляли. Це свідчить про раніші строки відновлення та стабілізацію ранового процесу.

Результати імуногістохімічного аналізу (*табл. 3*) підтвердили дані морфологічного дослідження, а також виявили вірогідне переважання αSMA- та CD34-позитивних клітин у групах декаметоксину, МСК і МСК-ІГ ($p < 0,05$ і $p < 0,001$ відповідно). Попри недостовірне збільшення віментин-позитивних клітин у групі декаметоксину ($p < 0,05$), визначили: у тварин, яким уводили МСК-ІГ, отримали найкращі результати.

Отже, в пізніші терміни загоєння ран (починаючи з 1 місяця і далі) у грануляційній тканині відбувалися такі зміни: шар вертикальних судин поступово стоншувався, кількість аморфної проміжної речовини в ньому зменшувалася, водночас збільшувалася кількість фібробластів не тільки навколо судин, але й у проміжках між ними.

Обговорення

Результати нашого дослідження зіставні з даними фахової літератури про етапність змін клітин-учасників запального процесу [10,11]. У фазі запалення спочатку переважають судинні реакції, що характеризують механізм запалення, а потім відбувається очищення рани від мертвих тканин. Друга фаза пов'язана з утворенням грануляційної тканини. Реорганізація рубця й епітелізація – основні компоненти фінальної стадії ранового процесу [12].

У результаті нашої експериментальної роботи встановили відмінності динаміки тканинної реакції під час загоєння хронічних гнійно-некротичних ран. Так, у всіх групах дослідження з коригувальною терапією, використовуючи декаметоксин, МСК і МСК-ІГ, на 3 добу експерименту спостереження виявили вірогідне зменшення запальної клітинної інфільтрації. Треба підкреслити, що в групі декаметоксину кількість ПЯЛ найменша (837,00 ± 9,78) порівняно з МСК і МСК-ІГ. У групах із застосуванням декаметоксину, МСК і МСК-ІГ вже на 3 добу лікування навколо країв ран і в її дні реєстрували появу малодиференційованих клітин, кількість яких істотно відрізнялася від групи контролю. Це підтверджено результатами імуногістохімічного дослідження. Так, у групах із застосуванням декаметоксину, МСК і МСК-ІГ достовірно збільшувалася кількість міофібробластів, що позитивно забарвлювалися αSMA, ендотеліальних клітин, які експресували CD34, і мезенхімальних клітин (віментин-позитивних фібробластів), особливо в групі з МСК-ІГ ($p < 0,001$).

Відомо, що основна функція макрофагів пов'язана з резорбцією за допомогою продукованих ними ферментів і поглинанням чужорідних структур [2]. Макрофаги переводять запальну реакцію в фібробластичну стадію, активуючи проліферацію фібробластів, що синтезують позаклітинний матрикс, зокрема колаген. У контрольній групі відбувалося гальмування фібробластичної реакції внаслідок пролонгації та загострення хронічного запалення на відміну від груп декаметоксину, МСК і МСК-ІГ, де розвиток фібробластичної стадії ранового процесу спостерігали в більшості тварин. Зменшення саме гнійного компонента вже на 3 добу спостереження більш виражене в разі застосування декаметоксину.

Виявлене на 7 добу вірогідне збільшення кількості фібробластів (208,00 ± 3,88) після лікування МСК-ІГ свідчить, що саме його введення забезпечує швидший перехід на фібробластичну стадію ранового запалення. В контрольній групі встановили: на 7 добу експерименту кількість нейтрофілів удвічі ($p < 0,05$) більша, ніж у групах декаметоксину, МСК і МСК-ІГ. Кількість фібробластів помітно більша під час застосування МСК-ІГ (208,00 ± 3,80). На ранніх строках спостереження (3–7 доба) фібробластична реакція вірогідно ($p < 0,05$) активніша в групах МСК і МСК-ІГ.

Одна з важливих ознак відновлення функції органа – формування судинного русла в пошкоджених тканинах, тому швидкість судиноутворення в грануляційній тканині є одним із критеріїв оцінювання позитивних властивостей застосованого препарату [13]. Як відомо [14,15], васкулоґенез пов'язаний із прогеніторними ендотеліальними клітинами, що є попередниками ендотеліальних клітин і добре ідентифікуються за допомогою маркера CD34 як поодинокі клітини, невеликі скупчення та ланцюжки. У групах коригувальної терапії з використанням декаметоксину, МСК і МСК-ІГ нам вдалося виявити позитивну динаміку утворення судин із прогеніторних ендотеліоцитів (васкулоґенез) від проліферації цих клітин до утворення серед них невеликих просторів, що, подовжуючись, формували мережу майбутніх судин. Ендотеліоцити з мембранно-цитоплазматичним забарвленням CD34 з утворенням судин капілярного типу добре візуалізувалися в стромальному компоненті дна рани, де виявляли хаотично розташовані судини дрібного калібру з істотним превалюванням капілярів. Встановили вірогідні дані щодо переважання CD34-позитивних клітин у групі з МСК-ІГ (0,73 ± 0,07, $p < 0,001$) як порівняти з контрольною групою. Це відповідає результатам інших дослідників [14,15].

За даними наукової літератури [16], формування епітелію на поверхні рани починається ще в першій стадії загоєння. У нашому дослідженні, слід зазначити, воно дуже повільно відбувалося в контрольній групі. Мінливий баланс між синтезом колагену та його руйнуванням лежить в основі механізму загоєння рани [16,17]. У фазі ремоделювання розпад колагену наростає, а синтез знижується, що підтверджено нашими даними в разі застосування МСК-ІГ та результатами інших авторів [18].

Синтезуючи колаген, еластин, глікопротеїни та протеоглікани, фібробласти забезпечують опорно-механічну функцію шкіри, продукуючи сигнальні молекули, що впливають на проникність судинних стінок і метаболізм, здійснюють трофічну функцію [19]. У нашому дослідженні мікроскопічне вивчення ділянок хронічної гнійно-некротичної рани на 14 добу показало швидшу динаміку очищення від гнійного процесу в разі застосування МСК. Фібробластична реакція в разі використання декаметоксину та МСК у процесі загоєння рани доволі виражена, але для декаметоксину виявили тенденцію до формування грубішого сполучнотканинного рубця. Здатність МСК стимулювати проліферацію фібробластів неодноразово підтверджена експериментально [11,15].

Макрофагально-фібробластична взаємодія призводить до міграції та прискореної проліферації фібробластів, їх диференціювання, синтезу, секреції колагену та інших компонентів матриксу, активного фібрилоґенезу. В нашому дослідженні спостерігали стимуляцію декаметоксином, МСК і МСК-ІГ активності фібробластів і судиноутворення в молодій сполучній тканині. Це поліпшувало оксигенацію рани, сприяло прискоренню дозрівання сполучної тканини з наступним ремоделюванням та епітелізацією хронічних гнійно-некротичних ран. У контрольній групі спостерігали затримку запальної реакції на моноцитарно-макрофагальній стадії; це не тільки збільшувало небезпеку гнійних ускладнень, але й перешкоджало завершенню фіброзування, а отже відновленню міцності ранового рубця.

Морфометричні дослідження показали: на 30 добу експерименту (58 доба спостереження) кількість нейтрофільних лейкоцитів, плазмоцитів, лімфоцитів і макрофагів у групі контролю перевищувала відповідні показники запальної відповіді в групах декаметоксину, МСК і МСК-ІГ. Аналогічна тканинна реакція характерна й для дегранулюючих мастоцитів, що беруть участь у викиді медіаторів запалення. Це свідчило про прогресування хронічного процесу в рані. В пізні стадії загоєння ран у грануляційній тканині формується досить правильне розташування волокнистих структур, вертикальних і горизонтальних, пересічених у взаємно перпендикулярних напрямках.

Особливе значення під час загоєння рани (стягування), безсумнівно, належить краще розвинутим глибоким шарам горизонтальних фібробластів і фіброзних волокон. Саме ці елементи змінюють грануляційну тканину, що зникає, і в пізні терміни загоєння заповнюють і стягують рановий дефект. Важливе значення горизонтальних структур, їхню роль у загоєнні рани визнають і інші дослідники [2,13,20]. У досліджених нами хронічних ранах контрольної групи, незважаючи на тривалі терміни після моделювання хронічної гнійно-некротичної рани (до 2 місяців і більше), не спостерігали повного закриття й епітелізації, незважаючи на проліферацію фіброзних волокон.

Отже, патоморфологічні дослідження свідчать: використання декаметоксину, МСК і МСК-ІГ під час лікування ран призводить до швидкого пригнічення гнійного запалення, прискорює процеси репаративної регенерації. У разі застосування МСК і МСК-ІГ швидше відбувається ремоделювання грануляційної тканини, а міофібробласти, які в нашому дослідженні позитивно маркувалися αSMA, є ключовою ланкою в стягуванні рани: вони не тільки підтримують гомеостаз міжклітинного матриксу дерми, забезпечуючи його ремоделювання та оновлення, але й відіграють важливу роль у підтримці фізіологічного стану інших шарів шкіри. Прискорення розвитку фібробластичної стадії при введенні МСК і МСК-ІГ у рану має важливе значення для ранішого відновлення структури та функцій ушкоджених тканин, а також для запобігання пізнім рановим ускладненням, оскільки неспроможність регенерації чи фіброзу пролонгує запалення або зумовлює його хронічний перебіг. Застосування МСК і МСК-ІГ під час лікування хронічних ран сприяє прискореній епітелізації: за нашими даними, вона починалася вже на 3 добу та була досить інтенсивною на 7 добу. Це зумовлено синтезом МСК різних факторів росту, що стимулюють проліферацію і мезенхімального, й епітеліального диферону шкіри.

Висновки

1. Результати дослідження довели позитивний ефект під час лікування експериментальних ран і високу ефективність МСК і МСК-ІГ, що підтверджено динамікою морфологічних змін у хронічній рані. В разі застосування декаметоксину встановили позитивну динаміку морфологічних показників загоєння ран на 3–7 добу репаративного процесу, а МСК і МСК-ІГ ефективні на всіх етапах дослідження.

2. Мезенхімальні стовбурові клітини та МСК-ІГ прискорювали процеси загоєння експериментальних хронічних гнійно-некротичних ран вже після 3 доби лікування (31 доба спостереження). В цей термін відбувалося швидше очищення поверхні рани від гнійно-некротичних тканин, прискорення формування грануляційної тканини. На 7 добу лікування під впливом МСК і МСК-ІГ спостерігали швидше формування та дозрівання грануляційної тканини, зменшення площі рани, прискорення процесів епітелізації.

3. На 14 та 30 добу лікування повну епітелізацію ран виявили у 60 % і 70 % експериментальних тварин, яким застосовували декаметоксин, 75 % і 80 % – МСК, 90 % й 95 % щурів – МСК-ІГ відповідно за термінами, а в контрольній групі епітелізацію спостерігали тільки в 10 % і 30 % тварин відповідно ($p < 0,001$).

4. Встановили високу ефективність МСК у комбінації з інертними газами під час лікування експериментальних хронічних гнійно-некротичних ран, що підтверджено вірогідним збільшенням і стабілізацією експресії віментину, CD34 та αSMA ($0,91 \pm 0,03$, $0,40 \pm 0,05$, $1,85 \pm 0,09$ відповідно, $p < 0,001$).

Перспективи подальших досліджень. Застосування розробленого методу під час лікування хронічних ран дає змогу вірогідно скоротити терміни очищення поверхні рани від гнійно-некротичних тканин та епітелізації порівняно з контрольною групою, прискорити дозрівання грануляційної тканини та фібрилоґенез. Застосування та впровадження клітинних технологій у гнійній хірургії – перспективний напрям для удосконалення та оптимізації лікування хворих із хронічними ранами. Наступні дослідження структурної перебудови хронічних ран із застосуванням новітніх молекулярно-біологічних маркерів під час лікування МСК і МСК-ІГ дадуть змогу здійснювати диференційований вибір тактики фармакокорекції та підвищать ефективність загоєння хронічних ран.

Фінансування

Дослідження виконане у рамках НДР Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова «Розробка науково обґрунтованих критеріїв патоморфозу та морфологічної діагностики соціально значущої інфекційної патології, серцево-судинних хвороб, захворювань жіночої репродуктивної системи», № держреєстрації 0119U103946; НДР «Ушкодження: механічні, фізичні, хімічні та біологічні причини. Механізми розвитку, діагностика та лікування», № держреєстрації 0121U110669.

Конфлікт інтересів: відсутній.
Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 10.12.2021
Після доопрацювання / Revised: 23.03.2022
Прийнято до друку / Accepted: 04.04.2022

Відомості про авторів:
Слободяник С. В., асистент каф. загальної хірургії, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна.
ORCID ID: 0000-0003-0770-6658
Хіміч С. Д., д-р мед. наук, професор, зав. каф. загальної хірургії, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна.
ORCID ID: 0000-0002-8643-2140
Вернигородський С. В., д-р мед. наук, професор, зав. каф. патологічної анатомії, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна.
ORCID ID: 0000-0002-9314-8527
Школьніков В. С., д-р мед. наук, професор каф. анатомії людини, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна.
ORCID ID: 0000-0001-8233-1863

Information about authors:
Slobodianyk S. V., Assistant of the Department of General Surgery, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine.
Khimich S. D., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of General Surgery, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine.
Vernygorodskyi S. V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine.
Shkolnikov V. S., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Human Anatomy, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine.

Список літератури

[1] Complex treatment of purulent wounds with the use of high-pressure aerodisperse mixture / V. O. Shaprynskyi, S. S. Skalskyi, Y. V. Shaprynskyi et al. *Wiadomosci lekarskie*. 2020. Vol. 73, Iss. 5. P. 889-894. https://doi.org/10.36740/wlek202005110
[2] Stem cells and chronic wound healing: state of the art / T. Leavitt, M. Hu, C. Marshall et al. *Chronic Wound Care Management and Research*. 2016. Vol. 3. P. 7-27. https://doi.org/10.2147/CWCMR.S84369
[3] Wilkinson H. N., Hardman M. J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open biology*. 2020. Vol. 10, Iss. 9. 200223. https://doi.org/10.1098/rsob.200223
[4] Ponomarenko E. V. Use of complex patches for the reconstruction of defects of soft tissue of the trunk and limbs caused by traumatic damage. *Shpytalna khirurhiia. Шпитальна хірургія. Журнал імені Л. Я. Ковальчука*. 2019. № 4. С. 90-94. https://doi.org/10.11603/2414-4533.2018.4.9719
[5] Kosaric N., Kiwanuka H., Gurtner G. C. Stem cell therapies for wound healing. *Expert opinion on biological therapy*. 2019. Vol. 19, Iss. 6. P. 575-585. https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1596257
[6] Пат. 123694 Україна, МПК G09B23/28. Спосіб створення хронічної рани у експериментальних тварин / С. В. Слободяник, С. Д. Хіміч, М. Д. Желіба, В. С. Школьніков ; заявник та власник Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова. № a202000027; заявл. 02.01.20; опубл. 12.05.2021. Бюл. № 19. https://sis.ukrpatent.org/uk/search/detail/1593228/
[7] A novel RGB-trichrome staining method for routine histological analysis of musculoskeletal tissues / F. Gaytan, C. Morales, C. Reymundo, M. Tena-Sempere. *Scientific reports*. 2020. Vol. 10, Iss. 1. P. 16659. https://doi.org/10.1038/s41598-020-74031-x
[8] Suvarna S. K., Layton C., Bancroft J. D. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 8th ed. Elsevier, 2020. https://doi.org/10.1016/C2015-0-00143-5
[9] Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: comparison with quantitative biochemical methods / L. B. Kinsel, E. Szabo, G. L. Greene et al. *Cancer research*. 1989. Vol. 49, Iss. 4. P. 1052-1056.
[10] Eming S. A., Martin P., Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine*. 2014. Vol. 6, Iss. 265. 265sr6. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337
[11] Multipotent stromal cells/mesenchymal stem cells and fibroblasts combine to minimize skin hypertrophic scarring / C. C. Yates, M. Rodrigues, A. Nuschke et al. *Stem cell research & therapy*. 2017. Vol. 8, Iss. 1. P. 193. https://doi.org/10.1186/s13287-017-0644-9
[12] Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies / A. Nourian Dehkordi, F. Mirahmadi Babaheydari, M. Chehelgerdi, S. Raeisi Dehkordi. *Stem cell research & therapy*. 2019. Vol. 10, Iss. 1. P. 111. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1212-2
[13] Physicochemically Tuned Myofibroblasts for Wound Healing Strategy / U. H. Ko, J. Choi, J. Choung et al. *Scientific reports*. 2019. Vol. 9, Iss. 1. P. 16070. https://doi.org/10.1038/s41598-019-52523-9
[14] Zhang Z., Lv L. Effect of local insulin injection on wound vascularization in patients with diabetic foot ulcer. *Experimental and therapeutic medicine*. 2016. Vol. 11, Iss. 2. P. 397-402. https://doi.org/10.3892/etm.2015.2917
[15] Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration / E. M. Tottoli, R. Dorati, I. Genta et al. *Pharmaceutics*. 2020. Vol. 12, Iss. 8. P. 735. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735
[16] Mathew-Steiner S. S., Roy S., Sen C. K. Collagen in Wound Healing. *Bioengineering*. 2021. Vol. 8, Iss. 5. P. 63. https://doi.org/10.3390/bioengineering8050063
[17] Rosique R. G., Rosique M. J., Farina Junior J. A. Curbing Inflammation in Skin Wound Healing: A Review. *International journal of inflammation*. 2015. P. 316235. https://doi.org/10.1155/2015/316235
[18] Human mesenchymal stem cells-conditioned medium improves diabetic wound healing mainly through modulating fibroblast behaviors / M. Saheli, M. Bayat, R. Ganji et al. *Archives of dermatological research*. 2019. Vol. 312, Iss. 5. P. 325-336. https://doi.org/10.1007/s00403-019-02016-6
[19] Fibroblasts as immune regulators in infection, inflammation and cancer / S. Avidson, M. Coles, T. Thomas et al. *Nature reviews. Immunology*. 2021. Vol. 21, Iss. 11. P. 714-717. https://doi.org/10.1038/s41577-021-00540-z
[20] MSC-released TGF-β regulate α-SMA expression of myofibroblast during wound healing / A. Putra, I. Alif, N. Hamra et al. *Journal of stem cells & regenerative medicine*. 2020. Vol. 16, Iss. 2. P. 73-79. https://doi.org/10.46582/jsrm.1602011

References

[1] Shaprynskyi, V. O., Skalskyi, S. S., Shaprynskyi, Y. V., Verba, A. V., & Makarov, V. M. (2020). Complex treatment of purulent wounds with the use of high-pressure aerodisperse mixture. *Wiadomosci Lekarskie*, *73*(5), 889-894. https://doi.org/10.36740/wlek202005110
[2] Leavitt, T., Hu, M., Marshall, C., Barnes, L., Longaker, M., & Lorenz, P. (2016). Stem cells and chronic wound healing: state of the art. *Chronic Wound Care Management and Research, 3*, 7-27. https://doi.org/10.2147/CWCMR.S84369
[3] Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open biology*, *10*(9), 200223. https://doi.org/10.1098/rsob.200223
[4] Ponomarenko, E. V. (2019). Use of complex patches for the reconstruction of defects of soft tissue of the trunk and limbs caused by traumatic damage. *Shpytalna khirurhiia. Zhurnal imeni L. Ya. Kovalchuka – Hospital Surgery. Journal Named by L. Ya. Kovalchuk*, (4), 90-94. https://doi.org/10.11603/2414-4533.2018.4.9719
[5] Kosaric, N., Kiwanuka, H., & Gurtner, G. C. (2019). Stem cell therapies for wound healing. *Expert opinion on biological therapy*, *19*(6), 575-585. https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1596257
[6] Slobodianyk, S. V., Khimich, S. D., Zheliba, M. D., & Shkolnikov, V. S. (2020). *Sposib stvorennia khronichnoi rany u eksperymentalnykh tvaryn* [Method of creating chronic wound in experimental animals]. Ukraine Patent UA 123694. https://sis.ukrpatent.org/uk/search/detail/1593228/
[7] Gaytan, F., Morales, C., Reymundo, C., & Tena-Sempere, M. (2020). A novel RGB-trichrome staining method for routine histological analysis of musculoskeletal tissues. *Scientific reports*, *10*(1), 16659. https://doi.org/10.1038/s41598-020-74031-x
[8] Suvarna, S. K., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2020). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques* (8th ed.). Elsevier. https://doi.org/10.1016/C2015-0-00143-5
[9] Kinsel, L. B., Szabo, E., Greene, G. L., Konrath, J., Leight, G. S., & McCarty, K. S., Jr (1989). Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: comparison with quantitative biochemical methods. *Cancer research*, *49*(4), 1052-1056.
[10] Eming, S. A., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine*, *6*(265), 265sr6. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337

[11] Yates, C. C., Rodrigues, M., Nuschke, A., Johnson, Z. I., Whaley, D., Stolz, D., Newsome, J., & Wells, A. (2017). Multipotent stromal cells/mesenchymal stem cells and fibroblasts combine to minimize skin hypertrophic scarring. *Stem cell research & therapy*, *8*(1), 193. https://doi.org/10.1186/s13287-017-0644-9

[12] Nourian Dehkordi, A., Mirahmadi Babaheydari, F., Chehelgerdi, M., & Raeisi Dehkordi, S. (2019). Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem cell research & therapy*, *10*(1), 111. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1212-2

[13] Ko, U. H., Choi, J., Choung, J., Moon, S., & Shin, J. H. (2019). Physicochemically Tuned Myofibroblasts for Wound Healing Strategy. *Scientific reports*, *9*(1), 16070. https://doi.org/10.1038/s41598-019-52523-9

[14] Zhang, Z., & Lv, L. (2016). Effect of local insulin injection on wound vascularization in patients with diabetic foot ulcer. *Experimental and therapeutic medicine*, *11*(2), 397-402. https://doi.org/10.3892/etm.2015.2917

[15] Tottoli, E. M., Dorati, R., Genta, I., Chiesa, E., Pisani, S., & Conti, B. (2020). Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. *Pharmaceutics*, *12*(8), 735. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735

[16] Mathew-Steiner, S. S., Roy, S., & Sen, C. K. (2021). Collagen in wound healing. *Bioengineering*. MDPI AG. https://doi.org/10.3390/bioengineering8050063

[17] Rosique, R. G., Rosique, M. J., & Farina Junior, J. A. (2015). Curbing inflammation in skin wound healing: A review. *International Journal of Inflammation*. Hindawi Publishing Corporation. https://doi.org/10.1155/2015/316235

[18] Saheli, M., Bayat, M., Ganji, R., Hendudari, F., Kheirjou, R., Pakzad, M., Najar, B., & Piryaei, A. (2020). Human mesenchymal stem cells-conditioned medium improves diabetic wound healing mainly through modulating fibroblast behaviors. *Archives of dermatological research*, *312*(5), 325-336. https://doi.org/10.1007/s00403-019-02016-6

[19] Davidson, S., Coles, M., Thomas, T., Kollias, G., Ludewig, B., Turley, S., Brenner, M., & Buckley, C. D. (2021). Fibroblasts as immune regulators in infection, inflammation and cancer. *Nature reviews. Immunology*, *21*(11), 704-717. https://doi.org/10.1038/s41577-021-00540-z

[20] Putra, A., Alif, I., Hamra, N., Santosa, O., Kustiyah, A. R., Muhar, A. M., & Lukman, K. (2020). MSC-released TGF-β regulate α-SMA expression of myofibroblast during wound healing. *Journal of stem cells & regenerative medicine*, *16*(2), 73-79. https://doi.org/10.46582/jsrm.1602011

UDC 616.98:578.834C0V]:618.2/.3]]-085.375
DOI: 10.14739/2310-1237.2022.1.253286

Clinical experience with tocilizumab in the treatment of pregnant woman with severe COVID-19

O. V. Riabokon*[1,A,F], I. O. Kuliesh[2,B,E], O. O. Furyk[1,B,C], T. B. Matvieieva[2,B,C], K. V. Kalashnyk[1,C,D]

[1]Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine, [2]Municipal Non-Profit Enterprise "Regional Infectious Diseases Clinical Hospital" of Zaporizhzhia Regional Council, Ukraine

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

The aim of the work – to present a case of positive use of tocilizumab in the treatment of pregnant woman with severe COVID-19.

Materials and methods. A self-observation clinical case of severe coronavirus disease (COVID-19) in pregnant K., 40 years old, who was treated at Municipal Non-Profit Enterprise "Regional Infectious Diseases Clinical Hospital" of Zaporizhzhia Regional Council. The patient was treated in accordance with the "Protocol for the provision of medical care for the treatment of coronavirus disease (COVID-19)".

Results. Our own clinical observation demonstrates the formation of severe COVID-19 in a 40-year-old pregnant woman in the second trimester of pregnancy. Combination treatment with glucocorticoids in the presence of oxygen dependence on the 11th day of the disease was ineffective for two days of clinical and laboratory parameters monitoring, which required a decision on the additional appointment of tocilizumab. The development of "cytokine storm" clinical and laboratory signs on the 12th day of the disease was evidenced by the preservation of fever in the range of 37.5–37.8 °C, no regression of oxygen dependence. According to laboratory data, an increase in the severity of lymphopenia as a relative quantity – up to 5 % and absolute quantity – up to 0.5 × 10^9/l, an increase in fibrinogen – up to 5.8 g/l and D-dimer – up to 1.9 ng/ml, high level of C-reactive protein – up to 190 mg/l. These data justify the additional use of tocilizumab, which was administered at a dose of 8 mg/kg in the absence of contraindications. Tocilizumab administration was effective, contributing to oxygen dependence regression and recovery of laboratory parameters within a week.

Conclusions. Our own clinical observation demonstrates the formation of severe COVID-19 in pregnant woman in the second trimester of pregnancy. Due to the ineffectiveness of glucocorticosteroid therapy and the presence of clear clinical and laboratory signs of "cytokine storm" on the 12th day of the disease, the use of tocilizumab was effective, which contributed to the oxygen dependence regression and recovery of laboratory parameters within a week. Treatment of pregnant woman with severe COVID-19 requires adherence to existing protocols.

Key words: coronavirus disease, COVID-19, infectious pregnancy complications, tocilizumab.

Pathologia
2022; 19 (1), 79-83

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

Клінічний досвід застосування тоцилізумабу в лікуванні вагітної з тяжким перебігом COVID-19

О. В. Рябоконь, І. О. Кулєш, О. О. Фурик, Т. Б. Матвєєва, К. В. Калашник

Мета роботи – описати випадок позитивного застосування тоцилізумабу в лікуванні вагітної з тяжким перебігом коронавірусної хвороби COVID-19.

Матеріали та методи. Наведено клінічний випадок власного спостереження тяжкого перебігу коронавірусної хвороби (COVID-19) у вагітної К., 40 років, яка перебувала на лікуванні в КНП «Обласна інфекційна клінічна лікарня» ЗОР. Лікування хворої здійснили згідно з «Протоколом надання медичної допомоги для лікування коронавірусної хвороби (COVID-19)».

Результати. Показано формування тяжкого перебігу COVID-19 у жінки віком 40 років у II триместрі вагітності. Комплексне лікування з застосуванням глюкокортикоїдів у разі виникнення кисневої залежності на 11 добу хвороби виявилося неефективним протягом двох діб спостереження за клініко-лабораторними параметрами; це потребувало розв'язання питання щодо додаткового призначення тоцилізумабу. Про розвиток клініко-лабораторних ознак «цитокінового шторму» на 12 добу хвороби свідчило збереження підвищеної температури тіла в межах 37,5–37,8 °С, відсутність регресії кисневої залежності. За результатами лабораторних досліджень, зафіксували збільшення виразності лімфопенії – і відносної (до 5 %), й абсолютної (до 0,5 × 10^9/л), підвищення фібриногену – до 5,8 г/л, D-димеру – до 1,9 нг/мл, високий рівень С-реактивного протеїну – до 190 мг/л. Це підтвердило доцільність додаткового призначення тоцилізумабу, який ввели у дозі 8 мг/кг, протипоказань не було. Введення тоцилізумабу виявилось ефективним, сприяло регресу кисневої залежності та відновленню лабораторних показників протягом тижня.

Висновки. Наведене власне клінічне спостереження демонструє формування тяжкого перебігу COVID-19 у вагітної в II триместрі вагітності. Враховуючи неефективність терапії глюкокортикостероїдами та наявність чітких клініко-лабораторних ознак «цитокінового шторму», введення тоцилізумабу на 12 добу хвороби було ефективним, сприяло регресу кисневої залежності та відновленню лабораторних показників протягом тижня. Лікування вагітних із тяжким перебігом COVID-19 потребує чіткого дотримання чинних протоколів.

Ключові слова: коронавірусна хвороба, COVID-19, інфекційні ускладнення вагітності, тоцилізумаб.

Патологія. 2022.
Т. 19, № 1(54).
С. 79-83

Pregnant women are one of the special and most difficult risk groups for the development of severe and complications of many viral infections. This is due to the formation of certain physiological immunological changes, increased oxygen demand and the emergence of additional risks when medical treatment is required [1]. In the conditions of the coronavirus disease (COVID-19) pandemic, attention was paid to cases of severe and critical course of COVID-19 in pregnant women, especially in the third trimester of pregnancy, with fatal outcome [2,3].

At present, the issue of pregnant patients with COVID-19 treatment remains difficult. In completed and ongoing clinical trials of COVID-19 drug therapy, pregnancy is still usually the exclusion criterion. This significantly limits the development of appropriate guidelines for the pregnant women treatment with this infection. Only the RECOVERY trial, which aimed to determine the appropriateness of dexamethasone in the treatment of patients with COVID-19, included pregnant patients with COVID-19 [4]. According to the results of this study, the minimum effective dose of dexamethasone is 6 mg per day. The inclusion of this drug in the treatment of patients with COVID-19, who need oxygen support, has reduced the mortality of these patients, and there have been no adverse effects associated with pregnancy [4].

Treatment of pregnant COVID-19 patients with severe and critical disease remains an extremely difficult issue. At present, there are no separate protocols for the provision of medical care to this category of patients, so the treatment of pregnant women with severe and critical COVID-19 requires compliance with existing protocols in the country [5,6] and a multidisciplinary approach involving physicians of different profiles [7].

The study of the pathogenetic mechanisms of the formation of the adverse course of COVID-19 demonstrates the leading role of immune-dependent mechanisms with cytokine dysregulation. This allows to justify the feasibility of cytokine-targeted therapy [8]. Such treatment options for patients with severe and critical COVID-19 are the use of interleukin-6 receptor inhibitors (IL-6) (tocilizumab) or IL-1β (anakinra), which are used to treat rheumatoid arthritis [9,10]. Tocilizumab was added as an adjunct to glucocorticosteroid therapy in patients with severe and critical COVID-19 case who have rapid respiratory decompensation. This is in line with existing international recommendations [11,12] and the "Protocol for the provision of medical care for the treatment of coronavirus disease (COVID-19)", approved by the Order of the Ministry of Health (MOH) of Ukraine [6].

Data from the current literature on the effectiveness of tocilizumab in clinical practice have some differences. On the one hand, many studies and meta-analyzes have shown a reduction in mortality among patients with COVID-19 treated with tocilizumab and maintenance therapy [13,14]. On the other hand, there are studies that, on the contrary, have shown no advantages in the results of treatment with tocilizumab in hospitalized patients with COVID-19 [15]. Therefore, clinical and laboratory evaluation of the immunotropic treatment effectiveness with tocilizumab remains relevant today [16]. In our opinion, this is especially true for certain categories of patients with COVID-19 who have risk factors in the form of comorbid conditions, in the pathogenetic mechanisms of which immunological changes are leading [17,18]. There is already a clear pathogenetic justification and successful experience in the literature on the use of tocilizumab in the treatment of patients with severe COVID-19 on the background of comorbid rheumatoid arthritis [18]. Tocilizumab in the treatment of pregnant women with severe and critical course of COVID-19, according to researchers [19], deserves special attention. Blockade of interleukin-6 during pregnancy is of particular interest given the pathophysiological relationship between elevated interleukin-6 levels and preterm birth [20]. Therefore, this led to the feasibility of analyzing their own clinical experience with tocilizumab in the treatment of pregnant women with severe COVID-19.

Aim

The aim of the work – to present a case of positive use of tocilizumab in the treatment of pregnant women with severe COVID-19.

Materials and methods

The clinical case of severe COVID-19 in pregnant K., 40 years old was analyzed. The patient was treated at the Municipal non-profit enterprise "Regional Infectious Diseases Clinical Hospital" of Zaporizhzhia Regional Council (infectious diseases hospital) from 01.10.2021 to 11.10.2021. The diagnosis of COVID-19 was laboratory confirmed by RNA-SARS-CoV-2 in the nasopharynx mucus by polymerase chain reaction. The patient was treated according to the "Protocol for the provision of medical care for the treatment of coronavirus disease (COVID-19)" [6].

Results

Patient K., 40 years old, was admitted to infectious diseases hospital on 01.10.2021 on the 12th day of illness with complaints of fever up to 37.5 °C, nonproductive cough, weakness, shortness of breath during exercise.

The patient had her first pregnancy with a gestational age of 19–20 weeks.

From the anamnesis of the disease it became known that she was not vaccinated against COVID-19. Patient felt ill on 19.09.2021 with an increase in body temperature to 37.5 °C, weakness, the appearance of a liquid dry cough. She was consulted by a family doctor, and RNA-SARS-CoV-2 was isolated from the nasopharyngeal mucus during the polymerase chain reaction. There was outpatient therapy with symptomatic drugs. Against the background of this treatment there was subfebrile persistence.

From 30.09.21 (the 11th day of illness) there was a deterioration: the body temperature rose to 38.0 °C, there were shortness of breath 24 per minute, decreased oxygen saturation to 89 %. In this regard, she was hospitalized in the central hospital of Melitopol. The patient's condition on admission was considered severe due to endogenous intoxication and the appearance of acute respiratory failure. Oxygen therapy in a mask mode was started. Against this background, oxygen saturation in-

creased to 97 %. Radiologically, bilateral polysegmental pneumonia was detected. The general analysis of blood revealed leukocytosis, neutrophilia, relative and absolute lymphopenia: leukocytes – 13.2 × 10^9/l, metamyelocytes – 1 %, stabs – 18 %, segmented – 70 %, lymphocytes – 5 % (abs – 0.6 × 10^9/l), monocytes – 4 %. The results of biochemical tests: prothrombin index – 87 %, fibrinogen – 4.7 g/l, D-dimer – 0.91 ng/ml, blood creatinine – 63 μmol/l, glucose – 3.0 mmol/l. Drug treatment was prescribed: dexamethasone 12 mg per day, low molecular weight heparin in a prophylactic dose, antibacterial therapy with meropenem. However, for two days there was no positive dynamics of clinical manifestations of the disease, in connection with which in the evening of 01.10.2021 the patient was transferred to the infectious diseases hospital.

Upon admission to the infectious hospital on the 12th day of the disease, the patient's condition is severe, body temperature 37.8 °C, respiratory rate 26 per minute, tachycardia 108 per minute, blood pressure 130/80 mm Hg, oxygen saturation 89 % without oxygen support. Oxygen therapy in a mask mode of 12 l/min started immediately, oxygen saturation with oxygen support of 97 %. Auscultatory breathing is weakened on both sides, crepitation is heard. Evaluation of the dynamics of clinical and laboratory parameters on the background of treatment with glucocorticosteroids for two days showed no effect from the prescribed treatment. This was evidenced by the preservation of body temperature in the range of 37.5–37.8 °C, no regression of oxygen dependence, according to laboratory data from 02.10.2021, there was an increase in the severity of lymphopenia as relative – up to 5 % and absolute – up to 0.5 × 10^9/l, increase in fibrinogen – up to 5.8 g/l and D-dimer – up to 1.9 ng/ml, high levels of C-reactive protein – up to 190 mg/l. The above mentioned indicated the development of a "cytokine storm", which became the rationale for the appointment of tocilizumab. According to the results of the follow-up, the level of procalcitonin was 0.1 ng/ml, ALT activity – 26.1 units, creatinine content – 79.7 μmol/l, glucose – 8.6 mmol/l, which indicated the absence of contraindications to the use of tocilizumab. The patient had a body weight of 65 kg at a height of 170 cm (body mass index 22.49 kg/m^2).

Taking into account the above, on 2.10.2021 (the 13th of the disease) 500 mg of tocilizumab (at the rate of 8 mg/kg of body weight) was administered intravenously, dexamethasone was extended, the dose of enoxiparin was doubled, and meropenem was continued. After the use of tocilizumab during the day there was a normalization of body temperature, which was subsequently stable. During the next two days, a significant regression of oxygen dependence was noted, which reduced oxygen support to 4 l/min, which completely disappeared by 8.10.2021. 13 % and absolute – 1.3 × 10^9/l, reduction of fibrinogen – up to 4.1 g/l. Control radiography of the chest from 11.10.2021 showed a clear positive trend in reducing infiltration of lung tissue. On 11.10.2021, the patient was discharged for outpatient treatment with recommendations for continued anticoagulant therapy for two weeks in a prophylactic dose.

Discussion

Literature data indicate that pregnant patients with COVID-19 are more likely to be hospitalized in the intensive care unit than non-pregnant women of the appropriate age [21,22]. A number of studies have identified certain risk factors that affect the severity of COVID-19 in pregnant women. These factors include older age, high body mass index, chronic hypertension, diabetes. The above-mentioned concomitant pathology, which occurred before pregnancy, are factors in the high risk of hospitalization in the intensive care unit and the emergence of indications for artificial lung ventilation [21]. Most researchers point to the fact that a special risk of severe and critical course of COVID-19 occurs in pregnant women in the II and III trimesters, because in the perinatal period or immediately after birth there is an increase in symptoms [23].

Thus, according to the results of American researchers at the time of hospitalization among pregnant women infected with SARS-CoV-2, 61.4 % had an asymptomatic course of COVID-19. However, the onset of labor pains to the appearance we can see different courses of disease: mild clinical symptoms – in 26.5 %, severe – in 26.1 %, and in 5 % – even a critical course of COVID-19 [23]. Our own clinical observation also demonstrates the formation of severe COVID-19 during the second trimester of pregnancy in a pregnant woman, who had one of the risk factors for severe COVID-19, namely the age of the patient 40 years.

Oxygen therapy is given special attention when providing medical care to pregnant women with severe and critical COVID-19. To improve its effectiveness, a prone-positioning algorithm has been developed and recommended for use in clinical practice [7]. In this case, childbirth can be considered as a component of the treatment of refractory hypoxemic respiratory failure in the development of critical conditions of pregnant women, especially during pregnancy 32 weeks and more [7]. At the same time, considerable attention is paid to resolving the issue of prescribing medical treatment. In the current literature, some clinical observations of the treatment of pregnant women with COVID-19 with the use of tocilizumab are currently demonstrated [19]. Our clinical observations also show that with clear clinical and laboratory signs of a cytokine storm on the 12th day of the disease, the use of tocilizumab was effective, leading to regression of oxygen dependence and recovery of laboratory parameters within a week.

Clinical observations on the efficacy of tocilizumab in the treatment of pregnant women with severe COVID-19 are accumulating in the current literature. However, this does not allow definitive conclusions to be drawn regarding the use of these drugs in pregnant women with COVID-19. Therefore, there is an urgent need to include pregnant women in randomized controlled trials to determine the most effective treatments for severe COVID-19 [19,24]. However, in the absence of such studies and specialized protocols for the provision of medical care to pregnant women with COVID-19, the existing Coronavirus Disease (COVID-19) Treatment Guidelines in existing countries should be strictly adhered to.

Conclusions

Own clinical observation showing the formation of severe COVID-19 in pregnant women in the second trimester of pregnancy was presented. Combination treatment with glucocorticoids in the event of oxygen dependence on the 11th day of the disease was ineffective for two days of clinical and laboratory parameters monitoring, which required a decision on the additional appointment of tocilizumab. In the presence of clear clinical and laboratory signs of "cytokine storm" on the 12th day of illness, the using of tocilizumab was effective, which led to the regression of oxygen dependence and the restoration of laboratory parameters within a week. Treatment of pregnant women with severe COVID-19 requires strict adherence to existing protocols.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.
Конфлікт інтересів: відсутній.

Надійшла до редакції / Received: 21.02.2022
Після доопрацювання / Revised: 28.03.2022
Прийнято до друку / Accepted: 08.04.2022

Information about authors:
Riabokon O. V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Infectious Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0002-7394-4649
Kuliesh I. O., MD, Director, Head of the Department No. 1, Municipal Non-Profit Enterprise "Regional Infectious Diseases Clinical Hospital" of Zaporizhzhia Regional Council, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0001-5575-9901
Furyk O. O., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Infectious Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0002-5196-7698
Matvieieva T. B., MD, Head of Department No. 4, Municipal Non-Profit Enterprise "Regional Infectious Diseases Clinical Hospital" of Zaporizhzhia Regional Council, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0003-1195-0151
Kalashnyk K. V., MD, PhD, Assistant of the Department of Infectious Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0002-4532-8953

Відомості про авторів:
Рябоконь О. В., д-р мед. наук, професор, зав. каф. інфекційних хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.
Кулєш І. О., директор, зав. відділення № 1, Комунальне неприбуткове підприємство «Обласна інфекційна клінічна лікарня» Запорізької обласної ради, Україна.
Фурик О. О., канд. мед. наук, доцент каф. інфекційних хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.
Матвєєва Т. Б., зав. відділення № 4, Комунальне неприбуткове підприємство «Обласна інфекційна клінічна лікарня» Запорізької обласної ради, Україна.
Калашник К. В., PhD, асистент каф. інфекційних хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.

References

[1] Racicot, K., & Mor, G. (2017). Risks associated with viral infections during pregnancy. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(5), 1591-1599. https://doi.org/10.1172/jci87490
[2] Hantoushzadeh, S., Shamshirsaz, A. A., Aleyasin, A., Seferovic, M. D., Aski, S. K., Arian, S. E., Pooransari, P., Ghotbizadeh, F., Aalipour, S., Soleimani, Z., Naemi, M., Molaei, B., Ahangari, R., Salehi, M., Oskoei, A. D., Pirozan, P., Darkhaneh, R. F., Laki, M. G., Farani, A. K., … Aagaard, K. (2020). Maternal death due to covid-19. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *223*(1). https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.04.030
[3] Li, J., Wang, Y., Zeng, Y., Song, T., Pan, X., Jia, M., He, F., Hou, L., Li, B., He, S., & Chen, D. (2020). Critically ill pregnant patient with Covid-19 and neonatal death within two hours of birth. *International journal of gynaecology and obstetrics*, *150*(1), 126-128. https://doi.org/10.1002/ijgo.13189
[4] Horby, P., Lim, W. S., Emberson, J., Mafham, M., Bell, J., Linsell, L., Staplin, N., Brightling, C., Ustianowski, A., Elmahi, E., Prudon, B., Green, C., Felton, T., Chadwick, D., Rege, K., Fegan, C., Chappell, L. C., Faust, S. N., Jaki, T., … Landray, M. J. (2020). Effect of dexamethasone in hospitalized patients with COVID-19 – preliminary report. https://doi.org/10.1101/2020.06.22.20137273
[5] COVID-19 Treatment Guidelines Panel. *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines*. National Institutes of Health. https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/
[6] Ministry of Healthcare of Ukraine. (2020, April 2). *Protokol "Nadannia medychnoi dopomohy dlia likuvannia koronavirusnoi khvoroby (COVID-19)"* [Protocol for the provision of medical care for the treatment of coronavirus disease (COVID-19) (No. 762)]. [in Ukrainian]. https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0762282-20?lang=en#Text
[7] Tolcher, M. C., McKinney, J. R., Eppes, C. S., Muigai, D., Shamshirsaz, A., Guntupalli, K. K., & Nates, J. L. (2020). Prone positioning for pregnant women with hypoxemia due to coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Obstetrics & Gynecology*, *136*(2), 259-261. https://doi.org/10.1097/aog.0000000000004012
[8] Rahmati, M. (2020). Cytokine-targeted therapy in severely ill covid-19 patients: Options and cautions. *Eurasian Journal of Medicine and Oncology*, *4*(2), 179-180. https://doi.org/10.14744/ejmo.2020.72142
[9] Burmester, G. R., Rigby, W. F., van Vollenhoven, R. F., Kay, J., Rubbert-Roth, A., Kelman, A., Dimonaco, S., & Mitchell, N. (2015). Tocilizumab in early progressive rheumatoid arthritis: Function, a randomised controlled trial. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *75*(6), 1081-1091. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-207628
[10] Furst, D. E. (2004). Anakinra: Review of recombinant human interleukin-I receptor antagonist in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clinical Therapeutics*, *26*(12), 1960-1975. https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2004.12.019
[11] Bhimraj, A., Morgan, R. L., Shumaker, A. H., Lavergne, V., Baden, L., Cheng, C. -C. V., Edwards, K. M., Gandhi, R., Gallagher, J., Muller, W. J., O'Horo, J. C., Shoham, S., Murad, M. H., Mustafa, R. A., Sultan, S., & Falck-Ytter, Y. (2020). Guidelines on the Treatment and Management of Patients with COVID-19. *IDSA*. https://www.idsociety.org/practice-guideline/covid-19-guideline-treatment-and-management/
[12] National Institute for Health and Care Excellence. (2021, March 23). COVID-19 rapid guideline: managing COVID-19: Guidance NG191. NICE. https://www.nice.org.uk/guidance/ng191
[13] Okoh, A. K., Bishburg, E., Grinberg, S., & Nagarakanti, S. (2021). Tocilizumab use in COVID-19-associated pneumonia. *Journal of medical virology*, *93*(2), 1023-1028. https://doi.org/10.1002/jmv.26471
[14] Lan, S. -H., Lai, C. -C., Huang, H. -T., Chang, S. -P., Lu, L. -C., & Hsueh, P. -R. (2020). Tocilizumab for severe COVID-19: A systematic review and meta-analysis. International *Journal of Antimicrobial Agents*, *56*(3), 106103. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106103
[15] Hermine, O., Mariette, X., Tharaux, P. -L., Resche-Rigon, M., Porcher, R., Ravaud, P., Bureau, S., Dougados, M., Tibi, A., Azoulay, E., Cadranel, J., Emmerich, J., Fartoukh, M., Guidet, B., Humbert, M., Lacombe, K., Mahevas, M., Pene, F., Pourchet-Martinez, V., … Renet, S. (2021). Effect of tocilizumab vs usual care in adults hospitalized with covid-19 and moderate or severe pneumonia. *JAMA Internal Medicine*, *181*(1), 32. https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.6820
[16] Atal, S., & Fatima, Z. (2020). IL-6 inhibitors in the treatment of serious covid-19: A promising therapy? *Pharmaceutical Medicine*, *34*(4), 223-231. https://doi.org/10.1007/s40290-020-00342-z
[17] Riabokon, O. V., Cherkaskyi, V. V., Onishchenko, T. Y., & Riabokon, Y. Y. (2021). Features of comorbid pathology spectrum and age structure of oxygen-dependent patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) depending on outcomes of the disease. *Zaporozhye Medical Journal*, *23*(2), 214-219. https://doi.org/10.14739/2310-1210.2021.2.228712
[18] Vizir, V. A., Sadomov, A. S., & Demidenko, O. V. (2021). Use of tocilizumab in the combination treatment of a COVID-19 patient with concomitant rheumatoid arthritis (a case report). *Zaporozhye Medical Journal*, *23*(5), 739-748. https://doi.org/10.14739/2310-1210.2021.5.232322
[19] Naqvi, M., Zakowski, P., Glucksman, L., Smithson, S., & Burwick, R. M. (2020). Tocilizumab and Remdesivir in a pregnant patient with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Obstetrics & Gynecology*, *136*(5), 1025-1029. https://doi.org/10.1097/aog.0000000000004050
[20] Wei, S. -Q., Fraser, W., & Luo, Z. -C. (2010). Inflammatory cytokines and spontaneous preterm birth in asymptomatic women. *Obstetrics & Gynecology*, *116*(2), 393-401. https://doi.org/10.1097/aog.0b013e3181e6dbc0

[21] Allotey, J., Stallings, E., Bonet, M., Yap, M., Chatterjee, S., Kew, T., Debenham, L., Llavall, A. C., Dixit, A., Zhou, D., Balaji, R., Lee, S. I., Qiu, X., Yuan, M., Coomar, D., Sheikh, J., Lawson, H., Ansari, K., van Wely, M., van Leeuwen, E., … for PregCOV-19 Living Systematic Review Consortium (2020). Clinical manifestations, risk factors, and maternal and perinatal outcomes of coronavirus disease 2019 in pregnancy: living systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*, *370*, m3320. https://doi.org/10.1136/bmj.m3320

[22] Cohen, J., Vignaux, O., & Jacquemard, F. (2020). Covid-19 in pregnant women: General Data from a French national survey. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 251, 267-268. https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.06.002

[23] Khoury, R., Bernstein, P. S., Debolt, C., Stone, J., Sutton, D. M., Simpson, L. L., Limaye, M. A., Roman, A. S., Fazzari, M., Penfield, C. A., Ferrara, L., Lambert, C., Nathan, L., Wright, R., Bianco, A., Wagner, B., Goffman, D., Gyamfi-Bannerman, C., Schweizer, W. E., … Dolan, S. M. (2020). Characteristics and outcomes of 241 births to women with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-COV-2) infection at five New York City medical centers. *Obstetrics & Gynecology*, *136*(2), 273-282. https://doi.org/10.1097/aog.0000000000004025

[24] Pierce-Williams, R. A. M., Burd, J., Felder, L., Khoury, R., Bernstein, P. S., Avila, K., Penfield, C. A., Roman, A. S., DeBolt, C. A., Stone, J. L., Bianco, A., Kern-Goldberger, A. R., Hirshberg, A., Srinivas, S. K., Jayakumaran, J. S., Brandt, J. S., Anastasio, H., Birsner, M., O'Brien, D. S., … Berghella, V. (2020). Clinical course of severe and critical coronavirus disease 2019 in hospitalized pregnancies: A united states cohort study. *American Journal of Obstetrics & Gynecology MFM*, *2*(3), 100134. https://doi.org/10.1016/j.ajogmf.2020.100134

UDC 616.348-002-06:616.94]-053.32-08-036.82
DOI: 10.14739/2310-1237.2022.1.252134

A case of successful treatment of an extremely preterm infant with necrotic enterocolitis complicated by sepsis of bacterial and fungal etiology

M. Yu. Kurochkin[1,A,B,D,C,F], A. H. Davydova*[1,A,B,D,E], M. O. Makarova[1,A,B,C], I. H. Denysenko[2,A,B,C], Yu. V. Horodkova[1,B,C,D]

[1]Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine, [2]Communal Non-commercial Enterprise "City Children's Hospital No. 5" of Zaporizhzhia City Council, Ukraine

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

Key words: necrotizing enterocolitis, peritonitis, sepsis, premature infant.

Pathologia 2022; 19 (1), 84-88

***E-mail:** annadavydova1978@gmail.com

The aim. To acquaint medical practitioners with the case of successful surgical treatment and intensive care of a extremely preterm infant with necrotic enterocolitis, complicated with intestinal perforation and sepsis of mixed bacterial and fungal etiology.

Materials and methods. The child was treated in the Neonatal Anesthesiology and Intensive Care Department of Communal Non-commercial Enterprise "City Children's Hospital No. 5" of Zaporizhzhia City Council. Blood analyses, microbiological, X-ray and ultrasound examinations were performed by indications using the hospital equipment.

Results. An extremely preterm, very low birth weight infant underwent nine traumatic surgical interventions for NEC with gastric and intestinal perforation, diffuse peritonitis, and adhesive intestinal obstruction. The child's condition was complicated by sepsis of mixed bacterial and fungal etiology. Preoperative preparation included antibacterial therapy, infusion therapy with modern balanced polyionic solutions, and inotropic support.

During and after surgical interventions, the child underwent multimodal combined anti-stress anesthesia with the use of neuroaxial blocks, prolonged MLV, antibacterial therapy with modern drugs according to the de-escalation principle and microbiological peculiarities of the department, antifungal therapy with reserve drugs, immune replacement therapy, parenteral nutrition and infusion program using blood products according to indications. Despite the child's critically severe condition and morphofunctional immaturity, the child has survived, has no neurological deficit, and has gained four times his initial body weight.

Conclusions. The use of multimodal combined anesthesia with caudal-epidural blocks in the intra- and postoperative periods, adequate respiratory and hemodynamic support, parenteral and early enteral feeding in a deeply premature baby with NEC probably contributed to antinociceptive protection and positive treatment outcome after 9 urgent operations. The reserve antibiotics and antifungal drugs prescription according to de-escalation principle, considering the sensitivity of the bacterial flora to them, bacteriological monitoring and immune replacement therapy, had a positive result in the treatment of sepsis, which complicated the course of NEC in the newborn baby.

Ключові слова: некротичний ентероколіт, перитоніт, сепсис, недоношена дитина.

Патологія. 2022. Т. 19, № 1(54). С. 84-88

Випадок успішного лікування глибоконедоношеної дитини з некротичним ентероколітом, що ускладнений сепсисом бактеріально-грибкової етіології

М. Ю. Курочкін, А. Г. Давидова, М. О. Макарова, І. Г. Денисенко, Ю. В. Городкова

Мета роботи – ознайомити лікарів-практиків з випадком успішного хірургічного лікування та інтенсивної терапії глибоконедоношеної дитини з некротичним ентероколітом (НЕК), що ускладнений перфорацією кишечника та сепсисом змішаної бактеріально-грибкової етіології.

Матеріали та методи. Дитина перебувала на лікуванні у відділенні анестезіології та інтенсивної терапії новонароджених КНП «Міська дитяча лікарня № 5» ЗМР. Дитині виконали клінічні та біохімічні аналізи крові, мікробіологічні, рентгенологічні та ультразвукові дослідження на обладнанні лікарні.

Результати. Глибоконедоношена дитина з дуже низькою масою тіла перенесла дев'ять травматичних оперативних втручань з приводу НЕК з перфорацією шлунка та кишківника, розлитого перитоніту, спайкової кишкової непрохідності. Стан дитини ускладнився сепсисом змішаної бактеріально-грибкової етіології. Передопераційна підготовка передбачала антибактеріальну терапію, інфузійну терапію з включенням сучасних збалансованих полііонних розчинів, інотропну підтримку.

Під час і після оперативних втручань дитині призначали мультимодальні комбіновані антистресові анестезії з використанням нейроаксіальних блокад, подовжену штучну вентиляцію легень, антибактеріальну терапію сучасними препаратами за деескалаційним принципом, враховуючи висіви дитини та мікробіологічні особливості відділення, протигрибкову терапію препаратами резерву, імунозамісну терапію; дитина отримувала парентеральне харчування, їй була призначена інфузійна програма з використанням препаратів крові за показаннями. Незважаючи на критично тяжкий стан дитини та морфофункціональну незрілість, у результаті лікування вона вижила, не має неврологічного дефіциту, маса її тіла збільшилася вчетверо від вихідної.

Висновки. Застосування мультимодальної комбінованої анестезії з використанням каудально-епідуральних блокад в інтра- та післяопераційному періодах, адекватна респіраторна та гемодинамічна підтримка, парентеральне на раннє ентеральне харчування у глибоконедоношеної дитини з НЕК, імовірно, позначилися на антиноцицептивному захисті та сприяли позитивному результату лікування після дев'яти ургентних операцій. Призначення антибіотиків резерву за принципом деескалації, враховуючи чутливість бактеріальної флори, здійснення бактеріологічного моніторингу й імунозамісної терапії мали позитивний ефект під час лікування сепсису, що ускладнив перебіг НЕК у новонародженого.

Necrotizing enterocolitis (NEC) is an acute necrotic intestinal syndrome of multifactorial and insufficiently studied etiology, which is characteristic mainly of the extremely preterm infants and is one of the main causes of morbidity and mortality in children born at a gestational age of less than 32 weeks [1–3]. In its pathogenesis, hypoxia and impaired mesenteric blood flow should be considered as the main link, leading to disruption of the barrier function of the intestinal mucosa, translocation of microbes into the bloodstream, and inflammation, triggering a cascade of cytokine reactions, ulceration of the mucosa, necrosis, and perforation [1,4,5]. Antibiotic usage and dysbiosis also play role in its pathogenesis [6–9].

Among risk factors of NEC are bottle-feeding and insufficient contact with mother's microbiome [1,6,9], low birth weight, low gestation term in birth, underweight to the gestation term, use of mechanical or assisted lung ventilation, premature rupture of membranes, black ethnicity, sepsis, outborn, hypotension, maybe also surfactant therapy and cesarean section [1,10].

Different authors consider a frequency of NEC development among premature babies to be from 5 % to 12 % [11,12], at the same time, several authors believe that the frequency of this pathology in recent years tends to increase [2,13]. However, the urgency of this problem is primarily due to the catastrophically high mortality rate [5,9,10], which the higher, the lower the baby's gestational age and birth weight are [7,10]. Among newborns with NEC requiring surgical intervention, mortality is 20–30 % [12], according to other authors – up to 60 % [3].

Despite the achievements of modern science, there is a problem of late diagnosis [14–16] and differential diagnosis of this pathology all over the world [3]. Some authors also pay attention to the lack of the precise indication for surgical intervention [17,18]. Among NEC complications are sepsis and septic shock, intestine perforation, multiple organ failure, short intestine syndrome, hepatic damage due to long parenteral feeding [4].

Common methods of NEC treatment are complete parenteral nutrition, antibiotics, probiotics, and surgical treatment in case of perforation [11,17]. Among today's promising researches is a development of a novel class of toll-like receptor 4 (TLR4) inhibitors [11]. In the prophylaxis of hard and lethal NEC complications struggle with vasal constriction leading to intestinal ischemia and perforation plays an important role [4]. One of the ways to combat vasoconstriction is an adequate anesthesia. There is a point of view that the advantage to caudal-epidural blockade should be given, which has such beneficial effects as reliable analgesia, intestinal desympathization, and, consequently, an increase in intestine blood flow, so – prevention of its ischemia, and activation of gastrointestinal motility [19].

Aim

To acquaint medical practitioners with the case of successful surgical treatment and intensive care of an extremely preterm infant with necrotic enterocolitis, complicated by intestinal perforation and sepsis of mixed bacterial and fungal etiology.

Materials and methods

The child was treated in the Neonatal Department of Anesthesiology and Intensive Care of the Communal Non-commercial Enterprise "City Children's Hospital No. 5" of Zaporizhzhia City Council. Blood analyses (clinical, biochemical), microbiological, X-ray and ultrasound examinations were performed by indications using the hospital equipment.

Patient's parents have signed informed consent.

Results

A child S. was born from the first pregnancy. On the 28th week his mother was hospitalized with a hard bilateral pneumonia, associated with COVID-19. A child was born via caesarian section because of placental abruption; birth weight was 1300 grams, length 42 cm, Apgar scale examination 5/6 degrees. Immediately after birth, tracheal intubation and transfer to mechanical lung ventilation (MLV) were performed.

On the third day after birth, the child was diagnosed with a hollow organ perforation. According to the abdominal organs radiography, free gas was found in the abdominal cavity projection, laparocentesis was performed, and the abdominal cavity was drained. The next day the child underwent a big operative intervention: laparotomy, revision of the abdominal organs, and suturing of the perforation of the stomach were provided.

Pre-operative preparation included powerful antibacterial therapy applied by the de-escalation principle (from wider to narrower spectrum), infusion therapy according to physiological needs appropriate for newborns, which included crystalloid solutions (isotonic sterofundin), and native single-group plasma. The child was constantly on a ventilator with physiologic parameters (V = 6–7 ml/kg, RR 36–40 per minute, PEEP 5 cm, FiO_2 30 %), hemodynamic support was provided with dobutamine at doses of 5–10 μg/kg/min.

After the preoperative preparation, the main indicators of homeostasis were stabilized and compensated (hourly diuresis 1.5 ml/kg/h; mean blood pressure (MBP) – 40–45 mm Hg), pH 7.33, peripheral blood saturation 92–96 %. During surgery the child underwent multimodal general anesthesia using a caudal-epidural block. We have previously studied this method of combined anes-

thesia with central spinal and caudal-epidural blockades in intra and postoperative period usage, and it showed the best results of anti-stress protection compared to other methods of combined general anesthesia for extensive and traumatic operations in newborns (Kurochkin M. Yu. *Central Neuroaxial Anesthesias in Newborn and Infants. Extended abstract of PhD dissertation.* KhMNU, Kharkiv, 2013).

We used the following technic of multimodal anesthesia: after premedication with atropine 0.01 mg/kg the induction with Sodium Oxybutyrate 150 mg/kg, myoplegia with atracurium besylate 0.5 mg/kg, analgesia by fentanyl 5 mcg/kg were provided. Then the caudal-epidural anesthesia with 2 mg/kg of bupivacaine 0.2 % was performed with bringing the volume of epidural bolus up to 1 ml/kg. The efficacy and term of caudal-epidural block onset were evaluated using impedance of the lower extremity (femur region) measurement before blockade and 15–20 minutes after it (Kurochkin, M., Davydova, A., Dmytriakov, V., Chemerys, Y., Krupinov, Y., Krupinova, O. and Svekatun, V. 2016. *Method for determining the onset of caudal-epidural anesthesia in children.* 112820).

In the case of necessity, ketamine 3–4 mg/kg and/or fentanyl 5 μg/kg were additionally added for analgesia during surgery. As for infusion during the intraoperative period, solution of sodium chloride 0.9 % and native plasma were infused in a ratio of 1:1 and at a rate of 15–20 ml/kg/h. Hemodynamics was maintained with dopamine at a dose of 7 μg/kg/min as it provides blood pressure consistency not only by increasing cardiac output, but also by peripheral vasoconstriction, and the experience of our hospital shows the advantage of using this drug versus dobutamine during extensive surgery in newborns.

In the postoperative period, the child underwent mechanical ventilation in the normoventilation mode (V = 6–7 ml/kg, RR 40–42 per minute, PEEP 5 cm, FiO_2 21–30 %). Infusion therapy according to the physiological need for fluid was conducted taking into account pathological losses (intestinal paresis) with general volume up to 150 ml per kilogram of weight, with electrolyte disorders correction such as additional KCl administration for hypokalemia episodes. Parenteral nutrition was used: the child received glucose 15 % 14–15 g/kg per day (in accordance with the rate of utilization of glucose 0.4–0.6 g/kg/hour); fat emulsions starting from 0.5 g/kg/day with a gradual increase to 2.5–3.0 g/kg; and solutions of amino acids from 1 g/kg/day to 3–4 g/kg/day. When the child began to assimilate the enteral feeding gradually, the doses of parenteral nutrition were reduced.

Postoperative analgesia was performed by a combination of intravenous continuous infusion of fentanyl at a rapid dosage of 5 μg/kg/hour and caudal-epidural blockades performed 1–2 times a day with 0.2 % bupivacaine solution (injected volume of local anesthetic with 0.9 % chloride sodium was 1.0–1.2 ml/kg) for 3–4 days. Then the dose of fentanyl was reduced to 3-2 mcg/kg/hour, intravenous paracetamol was added at a dose of 7.5 mg/kg 3–4 times daily. The same tactics of patient management was used in other cases of the perioperative period of all the following surgical interventions.

The infant's condition deteriorated critically after the 9th operation. The worsening was associated with the development of mixed fungal-bacterial etiology sepsis. Bacteriological examination data showed the presence of bacterial flora hospital strains in the pharynx, feces and blood: *Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Staphylococcus haemolyticus, Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Stenotrophomonas maltophilia, Candida non albicans*. The child had metabolic acidosis with the increased lactate level (pH 7.10–7.25, lactate up to 8 mmol/l), significant inflammatory changes in the blood (leucocytosis up to 38 × 10^9 with immature forms of neutrophils to 60 %), and the level of procalcitonin was 28.4 μg/ml.

The child received combined antibiotic therapy, which was de-escalated at the highest age-appropriate dosages: vancomycin 40 mg/kg in combination with meropenem 60 mg/kg, followed by colistin 70 ME/kg/day. Antifungal therapy was a combination of fluconazole and mycafungin with a later switch to caspofungin. Immunocompensatory therapy was carried out with preparations of normal human immunoglobulin in a total dose of 1 g/kg. After intensive therapy, the clinical and laboratory signs of sepsis regressed.

The course of the disease in the child was considered to be very severe, with the development of relapses and complications.

Upon the whole during few months, the infant underwent 9 surgeries:

1. The 3rd day of life: laparacentesis, abdominal drainage due to bowel perforation, III stage peritonitis;
2. The 4th day of life: laparotomy: abdominal revision, closure of gastric perforation;
3. Day 12: relaparotomy; abdominal revision; end-to-end jejunoanastomosis due to intestinal perforation, excision of the perforated part of the intestine; application of an end ileostomy (*Fig. 1*);
4. Day 66: end-to-end ileoanastomosis, cutting adhesions;
5. Day 79: laparatomy, cutting adhesions, intestine intubation;
6. Day 93: relaparotomy, cutting adhesions, resection of ileum (after perforation and adhesion to another part of the intestine), ileo-ileoanastomosis;
7. Day 107: relaparotomy, abdominal revision, releasing of adhesions, end-to-end ileo-ileoanastomosis, intestine intubation; postoperative period also had signs of intestinal obstruction;
8. Day 116: relaparotomy; revision of the abdominal organs; releasing of adhesions; application of end-to-end ileo-ascendo-anastomosis; postoperative period with free gas in the abdomen (as a result of failure of the previous anastomosis);
9. Day 120: relaparotomy, abdominal revision, end-ileostomy, abdominal sanitation.

Six months later, at the age of 13 months ileostomy was closed and intestinal integrity was restored.

The infant received full and then partial parenteral nutrition. After the last 9th operation, at the age of 4 months, the baby's body weight was 3800 g. On discharge from the intensive care unit to the neonatal pathology department on the 6th month of life, his body weight was 4930 g

Fig. 1. Intestine perforation. Free gas in the abdomen.

(+3630 g since birth) and before discharge from the hospital at the age of almost 7 months it was 5300 g (more than 4 times weight gain). It is important that the child has no neurological deficit and develops according to age.

Discussion

The uniqueness of this case is that the patient had the highest risk of an adverse outcome (grade 4–5 on the ASA anaesthetic scale), but underwent nine extensive surgical interventions, survived and almost fourfold body weight gain. The initial severity of the condition was determined by extreme prematurity with very low birth weight, intrapartum hypoxia due to premature abruption of the placenta. Morpho-functional immaturity of all organs and systems eventually contributed to the development of ulcerous-necrotic enterocolitis with subsequent gastric and intestinal perforations, diffuse peritonitis, and later sepsis of mixed bacterial-fungal etiology.

In other Ukrainian clinics, usage of neuroaxial blockades in infants with NEC is not common. However, we have had positive experience with them for several years. From our point of view, in this clinical case caudal-epidural anesthesia made it possible to reduce the dosage of narcotic analgesics significantly, and at the same time eliminated ischemic disorders of splanchnic blood flow due to the sympathetic component of the blockade. This contributed to a more rapid recovery of intestinal peristalsis.

In our opinion, the leading role in favorable outcome was played by multimodal combined anti-stressor anesthesia, including caudal-epidural blocks in the perioperative period; effectively conducted respiratory and hemodynamic support, parenteral nutrition and infusion therapy, powerful antibacterial, antifungal and immune replacement therapy, as well as high reserve capacity of the patient's organism.

Conclusions

1. The use of multimodal combined anaesthesia using caudal-epidural blocks in the intra- and postoperative periods, adequate respiratory and haemodynamic support, parenteral and therapeutic enteral feeding in an extremely preterm baby with NEC, probably contributed to reliable antinociceptive protection and positive treatment outcome after 9 urgent operations, contributing to 4-fold body weight gain, survival, and recovery.

2. The administration of reserve antibiotics and antifungal drugs according to the de-escalation principle, considering the sensitivity of the bacterial flora to them, bacteriological monitoring and immune replacement therapy, had positive results in the treatment of NEC complicated by sepsis in extremely preterm infant.

Prospects for further research. In the future, it is planned to study the effect of caudal-epidural blocks on the course of NEC in preterm neonates when applied in the early stages (intestinal paresis before the stage of intestinal pneumatosis and perforation). Also perspective in our opinion will be the study of the effect of central neuroaxial anesthesia on the processes of tissue repair and regeneration after extensive abdominal operations in newborns.

Funding
This work was conducted as a part of scientific research of Zaporizhzhia State Medical University "Scientific substantiation of diagnostic strategies, optimization of treatment and improvement of rehabilitation and prophylactic algorithms in the monitoring of children of different ages", state registration No. 0120U101143.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.
Конфлікт інтересів: відсутній.

Надійшла до редакції / Received: 28.01.2022
Після доопрацювання / Revised: 18.03.2022
Прийнято до друку / Accepted: 28.03.2022

Information about authors:
Kurochkin M. Yu., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pediatric Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0003-3536-9775
Davydova A. H., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pediatric Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0002-6689-5121
Makarova M. O., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pediatric Surgery and Anesthesiology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0003-2092-2240
Denysenko I. H., Head of Neonatal Anesthesiology and Intensive Care Unit, Communal Non-commercial Enterprise "City Children's Hospital No. 5" of Zaporizhzhia City Council, Zaporizhzhia, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0002-5240-4432
Horodkova Yu. V., MD, PhD, Assistant of the Department of Pediatric Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0001-5954-7682

Відомості про авторів:
Курочкін М. Ю., д-р мед. наук, професор каф. дитячих хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.
Давидова А. Г., канд. мед. наук, доцент каф. дитячих хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.
Макарова М. О., канд. мед. наук, доцент каф. дитячої хірургії та анестезіології, Запорізький державний медичний університет, Україна.
Денисенко І. Г., зав. відділення анестезіології та інтенсивної терапії новонароджених, КНП «Міська дитяча лікарня № 5» ЗМР, Україна.
Городкова Ю. В., канд. мед. наук (PhD), асистент каф. дитячих хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.

References

[1] Isani, M. A., Delaplain, P. T., Grishin, A., & Ford, H. R. (2018). Evolving understanding of neonatal necrotizing enterocolitis. *Current opinion in pediatrics*, *30*(3), 417-423. https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000629
[2] Heida, F. H., Stolwijk, L., Loos, M. H., van den Ende, S. J., Onland, W., van den Dungen, F. A., Kooi, E. M., Bos, A. F., Hulscher, J. B., & Bakx, R. (2017). Increased incidence of necrotizing enterocolitis in the Netherlands after implementation of the new Dutch guideline for active treatment in extremely preterm infants: Results from three academic referral centers. *Journal of pediatric surgery*, *52*(2), 273-276. https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2016.11.024
[3] Mavropulo, T. K. (2017). Nekrotyzuiuchyi enterokolit novonarodzhenykh – problemy diahnostyky [Neonatal necrotizing enterocolitis – diagnostic problems]. *Neonatology, Surgery and Perinatal Medicine*, *7*(4), 95-101. [in Ukrainian]. https://doi.org/10.24061/2413-4260.VII.4.26.2017.17
[4] Markel, T. A., Martin, C. A., Chaaban, H., Canvasser, J., Tanner, H., Denchik, H., & Good, M. (2020). New directions in necrotizing enterocolitis with early-stage investigators. *Pediatric research*, *88*(Suppl 1), 35-40. https://doi.org/10.1038/s41390-020-1078-0
[5] Neu, J., & Pammi, M. (2017). Pathogenesis of NEC: Impact of an altered intestinal microbiome. *Seminars in perinatology*, *41*(1), 29-35. https://doi.org/10.1053/j.semperi.2016.09.015
[6] Baranowski, J. R., & Claud, E. C. (2019). Necrotizing Enterocolitis and the Preterm Infant Microbiome. *Advances in experimental medicine and biology*, *1125*, 25-36. https://doi.org/10.1007/5584_2018_313
[7] Ma, Y. P., Ma, J. Y., & Tong, X. M. (2018). [A review of the relationship between gut microbiome and necrotizing enterocolitis in preterm infants]. *Chinese journal of contemporary pediatrics*, *20*(8), 680-685. https://doi.org/10.7499/j.issn.1008-8830.2018.08.015
[8] Wandro, S., Osborne, S., Enriquez, C., Bixby, C., Arrieta, A., & Whiteson, K. (2018). The Microbiome and Metabolome of Preterm Infant Stool Are Personalized and Not Driven by Health Outcomes, Including Necrotizing Enterocolitis and Late-Onset Sepsis. *mSphere*, *3*(3), e00104-18. https://doi.org/10.1128/mSphere.00104-18
[9] Pammi, M., Cope, J., Tarr, P. I., Warner, B. B., Morrow, A. L., Mai, V., Gregory, K. E., Kroll, J. S., McMurtry, V., Ferris, M. J., Engstrand, L., Lilja, H. E., Hollister, E. B., Versalovic, J., & Neu, J. (2017). Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. *Microbiome*, *5*(1), 31. https://doi.org/10.1186/s40168-017-0248-8
[10] Samuels, N., van de Graaf, R. A., de Jonge, R., Reiss, I., & Vermeulen, M. J. (2017). Risk factors for necrotizing enterocolitis in neonates: a systematic review of prognostic studies. *BMC pediatrics*, *17*(1), 105. https://doi.org/10.1186/s12887-017-0847-3
[11] Hackam, D., & Caplan, M. (2018). Necrotizing enterocolitis: Pathophysiology from a historical context. *Seminars in pediatric surgery*, *27*(1), 11-18. https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2017.11.003
[12] Meister, A. L., Doheny, K. K., & Travagli, R. A. (2020). Necrotizing enterocolitis: It's not all in the gut. *Experimental biology and medicine*, *245*(2), 85-95. https://doi.org/10.1177/1535370219891971
[13] Gordon, P. V., Swanson, J. R., MacQueen, B. C., & Christensen, R. D. (2017). A critical question for NEC researchers: Can we create a consensus definition of NEC that facilitates research progress?. *Seminars in perinatology*, *41*(1), 7-14. https://doi.org/10.1053/j.semperi.2016.09.013
[14] Juhl, S. M., Hansen, M. L., Fonnest, G., Gormsen, M., Lambaek, I. D., & Greisen, G. (2017). Poor validity of the routine diagnosis of necrotising enterocolitis in preterm infants at discharge. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, *106*(3), 394-398. https://doi.org/10.1111/apa.13541
[15] Eaton, S. (2017). Necrotizing enterocolitis symposium: Epidemiology and early diagnosis. *Journal of pediatric surgery*, *52*(2), 223-225. https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2016.11.013
[16] Gephart, S. M., Gordon, P. V., Penn, A. H., Gregory, K. E., Swanson, J. R., Maheshwari, A., & Sylvester, K. (2018). Changing the paradigm of defining, detecting, and diagnosing NEC: Perspectives on Bell's stages and biomarkers for NEC. *Seminars in pediatric surgery*, *27*(1), 3-10. https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2017.11.002
[17] Robinson, J. R., Rellinger, E. J., Hatch, L. D., Weitkamp, J. H., Speck, K. E., Danko, M., & Blakely, M. L. (2017). Surgical necrotizing enterocolitis. *Seminars in perinatology*, *41*(1), 70-79. https://doi.org/10.1053/j.semperi.2016.09.020
[18] Gilfillan, M., & Bhandari, V. (2017). Biomarkers for the diagnosis of neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis: Clinical practice guidelines. *Early human development*, *105*, 25-33. https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2016.12.002
[19] Vorotyntsev, S. I., Hrynovska, M. B., Sofilkanych, M. M., & Zakharchuk, O. V. (2018). Efficacy of regional analgesia techniques in abdominal surgery patients with obesity. *Pathologia*, *15*(2), 229-235. https://doi.org/10.14739/2310-1237.2018.2.141426