

# Тривалий restraint-стрес як предиктор формування інсулінорезистентності в експериментальних щурів

К. Б. Романова<sup>1B,C,D</sup>, О. В. Ганчева<sup>1B</sup>\*, Ю. М. Колесник<sup>1B,A,E,F</sup>

Запорізький державний медико-фармацевтичний 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

**Мета роботи** – визначити характер змін і патогенетичні механізми формування глікемічної кривої під час тесту толерантності до глюкози у щурів на 6, 15 і 21 тижні обмеження життєвого простору.

**Матеріали та методи.** Використали 55 щурів-самців лінії Wistar віком від 6 до 10 місяців. Тварин поділили на 4 групи: 1 – інтактний контроль, 10 щурів; 2, 3 і 4 групи – по 15 щурів-самців, які перебували в умовах обмеження життєвого простору протягом 6, 15 та 21 тижня відповідно. У плазмі крові натще визначали концентрації глюкози (тест-смужки Test Strip II на глюкометрі Glucocard (ARKRAY Inc., Японія), інсуліну та кортикостерону (імуноферментним методом, використовуючи комерційні набори для щурів фірми Monobind, USA), проводили тест толерантності до глюкози (ГТТ), розраховували індекс HOMA та коефіцієнт інсулін/кортикостеронового співвідношення.

**Результати.** У результаті обмеження життєвого простору, малорухливості та складних комунікаційних відносин у тварин, які 6 тижнів перебували в названих умовах, тип глікемічної кривої ставав гіпоінсулінемічно-гіпоглікемічним із високою чутливістю тканин до глюкози (індекс HOMA достовірно знижувався до 0,21 проти 0,55 в контролі), характеризувався відтермінованістю гіперглікемічного максимуму на 30 хвилині тесту, повільним поверненням до еуглікемічного рівня тільки на 90 хвилині (проти 30 хвилини у контролі). Гіпоінсулінемічну криву зі збереженою чутливістю тканин до глюкози (індекс HOMA 0,33 проти 0,55 в контролі) формувало 15-тижневе обмеження життєвого простору. Зміни в післяпрандiальному засвоєнні глюкози виявляли за найвищою концентрацією глюкози на 15 хвилині тесту, дуже повільним зниженням рівня глюкози в післяабсорбційному періоді без повернення до вихідних значень на 90 хвилині. Діабетичний тип глікемічної кривої формувався на 21 тижні обмеження, порушував чутливість тканин до глюкози (суттєве достовірне збільшення розрахункового індексу HOMA з 0,55 у контролі до 0,95), спричиняв виникнення інсулінорезистентності.

**Висновки.** Обмеження життєвого простору, малорухливість і складні комунікаційні відносини у тварин поступово формують комплекс порушень, що змінюють характер глікемічної реакції на глюкозне навантаження, порушують прандiальну секрецію інсуліну, підвищують гіперглікемізувальну дію контрінсулярних гормонів (кортикостерону) та реалізують дисфункціональні прояви прандiальної/післяпрандiальної глікемії. Гіпоінсулінемічно-гіпоглікемічний тип глікемічної кривої з високою чутливістю тканин до глюкози формується на 6 тижні обмежень і негараздів; гіпоінсулінемічну криву зі збереженою чутливістю тканин до глюкози одержали на 15 тижні; діабетичний тип глікемічної кривої із порушенням чутливості тканин до глюкози та розвитком інсулінорезистентності визначили на 21 тижні.

**Ключові слова:** стрес, інсулінорезистентність, вуглеводний обмін, тест толерантності до глюкози, щури.

Патологія. 2023. Т. 20, № 2(58). С. 103-107

\*E-mail: [gancheva\\_olga@i.ua](mailto:gancheva_olga@i.ua)

## Long-term restraint stress as a predictor of insulin resistance development in experimental rats

K. B. Romanova, O. V. Hancheva, Yu. M. Kolesnyk

**The aim** of the work was to define the pattern of changes and pathogenetic mechanisms of glycemic curve shape during a glucose tolerance test in rats at 6, 15, and 21 weeks of environmental space restriction.

**Materials and methods.** A total of 55 male Wistar rats aged 6–10 months were used and divided into 4 groups (1 – intact control, 10 rats; 2, 3 and 4 of 15 rats each, which were in conditions of restricted environmental space for 6, 15 and 21 weeks, respectively). Fasting plasma levels of glucose (test strips Test Strip II on a Glucocard glucometer (ARKRAY Inc., Japan)), insulin and corticosterone (by an immunoenzymatic method using commercial kits for rats from Monobind, USA) were measured, glucose tolerance tests (GTT) were performed, the HOMA index and the insulin/corticosterone ratio were calculated.

**Results.** The 6-week environmental space restriction, immobility and complex communication relations resulted in a hypoinsulinemic-hypoglycemic type of the glycemic curve with high tissue glucose sensitivity in animals which were in the conditions described (the HOMA index was significantly decreased to 0.21 versus 0.55 in the control), the characteristic delayed hyperglycemic peak at the 30<sup>th</sup> min of the test slowly returned to the euglycemic level by only the 90<sup>th</sup> min against the 30<sup>th</sup> min in the controls. The 15-week restriction caused a hypoinsulinemic curve with preserved tissue glucose sensitivity (the HOMA index 0.33 versus 0.55 in the controls). Alterations in postprandial glucose absorption were manifested by the highest glucose concentration at the 15<sup>th</sup> min of the test, a very slow decrease in the glucose level in the post-absorption period not being restored to baseline values by the 90<sup>th</sup> min. The 21-week restriction shaped a diabetic type of the glycemic curve, impaired tissue glucose sensitivity (a substantial and significant increase in the calculated HOMA index from 0.55 in the controls to 0.95) and resulted in the development of insulin resistance.

**Conclusions.** The environmental space restriction, immobility and complex communication relations gradually induce a range of disorders in animals and change the glycemic response shape to glucose load, impair prandial insulin secretion,

**Key words:** stress, insulin resistance, carbohydrate metabolism, glucose tolerance test, rats.

Pathologia, 2023. 20(2), 103-107

augment hyperglycemic effects of counterinsular hormones (corticosterone), and realize dysfunctional manifestations of prandial/postprandial glycemia. 6 weeks of restrictions and challenges shape the hypoinsulinemic-hypoglycemic type of the glycemic curve with high tissue glucose sensitivity, while 15 weeks result in the hypoinsulinemic curve with preserved tissue glucose sensitivity. 21 weeks show the diabetic type of the glycemic curve with impaired tissue glucose sensitivity and the development of insulin resistance.

Усі живі організми, щоб впоратися з широким спектром надмірних стимулів, які загрожують (або сприймаються як такі) і порушують динамічну рівновагу або гомеостаз, виробили висококонсервативну регулювальну систему стресу [1]. Доведено, що при впливі стресорів понад певний поріг активація системи стресу призводить до низки фізіологічних і поведінкових адаптацій, які допомагають досягти гомеостазу і збільшити шанси на виживання. Втім, коли стресова реакція на виклик неадекватна, надмірна або тривала, дезадаптація, що виникає в результаті, може спричинити патологічні стани. Навіть низькоінтенсивні стресори, що мають тривалу дію, здатні запускати складний каскад гормонально-метаболических порушень із найбільш виразними змінами у стані вуглеводного обміну [2].

Зазначимо, що не менш значущий модулювальний вплив на характер метаболічних змін має спосіб життя, особливо малорухливість або відсутність фізичної активності. Саме ці фактори вважають головною причиною поширення ожиріння та надмірної ваги, визначають як чинники ризику розвитку низки неінфекційних захворювань.

Недавні дослідження показали суттєве збільшення захворюваності на серцево-судинну патологію та діабет 2 типу в Україні та світі [3]. Показано зв'язок їх формування з метаболічними порушеннями через малорухливість і негативні умови життя. Поширеність малорухливого способу життя визначають як глобальну проблему суспільної охорони здоров'я через останні технологічні інновації та перехід до менш рухливих занять і розваг [4]. Так, в експериментальному дослідженні впливу 8-годинного обмеження життєвого простору в щурів Quadri K. Alabi та Rufus O. Akomolafe показали суттєве підвищення рівнів глюкози, інсуліну й індексу гомеостатичної оцінки інсулінорезистентності (HOMA-IR). Автори вважають, що це може бути пов'язано зі зниженою реактивністю тканин-мішеней до дії інсуліну, тобто свідчить про початок формування інсулінорезистентності [5].

На жаль, сучасні умови формують цілі комплекси життєвих негараздів: постійні стреси різної інтенсивності та тривалості, малорухливість із порушеннями комунікаційних соціальних і психологічних відносин. Такі комплекси складних і тривалих впливів утворюють взаємозв'язок між стресом і процесами, що спричиняють захворювання [6].

Незважаючи на стереотипність та універсальність стрес-реакції, для прогнозування її перебігу та характеру впливів необхідно враховувати такі важливі фактори, як сила та тривалість стресора, завершеність впливу, здатність про- та антистресорної систем, вихідний рівень нейрогуморального балансу та метаболічних констант.

Тому проблематика дослідження механізмів впливу на здоров'я населення соціального стресу з обмеженням життєвого простору, малорухливістю та

їхньої ролі в формуванні патологій залишається актуальною. Втім, незважаючи на високу значущість цієї проблеми та зацікавленість науковців в її розв'язанні, залишається багато нез'ясованих моментів. Тому для розуміння порушеної проблеми вважаємо важливим і необхідним експериментальне дослідження з моделюванням комплексу негативних впливів і вивчення динаміки змін від початку дії факторів до формування патогномічних симптомів патології.

## Мета роботи

Визначити характер змін і патогенетичні механізми формування глікемічної кривої під час тесту толерантності до глюкози у щурів на 6, 15 і 21 тижні обмеження життєвого простору.

## Матеріали і методи дослідження

У дослідженні використали 55 щурів-самців лінії Wistar віком 6–10 місяців, які перебували в виварії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету. Температура повітря – 20–25 °С, світловий день – від 07:00 до 19:00, з вільним доступом до їжі та води. Щурів поділили на 4 експериментальні групи: 1 – інтактний контроль (10 щурів); 2, 3 і 4 групи – по 15 тварин, яким моделювали restraint-стрес шляхом обмеження життєвого простору клітки (нормальний розмір – 350 см<sup>2</sup>) на 40 % (210 см<sup>2</sup>) протягом 6, 15 і 21 тижнів. Одночасно в клітці перебували 5 тварин. Для створення додаткових стресорних негараздів і гальмування адаптаційних процесів кожного тижня двох щурів із групи переміщали в іншу клітку в межах групи.

Стан вуглеводного обміну оцінювали шляхом визначення натще концентрацій глюкози (тест-смужки Test Strip II на глюкометрі Glucocard (ARKRAY Inc., Японія), інсуліну та кортикостерону на автоматичному імуноферментному аналізаторі Thunderbolt® Analyzer (Gold Standard Diagnostics, США) в плазмі крові, використовуючи комерційні набори для щурів фірми Monobind, USA. Крім того, провели тест толерантності до глюкози (ГТТ). Для оцінювання чутливості тканин до інсуліну розраховували індекс HOMA-IR за формулою:  $HOMA = C1 \times C2 / 22,5$ , де C1 – концентрація інсуліну натще, мкОД/мл; C2 – концентрація глюкози натще, мм/л. Для визначення характеру впливу та реалізації стрес-реакції розраховували коефіцієнт інсулін/кортикостеронового співвідношення.

ГТТ здійснили для визначення характеру глікемічної реакції на глюкозне навантаження, непрямого оцінювання прандіальної секреції інсуліну та регуляції прандіальної/післяпрандіальної глікемії, діагностики прихованих порушень вуглеводного обміну. Тест виконали згідно з методичними рекомендаціями «Доклінічні дослідження лікарських засобів», що рекомендовані фармакологічним комітетом МОЗ України для експе-

риментального вивчення нових гіпоглікемічних засобів [7]. Для проведення тесту після 12–14-годинного нічного голодування щурів розміщували по одному в клітках при вільному доступі до води. Перед початком тесту у кожної тварини визначали натще рівень глюкози плазми з хвостової вени. Глюкозне навантаження здійснювали шляхом одноразового внутрішньочеревинного введення 2 г глюкози на 1 кг маси тварини, що розведена в 6 мл 0,9 % розчину NaCl. Через 15, 30, 45 і 90 хвилин після введення глюкози брали кров із хвостової вени для визначення її концентрації.

Результати опрацювали, застосувавши пакет прикладних і статистичних програм Excel 7.0 (Microsoft Corp., США) і програму Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., № JPZ8041382130ARCN10-J). Розраховували середнє арифметичне значення у вибірці ( $M$ ), дисперсію та помилку середнього ( $m$ ). Для оцінювання достовірності відмінностей результатів в експериментальних і контрольній групі щурів визначали коефіцієнт Стьюдента ( $t$ ) для вибірки з нормальним законом розподілення даних, критерій Манна-Вітні ( $U$ ) – для вибірки, де показники не відповідали закону нормального розподілу. Після цього визначали вірогідність відмінностей у вибірках ( $p$ ). Достовірними вважали значення, для яких  $p_{st} \leq 0,05$ .

## Результати

Аналіз результатів ГТТ показав: у щурів, які 6 тижнів перебували в умовах обмеження життєвого простору, тип глікемічної кривої був дещо подібним до результатів контрольної групи, але виявили певні особливості. Зокрема, йдеться про відтермінованість гіперглікемічного максимуму (не з 15 хв, як у контролі, а з 30 хв), і пік концентрації глюкози в крові при цьому був достовірно нижчим. Еулікемічний рівень досягнуто не до 30 хв, а до 90 хв тесту (рис. 1). Імовірно, ці зміни пов'язані з вихідними низькими значеннями концентрацій глюкози й інсуліну через знижену відповідь  $\beta$ -клітин на глікемічні стимули (рис. 2). Зважаючи на ці особливості, вважаємо, що тип глікемічної кривої можна визначити як гіпоінсулінемічно-гіпоглікемічний із високою чутливістю тканин до глюкози. Це підтверджено вірогідним зниженням розрахункового індексу НОМА до 0,21 проти 0,55 у контрольній групі тварин.

Значну зміну післяпрандіального засвоєння глюкози у тварин спричиняло 15-тижневе обмеження простору. Це виявляли за відмінностями глікемічної кривої під час ГТТ. Результати тесту показали, що на тлі вищого рівня глюкози (вище від значень контролю на 28 %) та низької концентрації інсуліну (менше за контрольні на 54 %) формувалася глікемічна крива за гіпоінсулінемічним типом зі збереженою чутливістю тканин до глюкози. Наведені зміни визначали за максимальними концентраціями глюкози на 15 хв тесту, що була найвищою протягом дослідження та порівнюючи з іншими групами. Динаміка зниження рівня глюкози в післяабсорбційному періоді дуже повільна, без повернення до початкових значень на 90 хв. Імовірно, це пов'язано з вихідним низьким рівнем інсуліну та додатковим гіперглікемізуючим ефектом кортикостерону, концентрація якого в цей період перевищувала

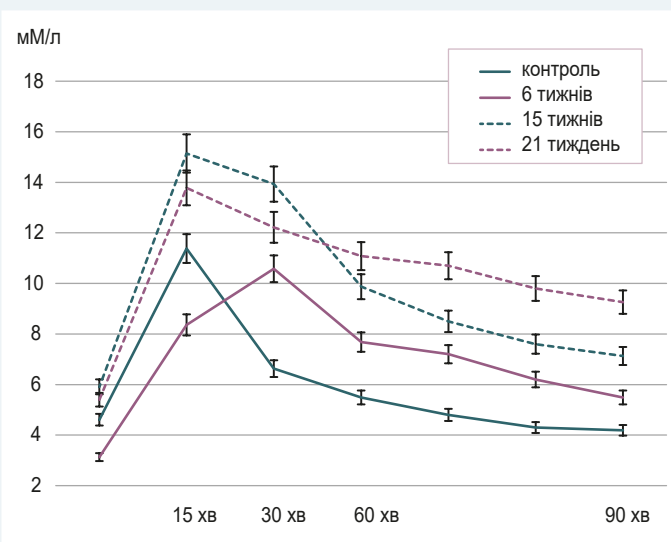


Рис. 1. Характер глікемічних кривих під час внутрішньочеревинного тесту толерантності до глюкози в щурів із restraint-стресом різної тривалості.

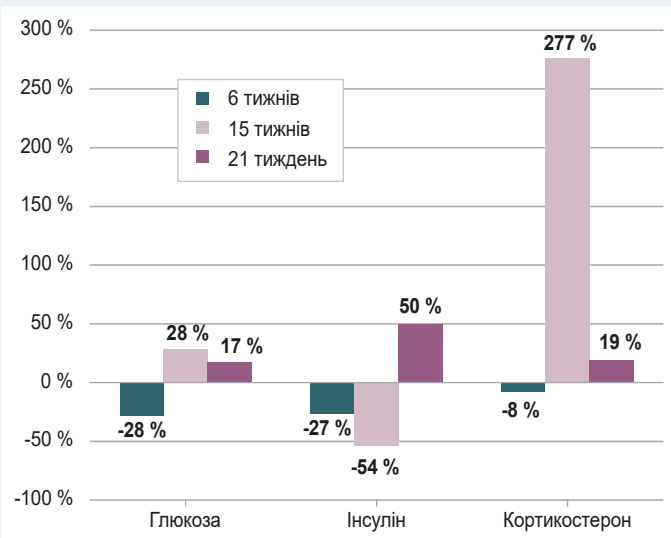


Рис. 2. Динаміка змін концентрацій глюкози, інсуліну та кортикостерону в щурів із restraint-стресом різної тривалості (6, 15 і 21 тиждень) порівняно з контролем (100 %). Відмінності показників груп із стресом різної тривалості щодо відповідних параметрів контрольної групи вірогідні ( $p_{st} < 0,05$ ).

значення контролю в 2,77 раза (рис. 2). Підтверджено збереженість чутливості тканин до глюкози – за достовірно нижчими значеннями індексу НОМА (0,33 проти 0,55 у контрольних щурів).

Обмеження життєвого простору, малорухливість і складні комунікаційні відносини у тварин протягом 21 тижня призводили до формування діабетичного типу глікемічної кривої. Для нього характерне порушення ранньої та пізньої фаз секреції інсуліну з розвитком інсулінорезистентності. Про це свідчили високі рівні глікемії протягом 15–30–45 хв після абсорбційного періоду з низькими коливаннями значень, збереження гіперглікемії наприкінці тесту (90 хв) та суттєве достовірне збільшення розрахункового індексу НОМА (з 0,55 у контролі до 0,95 в групі експериментальних тварин) (рис. 1).

## Обговорення

Гіпотеза про те, що тривалий багаторазовий вплив стресорів призводить до незворотних змін у вуглеводному обміні, набуває нині аксіоматичної форми. Так, у клінічних спостереженнях наслідків посттравматичного стресового розладу (ПТСР) в пацієнтів виявили підвищену поширеність серцево-судинних захворювань, цукрового діабету 2 типу, артеріальної гіпертензії, а також вищі показники смертності, що ними спричинена [8]. У дослідженні випадок-контроль у 160 молодих чоловіків-ветеранів збройних сил оцінювали, чи передбачає статус ПТСР підвищені маркери кардіометаболічного ризику. Порівнявши показники кардіометаболічного ризику з параметрами здорових людей: резистентності до інсуліну (НОМА-IR), С-реактивного білка, інтерлейкіну-6, фактора некрозу пухлини- $\alpha$ , симпатичної гіперактивності (за збільшенням частоти серцевих скорочень (ЧСС)) і нейроендокринної дисрегуляції (за підвищенням рівня кортизолу), – встановили, що діагноз ПТСР пов'язаний зі значно вищим рівнем НОМА-IR, ЧСС і концентрацією прозапальних цитокинів [9].

Експериментальні дослідження впливу стресорів на рівень глікемії в щурів показали, що комплекс негараздів, зокрема короткотривала одностороння іммобілізація з наступним 15-хвилинним примусовим плаванням, які повторювалися протягом 8 тижнів, призводили не тільки до безпосереднього підвищення рівня глюкози відразу після стресу, але й спостерігали тривалу відтерміновану гіперглікемію навіть після припинення впливів стресорів [10].

У дослідженні впливу обмеження життєвого простору, малорухливості та складних комунікаційних відносин, що здійснили, встановили динамічні зміни рівня глікемії натще та ключових гормонів, які безпосередньо забезпечують її сталість. Враховуючи низьку інтенсивність, невиразність і прихований вплив комплексу негараздів, спостерігали поступове накопичення метаболічних змін. Зазначимо, що тривалий стрес низької інтенсивності, який не може бути подоланий, постійна індукція додаткових підпорогових стресорів порушують динаміку формування адаптативних реакцій і спричиняють дезадаптивні зміни. Попередні дослідження впливу описаної моделі показали коливання маси тіла щурів, формування порушень гормонального профілю й вуглеводного обміну, стійкого підвищення артеріального тиску [11].

У нашому дослідженні цікавими виявилися зміни індексів інсулінорезистентності (НОМА-IR) та стресової адаптації / дезадаптації (інсулін/кортикостеронової індекс). Розрахунки у тварин із груп 6- і 15-тижневого restraint-стресу показали нижчі значення, ніж у контролі через гіпоінсулінемію та високий рівень кортикостерону. Це свідчить про збереженість чутливості тканин до інсуліну на тлі істотних гормональних змін. Тривалий restraint-стрес протягом 21 тижня призводив до збільшення індексів, особливо НОМА-IR (в 1,7 раза). Це стало, хоч і непрямим, але беззаперечним аргументом сформованої інсулінорезистентності, а інсулін/кортикостеронової індекс при цьому істотно підвищився порівняно з попередніми термінами експерименту (перевищив контроль більш ніж на 33 %).

Нині можна стверджувати, що реалізація стрес-реакції та механізмів адаптації цілком залежать від алостази глюкози. Тобто алостаз – процес досягнення адаптації організму до змінених умов життя. Це пов'язано з тим, що організм змінюється у відповідь на викид гормонів стресу, й ці зміни допомагають йому не лише подолати стресову ситуацію, але й фактично відновити гомеостаз. Надходження до кровообігу високої кількості енергетичних субстратів реалізується шляхом провідної ролі ендокринної системи: секреції в кров адреналіну наднирковими залозами, стимуляцією секреції глюкокортикоїдів (кортизолу, кортикостерону), яким і належить провідна роль у механізмі розвитку стресу. Секреція гормонів наднирковими залозами зазвичай має адаптивний ефект при короткостроковій дії. Втім, при тривалому або повторному стресі вони можуть викликати патологічні зміни в організмі. Пошкоджувальний ефект глюкокортикоїдів за цих умов визначено як «алостатичне навантаження», що стає одним з основних патогенетичних ланцюгів формування метаболічних порушень. При посиленні тяжкості та з часом алостатичне навантаження збільшеним рівнем глікемії через гіперглікемізуючі ефекти кортикостероїдів набуває патологічних наслідків і формує інсулінорезистентність [12].

Тривале перебування в стресових ситуаціях призводить до порушення функцій різних органів і систем, кумуляції фізіологічних змін. Це зумовлює зсув гомеостатичних констант, тобто формуються нові індивідуальні межі, «нова вихідна точка» того чи іншого параметра. У віддаленій перспективі порушується функціонування органів і систем, що також спричиняє зміни індивідуальної «норми», а отже формуються «нові вихідні точки верхньої та нижньої меж» тих чи інших параметрів, які закріплюються на гомеостатичному рівні. Саме від цих «нових» значень індивідуальної «норми» надалі відбувається гомеостатичне регулювання термінових реакцій адаптації, беззаперечно, внаслідок підвищення фізіологічної «ціни», «вартості» цих реакцій для організму [12]. В нашому дослідженні наслідки такого зсуву гомеостатичних меж через алостатичне навантаження виявили як суттєві метаболічні порушення: зміни характеру глікемічної реакції на глюкозне навантаження, що прогресують, зниження чутливості тканин до інсуліну та неефективну його прандіальну секрецію, підвищену гіперглікемізуючу дію контрінсулярних гормонів (кортикостерону), дисфункціональні прояви прандіальної та післяпрандіальної глікемії.

## Висновки

1. Обмеження життєвого простору, малорухливість і складні комунікаційні відносини у тварин поступово формують комплекс порушень, що змінюють характер глікемічної реакції на глюкозне навантаження, порушують прандіальну секрецію інсуліну, підвищують гіперглікемізуючу дію контрінсулярних гормонів (кортикостерону) та реалізують дисфункціональні прояви прандіальної/післяпрандіальної глікемії.

2. Гіпоінсулінемічно-гіпоглікемічний тип глікемічної кривої з високою чутливістю тканин до глюкози



формується на 6 тижні обмежень і негараздів; гіпоінсулінемічну криву зі збереженою чутливістю тканин до глюкози одержали на 15 тижні; діабетичний тип глікемічної кривої із порушенням чутливості тканин до глюкози та розвитком інсулінорезистентності визначили на 21 тижні.

### Фінансування

Дослідження виконане в рамках НДР Запорізького державного медичного університету: «Роль пептидергічних структур гіпоталамуса та стовбуру мозку в патогенезі артеріальної гіпертензії», за програмою наукових досліджень і розробок, що фінансується з державного бюджету, держреєстрація № 0117U002579 (2017–2019).

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 06.06.2023

Після доопрацювання / Revised: 21.06.2023

Схвалено до друку / Accepted: 30.06.2023

### Відомості про авторів:

Романова К. Б., асистент каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0009-0000-1096-5314

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

ORCID ID: 0000-0001-7339-7078

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

ORCID ID: 0000-0002-1556-5085

### Information about the authors:

Romanova K. B., MD, Assistant of the Department of Pathological Physiology with the Course of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

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

Kolesnyk Yu. M., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathological Physiology with the Course of Normal Physiology, Acting Rector of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Honorary Scientist and Engineering Worker of Ukraine.

### References

1. Sun, S., & Zhou, J. (2018). Molecular mechanisms underlying stress response and adaptation. *Thoracic cancer*, 9(2), 218-227. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12579>
2. Contoreggi C. (2015). Corticotropin releasing hormone and imaging, rethinking the stress axis. *Nuclear medicine and biology*, 42(4), 323-339. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2014.11.008>
3. Mykhalchyshyn, G. P. (2020). Trendy pokaznykiv, shcho kharakteryzuiut tiahar tsukrovoho diabetu 2 typu na systemy okhorony zdorovia v Ukraini ta inshykh rozvynenykh krainakh svitu [Trends of indicators characterizing the burden of type 2 diabetes on health care systems in Ukraine and some developed countries]. *Modern medical technology*, (3), 53-59. [in Ukrainian]. [https://doi.org/10.34287/mmt.3\(46\).2020.9](https://doi.org/10.34287/mmt.3(46).2020.9)
4. Yaribeygi, H., Maleki, M., Sathyapalan, T., Jamialahmadi, T., & Sahebkar, A. (2021). Pathophysiology of Physical Inactivity-Dependent Insulin Resistance: A Theoretical Mechanistic Review Emphasizing Clinical Evidence. *Journal of diabetes research*, 2021, 7796727. <https://doi.org/10.1155/2021/7796727>
5. Alabi, Q. K., & Akomolafe, R. O. (2022). Novel sedentary cage induced sedentariness in rats: evidence from relevant biomarkers. *BMC endo-*

6. crine disorders, 22(1), 293. <https://doi.org/10.1186/s12902-022-01221-1>
7. Kivimäki, M., Singh-Manoux, A., Pentti, J., Sabia, S., Nyberg, S. T., Al-fredsson, L., Goldberg, M., Knutsson, A., Koskenvuo, M., Koskinen, A., Kouvonen, A., Nordin, M., Oksanen, T., Strandberg, T., Suominen, S. B., Theorell, T., Vahtera, J., Väänänen, A., Virtanen, M., Westerholm, P., ... IPD-Work consortium (2019). Physical inactivity, cardiometabolic disease, and risk of dementia: an individual-participant meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 365, 11495. <https://doi.org/10.1136/bmj.11495>
8. Stefanov, O. V. (Ed.). (2001). *Doklinichni doslidzhennia likarskykh zasobiv* [Preclinical studies of medicinal products: methodical recommendations]. Avitsena. [in Ukrainian].
9. Šagud, M., Jakšić, N., Vuksan-Čusa, B., Lončar, M., Lončar, I., Peleš, A. M., Miličić, D., & Jakovljević, M. (2017). Cardiovascular Disease Risk Factors in Patients with Posttraumatic Stress Disorder (PTSD): A Narrative Review. *Psychiatra Danubina*, 29(4), 421-430. <https://doi.org/10.24869/psyd.2017.421>
10. Blessing, E. M., Reus, V., Mellon, S. H., Wolkowitz, O. M., Flory, J. D., Biero, L., Lindqvist, D., Dhabhar, F., Li, M., Qian, M., Abu-Amara, D., Galatzer-Levy, I., Yehuda, R., & Marmar, C. R. (2017). Biological predictors of insulin resistance associated with posttraumatic stress disorder in young military veterans. *Psychoneuroendocrinology*, 82, 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.04.016>
11. Nirupama, R., Devaki, M., & Yajurvedi, H. N. (2012). Chronic stress and carbohydrate metabolism: persistent changes and slow return to normalcy in male albino rats. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 15(3), 262-271. <https://doi.org/10.3109/10253890.2011.619604>
12. Romanova, K. B., Hancheva, O. V., & Kolesnyk, Yu. M. (2023). Patohenychni osoblyvosti hormonalnoho profilu u shchuriv, shcho zaznali restraint-stressu riznoi tryvalosti [Pathogenetic characteristics of the hormonal profile in rats subjected to restraint stress of different duration]. *Modern medical technology*, (2), 12-15. [in Ukrainian]. [https://doi.org/10.34287/MMT.2\(57\).2023.2](https://doi.org/10.34287/MMT.2(57).2023.2)
13. Wilkin, T. J., & Metcalf, B. S. (2009). Glucose allostasis: emperor's new clothes?. *Diabetologia*, 52(5), 776-778. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1295-x>

# Nestin, CD44, Ki-67, GS and AQP4 expression in the brain neurogenic niches of deceased patients with liver cirrhosis of different degree

T. V. Shulyatnikova<sup>1</sup>\*, A, B, C, D, V. O. Tumanskyi<sup>1</sup> A, D, E, F

Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine

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

## Key words:

hepatic encephalopathy, neurogenesis, astrocytogenesis, stem cells, Nestin, CD44, Ki-67, GS, AQP4.

Pathologia, 2023, 20(2), 108-117

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

**The aim of the study.** Immunohistochemical study of Nestin, CD44, Ki-67, GS, AQP4 expression in the subventricular zone of the lateral ventricle and hippocampus of deceased patients with liver cirrhosis depending on the age and Child–Pugh score.

**Materials and methods.** The brains of 90 deceased patients aged  $65 \pm 3$  years with non-alcoholic liver cirrhosis (LC) Child–Pugh class A, B and C were studied, which comprised 3 groups: group “A” – 30 deceased patients with compensated LC; “B” – 30 deceased patients with subcompensated LC (“mild decompensation”); “C” – 30 deceased patients with decompensated LC. Control group included brains of 30 patients died from acute cardiovascular failure and did not have liver disease. Each group was divided into 2 subgroups: patients  $\leq 59$  y. o. and patients  $\geq 60$  y. o. Grade 1–4 hepatic encephalopathy was detected in 59 out of 90 (65.55 %) patients with LC. The immunohistochemical levels of Nestin, CD44, Ki-67, GS and AQP4 were evaluated in paraffin tissue sections of the subventricular zones (SVZ) of the anterior and lower horns of the brain lateral ventricles, as well as the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus (DG) and other structures of hippocampus in standardized fields of view of the microscope Scope A1 Carl Zeiss (Germany) using Videotest-Morphology 5.2.0.158 software.

**Results.** In SVZ of control subgroups, Nestin+ astrocyte-like stem cells were localized mainly in subventricular glial nodules (SGN) and to a lesser extent in astrocytic ribbon. In brains of patients with compensated and subcompensated LC, there was increased Nestin expression compared to control (by 61.36 % and 208.74 %, respectively) due to increased numbers of Nestin+ cells in astrocytic ribbons. In the hippocampus of control and cirrhotic patients, Nestin expression was determined mainly in astrocyte-like cells of the *fimbria-fornix*, “glial plates” around the blood vessels entering the choroid plexus and subpial zone. In the SVZ of patients with subcompensated LC, the expressions of Nestin, CD44, and Ki-67 were maximally increased (by 208.74 %, 37.83 %, and 3 times, respectively), moreover, in the areas of periventricular reparative astrogliosis, in small foci of encephalolysis in the head of caudate nucleus, among GS+ and CD44+ astrocytes clusters of astrocyte-like Nestin+ and CD44+ cells were detected. In patients with decompensated LC, a significant decrease in Nestin and CD44 expression and absence of Ki-67 were observed in the SVZ, with a simultaneous maximum increase in the expression of GS and AQP4.

**Conclusions.** In the neurogenic niches of the lateral ventricles and hippocampus of patients with compensated and subcompensated LC, there are signs of activation of neural stem cells and niche astrocytes with increased expression of Nestin, CD44, and Ki-67, which reaches maximum in subcompensated LC. Clusters of astrocyte-like Nestin+ and CD44+ cells appear in foci of periventricular repair, which probably migrate from active adjacent subventricular niche. In the brains of the patients with decompensated LC and severe Grade 3–4 hepatic encephalopathy, deep astrocytic dysmetabolic dystrophy is associated with substantial decrease in the activity of subventricular stem niche and expected astrocytogenesis.

## Ключові слова:

печінкова енцефалопатія, нейрогенез, астроцитогенез, стовбурові клітини, Nestin, CD44, Ki-67, GS, AQP4.

Патологія. 2023. Т. 20, № 2(58). С. 108-117

## Характеристика експресії Nestin, CD44, Ki-67, GS і AQP4 у стовбурових нейрогенних нішах головного мозку померлих хворих на цироз печінки різних ступенів тяжкості

Т. В. Шулятнікова, В. О. Туманський

**Мета роботи** – імуногістохімічне дослідження експресії Nestin, CD44, Ki-67, GS, AQP4 у субвентрикулярній зоні бічного шлуночка та гіпокампа померлих хворих на цироз печінки різних вікових груп залежно від стадії захворювання за Чайлд–П'ю.

**Матеріали та методи.** Дослідили головний мозок (ГМ) 90 померлих (вік –  $65 \pm 3$  роки) хворих на неалкогольний цироз печінки (ЦП) класу А, В і С за Чайлд–П'ю. Сформували 3 групи спостережень: група «А» – 30 померлих хворих на компенсований ЦП; «В» – 30 померлих хворих на субкомпенсований ЦП; «С» – 30 померлих хворих на декомпенсований ЦП. У групі контролю – ГМ 30 померлих від гострої серцево-судинної недостатності, які не мали захворювань печінки. Кожну групу поділили на 2 підгрупи за віком:  $\leq 59$  років і  $\geq 60$  років. У 59 із 90 (65,55 %) хворих на ЦП визначили симптоматику печінкової енцефалопатії I–IV ступенів. У парафінових зрізах тканини субвентрикулярних зон (SVZ) переднього та нижнього рогів бічних шлуночків ГМ, а також субгранулярної зони (SGZ) зубчастої звивини (DG) та інших структур гіпокампа визначили рівень імуногістохімічної експресії Nestin, CD44, Ki-67, GS і AQP4 у стандартизованих полях зору мікроскопа Scope A1 Carl Zeiss (Germany) з програмою Відеотест-Морфологія 5.2.0.158.

**Результати.** У SVZ ГМ контрольних підгруп Nestin+ астроцитоподібні стовбурові клітини локалізувалися здебільшого в субвентрикулярних гліальних вузликах (SGN), менше – в астроцитарних стрічках. У ГМ хворих на компенсований і субкомпенсований ЦП встановили підвищену експресію Nestin щодо контролю (на 61,36 % і 208,74 % відповідно) внаслідок підвищення кількості Nestin+ клітин в астроцитарних стрічках. У гіпокампі контрольних пацієнтів і хворих на ЦП експресію Nestin визначали передусім в астроцитоподібних клітинах бахроми-склепіння, «гліальних пластинок» основи судин хоріоїдного сплетення та субпіальної зони. У SVZ ГМ хворих на субкомпенсований ЦП експресія Nestin,

CD44 і Ki-67 максимально підвищувалася (на 208,74 %, 37,83 % і втричі відповідно), а в ділянках перивентрикулярного репаративного астрогліозу в дрібних вогнищах енцефалолізу голівки хвостатого ядра серед GS+ і CD44+ астроцитів визначили скупчення астроцитоподібних Nestin+ і CD44+ клітин. У хворих на декомпенсований ЦП у SVZ ГМ спостерігали значне зниження експресії Nestin і CD44, відсутність експресії Ki-67 при одночасному максимальному підвищенні експресії GS і AQP4.

**Висновки.** У хворих на компенсований і субкомпенсований ЦП у нейрогенних нішах бічних шлуночків і гіпокампа виявили ознаки активації нейральних стовбурових клітин і нішевих астроцитів з підвищенням експресії Nestin, CD44 і Ki-67, що досягає максимальних значень при субкомпенсації ЦП. У вогнищах перивентрикулярної репарації з'являються скупчення астроцитоподібних Nestin+ і CD44+ клітин, що, ймовірно, мігрують з активних субвентрикулярних ніш. У ГМ хворих на декомпенсований ЦП і тяжку Grade 3–4 печінкову енцефалопатію на фоні глибокої астроцитарної дисметаболическої дистрофії зафіксували виразне зниження активності субвентрикулярних стовбурових ніш і астроцитогенезу.

Hepatotoxic brain damage in liver cirrhosis (LC) is characterized by a progressive amplification of astrocyte deficiency with the development of astroasthenia, and subsequently decompensated edema and death of these cells [1]. High concentrations of plasma and intracerebral ammonia, along with other neurotoxins, disrupt the astroglia functionality leading to dysfunction and damage of neurons, that clinically manifest as hepatic encephalopathy [2]. Persistent brain edema of varying degree and accompanied microcirculation disorders leads to ischemic damage and mosaic-to-focal neuronal death in the cerebral cortex, thalamus, striatum, cerebellum and hippocampus. Furthermore, episodes of coma in cirrhotic patients associated with laminar necrosis in deep layers of the cerebral cortex. The loss of a significant number of astrocytes and neurons creates a need for neurogenesis to restore the lost of cellular elements of a single neuroglial unit.

Neurogenesis in the adult human brain is still one of the most debated issues. In a broad sense, neurogenesis is the generation of brain cells from neural stem cells (NSCs) which mostly localized in the so called canonical neurogenic niches: the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles and the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus (DG) [3]. It is believed that multipotent NSCs are astrocytic in nature; in the course of proliferation and differentiation, they are able to give rise to new generations of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes [3]. In contrast to rodents, the main human neurogenic niche, which retains weakly proliferating stem cells throughout life, is the SVZ of the lateral ventricles, and to a lesser extent, the SGZ DG [4].

Quiñones-Hinojosa A. group described cytoarchitecture and ultrastructure of four SVZ layers in lateral walls all horns of human lateral ventricles [5]: I – ependymal cells monolayer; II – hypocellular gap (distinguishing feature of the human SVZ from rodents and non-human primates); III layer – astrocytic ribbon (GFAP+ astrocytes); IV layer – transitional zone, passing into the underlying nervous tissue. Authors demonstrated that some astrocytes and single GFAP+ cells of hypocellular gap retained signs of PCNA+ and Ki-67+ proliferative activity. Moreover, it is expected the existence of alternative neurogenic niches and reparative cellular transformations in neurodegenerative diseases, epilepsy, and cerebrovascular disease [6,7,8].

Among the most commonly used markers to identify human NSCs are Nestin, EGFR, NGFR, Sox2, GFAP $\alpha/\delta$ , and Musashi-1. Proliferating NSCs express GFAP, Ki-67, and PCNA; the resulting progenitor cells retain the expression of Nestin, Ki-67, PCNA and reduced expression

of GFAP additionally expressing transcription factors (Mash1). Cells of specific differentiation emerging from multipotent cells express proteins specific for astrocytes, oligodendrocytes, and neurons during migration and maturation. To identify maturing and mature astrocytes, commonly used markers are CD44, GFAP / GS, AQP4 [9].

Activation of adult human neurogenesis was shown in a limited list of brain pathologies including brain infarction [10], traumatic brain injury [11], Huntington disease [12], Alzheimer's disease [13]. To our knowledge, there are no studies on adult human neurogenesis, including astrocytogenesis, under conditions of chronic hepatogenic intoxication, as well as data on how the immunocytochemical profile and proliferative activity of neurogenic niche cells change during their differentiation in the brain of cirrhotic patients. Analysis of astrocytogenesis in patients with hepatogenic neurotoxicity opens new perspectives for potential therapies aimed at restoration of astrocytes, the primary targets of this pathology.

## Aim

Immunohistochemical study of Nestin, CD44, Ki-67, GS, AQP4 expression in the subventricular zone of the lateral ventricle and hippocampus of deceased patients with liver cirrhosis depending on the age and Child–Pugh score.

## Materials and methods

The study was performed on the brain of 90 deceased patients aged 46 to 83 y. o. (mean age 65  $\pm$  3 y. o.) who suffered from non-alcoholic cirrhosis of classes A, B and C according to the Child–Pugh scoring [14], which comprised 3 groups: group “A” (n = 30, compensated LC), group “B” (n = 30, subcompensated or “mild decompensation” LC) and group “C” (n = 30, decompensated LC). Each group was divided into 2 age subgroups: patients  $\leq$ 59 y. o. (46–57 y. o.) [“x1”] and patients  $\geq$ 60 y. o. (61–83 y. o.) [“x2”] – groups “A1” (n = 23), “A2” (n = 7), “B1” (n = 19), “B2” (n = 11), “C1” (n = 9), “C2” (n = 21). Cases of endocrine pathology, cancerous and alcoholic nature of liver pathology were excluded from the study. In the control group (“Cntr”), the brain of 30 patients aged 40 to 81 y. o. who died from acute cardiovascular insufficiency (mean age 59.0  $\pm$  2.5 y. o.), who did not suffer from liver pathology and other toxic-metabolic diseases, was studied. By age, the group was also divided into 2 subgroups: “Cntr 1” (n = 12), “Cntr 2” (n = 18).

In 59 of 90 (65.55 %) cirrhotic patients, symptoms of HE Grade 1–4 were clinically diagnosed. In group “A”,

8 (26.66 %) patients had symptoms of HE Grade 1, in group "B", 21 (70.00 %) patients had HE Grade 1 and 2, in group "C", HE Grade 2–3 occurred in 23 (76.66 %) patients, and Grade 4 HE (hepatic coma) before death was registered in 7 (23.33 %) patients.

During autopsies which were performed 6–20 h. after death, samples of the liver (to verify LC), subventricular zone of the lateral wall of the brain lateral ventricle anterior horn with the adjacent tissue of the caudate nucleus head as well as the hippocampus were collected. The choice of these brain regions was argued by evidence for their neurogenic potential in the adult human brain [3]. The autopsy material was fixed in 10 % buffered formalin with further embedding in paraffin blocs. Serially slides of 4  $\mu$ m thickness prepared on a precision rotary microtome HM 3600 ("MICROM Laborgerate GmbH", Germany), after deparaffination were treated with hematoxylin and eosin for general assessment of microscopic changes. For immunohistochemical (IHC) detection of NSCs, Nestin was chosen as a marker most specifically detecting these cells and most often used by other authors in NSCs studies [15]. For assessing cell population with astrocytic phenotype, more astrocyte-restricted markers were used: involved in glutamate and glutamine metabolism (glutamine synthetase, GS); water channels (aquaporin-4, AQP4); hyaluronan receptor (CD44). Ki-67 was chosen to detect proliferating cells.

IGH studies were performed according to the standard protocol of the antibody manufacturer using primary antibodies: mouse anti-human Nestin monoclonal antibody (Clone 10C2, ready-to-use MAD-000719QD-3, Master Diagnostica S. L., Vitro, Spain), rabbit polyclonal anti-CD44 (PA5-21419, Thermo Scientific, USA), rabbit polyclonal anti-GS (Thermo Scientific Inc., USA), rabbit polyclonal anti-AQP4 (Thermo Scientific Inc., USA), Ki-67 recombinant rabbit monoclonal antibody (Clone SP6, Thermo Scientific Inc., USA) and the Ultra VisionQuanto Detection imaging system with diaminobenzidine (Thermo Scientific Inc., USA).

For statistical analysis, IHC levels of Nestin, CD44, Ki-67, GS, AQP4 were determined in the hippocampal DG and SVZ of both anterior and inferior horns of the lateral ventricles (SVZs). When studying expression of Nestin, CD44, GS, AQP4 in the SVZs of both locations and hippocampal DG, 10 random, standardized fields of view (SFV) of the microscope Scope A1 "Carl Zeiss" (Germany) with Jenoptik Progres Gryphax 60N-C1' 1.0x426114 (Germany) camera were studied at magnification of x200 using Videotest-Morphology 5.2.0.158 (VideoTest) software. Nestin, CD44, GS, AQP4 levels were expressed as a percentage of the relative area (Srel., %) that occupies immunopositive material to the total area of SFV. Ki-67 level in DG and SVZs was evaluated in 20 SFV of each of two regions, covering adjacent neural tissue at least 600  $\mu$ m below the astrocytic ribbon (for the SVZs) at mag. x200, and expressed as the mean number of immunopositive cells per 1 mm<sup>2</sup> tissue section area in each autopsy case.

Data analyzed using the Statistica® package for Windows 13.0 (StatSoft Inc., License No. JPZ804I382130ARCN10-J). Results were expressed as median (Me) with range (Q1; Q3). The Mann–Whitney U

test was used to compare two groups, and the Kruskal–Wallis test was used to compare more than two groups. The results were considered statistically significant at the level of 95 % ( $p < 0.05$ ).

## Results

IHC patterns of neurogenesis and astrocytogenesis markers (Nestin, CD44, Ki-67, GS i AQP4) in SVZ of anterior and inferior lateral ventricular horns and hippocampal DG revealed heterogeneity of immunohistochemical cytoarchitecture of these zones.

**Nestin expression.** In patients of all studied groups, in DG and SVZs was revealed territorial heterogeneity in distribution of Nestin-expressing cells (NECs) due to different abundance of NSCs, as well as different density and trajectory of the local vasculature.

In SVZs and hippocampal DG of control group cytoplasmic Nestin expression was found in the endothelium of all vessels, including well developed subventricular vasculature. In SVZs, extravascular accumulations of Nestin+ cells (Fig. 1) was detected mainly in the so-called subventricular glial nodules (SGNs) – cellular clusters of subependymal layer protruding into the ventricular lumen and often without ependymal coverage. In astrocytic ribbon, cytoplasmic Nestin expression was defined in the bodies and short, thin processes of moderate number of slightly elongated NSCs-astrocyte-like cells, localized around vessels and oriented parallel to ependymal layer (Fig. 2). Outside the DG zone of the hippocampus, NECs of multipolar slightly elongated morphology were found, similar to those in SVZ of both horns. The highest prevalence of these NECs was determined in the hippocampal *fimbria-fornix* including locations near the thin septum separating the subarachnoid space of the choroid fissure of the *cistern ambiens* and the cavity of the lower horn of the lateral ventricle; "glial plates" around the base of the choroid plexus (CP) vessels. From there, the flow of NECs was divided into two branches: 1) subpially and up to the subiculum; 2) to a lesser extent – along the entire SVZ with an extension in the form of a weakly positive periventricular white matter around the tail of the inferior ventricular horn. This feature of Nestin expression in the hippocampus outside DG was equally characteristic of both age subgroups.

Between two age control "Cntr1" / "Cntr2" subgroups, differences in Nestin expression by DG and SVZ cells was not detected.

In compensated cirrhotic patients of age subgroups "A1" and "A2", Nestin levels in DG did not differ from DG values in control "Cntr1" and "Cntr2" subgroups, however, in the SVZs, Nestin was significantly increased compared to control "Cntr1" and "Cntr2" (by 48.95 % and 73.78 %, respectively) by increasing the amount of NECs in the astrocyte ribbon. When comparing age subgroups "A1" and "A2" in both SVZ and DG, Nestin levels did not show differences ( $p > 0.05$ ) (Table 1).

In subcompensated LC age subgroups "B1" and "B2", the level of Nestin in DG exceeded by 79.02 % and 68.91 % similar parameters of control "Cntr1" and "Cntr2"; and in SVZs, Nestin was higher by 257.10 % and 160.39 % (respectively) of the similar parameters of



**Table 1.** Nestin, CD44, GS, AQP4 levels in the DG and SVZs of cirrhotic patients and control group expressed as Srel. (%) and numbers/mm<sup>2</sup> for Ki-67

Parameter	Group "A"		Group "B"		Group "C"		Control group	
	≤59 y. o. ("A1")	≥60 y. o. ("A2")	≤59 y. o. ("B1")	≥60 y. o. ("B2")	≤59 y. o. ("C1")	≥60 y. o. ("C2")	≤59 y. o. ("Cntr1")	≥60 y. o. ("Cntr2")
<b>Dentate gyrus of hippocampus</b>								
Nestin	4.13 (3.56; 4.26)	4.05 (3.34; 4.58)	7.34 (6.47; 8.39)**	5.27 (4.83; 6.65)**	5.45 (4.14; 5.53)†	3.17 (2.75; 4.62)†	4.10 (3.49; 4.94)	3.12 (2.45; 4.28)
CD44	11.48 (10.18; 12.49)	15.76 (13.77; 16.95)§	17.39 (16.78; 18.15)**	22.47 (19.35; 25.32)**§	11.96 (10.88; 13.47)†	14.58 (14.19; 16.63)†§	11.26 (10.53; 12.24)	14.37 (13.34; 15.28)
Ki-67	No	No	2.00 (1.00; 3.00)**§	No	No	No	No	No
GS	3.48 (3.21; 5.37)*	3.79 (3.14; 5.58)*	6.26 (5.95; 7.48)**	6.67 (5.83; 7.97)**	8.23 (7.93; 8.75)**†	8.84 (8.14; 9.11)**†	2.25 (1.45; 2.72)	2.36 (1.23; 2.84)
AQP4	7.38 (7.12; 8.39)*	8.47 (7.95; 9.76)*	12.16 (11.39; 14.53)**	14.34 (13.48; 15.83)**	15.36 (14.15; 16.65)**	16.23 (14.37; 18.14)**	4.58 (3.29; 6.92)	4.14 (3.45; 6.74)
<b>Subventricular zones of lateral ventricle</b>								
Nestin	6.39 (5.84; 6.81)*	6.10 (5.83; 7.65)*	15.32 (7.15; 11.32)**	9.14 (8.26; 10.31)**§	5.45 (4.23; 6.28)†	4.47 (3.92; 6.12)†	4.29 (3.54; 5.72)	3.51 (3.18; 5.11)
CD44	16.08 (15.72; 16.58)*	18.96 (18.45; 19.28)*§	19.45 (18.36; 21.79)**	24.26 (22.84; 27.58)**§	16.59 (15.88; 17.63)**†	19.12 (18.89; 19.63)**†§	14.37 (13.48; 15.14)	17.29 (17.04; 18.15)
Ki-67	2.00 (1.00; 4.00)	No	6.00 (5.00; 7.00)**§	No	No	No	2.00 (1.00; 3.00)	No
GS	6.56 (5.11; 7.27)*	7.29 (7.03; 8.04)*	8.73 (7.92; 9.16)**	9.34 (8.43; 9.97)**	10.12 (9.33; 10.68)**†	7.16 (6.84; 7.43)**†§	3.47 (2.79; 4.93)	4.74 (3.54; 6.72)
AQP4	12.36 (11.46; 15.58)*	14.43 (13.67; 15.23)*	16.64 (16.15; 17.59)**	17.52 (16.29; 18.76)**	18.38 (17.29; 19.14)**	20.27 (18.34; 22.63)**	5.34 (4.28; 9.54)	7.30 (5.72; 10.63)

\*: significant difference compared to control ( $p < 0.05$ ); #: significant difference compared to group "A" ( $p < 0.05$ ); †: significant difference compared to group "B" ( $p < 0.05$ ). These comparisons were made between indicators of the same age group and within the same brain region. §: significant difference between age groups within the same LC class ( $p < 0.05$ ). All data are presented as a median with the lower and upper quartiles.

"Cntr1" and "Cntr2". At the same time, Nestin level in DG and SVZs of subcompensated subgroups "B1" and "B2" was higher than levels in compensated subgroups "A1" and "A2" ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

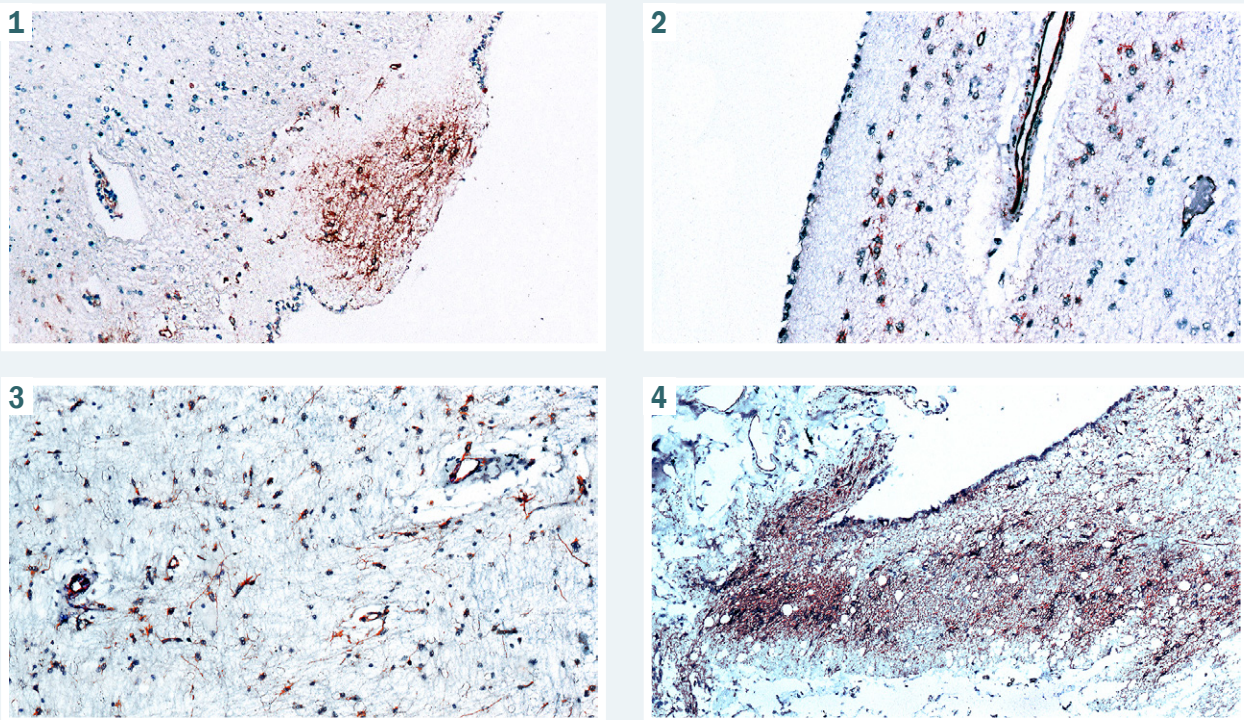
When comparing age subgroups "B1" and "B2" of subcompensated LC, the difference in Nestin level occurred only in SVZs, where in older "B2" subgroup indicators were significantly lower by 167.61 % ( $p < 0.05$ ) than in younger "B1" subgroup (Table 1). Increased Nestin level in DG is explained by the appearance of immunopositive reactive astrocytes in the molecular layer, while in SVZs – by increased numbers of Nestin+ slightly elongated astrocyte-like cells in the astrocyte ribbon outside SGNs, as in compensated LC. In the head of the caudate nucleus adjacent to SVZ in patients with subcompensated LC of both age subgroups, Nestin expression was also determined in the cytoplasm and short processes of astrocyte-like cells, as well as in the bodies and elongated thin processes of reactive astrocytes, localized in areas of astrogliosis, which sometimes encountered around small encephalolysis foci (Fig. 3). In other parts of the hippocampus, elevated Nestin level was due to an increased number of NECs and Nestin+ processes in the *fimbria-fornix*, "glial plates" around the base of CP vessels (Fig. 4), and subpial zone.

In patients with decompensated LC age subgroups "C1" and "C2", Nestin level was lower than in patients with subcompensated LC subgroups "B1" and "B2": in DG – lower by 34.67 % and 66.24 % respectively; in SVZs – lower by 181.10 % and 104.47 % ( $p < 0.05$ ) (Table 1). At the same time, Nestin expression in DG and SVZs did not differ from the indices of "A1" and "A2" subgroups of compensated LC and control subgroups "Cntr1" and "Cntr2" ( $p > 0.05$ ) (Table 1). In the SVZs of subgroups "C1" and "C2", areas of perivascular rarefaction of the

subependymal tissue were often observed, as well as more often determined foci of encephalolysis adjacent to the SVZ, however, the latter were surrounded by reactive astrocytes with reduced or lost Nestin expression. In the hippocampus outside the DG, Nestin expression was proportionally reduced in all previously described structures and retained relatively pronounced only in the elongated multipolar NECs of "glial plates" around the bases of the CP vessels. Nestin levels in DG and SVZs in subgroups "C1" and "C2" did not show significant differences ( $p > 0.05$ ) (Table 1).

**CD44 expression.** In DG and SVZs in control subgroups "Cntr1" and "Cntr2", CD44 expression was determined in the cell membranes of fibrous-like astrocytes and their long, straight perpendicularly directed processes with small varicosities. In SVZ of anterior horn, CD44+ processes localized directly under ependymal monolayer and spread up to the top layers of underlying caudate nucleus head. In DG, CD44+ astrocytes determined predominantly in SGZ and *hilus*. Outside DG, weak to moderate CD44 expression was detected in astrocytes of *alveus*, *stratum lacunosum*, *fimbria-fornix* and in interlaminar astrocytes of the subpial zone. CD44 levels in DG and SVZs of older subgroup "Cntr2" exceeded by 27.61 % and 20.32 % (respectively) indicators of younger subgroup "Cntr1" (Table 1).

In patients with compensated LC of subgroups "A1" and "A2", CD44 level in DG did not differ from control subgroups, however, in SVZs, CD44 levels significantly exceeded the indices of "Cntr1" and "Cntr2" – by 11.89 % and 9.65 %, respectively. Growth of CD44 expression is explained by expansion of the area of immunopositive cells and their processes in the same hippocampal regions and SVZs as in the control. In older subgroup "A2" of patients with compensated LC, both in DG and SVZs,



**Fig. 1.** Cytoplasmic Nestin expression in cell bodies and processes within the subventricular glial nodule in the anterior horn of the brain lateral ventricle in 63 y. o. deceased patient of control group (subgroup "Cntr2"). Mo monoclonal Nestin, clone 10C2, Master diagnostica. Mag.  $\times 100$ .

**Fig. 2.** Nestin expression in the bodies and processes of astrocyte-like cells and in the vascular endothelium of the astrocytic ribbon in SVZ of the lateral ventricle anterior horn in 67 y. o. deceased patient of the control group (subgroup "Cntr2"). Mo monoclonal Nestin, clone 10C2, Master diagnostica. Mag.  $\times 200$ .

**Fig. 3.** Nestin expression in the cytoplasm and processes of astrocyte-like cells and in the vascular endothelium of the emerging glial scar near the SVZ of the lateral ventricle anterior horn in 63 y. o. deceased patient with subcompensated LC (subgroup "B2"). Mo monoclonal Nestin, clone 10C2, Master diagnostica. Mag.  $\times 100$ .

**Fig. 4.** Nestin expression in the cytoplasm and processes of astrocyte-like cells in the fimbrial region of the hippocampus near the base of the choroidal vessels in 72 y. o. deceased patient with subcompensated LC (subgroup "B2"). Mo monoclonal Nestin, clone 10C2, Master diagnostica. Mag.  $\times 100$ .

a higher level of CD44 was determined: by 37.28 % and 17.91 %, respectively ( $p < 0.05$ ), compared to younger subgroup "A1" (Table 1).

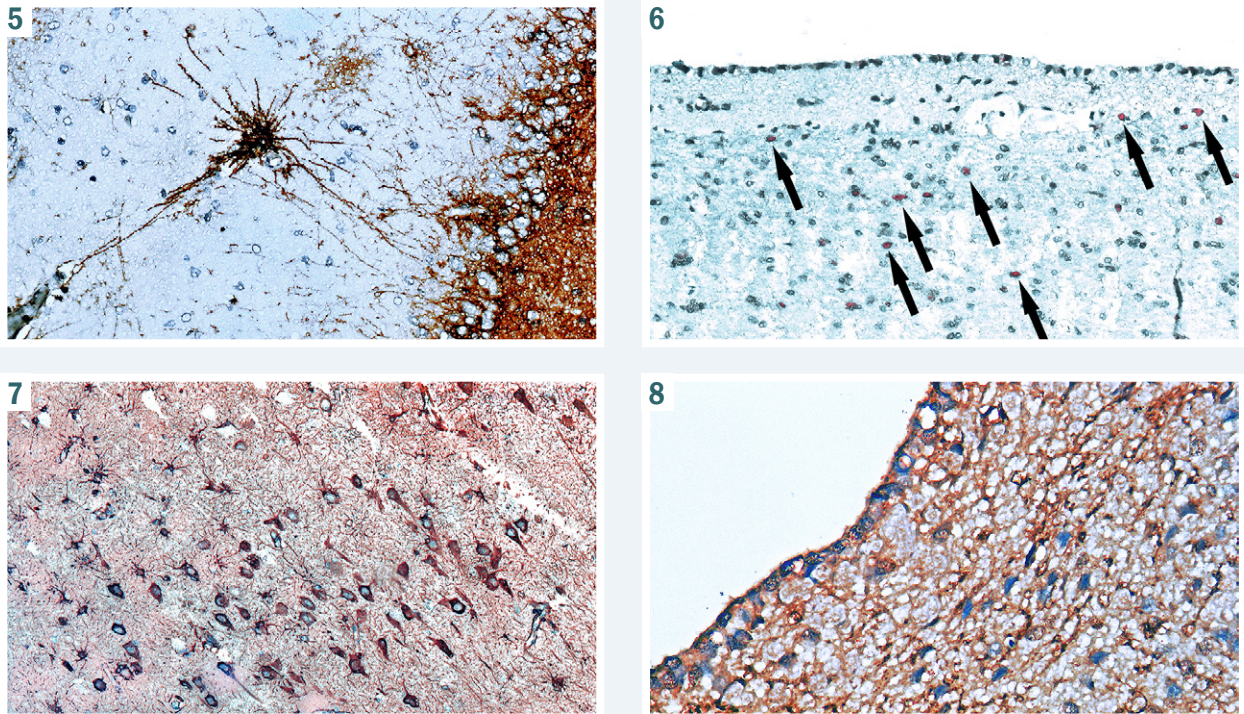
In patients with subcompensated LC of subgroups "B1" and "B2", CD44 level exceeded parameters of control subgroups "Cntr1" and "Cntr2": in DG – by 54.44 % and 56.36 %; in SVZs – by 35.35 % and 40.31 %, respectively ( $p < 0.05$ ), as well as values in compensated LC of subgroups "A1" and "A2": in DG – by 51.48 % and 42.57 %; in SVZs – by 20.95 % and 27.95 %, respectively ( $p < 0.05$ ). In both DG and SVZs, higher values were noted in older subgroup "B2" compared to younger "B1": by 29.21 % and 24.73 %, respectively ( $p < 0.05$ ) (Table 1). In DG, increased CD44 expression was determined mainly in a dense network of CD44+ fibers in the SGZ and *hilus*, as well as around the cell membranes of neurons in the granular layer. Determining whether this expression is neuronal-membrane is problematic without double labeling technique. In the molecular layer of DG, single CD44+ astrocytes often connected by their processes the membranes of granular neurons of *stratum granulosum* and vessel walls of the molecular layer (Fig. 5). In "B1" and "B2" subgroups of subcompensated LC, CD44+ astrocyte-like cells and a dense network of long CD44+ processes were found in increased amounts in the *alveus*, *stratum radiatum*, *stratum lacunosum*, *fimbria-fornix*,

subpial zone (interlaminar astrocytes), "glial plates" around the base of the CP vessels, partially coinciding in localization with the highest expression of Nestin in the same subgroups.

In the SVZ of the anterior ventricular horn, increased CD44 expression was determined in its layers II, III, and IV. In areas of astrogliosis of the head of the caudate nucleus in subcompensated LC brains, there was also a significant expression of CD44 in a network of elongated straight astrocytic varicose processes and their fragments, as well as in the clusters of small rounded-shaped stem-like cells with 1–2 short thin processes. In addition to fibrous astrocytes, CD44 expression was also determined in protoplasmic astrocytes with bushy appearance. Often, the bodies of CD44+ astrocytes localized near large vessels sending a smaller part of the processes to the vascular walls and most of them directing radially from the vessels, forming characteristic, asymmetric perivascular radiances.

In decompensated LC of subgroups "C1" and "C2", CD44 level was reduced relative to compensated subgroups "B1" and "B2": in DG – by 45.40 % and 54.11 %; in SVZs – by 17.23 % and 26.88 %, respectively ( $p < 0.05$ ) (Table 1). Despite the general trend towards a decrease in CD44 expression in decompensated patients, CD44 rates in DG and SVZs in older "C2" subgroup exceeded





**Fig. 5.** CD44 expression in the granular and subgranular layer of DG, as well as in the fibrous-like astrocyte of the molecular layer, sending its direct processes to the granular layer and to the vascular wall, in deceased 67 y. o. patient with subcompensated LC (subgroup "B2"). Rabbit polyclonal anti-CD44. Mag.  $\times 200$ .

**Fig. 6.** Ki-67 expression by single cellular nuclei within the hypocellular gap, astrocytic ribbon, and also in the head of the caudate nucleus adjacent to the SVZ in deceased 45 y. o. patient with subcompensated LC (subgroup "B1"). Ki-67 rabbit monoclonal antibody, clone SP6. Mag.  $\times 200$ .

**Fig. 7.** GS expression in the cytoplasm and dendrites of neurons, perineuronal gliocytes, astrocytes and their processes near the focus of encephalolysis in the caudate nucleus adjacent to the SVZ of the lateral ventricle anterior horn in deceased 73 y. o. patient with decompensated LC (subgroup "C2"). Rabbit polyclonal anti-GS. Mag.  $\times 50$ .

**Fig. 8.** AQP4 expression in ependymocytes and astrocytic processes within hypocellular gap and astrocytic ribbon in the SVZ of the lateral ventricle anterior horn in deceased 45 y. o. patient with subcompensated LC (subgroup "B1"). Rabbit polyclonal anti-AQP4. Mag.  $\times 400$ .

those in younger "C1" subgroup: by 21.90 % and 15.25 %, respectively ( $p < 0.05$ ). In foci of encephalolysis of different age in the head of the caudate nucleus adjacent to the SVZ, membrane expression of CD44 was often found in the body and elongated processes of reactive astrocytes that form glial scars.

**Ki-67 expression.** In the DG, nuclear Ki-67 expression was determined in single cells of the subgranular zone only in the younger "B1" subgroup in subcompensated LC (Table 1), however, the method of this IHC study does not identify the phenotype of Ki-67+ cells.

In the SVZs of control subgroup "Cntr1", Ki-67+ nuclei were found in single cells of the astrocytic ribbon in the anterior and lower horn of the lateral ventricle, as well as in layer II directly under the ependyma. In younger patients with compensated LC of "A1" subgroup, Ki-67 expression was observed in single cells of the same localization. In younger patients with subcompensated LC of "B1" subgroup, a 3-fold higher number of Ki-67+ cells were determined in SVZs compared to control "Cntr1", and single Ki-67+ cells were found in the caudate nucleus directly under the astrocytic ribbon (Fig. 6). At the same time, in patients with decompensated LC of both age subgroups "C1" and "C2", no Ki-67+ cells were detected at all in SVZs. In patients with subcompensated and decompensated LC, Ki-67 expression was absent in small

areas of the reparative astrogliosis around encephalolysis foci adjacent to the SVZs.

Both in control patients and in all cirrhotic groups older than 60 y. o., in DG and SVZs Ki-67+ cells were absent (Table 1).

**GS expression.** In control patients, GS-antibody labeled cytoplasm of astrocytic bodies and initial segments of processes in DG SGZ, in the hippocampal *fimbria-fornix* and in the "glial plates" of the CP vessels, as well as in astrocytes of astrocytic ribbons of SVZs, in protoplasmic-like astrocytes of the caudate nucleus adjacent to the SVZ. Weak GS expression was found in the cytoplasm of ependymal cells of lateral ventricles. GS level had no significant differences between age subgroups "Cntr1" and "Cntr2" (Table 1).

In compensated LC of subgroups "A1" and "A2", GS level exceeded control "Cntr1" and "Cntr2": in DG – by 54.66 % and 60.59 %; in SVZs – by 89.04 % and 53.79 %, respectively ( $p < 0.05$ ) (Table 1). Elevated GS expression was due to an increased number of GS+ cells and their processes in the same localizations as in control. GS level in DG and SVZs did not differ between the age subgroups "A1" and "A2".

In subcompensated LC of subgroups "B1" and "B2", GS level exceeded not only control values, but also indices of compensated subgroups "A1" and "A2": in DG – by

79.88 % and 75.98 %; SVZs – by 33.07 % and 28.12 %, respectively ( $p < 0.05$ ) (Table 1). In subcompensated LC, in the foci of postnecrotic astrogliosis of the caudate nucleus head adjacent to the SVZ, as well as in the white matter of hippocampus, GS+ hypertrophied fibrous astrocytes, GS+ binuclear astrocytes and astrocyte-like cells were found, as well as weakly GS-positive perivascular astrocytic endfeet. In the “glial plates” of the base of the CP vessels, an increased number of GS+ astrocytes were also found.

In decompensated LC of subgroups “C1” and “C2”, an increased GS level was determined in DG, which significantly ( $p < 0.05$ ) exceeded that in compensated and subcompensated LC subgroups (Table 1). The highest GS level compared to control in decompensated LC was observed in the SVZ astrocytic ribbon and brain tissue adjacent to the SVZ. Interestingly, SVZs of younger decompensated patients (“C1”) was characterized by significantly higher GS levels than compensated and subcompensated patients of the same age subgroups (“A1” and “B1”) ( $p < 0.05$ ), however, in older decompensated patients (“C2”), it decreased to the values of compensated (“A2”) and became less than subcompensated (“B2”) by 30.44 % ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

GS expression in DG and SVZs did not differ between the groups “A1” / “A2” and “B1” / “B2”; however, for SVZs, GS level in older “C2” subgroup was significantly lower than in younger “C1” by 41.34 %. Despite the trend towards a decrease in GS level in “C2”, in the subventricular tissue of the caudate nucleus and in hippocampus, separate groups of neurons were identified to selectively express GS in their cytoplasm and dendrites, as well as in the initial parts of axons (Fig. 7). Additionally, nearby acute and healing small foci of encephalolysis, polyphenotypic GS appearance were defined in the satellite oligodendrocyte-like glia around GS- and GS+ neurons, in fibrose-like astrocytes, perivascular astrocytic endfeet, as well as in individual chains of oligodendrocytes.

**AQP4 expression.** In DG and SVZs of control subgroups “Cntr1” and “Cntr2”, AQP4 expression of was determined in the plasma membranes of ependymocytes, plasmalemmas of astrocytic bodies and perivascular endfeet, as well as in the parenchymal processes forming a network of intersecting immunopositive thin strands in the neuropil of the SVZ hypocellular gap; in astrocytes of astrocytic ribbons; astrocytes of DG SGZ and hippocampal *hilus*, as well as in the astrocytes of the “glial plates” of the base of the CP vessels. AQP4 level in both DG and SVZ had no differences between subgroups “Cntr1” and “Cntr2” (Table 1).

With progression of LC from compensated to subcompensated and decompensated stage, the same aforementioned cell populations of DG and SVZs showed an increase in AQP4 expression (Fig. 8) with significant difference between subgroups “A1” / “B1” and “A2” / “B2”. However, in patients with decompensated LC, AQP4 expression in both DG and SVZs stops its growth having no differences between the subgroups “B1” / “C1” and “B2” / “C2”. AQP4 levels between age subgroups of the same LC class (“A1” / “A2”, “B1” / “B2”, “C1” / “C2”) did not have a significant difference ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

## Discussion

It is believed that mammalian NSCs are specialized cells capable of self-renewal, proliferation, and differentiation in new lineages, which, however, almost completely cease to realize their neurogenic potential soon after birth under physiological conditions [16]. Quiescence, reactivation, subsequent proliferation, and selection further differentiation pathway are finely regulated by factors that are synthesized by niche astrocytes [17], by NSCs as well as controlled by activity nearby neurons and composition of CSF containing numerous growth factors [4]. According to E. Akdemir et al. and S. Clavreul et al. [9,18], during animal embryogenesis, glial differentiation of progenitor cells are finely tuned by the Notch signaling pathway and dynamic expression of transcription factors (sex-determining region Y-box 9 [Sox9]; brain-specific homeobox/POU domain protein 2 [Brn2]; nuclear factor-I A [NFIA]; zinc finger and BTB domain-containing protein 20 [Zbtb20]), which suppress neuronogenesis and promote switching of differentiation program to the path of astrocytogenesis. It is believed, that under physiological conditions in vertebrates, the proliferation of astrocytes derived from niche NSCs ends in the early postnatal period [19,20], and in adults, a low-level proliferation is determined only in mature astrocytes [9].

Specific factors and pathological processes causing stimulation, activation and proliferation of niche NSCs in adults still need to be established, and the mechanisms of adult astrocytogenesis are extremely poorly described even in animals [9,18].

Nestin, an intermediate filament protein Class VI, still considered the main marker of NSCs and NPCs, its expression is suppressed during subsequent differentiation of NPCs into neurons or glia [21]. Nevertheless, Nestin expression, which depends on the ubiquitin proteasome system, can also be determined in mature reactive astrocytes, in which it is presumably involved in the processes of mitosis, differentiation and migration [21].

In our study, Nestin expression was determined in multi- and bipolar SVZs cells of the anterior horn of the lateral ventricles of the GM, which morphologically resembled niche astrocyte-like NPCs and neuroblasts described by C. Wang et al. [22]. In the SVZs of control cases Nestin+ cells were localized mainly in subventricular glial nodules, which is consistent with the data of S. de Sonnaville et al. [4]. The low Nestin level in SVZs of control patients in both age groups indicates that, outside of pathological stimulation, the basal amount of Nestin+ NSCs in niche areas is largely unchangeable.

In patients with compensated cirrhosis, the SVZs astrocytic ribbons were found to have significantly increased Nestin+ level compared to control, and even more so in elderly patients. SVZs of subcompensated cirrhosis was characterized by maximal Nestin expression, associated with 3-fold increase number of Ki-67+ cells in patients less than 60 y. o., which significantly exceeds the indicators of elderly patients with more pronounced destructive processes in the periventricular tissue, and indicates a greater degree of reactivity of niche cells in response on less pronounced damage to the nervous tissue in younger patients.



Herewith, we failed to detect Nestin+ cells outside the vascular walls in the DG SGZ of the hippocampus, which indicates a lower significance of the DG SGZ as a niche of permanent adult neurogenesis in a conditionally intact brain, as well as in response to chronic hepatogenic intoxication and that is partially confirmed by other studies [16]. We found that in control groups as well as in compensated and subcompensated cirrhotic patients, hippocampal NECs and Nestin+ fibers were maximally localized in the *fimbria-fornix*, “glial plates” of the base of the CP vessels, SVZ, subpial zone up to *subiculum*. A similar localization of NECs in the hippocampus of healthy adults and patients with epilepsy has been described by J. Liu et al. [15]. Mentioned Nestin+ cells were morphologically similar astrocyte-like NECs found in the astrocytic ribbon of the anterior ventricular horn. In compensated and subcompensated cirrhotic patients, named areas of the hippocampal formation were characterized by increased expression of Nestin+, CD44+, GS+, including that in astrocyte-like cells. This suggests the potential role of the lower ventricular horn SVZ, the *fimbria fornix*, “glial plates” around the blood vessels entering the CP, and hippocampal subpial zone as a possible alternative neurogenic niche of the hippocampal formation.

As was indicated by R. Bihlmaier et al. [23] “glial plate’s” astrocytes are surrounded by specific microenvironment and are highly susceptible to aggressive and trophic factors, which exchange in CP is persistently enhanced. According to J. Passarelli et al., they may directly influence neurogenesis, being in close relationship with subependymal niche astrocytes [8]. It should be noted that NECs in the studied SVZs and hypothetical alternative neurogenic niches morphologically correspond to the proliferative NSCs described by other researchers [15,24]. Thus, we assume that revealed growth of Nestin+, CD44+, GS+ expression in astrocyte-like cells of SVZs and hypothetical alternative neurogenic niches during compensated and subcompensated cirrhosis is due to the activation of astrocytogenesis programs in response to widespread dysmetabolic astrodystrophy and astrocyte loss developing in patients with cirrhosis [1].

In the brain of patients with compensated and subcompensated cirrhosis, we identified areas of reparative astrogliosis around single small foci of encephalolysis in the head of the caudate nucleus adjacent to the SVZ of the anterior horn, which contained astrocyte-like NECs with niche morphology, most likely migrating from the nearby SVZ niche. Migration is also supported by the absence of Ki-67 expression in areas of astrogliosis with the simultaneous presence of single Ki-67+ cells in the nearby SVZ.

We found that with the progression of cirrhosis, astrocytes of SVZs and SGZ DG significantly increases GS expression, and this sharply decrease in elderly patient’s SVZ with decompensated cirrhosis, as well as in other brain regions [1]. This most likely indicates an adaptive increase in GS synthesis by periventricular, including fibrous astrocytes in response to high levels of ammonia in the brain tissue, which is accompanied by the activation of neurogenesis programs in niches and an increased Nestin level.

In older patients of control groups and of cirrhotic groups of all three Child–Pugh classes, in both SVZs and DG SGZ we established significantly increased CD44 expression, the main receptor for hyaluronic acid (HA), compared to younger patients, which is in line with idea of the age-related accumulation of HA in the brain and increased expression of CD44 [25]. Membrane CD44 is involved in intercellular adhesion, cell migration and signaling [26]. In human brain, the main cells expressing CD44 are white matter fibrous astrocytes and, to lesser extent, oligodendrocytes, neurons, and microglia [26]. In our study, the location of CD44+ cells with their characteristic long straight processes coincides with the localization of Nestin+ cells in the SVZs and beyond, including areas of periventricular reactive astrogliosis. Liu Y. et al. [27] have shown that overexpression of CD44 in glial progenitor cells inhibits oligodendrocyte differentiation and promotes astrocytic lineage differentiation. Moreover, recent studies [28] evidenced that Nestin expression in adult niche astrocytes negatively regulates neurogenesis through Notch signaling switching the differentiation of new generations of NSCs to the astrocytic lineage. It can be assumed that the simultaneous increase in the expression of Nestin and CD44 in subventricular neurogenic niches in patients with compensated and subcompensated cirrhosis is an adaptive attempt to activate NSCs, including subsequent switching towards astrocytogenesis (which is indirectly confirmed by the presence of clusters of Nestin+ NSC-like cells in areas of periventricular astrogliosis).

Cirrhosis decompensation leads to a dysfunctional state of the entire astrocytic population, edematous changes and clasmotodendrosis of astrocytes [1]. In patients with decompensated liver cirrhosis and severe Grade 3–4 hepatic encephalopathy, associated with the maximal ammonia accumulation in the brain and aggravation of astrodystrophy [2], compensatory astrocytogenesis in the neurogenic niches drops, characterized by significant decrease in Nestin and CD44 expression, and the absence of Ki-67 expression in all brain regions studied.

## Conclusions

1. In patients with compensated and subcompensated liver cirrhosis, subventricular neurogenic niches (subventricular zone of the anterior and inferior horns of the lateral ventricles), as well as in the *fimbria-fornix*, “glial plates” of the base of the choroid plexus vessels, subpial zone of the hippocampus, demonstrate signs of activation of neural stem cells and niche astrocytes in the form of increased expression of Nestin, CD44, Ki-67, and GS.
2. In subventricular zones of control patients, the largest number of Nestin+ cells are localized in subventricular glial nodules, while in cirrhotic patients, an increase in Nestin-positive cells is observed mainly in the astrocytic ribbons.
3. In cirrhotic patients, cells of the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus, which is considered the second canonical neurogenic niche of mammals, show insignificant expression of Nestin, which indicates less involvement of this zone in the processes of adult neurogenesis in chronic hepatogenic neurotoxicity.

4. During subcompensated liver cirrhosis, periventricular reparative astrogliosis around encephalolytic foci in the head of caudate nucleus, beside GS+ and CD44+ astrocytes include clusters of astrocyte-like Nestin+ and CD44+ cells, which may indicate the migration to these reparative foci of astrocytes that differentiate from stem cells of the nearby active subventricular niche.

5. The patterns of Nestin, CD44, GS, AQP4 and Ki-67 expression in patients with decompensated liver cirrhosis with severe hepatic encephalopathy Grade 3–4 and deep astrocytic insufficiency reflect significant decrease in the activity of subventricular neurogenic niches and inhibition of astrocytogenesis in periventricular foci of astrogliosis.

**Prospects for further research.** Further studies are needed to evaluate more astrocyte-specific progenitor markers to confirm or refute the hypothesis of activation of the adult astrocytogenesis from niche stem cells in health and hepatogenic neurotoxicity to search the methods of control the regenerative programs that are expected to exist throughout human life.

#### Funding

This study was conducted in the framework of the scientific research work of Zaporizhzhia State Medical University "Morphogenesis of destructive-reparative processes of the brain in the diseases of vascular and toxic-metabolic genesis", state registration No. 0118U004253 (2018–2022) of the Ministry of Health of Ukraine.

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

Надійшла до редакції / Received: 05.06.2023

Після доопрацювання / Revised: 21.06.2023

Схвалено до друку / Accepted: 02.07.2023

#### Information about authors:

Shulyatnikova T. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical 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 and Pharmaceutical University, Honorary Scientist and Engineering Worker of Ukraine. ORCID ID: 0000-0001-8267-2350

#### Відомості про авторів:

Шулятникова Т. В., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Туманський В. О., д-р мед. наук, професор каф. патологічної анатомії і судової медицини, проректор з наукової роботи, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, заслужений діяч науки і техніки України.

#### References

- Shulyatnikova, T. V., & Tumanskyi, V. O. (2022). Key astroglial markers in human liver cirrhosis of different degree: immunohistochemical study. *Zaporozhye medical journal*, 24(5), 529-537. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2022.5.261327>
- Shulyatnikova, T. V., & Tumanskyi, V. O. (2023). Ammonia level and Alzheimer type 2 astrocytes in the brain of deceased patients with liver cirrhosis of the varying degree. *Pathologia*, 20(1), 36-44. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2023.1.276453>
- Gault, N., & Szele, F. G. (2021). Immunohistochemical evidence for adult human neurogenesis in health and disease. *WIREs mechanisms of disease*, 13(6), e1526. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1526>
- De Sonnaville, S. F. A. M., van Strien, M. E., Middeldorp, J., Sluijs, J. A., van den Berge, S. A., Moeton, M., Donega, V., van Berkel, A., Deering, T., De Filippis, L., Vescovi, A. L., Aronica, E., Glass, R., van de Berg, W. D. J., Swaab, D. F., Robe, P. A., & Hol, E. M. (2020). The adult human subventricular zone: partial ependymal coverage and proliferative capacity of cerebrospinal fluid. *Brain communications*, 2(2), fcaa150. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa150>
- Quiñones-Hinojosa, A., Sanai, N., Soriano-Navarro, M., Gonzalez-Perez, O., Mirzadeh, Z., Gil-Perotin, S., Romero-Rodriguez, R., Berger, M. S., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2006). Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *The Journal of comparative neurology*, 494(3), 415-434. <https://doi.org/10.1002/cne.20798>
- Griffiths, B. B., Bhutani, A., & Stary, C. M. (2020). Adult neurogenesis from reprogrammed astrocytes. *Neural regeneration research*, 15(6), 973-979. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.270292>
- Geribaldi-Doldán, N., Carrascal, L., Pérez-García, P., Oliva-Montero, J. M., Pardo-Díaz, R., Domínguez-García, S., Bernal-Utrera, C., Gómez-Oliva, R., Martínez-Ortega, S., Verástegui, C., Nunez-Abades, P., & Castro, C. (2023). Migratory Response of Cells in Neurogenic Niches to Neuronal Death: The Onset of Harmonic Repair?. *International journal of molecular sciences*, 24(7), 6587. <https://doi.org/10.3390/ijms24076587>
- Passarelli, J. P., Nimjee, S. M., & Townsend, K. L. (2022). Stroke and Neurogenesis: Bridging Clinical Observations to New Mechanistic Insights from Animal Models. *Translational stroke research*, 10.1007/s12975-022-01109-1. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s12975-022-01109-1>
- Akdemir, E. S., Huang, A. Y., & Deneen, B. (2020). Astrocytogenesis: where, when, and how. *F1000Research*, 9, F1000 Faculty Rev-233. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22405.1>
- Macas, J., Nern, C., Plate, K. H., & Momma, S. (2006). Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(50), 13114-13119. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4667-06.2006>
- Zheng, W., ZhuGe, Q., Zhong, M., Chen, G., Shao, B., Wang, H., Mao, X., Xie, L., & Jin, K. (2013). Neurogenesis in adult human brain after traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*, 30(22), 1872-1880. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1579>
- Curtis, M. A., Penney, E. B., Pearson, A. G., van Roon-Mom, W. M., Butterworth, N. J., Dragunow, M., Connor, B., & Faulk, R. L. (2003). Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 9023-9027. <https://doi.org/10.1073/pnas.1532244100>
- Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., Ávila, J., & Llorens-Martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature medicine*, 25(4), 554-560. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0375-9>
- Wan, S. Z., Nie, Y., Zhang, Y., Liu, C., & Zhu, X. (2020). Assessing the Prognostic Performance of the Child-Pugh, Model for End-Stage Liver Disease, and Albumin-Bilirubin Scores in Patients with Decompensated Cirrhosis: A Large Asian Cohort from Gastroenterology Department. *Disease markers*, 2020, 5193028. <https://doi.org/10.1155/2020/5193028>
- Liu, J., Reeves, C., Jacques, T., McEvoy, A., Miserochhi, A., Thompson, P., Sisodiya, S., & Thom, M. (2018). Nestin-expressing cell types in the temporal lobe and hippocampus: Morphology, differentiation, and proliferative capacity. *Glia*, 66(1), 62-77. <https://doi.org/10.1002/glia.23211>
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K. I., Chang, E. F., Gutierrez, A. J., Kriegstein, A. R., Mathern, G. W., Oldham, M. C., Huang, E. J., Garcia-Verdugo, J. M., Yang, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, 555(7696), 377-381. <https://doi.org/10.1038/nature25975>
- Cassé, F., Richetin, K., & Toni, N. (2018). Astrocytes' Contribution to Adult Neurogenesis in Physiology and Alzheimer's Disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 432. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00432>
- Clavreul, S., Dumas, L., & Loulier, K. (2022). Astrocyte development in the cerebral cortex: Complexity of their origin, genesis, and maturation. *Frontiers in neuroscience*, 16, 916055. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.916055>
- Sohn, J., Orosco, L., Guo, F., Chung, S. H., Bannerman, P., Mills Ko, E., Zarbalis, K., Deng, W., & Pleasure, D. (2015). The subventricular zone continues to generate corpus callosum and rostral migratory stream astroglia in normal adult mice. *The Journal of neuroscience*, 35(9), 3756-3763. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3454-14.2015>

20. Moroni, R. F., Deleo, F., Regondi, M. C., Madaschi, L., Amadeo, A., & Frassoni, C. (2018). Proliferative cells in the rat developing neocortical grey matter: new insights into gliogenesis. *Brain structure & function*, 223(9), 4053-4066. <https://doi.org/10.1007/s00429-018-1736-8>
21. Potokar, M., Morita, M., Wiche, G., & Jorgačevski, J. (2020). The Diversity of Intermediate Filaments in Astrocytes. *Cells*, 9(7), 1604. <https://doi.org/10.3390/cells9071604>
22. Wang, C., Liu, F., Liu, Y. Y., Zhao, C. H., You, Y., Wang, L., Zhang, J., Wei, B., Ma, T., Zhang, Q., Zhang, Y., Chen, R., Song, H., & Yang, Z. (2011). Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell research*, 21(11), 1534-1550. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.83>
23. Bihlmaier, R., Deffner, F., Mattheus, U., Neckel, P. H., Hirt, B., & Mack, A. F. (2023). Aquaporin-1 and Aquaporin-4 Expression in Ependyma, Choroid Plexus and Surrounding Transition Zones in the Human Brain. *Biomolecules*, 13(2), 212. <https://doi.org/10.3390/biom13020212>
24. Nogueira, A. B., Sogayar, M. C., Colquhoun, A., Siqueira, S. A., Nogueira, A. B., Marchiori, P. E., & Teixeira, M. J. (2014). Existence of a potential neurogenic system in the adult human brain. *Journal of translational medicine*, 12, 75. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-75>
25. Su, W., Foster, S. C., Xing, R., Feistel, K., Olsen, R. H., Acevedo, S. F., Raber, J., & Sherman, L. S. (2017). CD44 Transmembrane Receptor and Hyaluronan Regulate Adult Hippocampal Neural Stem Cell Quiescence and Differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 292(11), 4434-4445. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.774109>
26. Dzwonek, J., & Wilczynski, G. M. (2015). CD44: molecular interactions, signaling and functions in the nervous system. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 175.
27. Liu, Y., Han, S. S., Wu, Y., Tuohy, T. M., Xue, H., Cai, J., Back, S. A., Sherman, L. S., Fischer, I., & Rao, M. S. (2004). CD44 expression identifies astrocyte-restricted precursor cells. *Developmental biology*, 276(1), 31-46. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.018>
28. Wilhelmsson, U., Lebkuechner, I., Leke, R., Marasek, P., Yang, X., Antfolk, D., Chen, M., Mohseni, P., Lasić, E., Bobnar, S. T., Stenovec, M., Zorec, R., Nagy, A., Sahlgren, C., Pekna, M., & Pekny, M. (2019). Nestin Regulates Neurogenesis in Mice Through Notch Signaling from Astrocytes to Neural Stem Cells. *Cerebral cortex (New York, N. Y.: 1991)*, 29(10), 4050-4066. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy284>

# Модуляція клітинного складу регенераційної невроми дексаметазоном і гранулоцитарним колонієстимулявальним фактором

О. М. Грабовий<sup>1, A, C, D, F</sup>, Н. М. Невмержицька<sup>1, B, D, E, F</sup>, О. Б. Альохін<sup>2, D, E</sup>,  
Г. Б. Костинський<sup>3, D, E</sup>, Н. В. Ритікова<sup>1, B</sup>

<sup>1</sup>Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна, <sup>2</sup>Маріупольський державний університет, м. Київ, Україна,  
<sup>3</sup>Приватний заклад вищої освіти «Міжнародний європейський університет», м. Київ, 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:**  
регенерація нерва,  
дексаметазон,  
гранулоцитарний  
колоніє-  
стимулявальний  
фактор.

**Патологія. 2023.**  
**T. 20, № 2(58).**  
**C. 118-125**

\*E-mail:  
natalianmu@ukr.net

**Мета роботи** – оцінити в регенераційній невромі сідничого нерва щура зміни кінетики вмісту мезенхімальних (віментин-позитивні) та репаративних шваннівських (*GFAP*-позитивні) клітин, враховуючи активність регуляції локального гомеостазу (експресія *CD73*) за умов дії дексаметазону та гранулоцитарного колонієстимулявального фактора (GCSF).

**Матеріали та методи.** У регенераційній невромі в 168 щурів самців лінії Вістар імуногістохімічно виявляли віментин-, *GFAP*- та *CD73*-позитивні клітини. Здійснили кількісне оцінювання, використали методи статистичного опрацювання даних.

**Результати.** Регенераційна неврома сідничого нерва характеризується стереотипною кінетикою клітинного складу. Дексаметазон на початковому етапі формування регенераційної невроми (1–7 доба) призводив до зменшення в ній запальної інфільтрації та накопичення мезенхімальних віментин+клітин, виразно прискорював накопичення нейральних *GFAP*+репаративних нейролемоцитів і пригнічував експресію *CD73*. Дія гранулоцитарного колонієстимулявального фактора (1–3 доба) у регенераційній невромі призводила до незначного зменшення запальної інфільтрації, збільшення кількості кровоносних судин, що проникають до неї. За цих умов виразно зростала швидкість і кількість накопичення віментин+клітин та експресія *CD73*, а також швидкість накопичення *GFAP*+клітин. Відхилення експресії віментину, *GFAP* і *CD73* у невромі під дією речовин, що вивчали, поступово зменшувалися і через 8 тижнів досліду істотно не відрізнялися від контрольних. При сумісній дії дексаметазон і гранулоцитарний колонієстимулявальний фактор потенціювали ефекти один одного та зумовлювали тривале збереження високої експресії *CD73*. За цих умов спостерігали найвиразніше наближення будови новоутвореної ділянки нерва до будови інтактного нервового стовбура.

**Висновки.** Одночасна дія дексаметазону та GCSF на початкових етапах формування регенераційної невроми, на відміну від їхньої ізольованої дії, спричиняє не тільки зміни динаміки накопичення мезенхімальних і нейральних клітин, але й модифікує новоутворену ділянку нерва, наближаючи її будову до інтактною. Це супроводжується феноменом зростання реактивності нейролемоцитів на етапі проростання осьових циліндрів через регенераційну невромю.

**Key words:**  
nerve regeneration,  
dexamethasone,  
granulocyte colony-  
stimulating factor.

**Pathologia, 2023.**  
**20(2), 118-125**

## Modulation of the tissue composition of regenerative neuroma by dexamethasone and granulocyte colony-stimulating factor

O. M. Grabovyi, N. M. Nevmerzhitska, A. B. Alyokhin, H. B. Kostynskyi, N. V. Rytikova

**Aim.** To evaluate the change of the content of mesenchymal (vimentin-positive) and reparative Schwann (*GFAP*-positive) cells in the regenerative neuroma of the rat sciatic nerve, taking into account the activity of local homeostasis regulation (*CD73* expression) under the influence of dexamethasone (Dex) and granulocyte colony-stimulating factor (GCSF).

**Materials and methods.** Vimentin-, *GFAP*-, and *CD73*-positive cells were detected immunohistochemically in the regenerative neuroma of 168 male Wistar rats, and their presence was quantified using statistical methods.

**Results.** The regenerative neuroma of the sciatic nerve is characterized by a stereotypical cellular composition kinetics. Dexamethasone, during the initial stage of neuroma formation (1–7 days), led to a reduction in inflammatory infiltration and accumulation of vimentin+ mesenchymal cells. It significantly accelerated the accumulation of neural *GFAP*+ reparative Schwann cells and suppressed the expression of *CD73*. The granulocyte colony-stimulating factor (1–3 days) in the regenerative neuroma resulted in a slight reduction in inflammatory infiltration and an increase in the number of blood vessels penetrating into it. Under these conditions, the speed and quantity of vimentin+ cell accumulation and *CD73* expression noticeably increased, as well as the speed of *GFAP*+ cell accumulation. The deviations in the expression of vimentin, *GFAP*, and *CD73* in the neuroma under the administration of the mentioned substances gradually decreased and, after 8 weeks of the experiment, did not differ significantly from the control. When combined, dexamethasone and granulocyte colony-stimulating factor potentiated each other's effects and, in addition, led to long-term maintenance of high *CD73* expression. At the same time, the most pronounced approximation of the structure of the newly formed part of the nerve to the structure of the intact nerve trunk was observed.

**Conclusions.** The simultaneous action of Dex and GCSF during the initial stages of regenerative neuroma formation, in contrast to their individual actions, not only alters the dynamics of mesenchymal and neural cell accumulation but also modifies the newly formed part of the nerve, bringing its structure closer to the intact state. This phenomenon is accompanied by increased reactivity of neurolemocytes during the axial cylinder germination stage of neuroma regeneration.



Регенераційна неврома (RegN) утворюється на місці ушкодження периферичного нерва в результаті активації резидентних клітин його тканин, а також міграції з крові лейкоцитів і мезенхімальних стовбурових клітин. З-поміж клітин, що беруть участь у формуванні регенерату, розрізняють гематогенні клітини запальної інфільтрації, мезенхімальні (резидентні та нерезидентні клітини-попередники, фібробласти) та нейральні (нейролемоцити). Безпосередньо у новоутворенні зруйнованої ділянки нерва братимуть участь мезенхімальні та нейральні клітини, створюючи умови для наступного відновлення невротизації периферичного відрізка нерва. Мезенхімальний компонент невроми (молода сполучна тканина, що регенерує, з кровоносними судинами) спочатку заповнює тканинний дефект, який утворився після травми, і стає субстратом, по якому можуть мігрувати репаративні нейролемоцити [1]. Нейролемоцити формують шляхи для проростання осьових циліндрів [2]. На пізніших етапах формування сполучнотканинних волокон у невромі (особливо у разі надмірного) або при затримці міграції нейролемоцитів ці фактори стають негативними щодо проростання осьових циліндрів і відновлення функції пошкодженого нерва. Кооперативні зв'язки мезенхімальних і нейральних елементів на початку регенерації нерва з часом набувають ознак конкурентних і при дисбалансі можуть погіршити її результати. Отже, розуміння міжтканинних зв'язків під час регенерації периферичних нервів може стати підґрунтям для розроблення засобів та інструментів її менеджменту, стимуляції.

Один із факторів, що суттєво впливає на процеси запалення та наступні репарації, – дія кортикостероїдів. Їхній вплив на регенерацію нервів активно вивчали, але досі немає однозначної позиції щодо її покращення [3].

Інший клас речовин, що діють на процеси проліферації, міграції та диференціювання клітин, – фактори росту, зокрема під час регенерації периферичних нервів [4]. Серед цих факторів особливу увагу привертає гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор (GCSF), що використовують для активації та мобілізації мезенхімальних стовбурових клітин [5]. Його застосування при пошкодженні периферичних нервів має низку позитивних ефектів [6, 7].

## Мета роботи

Оцінити в регенераційній невромі сідничого нерва щура зміни кінетики вмісту мезенхімальних (віментин-позитивні) та репаративних шваннівських (GFAP-позитивні) клітин, враховуючи активність регуляції локального гомеостазу (експресія CD73) за умов дії дексаметазону та гранулоцитарного колонієстимулювального фактора.

## Матеріали і методи дослідження

Дослідження здійснили на 168 щурах самцях лінії Вістар, маса тіла – 220–250 г. Тварин утримували у звичайних умовах віварію на стандартному раціоні при вільному доступі до їжі та води. Експеримент здійснили відповідно до принципів Європейської конвенції

про захист хребетних тварин, що використовуються з дослідними та іншими науковими цілями (Страсбург, 1986 р.), а також закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Одержали експертний висновок комісії з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Національного медичного університету імені О. О. Богомольця № 160 від 26.09.2022 р.

Оперативне втручання виконали під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг внутрішньоочеревинно). Після видалення шерсті та обробки шкіри 5 % розчином йоду щурам виконали розріз шкіри та фасції по задній поверхні правого стегна. Тупим шляхом роз'єдали м'язи та перерізуали сідничний нерв на рівні середини стегнової кістки. Рану зашили пошарово, операційне поле обробили 5 % розчином йоду.

Тварин рандомно поділили на 4 групи (по 42 щура):

1 група (контроль, **C**) – щурам з 1 до 5 дня після операції підшкірно вводили 0,5 мл 0,9 % розчину NaCl;

2 група (**Dex**) – у ті самі терміни підшкірно вводили дексаметазон (Dex, 10 мг/кг);

3 група (**GCSF**) – на 1, 2 і 3 день дослідів тваринам підшкірно вводили гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор (Граноцит® 34, Санофі-Авентіс, Франція), 50 мкг/кг;

4 група (**GCSF + Dex**) – на 1, 2 і 3 день дослідів щурам підшкірно вводили GCSF (50 мкг/кг) та на 1–5 дні дослідів вводили Dex (10 мг/кг).

Евтаназію тварин здійснили введенням овердозу тіопенталу натрію (200 мг/кг).

Фрагмент нерва з регенераційною невромною для дослідження брали через 1, 3, 7, 14, 28 і 56 діб після невротомії (по 7 тварин на кожен строк), фіксували в 10 % забуференому формаліні (рН 7.4; 40 °С, 48 годин), ущільнювали в парапласт і виготовляли зрізи завтовшки 4 мкм. Забарвлювали гематоксиліном та еозином, виконували імуногістохімічні (ІГХ) реакції відповідно до протоколів виробників антитіл. Застосували такі первинні антитіла: мишине моноклональне антитіло до віментину (Vim, V9, MA5-11883 Thermo Fisher), розведення 1:250; мишине моноклональне антитіло до гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP, ASTRO6, MA5-12023, Thermo Fisher) розведення 1:200; кроляче поліклональне антитіло до CD73 (Ab175396; Abcam), розведення 1:200. Продукти реакції візуалізували за допомогою системи детекції на основі діамінобензидину (EnVision FLEX, Dako, Данія). Препарати досліджували та фотографували за допомогою мікроскопа Olympus B53 із цифровою фотокамерою SP180. На цифрових зображеннях ×400 (300 × 225 мкм; 1224 × 920 пікселів RGB, режим освітлення – фото, стандартизована експозиція). Експресію ІГХ-маркерів визначали напівкількісним методом, використовуючи програмне забезпечення ImageJ 1.46 (Wayne Rasband, NIH, USA) для деконволюції та наступного аналізу з вимірюванням площі ІГХ-забарвлення [8]. Вимірювання здійснили в 7 тестових точках в матеріалі від кожної експериментальної тварини.

Числові дані (відповідні часові ряди) опрацювали, застосувавши стандартні статистичні методи, з обчисленням середнього арифметичного, стандартного відхилення та стандартної помилки середнього. Точ-

ний тест Колмогорова–Смирнова показав, що всі дані вимірювань не суперечать нормальному розподілу. Для оцінювання значущості міжгрупових відмінностей використали критерій Стьюдента. Відмінності між показниками вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ . Зв'язки між показниками, що досліджували, оцінювали за кореляцією Пірсона; величину запізнення / випередження у часі (часові лаги) однієї змінної щодо іншої оцінювали методом крос-кореляційного аналізу [9].

## Результати

Спостереження показали, що у тварин контрольної групи відновлення перерізаного нерва відбувалося за стереотипною кінетикою. У кров'янисто-фібринозні маси між відрізкамі нерва відбувалася інвазія клітини запальної інфільтрації, фібробластів і кровоносних судин. Поступово зменшувалася запальна інфільтрація, зростала питома кількість фібробластоподібних клітин. У молодий сполучнотканинний регенерат проникали нейролемоцити, що згодом формували бюгнерівські смужки. Також формувалися колагенові волокна, що нерівномірно розподілялися в невромі. На другому місяці після невротомії відбувалося виразне зменшення її клітинності.

На початковому етапі (1–7 доба) регенерації нерва під впливом високих доз Dex передусім спостерігали різке зменшення запальної клітинної інфільтрації. В регенераті накопичувалося менше фібробластичних елементів, затримувалася васкуляризація. Разом із тим, кількість шваннівських клітин у невромі дещо зростала. У складі регенерату формувалося менше колагенових волокон, і вони мали виразнішу повздожню орієнтацію. Тяжі нейролемоцитів, що формувалися у РегН, виглядали більш компактними та мали виразнішу тенденцію до повздожнього розташування. Зазначимо, що в невромі, починаючи з 3 доби досліду, з'являлися великі округлі або неправильної форми клітини з крупним гомогенно забарвленим ядром. Їхня кількість зростала до 7–14 доби, коли вони утворювали скупчення, після чого візуальна верифікація ставала складною.

Дія GCSF (1–3 доба) спричиняла у РегН незначне зменшення запальної інфільтрації, збільшення кількості кровоносних судин, що проникають до неї. Порівняно із **C**, і **Dex** у ній зростала кількість клітин неправильної або округлої форми з округлими гомогенними ядрами та гомогенною цитоплазмою. Надалі РегН характеризувалася вищим питомим вмістом клітин і формуванням масивніших порівняно з **C** пучків нейролемоцитів.

Одночасне застосування Dex і GCSF призводило до різкого зниження запальної клітинної інфільтрації РегН, уповільнення накопичення в ній клітин фібробластичного ряду і зменшення об'єму утворення сполучнотканинних волокон. Разом з тим у невромі активно накопичувалися клітини округлої або неправильної форми, що на 7 і 14 добу могли утворювати скупчення. Регенерат загалом мав меншу питому щільність клітин, ніж у групі **GCSF**. На 28 і 56 добу в новоутвореному фрагменті нерва виявляли менше клі-

тин фібробластичного ряду, ніж у **C**, а нейролемоцити мали дещо менші розміри та формували пучки різної товщини. Порівняно з іншими експериментальними групами новоутворений фрагмент за будовою найбільше наближався до інтактного нерва.

ІГХ-дослідження показали: експресія маркерів, які досліджували, загалом відповідає стереотипній кінетиці процесу регенерації перерізаного нерва. Вона зростала, демонструючи надмірність і сягаючи максимуму між 14 і 28 днями досліджень. Експресію *Vim* виявляли в фібробластоподібних, відростчатих і неправильної форми клітинах. Крім того, імунореактивність до *Vim* властива великим клітинам округлої або неправильної форми з округлими гомогенними ядрами. Поліморфноядерні лейкоцити фактично *Vim*-негативні. Іноді траплялися *Vim*+ дрібні лімоцитоподібні клітини. Експресію *GFAP* виявляли частіше у порівняно великих клітинах із крупними овальними ядрами з дрібнодраглистим хроматином. *CD73* різною мірою експресувався у клітинах майже всіх морфологічних форм. Застосування Dex, GCSF та їх поєднання змінювало рівень експресії досліджених маркерів (рис. 1).

Кількісне оцінювання експресії *Vim* у клітинах РегН сідничного нерва показало, що відмінність дії препаратів виявляли насамперед за зміною швидкості накопичення цих клітин (рис. 2, Vimentin). Характер власне траєкторій показника чисельності популяції залишався майже незмінним (мав S-подібний вигляд). Аналіз подібності відповідних часових рядів, використовуючи як міру подібності кореляцію Пірсона, підтвердив це спостереження. Так, кореляція між **Dex**, **GCSF**, **Dex + GCSF** і контрольною кривою **C** становила 0,978, 0,920 та 0,987 відповідно (табл. 1). За даними, що наведені на рис. 2 (Vimentin), застосування Dex спричинило зниження темпів росту клітин *Vim*+ та їхньої фінальної кількості порівняно з **C**. Застосування **GCSF** найбільше стимулювало зростання питомої кількості цих клітин, а в групі **Dex + GCSF** спостерігали динаміку, що майже не відрізняється від такої у контрольній групі, хоча й на вищому рівні.

На початковому етапі формування РегН (1 і 3 доби) найбільше на накопичення у ній *GFAP*+ клітин впливали **Dex** і **Dex + GCSF**, дещо менше – **GCSF** (порівняно з контрольною групою **C**) (рис. 2, GFAP). Відмінності впливу речовин, що вивчали, були особливо помітні в наступні 4 доби, коли під їхнім впливом через 7 днів досліду майже завершувалася фаза прискореного накопичення цих клітин. На відміну від цього, фаза зростання кількості *GFAP*+ клітин у групі **GCSF**, як і в групі **C**, тривала значно довше (до 28 доби). Піковий рівень кількості клітин *GFAP*+ у всіх дослідних групах майже однаковий, його досягнуто в ті самі строки. Відмінності за впливом препаратів виявили й на завершальній стадії спостережень, коли зниження кількості *GFAP*+ регенераторних шваннівських клітин у **Dex + GCSF** виявилось найменшим, а в **Dex** – найбільшим. Це свідчить, що головна відмінність дії препаратів, що досліджували, полягає в характері переходу популяції клітин *GFAP*+ із початкового стану на фінальний, тобто в характері динаміки (траєкторій) зростання їхнього клітинного пулу (рис. 2, GFAP).



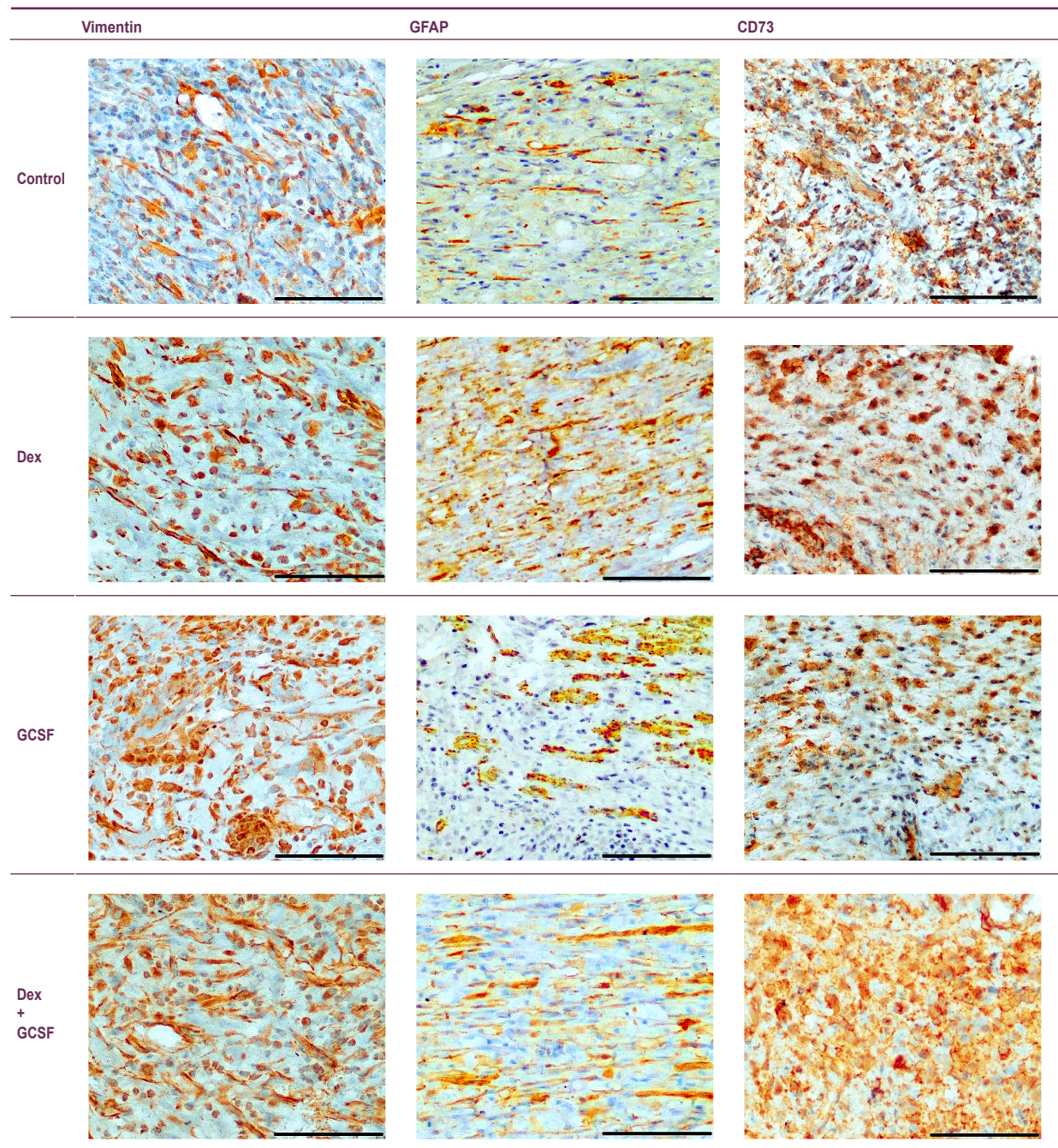


Рис. 1. Експресія *Vim*, *GFAP* і *CD73* у клітинах регенераційної невромі сідничого нерва щурів через 7 дб після нейротомії. ІГХ. Мікрофото, об. 40, ок. 10. **Control**: умовно інтактні тварини; **Dex**: тварини, що зазнали дії дексаметазону; **GCSF**: тварини, що зазнали дії гранулоцитарного колонієстимулювального фактора; **Dex + GCSF**: тварини, що зазнали дії Dex і GCSF. 3б.  $\times 400$ . Шкала 100 мкм.

Таблиця 1. Матриця близькості (кореляція) часових рядів експресії *Vim*, *GFAP* і *CD73* у клітинах регенераційної невромі

Група	1–3–7–14–28–56			1–3–7			14–28–56		
	<i>Vim</i>	<i>GFAP</i>	<i>CD73</i>	<i>Vim</i>	<i>GFAP</i>	<i>CD73</i>	<i>Vim</i>	<i>GFAP</i>	<i>CD73</i>
<b>C</b>	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<b>Dex</b>	0,978	0,840	0,979	0,984	1,000	0,977	1,000	0,994	0,982
<b>GCSF</b>	0,920	0,915	0,988	0,990	0,948	0,995	0,998	0,708	0,995
<b>Dex + GCSF</b>	0,987	0,613	0,930	0,997	0,999	0,964	0,997	-0,345	-0,541

**C**: контрольні тварини; **Dex**: тварини, що зазнали дії дексаметазону; **GCSF**: тварини, що зазнали дії гранулоцитарного колонієстимулювального фактора; **Dex + GCSF**: тварини, що зазнали дії Dex та GCSF; **1–3–7–14–28–56**, **1–3–7**, **14–28–56**: часові інтервали (добі після операції).

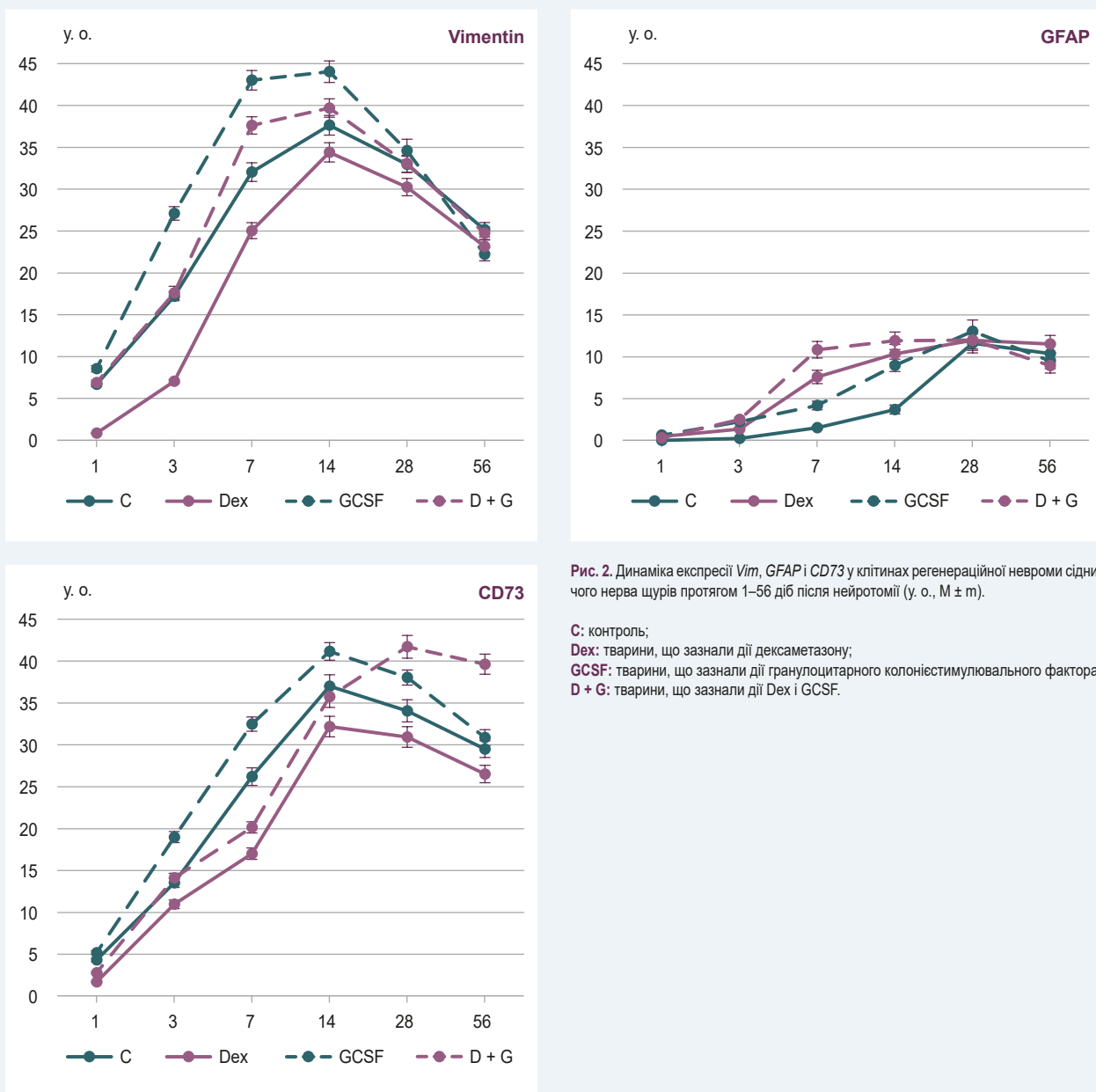


Рис. 2. Динаміка експресії *Vim*, *GFAP* і *CD73* у клітинах регенераційної невроми сідничого нерва щурів протягом 1–56 днів після нейротомії (у. о.,  $M \pm m$ ).

**C:** контроль;  
**Dex:** тварини, що зазнали дії дексаметазону;  
**GCSF:** тварини, що зазнали дії гранулоцитарного колонієстимулювального фактора;  
**D + G:** тварини, що зазнали дії Dex і GCSF.

Аналіз кореляції між відповідними часовими рядами підтвердив виявлені закономірності. Так, коефіцієнт кореляції Пірсона між послідовностями **C** і **GCSF**, **Dex** і **Dex + GCSF** для траєкторій загалом становив 0,915, 0,840 і 0,613 відповідно; для початкових відрізків (1–3–7 доби) – 0,980, 1,000 та 0,999 відповідно; для кінцевих відрізків (14–28–56 доби) – 0,708, 0,994 та -0,345 відповідно (табл. 1).

Експресія *CD73* клітинами РегН загалом показала зв'язок із клітинністю, виявила типову кінетику і помірне зменшення рівня при дії Dex, збільшення – під впливом GCSF (рис. 2, *CD73*). Принципову відмінність динаміки експресії *CD73* визначили лише у групі **Dex + GCSF** на завершальній стадії експерименту. Коли в інших групах відбувалося зниження імунореактивності до *CD73*, у цій групі таке зниження почалося значно пізніше і відбувалося суттєво повільніше. Цей

феномен відразу позначився на показнику подібності відповідної траєкторії **Dex + GCSF** із **C** ( $r = -0,541$ ).

Аналіз динаміки процесів, які вивчали, у межах кожної окремо взятої дослідної групи показав наявність певних часових лагів між процесами накопичення *Vim*<sup>+</sup>, *GFAP*<sup>+</sup> клітин і рівнем експресії *CD73*, а також їхню залежність від умов експерименту (рис. 3, табл. 2).

На відміну від Dex, GCSF (рис. 3, табл. 2) активував процеси накопичення *Vim*<sup>+</sup>-клітин і підвищував загальний рівень експресії *CD73* (відповідні криві знаходяться помітно вище за такі в групах **C** і **Dex**), незначно впливав (порівняно з контролем) на процес накопичення *GFAP*<sup>+</sup>-регенераторних нейролемоцитів. Вплив GCSF на зростання числа *Vim*<sup>+</sup>-клітин помітно сильніший (більш крута крива) і випереджав не тільки збільшення кількості *GFAP*<sup>+</sup>-клітин у часі,



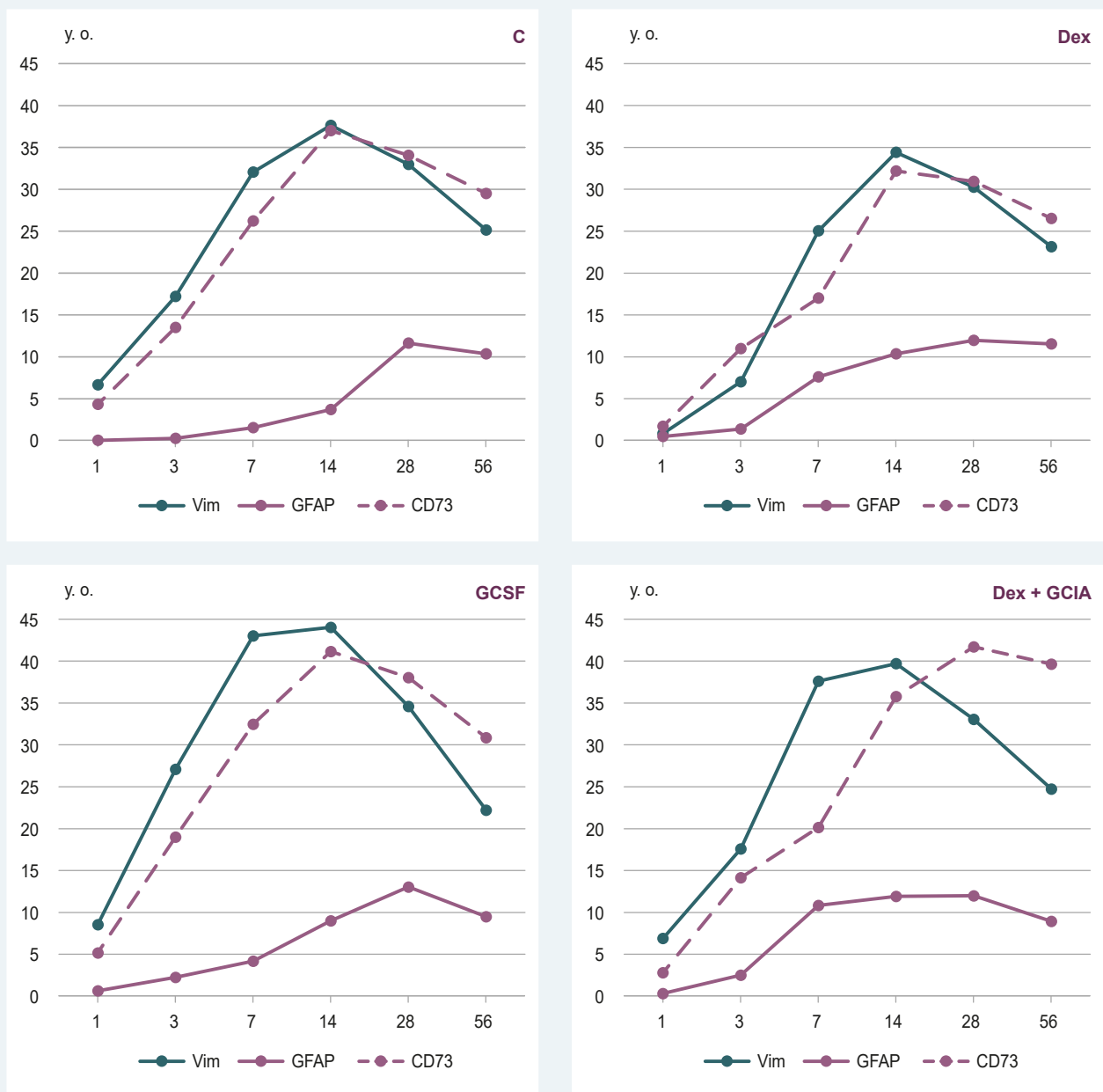


Рис. 3. Співвідношення експресії *Vim*, *GFAP* і *CD73* у клітинах регенераційної неврони сідничного нерва щурів протягом 1–56 днів після нейротомії (у. о.). **C**: контроль; **Dex**: тварини, що зазнали дії дексаметазону; **GCSF**: тварини, що зазнали дії гранулоцитарного колонієстимулювального фактора; **Dex + GCSF**: тварини, що зазнали дії Dex і GCSF.

але і зростання експресії *CD73*, що, своєю чергою, випереджають перебіг процесу *GFAP* (рис. 3, GCSF).

Однчасне застосування Dex і GCSF (рис. 3, Dex + GCSF) спричинило комплексну реакцію. У цьому разі зберігався ефект від впливу GCSF (криві *Vim* і *GFAP*, рис. 3, Dex + GCSF), але, на відміну від інших дослідних груп, загальна експресія *CD73* продовжувала зростати значно довше, а фаза її зниження істотно відтермінована й уповільнена (рис. 3, *CD73*, табл. 2).

## Обговорення

Отже, Dex і GCSF суттєво впливають на вміст клітин мезенхімального (*Vim*+) та нейрального (*GFAP*+) пулів у РегН та їхні реактивні можливості. Розвиток РегН

після дії таких активних чинників, як Dex і GCSF на початкових етапах формування прагне повернутися до параметрів стереотипної кінетики, що притаманна **C** (рис. 2) [10]. Однак зміни, що відбуваються в разі їх застосування, характеризуються інертністю, спричиняючи певні зміни стану відновленого фрагмента нерва в віддалені строки після травми.

Очікувано Dex різко зменшував виразність запальної реакції, що є одним із провідних факторів ініціації репаративної регенерації. Відповідно, це призводило до уповільнення та зменшення об'єму накопичення *Vim*+-клітин мезенхімального / фібробластичного ряду в невромі, а також утворення в ній меншого об'єму сполучнотканинних волокон. Такі дані одержали й в інших дослідженнях [11]. Особливу увагу привернула

Таблиця 2. Часові лаги ( $\Delta t$ ) та взаємна кореляція ( $r$ ) між траєкторіями показників експресії *Vim*, *GFAP* і *CD73* у клітинах регенераційної нерви

Групи $\Delta t$		Vim		GFAP		CD73	
		$r$	$\Delta t$	$r$	$\Delta t$	$r$	$\Delta t$
C	GFAP	1	0,774	0	1,000	1	0,811
	Vim	0	1,000	-1	0,774	0	0,960
	CD73	0	0,960	-1	0,811	0	1,000
Dex	GFAP	0	0,925	0	1,000	0	0,945
	Vim	0	1,000	0	0,925	0	0,944
	CD73	0	0,944	0	0,945	0	1,000
GCSF	GFAP	1	0,727	0	1,000	0	0,831
	Vim	0	1,000	-1	0,727	0	0,859
	CD73	0	0,859	0	0,831	0	1,000
Dex + GCSF	GFAP	0	0,953	0	1,000	0	0,849
	Vim	0	1,000	0	0,953	0	0,703
	CD73	0	0,703	0	0,849	0	1,000

C: контрольні тварини; Dex: тварини, що зазнали дії дексаметазону; GCSF: тварини, що зазнали дії гранулоцитарного колонієстимулювального фактора; Dex + GCSF: тварини, що зазнали дії Dex і GCSF.

поява в РегН із 3 доби досліджу *Vim*+ великих округлих або неправильної форми клітин із крупним гомогенно забарвленим ядром, що утворювали скупчення через 7 і 14 діб після невротомії. Щодо шваннівських клітин, то, незважаючи на пригнічення ініціуювального фактора запалення, спостерігали виразне зростання швидкості їх накопичення в нервомі. Це збігається з результатами дослідження J. I. Lee et al. [12]: нейролемоцити експресують рецептори до глюкокортикоїдів, що активують їхню проліферацію. Отже, виникає питання про те, яким чином регенераторні шваннівські клітини реагуюватимуть на Dex у період, коли їхня кількість у нервомі досягає плато, а вони зазнають диференціювання.

Результати нашого дослідження (табл. 2) показали: пригнічення мезенхімальної реакції та прискорення накопичення регенераторних шваннівських клітин майже усувало відставання останніх у формуванні клітинного складу РегН.

Експресія *CD73*, який є одним із ключових регуляторів реактивності клітин внаслідок пурінергічної передачі [13], під впливом Dex знижувалася та залишалася такою до кінця спостережень. Імовірно, це пов'язано з загальним зменшенням клітинності РегН.

Дані, що одержали, свідчать: GCSF як активатор мезенхімальних стовбурових клітин [14] очікувано збільшував накопичення фібробластоподібних клітин у нервомі, але не змінював його динамічний профіль (табл. 1). При цьому спостерігали певне зменшення запальної клітинної інфільтрації, що можна пов'язати з накопиченням у РегН мезенхімальних стовбурових клітин та їхніми протизапальними властивостями [14]. Разом з тим, у ній дещо зростала швидкість накопичення регенераторних нейролемоцитів (рис. 2). Це може бути пов'язано з впливом секретому мезенхімальних стовбурових клітин [14] та/або прямим впливом GCSF на нейролемоцити [4,6,7]. На цьому фоні спостерігали максимальну швидкість збільшення експресії *CD73*, що можна пояснити швидким зростанням клітинності РегН. Після 14 доби дослідження вона знижувалася значно повільніше, ніж у групах C і Dex. Це відрізнялося від зменшення кількості *Vim*+-клітин, але збіглося зі зростанням кількості нейролемоцитів. Припускаємо, це пов'язано з проростанням осьових циліндрів через бюгнерівські стрічки [7].

Якщо загалом окреме застосування Dex і GCSF спричиняло прискорення або уповільнення накопичення у регенераті *Vim*+ мезенхімальних клітин, зумовлювало певне прискорення накопичення *GFAP*+ регенераторних шваннівських клітин та певною мірою змінювало їхнє співвідношення, то комплексне застосування цих препаратів (Dex + GCSF) змінило кінетику клітинного складу РегН. У результаті новоутворений фрагмент нерва за будовою найбільше наближався до інтактного порівняно з параметрами тварин із груп C, Dex і GCSF. Крім того, до 7 і 14 доби у регенераті накопичувалася значна кількість *Vim*+ великих округлих або неправильної форми клітин з крупним гомогенно забарвленим ядром. Імовірно, ці клітини є мезенхімальними стовбуровими клітинами, накопичення яких індуковано GCSF, а їх персистенція в регенераті зумовлена гальмуванням Dex їхнього диференціювання [15].

Крім того, результатом сумісної дії Dex + GCSF став феномен значного зростання експресії *CD73* у клітинах РегН під час її дозрівання (14–28–56 доби після невротомії, рис. 2, *CD73*, табл. 1). У цей час відбувається суттєва редукція надлишкової кількості фібробластичних елементів, диференціювання нейролемоцитів і проростання по бюгнерівським смужкам осьових циліндрів [10]. Припускаємо, що за цих умов була модифікована реактивна здатність нейролемоцитів, які бурхливо відповідали на контакт з осьовими циліндрами, котрі вросли в РегН. Враховуючи, що *CD73* (5'-нуклеотидаза) – життєво важливий фермент для підтримання тканинної організації та сприяє відновлювальним процесам [13], її високу експресію можна оцінити як позитивний вплив на регенерацію нерва.

## Висновки

1. Дія Dex на початкових етапах формування регенераційної нерви призводить до виразного пригнічення запальної реакції, зменшення швидкості накопичення мезенхімальних клітин і збільшення такої для регенераторних шваннівських клітин.

2. Дія GCSF на початкових етапах формування регенераційної нерви спричиняє незначне пригнічення запальної реакції, збільшення швидкості

накопичення мезенхімальних клітин і регенераторних шваннівських клітин.

3. Одночасна дія Dex і GCSF на регенераційну неврому, що формується, не тільки призводить до зміни динаміки накопичення в ній мезенхімальних і нейральних клітин, але й модифікує новоутворену ділянку нерва, наближаючи її будову до інтактної.

4. Одночасна дія Dex і GCSF на регенераційну неврому супроводжується феноменом зростання реактивності нейролемоцитів на етапі проростання через неї осьових циліндрів.

#### Фінансування

Дослідження виконане в рамках НДР Національного медичного університету імені О. О. Богомольця: «Вивчити особливості відновлювальних процесів у головному мозку та нервовому стовбурі при модуляції накопичення та диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин» за програмою наукових досліджень та розробок, які фінансуються з державного бюджету, № держреєстрації 0123U101051 (2023–2025).

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 31.05.2023

Після доопрацювання / Revised: 26.06.2023

Схвалено до друку / Accepted: 05.07.2023

#### Відомості про авторів:

Грабовий О. М., д-р мед. наук, професор, в. о. зав. каф. гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-5705-9909

Невмержицька Н. М., асистент каф. гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-5378-2267

Альохін О. Б., д-р екон. наук, професор каф. системного аналізу та інформаційних технологій, Маріупольський державний університет, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-5209-8036

Костинський Г. Б., д-р мед. наук, професор каф. медико-біологічних дисциплін, Приватний заклад вищої освіти «Міжнародний європейський університет», м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-4984-9764

Ритікова Н. В., канд. мед. наук, доцент каф. гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-6044-0433

#### Information about authors:

Grabovyi O. M., MD, PhD, DSc, Professor, Acting Head of the Department of Histology and Embryology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Nevmerzhytska N. M., Teaching Assistant of the Department of Histology and Embryology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Alyokhin, A. B., PhD, DSc, Professor of the Department of System Analysis and Information Technologies, Mariupol State University, Kyiv, Ukraine.

Kostynskyi H. B., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Medical and Biological Disciplines, Private Higher Education Institution "International European University", Kyiv, Ukraine.

Rytikova N. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Histology and Embryology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

#### References

- Suzuki, T., Kadoya, K., Endo, T., & Iwasaki, N. (2023). Molecular and regenerative characterization of repair and non-repair Schwann cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 43(5), 2165-2178. <https://doi.org/10.1007/s10571-022-01295-4>
- Min, Q., Parkinson, D. B., & Dun, X. P. (2021). Migrating Schwann cells direct axon regeneration within the peripheral nerve bridge. *Glia*, 69(2), 235-254. <https://doi.org/10.1002/glia.23892>
- Charoenlux, P., Utoompurkorn, N., & Seresirikachorn, K. (2023). The efficacy of corticosteroid after facial nerve neurolysis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trial. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, 89(1), 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2021.09.005>
- Önger, M. E., Delibaş, B., Türkmen, A. P., Erener, E., Altunkaynak, B. Z., & Kaplan, S. (2017). The role of growth factors in nerve regeneration. *Drug discoveries & therapeutics*, 10(6), 285-291. <https://doi.org/10.5582/ddt.2016.01058>
- Berebichez-Fridman, R., & Montero-Olvera, P. R. (2018). Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review. *Sultan Qaboos University medical journal*, 18(3), e264-e277. <https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.03.002>
- Jia, H., Wang, Y., Chen, J., Li, J. P., Han, H. Q., Tong, X. J., He, Z. Y., & Ma, W. Z. (2019). Combination of BMSCs-laden acellular nerve xenografts transplantation and G-CSF administration promotes sciatic nerve regeneration. *Synapse (New York, N. Y.)*, 73(7), e22093. <https://doi.org/10.1002/syn.22093>
- Frost, H. K., Kodama, A., Ekström, P., & Dahlin, L. B. (2016). G-CSF prevents caspase 3 activation in Schwann cells after sciatic nerve transection, but does not improve nerve regeneration. *Neuroscience*, 334, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.07.045>
- Crowe, A. R., & Yue, W. (2019). Semi-quantitative Determination of Protein Expression using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. *Bio-protocol*, 9(24), e3465. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3465>
- (2017). Learn about time series cross-correlations in SPSS with data from the USDA feed grains database (1876-2015). In *Sage Research Methods Datasets Part 1*. SAGE Publications, Ltd. <https://doi.org/10.4135/9781473995765>
- Wang, M. L., Rivlin, M., Graham, J. G., & Beredjikian, P. K. (2019). Peripheral nerve injury, scarring, and recovery. *Connective tissue research*, 60(1), 3-9. <https://doi.org/10.1080/03008207.2018.1489381>
- Li, Q., Li, T., Cao, X. C., Luo, D. Q., & Lian, K. J. (2016). Methylprednisolone microsphere sustained-release membrane inhibits scar formation at the site of peripheral nerve lesion. *Neural regeneration research*, 11(5), 835-841. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.182713>
- Lee, J. I., Hur, J. M., You, J., & Lee, D. H. (2020). Functional recovery with histomorphometric analysis of nerves and muscles after combination treatment with erythropoietin and dexamethasone in acute peripheral nerve injury. *PLoS one*, 15(9), e0238208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238208>
- Minor, M., Alcedo, K. P., Battaglia, R. A., & Snider, N. T. (2019). Cell type- and tissue-specific functions of ecto-5'-nucleotidase (CD73). *American journal of physiology. Cell physiology*, 317(6), C1079-C1092. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00285.2019>
- Grabovyi, O. M., Nevmerzhytska, N. M., Yaremenko, L. M., Kostynskyi, H. B., Demydchuk, A. S., Kondaurova, H. Yu. (2023). Mezenkhimalni stovburovi klityny: riznomanitnist [Mesenchymal stem cells: diversity]. *Pathologia*, 20(1), 76-84. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2023.1.272938>
- Han, L., Wang, B., Wang, R., Gong, S., Chen, G., & Xu, W. (2019). The shift in the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis of mesenchymal stem cells mediated by glucocorticoid receptor. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 377. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1498-0>



# Clinical and prognostic value of parameters of cytokine regulation in oxygen-dependent patients with the coronavirus disease COVID-19

O. V. Riabokon<sup>id</sup>A,F, V. V. Cherkaskyi<sup>id</sup>B,C,D, Yu. Yu. Riabokon<sup>id</sup>C,E, R. O. Shcherbina<sup>id</sup>C,D

Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine

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

## Key words:

coronavirus disease, COVID-19, viral infection, cytokines, “cytokine storm”, prognosis.

Pathologia, 2023, 20(2), 126-134

\*E-mail: ryabokonzsmu@ukr.net

**Aim of the work** is to find out the clinical and prognostic significance of cytokine regulation parameters in oxygen-dependent patients with COVID-19 coronavirus disease in dynamics of the disease.

**Material and methods.** 78 oxygen-dependent patients with COVID-19 aged from 52 to 84 years were examined. All patients were examined and treated in accordance with the regulations in force at the relevant time. The patients were divided into groups: I group – 38 patients who recovered; II group – 40 patients with fatal outcome of the disease. In the blood serum of patients with COVID-19 and 20 healthy individuals, were determined by enzyme immunoassay the content of interleukin (IL) IL-2 (Elabscience, USA), IL-4 (Affymetrix eBioscience, Austria), IL-6 (Invitrogen, Austria), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (Elabscience, USA). Statistical processing was performed in the Statistica 13 for Windows program (StatSoft Inc., No. JPZ8041382130ARCN10-J).

**Results.** The content of IL-2 in the blood serum of oxygen-dependent patients with COVID-19 of both groups was significantly higher ( $p < 0.001$ ) than in healthy individuals. IL-2 content was higher in patients of II group ( $p < 0.001$ ) than in patients of I group. In dynamics, a further increase in content of IL-2 was noted in patients of the II group ( $p < 0.05$ ). The diagnostic significance has been established of the increased level of IL-2 in assessing the high probability of the development of a fatal outcome of the disease during hospitalization (AUC = 0.698,  $p = 0.030$ ) and in the dynamics of treatment (AUC = 0.745,  $p = 0.015$ ).

The content of IL-6 in the blood serum of oxygen-dependent patients with COVID-19 of both groups was also significantly higher ( $p < 0.001$ ) than in healthy individuals. However, the level of increase of this cytokine at the time of hospitalization did not have prognostic value regarding the risk of fatal outcome (AUC = 0.539,  $p = 0.562$ ). In the dynamics of treatment, the content of IL-6 in blood serum continued to increase in patients of the II group ( $p < 0.01$ ). During this period of observation, a threshold level of increase IL-6 level was established, which indicates a high probability of the development of a fatal outcome in these patients (AUC = 0.850,  $p < 0.001$ ).

The content of chemokine MCP-1 in blood serum at the time of hospitalization in patients of both groups was higher ( $p < 0.01$ ) than in healthy people. At the same time, the content of MCP-1 in patients of the II group was higher ( $p < 0.05$ ) than in the patients of the I group. The diagnostic significance of the increased level of MCP-1 was established, which indicated a high probability of the development of a fatal outcome during hospitalization. In dynamics, there was a tendency ( $p > 0.05$ ) to decrease its content ( $p > 0.05$ ), however, during this period of observation, MCP-1 did not have prognostic value.

IL-4 turned out to be uninformative in prognostic terms for determining the probability of a fatal outcome of COVID-19.

**Conclusions.** Changes in the parameters of cytokine regulation in patients with COVID-19 during the development of oxygen dependence are characterized by a significant increase content of IL-2, IL-6 and chemokine MCP-1 in blood serum. The level of increase of these cytokines has diagnostic value in determining the high probability of the development of a fatal outcome of the disease at certain stages of observation.

## Ключові слова:

коронавірусна хвороба, COVID-19, вірусна інфекція, цитокіни, «цитокіновий шторм», прогноз.

Патологія. 2023. Т. 20, № 2(58). С. 126-134

## Клініко-прогностичне значення параметрів цитокінової регуляції в кисневозалежних хворих на коронавірусну хворобу COVID-19

О. В. Рябоконе, В. В. Черкаський, Ю. Ю. Рябоконе, Р. О. Щербина

**Мета роботи** – з'ясувати клініко-прогностичне значення параметрів цитокінової регуляції в кисневозалежних хворих на коронавірусну хворобу COVID-19 у динаміці хвороби.

**Матеріали та методи.** У дослідження залучили 78 кисневозалежних хворих на COVID-19 віком від 52 до 84 років. Усі хворі обстежені, отримали лікування згідно з чинними на час дослідження протоколами. Хворих поділили на групи: I – 38 пацієнтів, які одужали; II – 40 осіб із летальним наслідком хвороби. У сироватці крові хворих на COVID-19 і 20 здорових осіб методом імуноферментного аналізу визначали вміст інтерлейкіну IL-2 (Elabscience, USA), IL-4 (Affymetrix eBioscience, Austria), IL-6 (Invitrogen, Austria), моноцитарного хемотактичного протеїну-1 (MCP-1) (Elabscience, USA). Статистично результати опрацювали в програмі Statistica 13 for Windows (StatSoft Inc., No. JPZ8041382130ARCN10-J).

**Результати.** Вміст IL-2 у сироватці крові кисневозалежних хворих на COVID-19 обох груп значно вищий ( $p < 0,001$ ), ніж у здорових. У хворих II групи вміст IL-2 вищий ( $p < 0,001$ ), ніж у пацієнтів I групи. У динаміці в хворих II групи визначали зростання вмісту IL-2 ( $p < 0,05$ ). Встановили діагностичну значущість підвищення IL-2 в оцінці високої ймовірності настання летального наслідку хвороби і при госпіталізації (AUC = 0,698,  $p = 0,030$ ), і в динаміці лікування (AUC = 0,745,  $p = 0,015$ ).

Вміст IL-6 у сироватці крові кисневозалежних хворих на COVID-19 обох груп також значно вищий ( $p < 0,001$ ), ніж у здорових осіб. Проте рівень підвищення цього цитокіну на час госпіталізації не мав прогностичного значення щодо ризику летального наслідку ( $AUC = 0,539$ ,  $p = 0,562$ ). У динаміці лікування у хворих II групи вміст IL-6 в сироватці крові продовжував зростати ( $p < 0,01$ ). У цей термін спостереження встановили межовий рівень підвищення рівня IL-6, який вказував на високу ймовірність настання летального наслідку в цих хворих ( $AUC = 0,850$ ,  $p < 0,001$ ).

Вміст хемокіну MCP-1 у сироватці крові на час госпіталізації в пацієнтів обох груп вищий ( $p < 0,01$ ), ніж у здорових. Концентрація MCP-1 у хворих II групи вища ( $p < 0,05$ ), ніж у пацієнтів I групи. Встановили діагностичну значущість підвищення MCP-1, що під час госпіталізації вказувала на високу ймовірність настання летального наслідку. В динаміці встановили тенденцію ( $p > 0,05$ ) до зниження його вмісту ( $p > 0,05$ ), але в цей термін спостереження MCP-1 не мав прогностичного значення.

Прогностично неінформативним для визначення ймовірності ризику летального наслідку COVID-19 виявився IL-4.

**Висновки.** Зміни параметрів цитокінової регуляції хворих на COVID-19 при розвитку кисневої залежності характеризуються значним підвищенням вмісту IL-2, IL-6 і хемокіну MCP-1 у сироватці крові. Рівень підвищення цих цитокінів має діагностичне значення щодо визначення високої ймовірності настання летального наслідку хвороби на певних етапах спостереження.

Today it is known that the clinical course of the coronavirus disease (COVID-19) is characterized by significant polymorphism, from an almost asymptomatic course to the development of an extremely severe acute respiratory distress syndrome. Due to the tropism of SARS-CoV-2 to type II alveocytes, 15 % of patients with COVID-19 develop pneumonia, which is one of the main causes of death in patients with coronavirus disease [1]. Data from modern literature show that the development of acute respiratory distress syndrome in the case of COVID-19 is not so much related to the viral load as to the formation of an excessive immune response, which leads to a significant release of pro-inflammatory cytokines, that it is a development of the so-called "cytokine storm" [1,2].

In addition, the presence of the S-protein in the structure of the virus, which is the main determinant of its virulence, determines tropism of the pathogen SARS-CoV-2 not only to alveocytes of type II, but also to other cells that express the receptor of angiotensin-converting enzyme type 2 on their membrane. These cells also include cells of the intestinal mucosa, epithelial cells of the distal kidney tubules, endothelial cells, etc. [3]. Therefore, acute uncontrolled hyperproduction of pro-inflammatory cytokines has a multisystem character and causes the development of multiple organ insufficiency, which requires hospitalization of such patients in the Department of Anesthesiology and Intensive Care (ICU) [1,4,5].

Today, the research of immunopathogenetic mechanisms, which are the basis of the formation of the "cytokine storm", continues. One of the explanations is the development of virus-induced cell pyroptosis, which is a powerful inflammatory form of lytic-programmed cell death, which is accompanied by the release of pro-inflammatory cytokines and causes the migration of macrophages and lymphocytes [6,7]. Significant migration of lymphocytes into lung tissue explains the development of lymphopenia in severe and critical patients [8]. In addition, there is some evidence of changes in innate immunity, namely a decrease interferon activity during SARS-CoV-2 replication, which explains why macrophages, dendritic cells, and neutrophils initiate an immune response as the primary defense of the body [6,9]. Evidence of this is also significant infiltration by macrophages of lungs and mucous membrane of the bronchi during the pathomorphological examination of the deceased [10]. Modern

research works show numerous evidences of the role of high levels of pro-inflammatory cytokines and excessive activation of immunocompetent cells in formation of an unfavorable prognosis of COVID-19 [4,11,12,13].

Therefore, research continues today to clarify the clinical-pathogenetic role of certain immune changes and search for the most informative prognostic immunological parameters in patients with the new coronavirus disease COVID-19.

## Aim

The purpose of the work is to find out the clinical and prognostic value of the parameters of cytokine regulation in oxygen-dependent patients with the coronavirus disease COVID-19 in dynamics of the disease.

## Material and methods

The research included 78 oxygen-dependent patients with coronavirus disease COVID-19 who were treated at the ICU of the Municipal Non-Profit Enterprise "Regional Infectious Clinical Hospital" Zaporizhzhia Regional Council" during 2020–2021. In all patients, the diagnosis of COVID-19 was confirmed by isolation of RNA-SARS-CoV-2 in nasopharyngeal mucus by polymerase chain reaction method. All patients were not vaccinated against COVID-19. The age of the patients ranged from 52 to 84 years. There were 42 men, 36 women.

All patients were examined and treated in accordance with the regulations in force at the relevant time: Order of the Ministry of Health of Ukraine dated 28.03.2020 No. 722 "Organization of medical care for patients with coronavirus disease (COVID-19)" (as amended by the order of the Ministry of Health of Ukraine dated 17.09.2020 No. 2122 "On amendments to the Standards of medical care "Coronavirus disease (COVID-19)". Order of the Ministry of Health of Ukraine No. 10 dated 07.01.2021 "On approval of amendments to the Standards of medical care "Coronavirus disease (COVID-19)". Order of the Ministry of Health of Ukraine dated April 6, 2021 No. 638 "Protocol for the provision of medical assistance for the treatment of the coronavirus disease (COVID-19)".

In order to find out the clinical and prognostic value of parameters of cytokine regulation, oxygen-depend-

**Table 1.** Comparison of the cytokine content in the blood serum of oxygen-dependent patients with the coronavirus disease COVID-19 in dynamics, Me [Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>]

Indicator, units of measurement	Healthy individuals (n = 20)	I group (n = 38)		II group (n = 40)	
		at the time of admission	after 5–7 days	at the time of admission	after 5–7 days
IL-2, pg/ml	16.82 [2.74; 30.90]	95.43 [47.63; 296.97] <sup>1</sup>	252.96 [164.00; 332.51] <sup>1,3</sup>	237.10 [168.68; 309.45] <sup>1,2</sup>	366.62 [328.51; 494.28] <sup>1,2,3</sup>
IL-4, pg/ml	0.06 [0.04; 0.08]	0.08 [0.06; 0.16] <sup>1</sup>	0.08 [0.06; 0.14]	0.12 [0.06; 0.20] <sup>1</sup>	0.09 [0.06; 0.21] <sup>1</sup>
IL-6, pg/ml	0.62 [0.24; 0.96]	5.05 [2.74; 16.5] <sup>1</sup>	4.39 [1.77; 5.40] <sup>1</sup>	5.04 [4.34; 19.77] <sup>1</sup>	9.92 [5.98; 25.48] <sup>1,2,3</sup>
MCP-1, pg/ml	18.3 [15.9; 19.45]	38.42 [24.55; 51.08] <sup>1</sup>	40.45 [23.69; 75.75] <sup>1</sup>	53.48 [34.43; 91.71] <sup>1,2</sup>	52.05 [19.55; 123.74] <sup>1</sup>

<sup>1</sup>: the difference is significant, compared to healthy individuals ( $p < 0.01$ ); <sup>2</sup>: compared to the I group patients in the corresponding period of observation ( $p < 0.05$ ); <sup>3</sup>: compared with hospitalization of patients of the corresponding group ( $p < 0.05$ ).

ent patients with COVID-19 were divided into groups depending on the outcome of the disease: group I – 38 patients who recovered; group II – 40 patients with a fatal outcome of the disease. The groups of patients did not differ statistically of gender ( $p > 0.05$ ) and age ( $p > 0.05$ ), and at the time of hospitalization to the ICU, they did not statistically differ in the degree of severity of acute respiratory insufficiency ( $p > 0.05$ ) and the frequency of the need for non-invasive lung ventilation at the time of observation ( $p > 0.05$ ).

The research was carried out in compliance with the provisions of the “Rules of Ethical Principles of Conducting Scientific Medical Research with Human Participation” approved by the Declaration of Helsinki and the legislation of Ukraine. All patients were included in the research on a random sign and provided written informed consent.

The content of interleukin (IL) IL-2 (Elabscience, USA), IL-4 (Affymetrix eBioscience, Austria), IL-6 (Invitrogen, Austria), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (Elabscience, USA), according to the instructions provided by the manufacturers, was determined in the blood serum of all patients with COVID-19 and 20 healthy individuals of the control group using the enzyme immunoassay method. Enzyme immunoassays were conducted on basis of the Educational Medical Laboratory center of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University (scientific consultant – PhD, DSc, R. O. Shcherbina).

Statistical processing was performed in the Statistica 13 for Windows program (StatSoft Inc., No. JPY28041382130ARCN10-J). Non-parametric statistical methods were used in the work, the investigated quantitative parameters are presented in the form of Me [Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>]. The Mann–Whitney test was used to assess the reliability of differences between quantitative traits in independent samples. The Wilcoxon test was used to assess the reliability of differences between quantitative traits in dependent samples. ROC analysis was used to cut off the threshold level of the indicator.

## Results

Based on the results of the research, it was established that in oxygen-dependent patients with COVID-19, changes in cytokine regulation system were characterized by a significant increase in the level of pro-inflammatory cytokines. Patients were admitted to ICU in the second week of illness, namely patients of the I group by 9.0 [7.0; 11.0] day of illness and patients of the II group by 8.0 [6.0; 11.0] day of illness ( $p > 0.05$ ).

The analysis of the content of IL-2 in blood serum showed that when patients were hospitalized to the ICU

due to the development of oxygen dependence, the level of IL-2 was significantly higher, compared to the level of healthy individuals, as in patients of group I (by 5.7 times,  $p < 0.001$ ), as well as in patients of the II group (by 14.1 times,  $p < 0.001$ ). A comparison of IL-2 content in blood serum showed that at the time of hospitalization, this indicator was statistically significantly higher ( $p < 0.05$ ) in the II group of patients, who later died of the disease, compared to the I group of patients, who later recovered. The analysis of the IL-2 content in blood serum in dynamics after 5–7 days of treatment showed that in patients of the I group this indicator had only a tendency to increase ( $p > 0.05$ ), while in patients of the II group a further statistically significant increase was noted growth ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

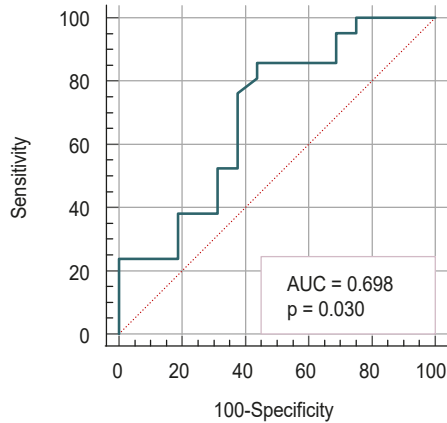
The content of IL-6 in blood serum during hospitalization of oxygen-dependent patients to ICU was 8.1 times higher, compared to the indicators of healthy individuals in patients of group I ( $p < 0.001$ ) and in patients of group II ( $p < 0.001$ ). At the same time, the degree of its increase at the time of hospitalization when comparing patients of the I and II groups did not statistically differ ( $p > 0.05$ ). Analysis of IL-6 content in blood serum in dynamics after 5–7 days of treatment showed that the IL-6 content in blood serum had a tendency ( $p > 0.05$ ) to decrease in the I group patients who subsequently recovered. However, in patients of the II group, conversely, the level of IL-6 continued to increase and was higher ( $p < 0.01$ ), compared to the content of this cytokine during hospitalization of patients of the corresponding group. Comparison of IL-6 content in the blood serum of patients of the investigated groups after 5-7 days of treatment also showed a higher level in patients of the II group, compared to the I group (by 2.3 times,  $p < 0.05$ ) (Table 1).

The analysis of the content of IL-4 in the blood serum of patients with COVID-19 showed its moderate increase in patients of both investigated groups at the time of hospitalization, compared to healthy people ( $p < 0.05$ ). In dynamics of patients of the I group, a clear trend towards its decrease was noted ( $p > 0.05$ ), compared to the corresponding indicator at the time of hospitalization, and after 5–7 days of treatment, this indicator did not statistically differ from the content of IL-4 in the blood serum of healthy individuals ( $p > 0.05$ ). In patients of the II group, the content of IL-4 in blood serum also had a tendency ( $p > 0.05$ ) to decrease, but after 5–7 days of treatment it remained higher (by 1.5 times,  $p < 0.05$ ) than in healthy individuals (Table 1).

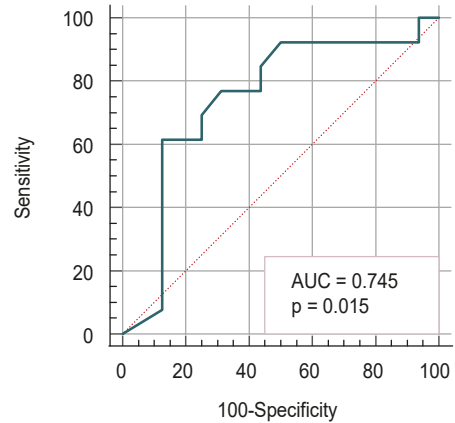
When analyzing the content of MCP-1 in blood serum, which is a chemokine, it was established that at the time of hospitalization to the ICU due to the appearance of



1A

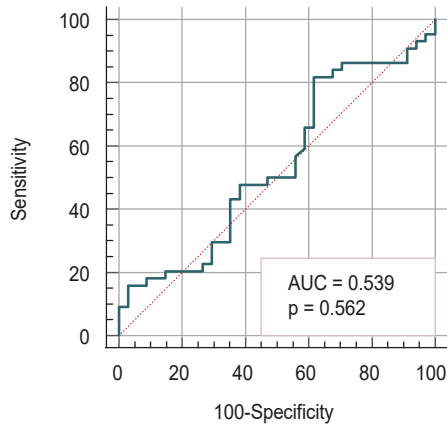


1B

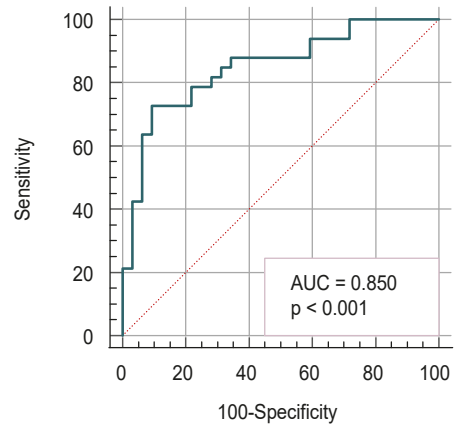


**Fig. 1.** Prediction of the probability of the development a fatal outcome of the disease in oxygen-dependent patients with COVID-19 according to the level of increased IL-2 in blood serum in the dynamics of observation.

2A



2B



**Fig. 2.** Prediction of the probability of the development of a fatal outcome of the disease in oxygen-dependent patients with COVID-19 according to the level of increased IL-6 in blood serum in the dynamics of observation.

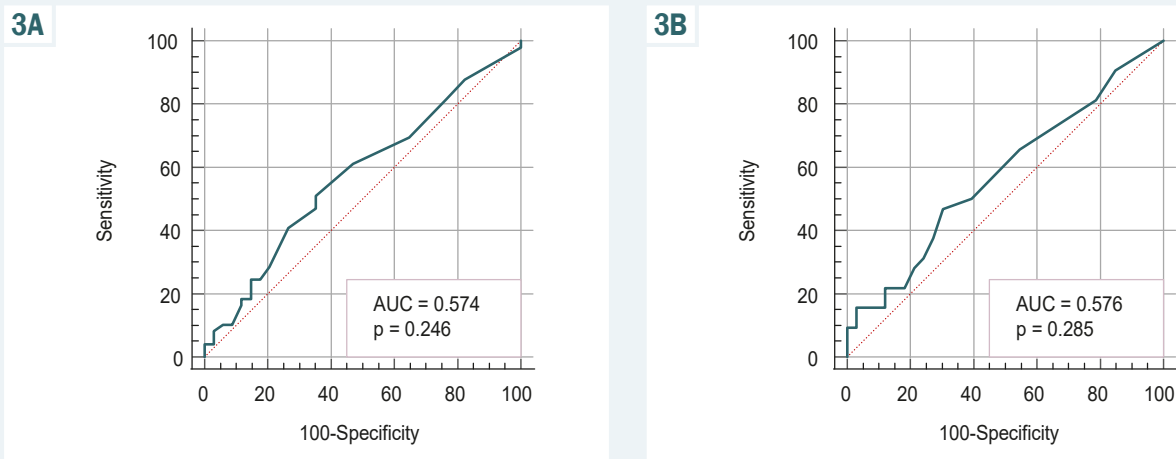
oxygen dependence, this indicator was higher in patients of both investigated groups than in healthy people: in patients of the I group by 2.1 times ( $p < 0.01$ ), in patients of the II group by 2.9 times ( $p < 0.01$ ). A comparison of the content of MCP-1 in blood serum of patients of investigated groups at the time of hospitalization to the ICU showed a statistically significantly higher ( $p < 0.05$ ) its content in patients of the II group, who later died of the disease, compared to patients of the I group, who later recovered. In dynamics against the background of treatment, a tendency ( $p > 0.05$ ) to decrease the content of MCP-1 in blood serum was noted in patients of both investigated groups, however, this indicator after 5–7 days of treatment remained higher ( $p < 0.01$ ) than in healthy individuals (Table 1).

ROC analysis was carried out in the further part of our research, taking into account the established changes in the content of the investigated cytokines to assess their diagnostic significance in assessing the risk of developing an adverse course of the disease of COVID-19.

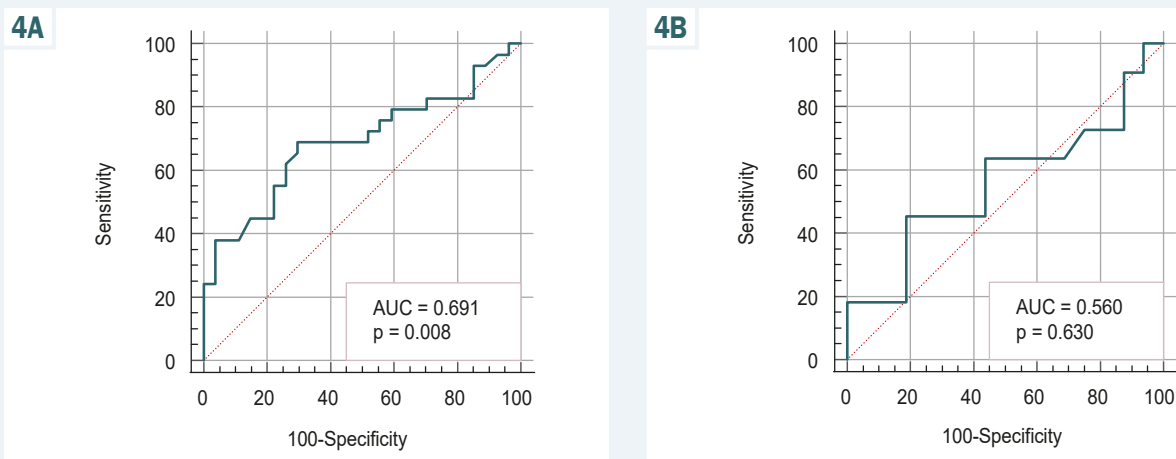
When assessing the diagnostic significance the content of IL-2 in blood serum at the time of hospitalization of patients with COVID-19 to the ICU with the appearance

of oxygen dependence, according to the results of the ROC analysis, it was established that the threshold level of IL-2 in blood serum, which indicates the high probability of the development of a fatal outcome of the disease in oxygen-dependent patients with COVID-19 was 96.65 pg/ml (AUC = 0.698,  $p = 0.030$ ) (sensitivity – 85.71 %, specificity – 56.25 %) (Fig. 1A). The level of IL-2 in blood serum retained its diagnostic significance in the dynamics of observation. Namely, after 5–7 days of treatment, the threshold level of IL-2 in blood serum, which indicates a high probability of developing a fatal outcome of the disease in these patients, was 338.03 pg/ml (AUC = 0.745,  $p = 0.015$ ) (sensitivity – 61.54 %, specificity – 87.50 %) (Fig. 1B).

Analysis of the diagnostic significance the content of IL-6 in blood serum of patients with COVID-19 showed that at the time of hospitalization of patients to the ICU, the level of increase of this cytokine in relation to the assessment of the prognosis of the fatal outcome of the disease turned out to be uninformative (AUC = 0.539,  $p = 0.562$ ) (Fig. 2A). However, according to the results of the ROC analysis, after 5–7 days of treatment of oxygen-dependent patients, a threshold level of increase of this cytokine



**Fig. 3.** Prediction of the probability of the development of a fatal outcome of the disease in oxygen-dependent patients with COVID-19 according to the level of increased IL-4 in blood serum in the dynamics of observation.



**Fig. 4.** Prediction of the probability of the development of a fatal outcome of the disease in oxygen-dependent patients with COVID-19 according to the level of increased MCP-1 in blood serum in the dynamics of observation.

of 7.34 pg/ml was established, which indicates a high probability of the development of a fatal outcome in these patients (AUC = 0.850,  $p < 0.001$ ) (sensitivity – 72.73 %, specificity – 90.62 %) (Fig. 2B).

When conducting ROC analysis, the diagnostic significance of IL-4 content in blood serum for predicting the development of a fatal outcome in oxygen-dependent patients with the coronavirus disease COVID-19 was not established. The threshold level content of IL-4 in blood serum was not established at the time of hospitalization of patients to the ICU (AUC = 0.574,  $p = 0.246$ ) (Fig. 3A), and in the dynamics after 5–7 days of treatment (AUC = 0.576,  $p = 0.285$ ) (Fig. 3B).

The conducted ROC analysis to establish the diagnostic significance of the MCP-1 content in blood serum for predicting the development of a fatal outcome in oxygen-dependent patients with the coronavirus disease COVID-19 established a threshold level of this cytokine at the time of hospitalization of 46.41 pg/ml, which indicates a high probability development of a fatal outcome in these patients (AUC = 0.691,  $p = 0.008$ ) (sensitivity – 68.97 %, specificity – 70.37 %) (Fig. 4A). However, in the dynamics of observation after 5–7 days of treatment, this

indicator no longer had a prognostic value (AUC = 0.560,  $p = 0.630$ ) (Fig. 4B).

## Discussion

In research devoted to elucidating the immunopathogenesis of COVID-19, IL-6 attracts special attention. This cytokine is able to produce almost all immune cells, endothelial cells, fibroblasts, etc. The chemical structure of IL-6 is a glycoprotein that can exhibit pro-inflammatory and anti-inflammatory properties [14]. The main immunomodulatory role of IL-6 is related to the development of the pro-inflammatory CD4<sup>+</sup> T-cell response. Under the influence of IL-6, the cytotoxic activity of CD8<sup>+</sup> lymphocytes is stimulated, IL-6 is able to regulate the activity of T-helper type 17, etc. In addition, IL-6 plays a role in differentiation of B-lymphocytes and the subsequent production of antibodies [15,16]. In research devoted to the study of immunopathogenesis of COVID-19, the relationship between an elevated level of IL-6 and the development of a “cytokine storm” has been proven [9,17,18,19,20]. The highest level of IL-6 is associated with the development of a severe course of COVID-19 and its complications.

Thus, in the research [17] it was demonstrated that high levels of IL-6 in blood serum were recorded in 86.8 % of hospitalized patients, of which 22.3 % had a level of increase of this cytokine more than 10 times higher than that of healthy people. Taking into account the certain prognostic value of this cytokine, proposals have been made for continuous measurement content of IL-6 in patients with COVID-19 [21,22].

According to the results of our research there was demonstrated a significant increase in contents of IL-6 in blood serum of oxygen-dependent patients who were hospitalized to the ICU compared to healthy people ( $p < 0.001$ ). However, it should be noted that at the time of admission of oxygen-dependent patients with COVID-19 to the ICU, the level of increase of this indicator had no prognostic value in determining the risk of a fatal outcome ( $AUC = 0.539$ ,  $p = 0.562$ ). In the research [9], a similar pattern was also obtained regarding the content of IL-6 in hospitalized patients. It was demonstrated that the level of its increase in hospitalized patients who needed and did not need intensive therapy did not differ statistically [9]. The data obtained in our research made it possible to demonstrate the prognostic significance of measuring content of IL-6 in the dynamics of treatment of oxygen-dependent patients with COVID-19. Namely, after 5–7 days of treatment in ICU, the threshold level of this cytokine was calculated, which indicated a high probability of a fatal outcome of the disease ( $AUC = 0.745$ ,  $p = 0.015$ ).

In the research [23], the authors also pay attention to the peculiarities of the dynamics of the immune response in patients with a severe course of COVID-19. At the end of the second week of the disease that intensity of the immune response increases more than it should, which is accompanied by the release of a significant amount of pro-inflammatory cytokines and is associated with severity of the disease and higher mortality [23]. In the research [17], it was also proven that in hospitalized patients with COVID-19, the number of neutrophils increases, and the number of monocytes in blood decreases in accordance with the increase in the level of IL-6, which indicates the inability of IL-6 to fulfill its protective and regulatory role in cellular structures of the innate immunity of these patients, and the continuation of the acute phase and the accumulation of neutrophils lead to tissue damage.

In research devoted to the study of the features of the “cytokine storm” in patients with SARS-CoV-2 infection, it was noted that during its formation, a wide range of cytokines, including chemokines, are released [24,25]. Chemokines are proteins with low molecular weight and potent chemotactic activity that play a role in the recruitment of immune cells during inflammation. Their chemotactic abilities are caused by binding to receptors that are associated with G-protein, which are expressed on the membranes of leukocytes and endothelial cells [26,27]. One of the leading chemokines is MCP-1, the production of which is induced by products of oxidative stress, other cytokines, or growth factors. Monocytes and macrophages are the main source of MCP-1, which regulates the migration of T-cells and natural killer cells [28]. When studying the immunopathogenesis of COVID-19, an elevated level of MCP-1 was found in bronchoalveolar lavage fluid [29] and postmortem in lung tissue [30], which

is a clear evidence of the participation of MCP-1 in the pathogenesis SARS-CoV-2 infection. In the research [31] it was proven that the expression of MCP-1 increases rapidly in early phase of infection and then progressively decreases. This gave the reason to the researchers to claim that monitoring the level of MCP-1 and therapeutic response to increasing the level of this chemokine may be a promising strategy to prevent the progression of COVID-19 from a mild to severe course.

According to the results of our research, an increase in the level of MCP-1 in blood serum of oxygen-dependent patients with COVID-19 at the time of hospitalization to the ICU was established, compared to healthy people. At the same time, the MCP-1 content in blood serum was statistically significantly higher in patients who subsequently died of the disease than in patients who subsequently recovered. We established a threshold level of MCP-1 elevation, which indicated a high probability of a fatal outcome of the disease ( $AUC = 0.691$ ,  $p = 0.008$ ) precisely at the time of admission to the ICU. The regularity established by us is also confirmed by the results of research by other authors, who found that the level of MCP-1 increase in blood serum is higher in those who required hospitalization to the ICU, which indicates a connection between chemokines and lung damage and, accordingly, the severity of the disease [9]. However, it should be noted that some researchers report that MCP-1 content in blood serum is also elevated in patients with a mild form of the disease of COVID-19 [32], so the question remains open regarding the diagnostic and prognostic value of this indicator for patients with a mild course of COVID-19.

The production of pro-inflammatory cytokines in significant quantities during the development of a «cytokine storm» indicates the hyperactivity of the immune system, which causes the migration of immunocompetent cells into the lung tissue, primarily monocytes and T-lymphocytes. This leads to the formation of inflammatory infiltrates in interstitium of the lungs with a predominance of mononuclear lymphocytes, which is combined with the development of significant lymphopenia with the circulation of hyperactive T-lymphocytes in peripheral blood [4,33]. “Cytokine storm” is characterized by an increase in the level of many pro-inflammatory cytokines IL-1, IL-6, IL-7, tumor necrosis factor- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , in particular IL-2 [1,4,19,20]. It is believed that IL-2, using the IL-2R-JAK-STAT5 signaling pathway, induces the differentiation of CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes, CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes, and normal killer cells [34]. This explains the detection of a high level of IL-2 and its soluble receptors in the severe course of COVID-19 [11]. However, the role of IL-2 in the immunopathogenesis of COVID-19 remains insufficiently elucidated. There are also isolated research that demonstrate, conversely, a decrease IL-2 content during a severe course of COVID-19 [35].

The results of our research demonstrate a significant increase in the level of IL-2 in blood serum of oxygen-dependent patients with COVID-19 upon admission to the ICU and a further increase its level in the dynamics of treatment after 5–7 days. We established a certain diagnostic significance content of IL-2 in blood serum at the time of hospitalization ( $AUC = 0.698$ ,  $p = 0.030$ ) and in the dynamics of treatment ( $AUC = 0.745$ ,  $p = 0.015$ ).



We set the corresponding threshold levels IL-2 in blood serum indicates a high probability of the development of a fatal outcome of the disease in these patients. The results of our research coincide with the results of most other researchers, who also confirm the association of a high level of IL-2 in blood serum with severe and critical course of COVID-19 [1,4,11,19,20]. A research [9] also demonstrated that the level of increased IL-2 in blood serum is higher in those who required hospitalization for ICU, suggesting a link between this cytokine and lung damage and, accordingly, disease severity. Today, it is suggested that one of the causes of lymphopenia, the progression of which is considered to be an unfavorable prognostic sign [36,37], should be considered lymphocyte apoptosis, which is precisely associated with hypercytokinemia [38,39].

Much fewer works are devoted to clarifying the role of anti-inflammatory cytokines in the immunopathogenesis of COVID-19. However, in the research [9] attention was drawn to the fact that SARS-CoV-2 infection initiated a much more pronounced secretion of T-helper type 2 cytokines, in particular IL-4 and IL-10, in contradistinction to SARS-CoV infection, in which significant increase the level of these cytokines was not observed [40]. It is considered that SARS-CoV-2 antigens contribute to the release of interferons of types I and III, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 and interferon- $\gamma$  [41]. However, when assessing the cytokine profile in patients with a severe course of COVID-19, according to researchers [42], low concentrations of type I interferons and increased levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-7 and chemokines were detected. The results of our research also demonstrate an increase the levels of the studied cytokines, however, the level of increase pro-inflammatory cytokines was significantly higher than IL-4. In addition, we did not establish the diagnostic significance of the increased level of IL-4 in assessing the risk of an adverse outcome of the disease when patients are admitted to the intensive care unit and in the dynamics after 5–7 days of treatment.

## Conclusions

1. In oxygen-dependent patients with COVID-19, the content of pro-inflammatory cytokines IL-2 and IL-6 is significantly increased at the time of hospitalization ( $p < 0.01$ ), compared to healthy people. Diagnostic value in determining the high probability of death and the development of a fatal outcome COVID-19 at the time of hospitalization has an increased level of IL-2 (AUC = 0.698,  $p = 0.030$ ), and in the dynamics of treatment as IL-2 (AUC = 0.745,  $p = 0.015$ ), and IL-6 (AUC = 0.850,  $p < 0.001$ ).

2. At the time of admission of oxygen-dependent patients with COVID-19, the content of chemokine MCP-1 in blood serum is higher than in healthy individuals ( $p < 0.001$ ), and the level of its increase during this period of observation has diagnostic value in determining a high probability of the development of a fatal outcome of the disease (AUC = 0.691,  $p = 0.008$ ). In the dynamics of treatment, the content of this cytokine tends to decrease ( $p > 0.05$ ), but its level no longer has a prognostic value.

3. The content of anti-inflammatory cytokine IL-4 in blood serum of oxygen-dependent patients with

COVID-19 during hospitalization is slightly increased ( $p < 0.05$ ), compared to healthy patients. The level of increased IL-4 has no diagnostic value in terms of determining the probable stage and development of the fatal outcome of the disease at all stages of observation.

**Prospects for further research.** In our opinion, a promising direction for further research is to establish the prognostic significance of cytokine regulation parameters in patients with a severe and critical course of COVID-19 when various options of immunotropic treatment are used.

## Funding

The research was carried out as part of the planned research work of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University "Improving approaches to the diagnosis and treatment of patients with the most common infectious diseases occurring on the background of comorbid pathology", state registration No. 0122U002570 (2022–2026).

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

Надійшла до редакції / Received: 09.06.2023

Після доопрацювання / Revised: 21.06.2023

Схвалено до друку / Accepted: 03.07.2023

## Information about authors:

Riabokon O. V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Infectious Diseases, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-7394-4649](https://orcid.org/0000-0002-7394-4649)

Cherkaskyi V. V., MD, Assistant of the Department of Infectious Diseases, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0003-2959-8803](https://orcid.org/0000-0003-2959-8803)

Riabokon Yu. Yu., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Children Infectious Diseases, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-2273-8511](https://orcid.org/0000-0002-2273-8511)

Shcherbina R. O., PhD, DSc, Associate Professor of Department of Natural Sciences for Foreign Students and Toxicological Chemistry, Head of Educational and Scientific Medical Laboratory Center with Vivarium, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-9742-0284](https://orcid.org/0000-0002-9742-0284)

## Відомості про авторів:

Рябоконт О. В., д-р мед. наук, професор, зав. каф. інфекційних хвороб, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Черкаський В. В., асистент каф. інфекційних хвороб, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Рябоконт Ю. Ю., д-р мед. наук, професор каф. дитячих інфекційних хвороб, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Щербина Р. О., д-р фарм. наук, доцент каф. природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії, керівник Навчально-наукового медико-лабораторного центру з віварієм, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

## References

- Montazersaheb, S., Hosseiniyan Khatibi, S. M., Hejazi, M. S., Tarhiz, V., Farjami, A., Ghasemian Sorbeni, F., Farahzadi, R., & Ghasemnejad, T. (2022). COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. *Virology journal*, 19(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01814-1>

2. Grasselli, G., Tonetti, T., Filippini, C., Slutsky, A. S., Pesenti, A., & Ranieri, V. M. (2021). Pathophysiology of COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome – Authors' reply. *The Lancet. Respiratory medicine*, 9(1), e5–e6. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30525-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30525-7)
3. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
4. Ragab, D., Salah Eldin, H., Taeimah, M., Khattab, R., & Salem, R. (2020). The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. *Frontiers in immunology*, 11, 1446. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01446>
5. Cherkaskiy, V. V., Riabokon, O. V., & Riabokon, Yu. Yu. (2023). The clinical and prognostic role of changes in parameters of the hemostasis system and C-reactive protein in the development of thrombotic complications in oxygen-dependent patients with coronavirus disease (COVID-19). *Pathologia*, 20(1), 27–35. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2023.1.274921>
6. McGonagle, D., Sharif, K., O'Regan, A., & Bridgewood, C. (2020). The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmunity reviews*, 19(6), 102537. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102537>
7. Yang, M. (2020). Cell Pyroptosis, a Potential Pathogenic Mechanism of 2019-nCoV Infection. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3527420>
8. Tavakolpour, S., Rakhshandehroo, T., Wei, E. X., & Rashidian, M. (2020). Lymphopenia during the COVID-19 infection: What it shows and what can be learned. *Immunology letters*, 225, 31–32. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.06.013>
9. Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30183-5)
10. Barton, L. M., Duval, E. J., Stroberg, E., Ghosh, S., & Mukhopadhyay, S. (2020). COVID-19 Autopsies, Oklahoma, USA. *American journal of clinical pathology*, 153(6), 725–733. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa062>
11. Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., Wang, T., Zhang, X., Chen, H., Yu, H., Zhang, X., Zhang, M., Wu, S., Song, J., Chen, T., Han, M., Li, S., Luo, X., Zhao, J., & Ning, Q. (2020). Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *Journal of clinical investigation*, 130(5), 2620–2629. <https://doi.org/10.1172/jci137244>
12. Tufan, A., Avanoğlu Güler, A., & Matucci-Cerinic, M. (2020). COVID-19, immune system response, hyperinflammation and repurposing anti-rheumatic drugs. *Turkish journal of medical sciences*, 50(SI-1), 620–632. <https://doi.org/10.3906/sag-2004-168>
13. Mangalmurti, N., & Hunter, C. A. (2020). Cytokine Storms: Understanding COVID-19. *Immunity*, 53(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.017>
14. Park, M. D. (2020). Macrophages: a Trojan horse in COVID-19? *Nature reviews immunology*, 20(6), 351. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0317-2>
15. Kimura, A., & Kishimoto, T. (2010). IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European journal of immunology*, 40(7), 1830–1835. <https://doi.org/10.1002/eji.201040391>
16. Jones, B. E., Maerz, M. D., & Buckner, J. H. (2018). IL-6: a cytokine at the crossroads of autoimmunity. *Current opinion in immunology*, 55, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.09.002>
17. Rostamian, A., Ghazanfari, T., Arabkheradmand, J., Edalatfard, M., Ghaffarpour, S., Salehi, M. R., Raeeskarami, S. R., Mahmoodi Aliabadi, M., Rajabnia Chenary, M., Mirsharif, E. S., Jamali, D., Sattarian, M. R., Najafizadeh, R., Hosseinielki Sari, S., Jafarpour, S., Nezhadseifi, E., Movasseghi, S., Baharvand, E., Beiranvand, S., Roomi, A., & Naghizadeh, M. M. (2020). Interleukin-6 as a Potential Predictor of COVID-19 Disease Severity in Hospitalized Patients and its Association with Clinical Laboratory Routine Tests. *Immunoregulation*, 29–36. <https://doi.org/10.32598/immunoregulation.3.1.4>
18. Coomes, E. A., & Haghbayan, H. (2020). Interleukin-6 in Covid-19: A systematic review and meta-analysis. *Reviews in medical virology*, 30(6), 1–9. <https://doi.org/10.1002/rmv.2141>
19. Ruan, Q., Yang, K., Wang, W., Jiang, L., & Song, J. (2020). Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive care medicine*, 46(5), 846–848. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05991-x>
20. Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., Qiu, Y., Wang, J., Liu, Y., Wei, Y., Xia, J., Yu, T., Zhang, X., & Zhang, L. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 395(10223), 507–513. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30211-7)
21. Liu, F., Li, L., Xu, M., Wu, J., Luo, D., Zhu, Y., Li, B., Song, X., & Zhou, X. (2020). Prognostic value of interleukin-6, C-reactive protein, and procalcitonin in patients with COVID-19. *Journal of clinical virology*, 127, 104370. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104370>
22. Ulhaq, Z. S., & Soraya, G. V. (2020). Interleukin-6 as a potential biomarker of COVID-19 progression. *Médecine et maladies infectieuses*, 50(4), 382–383. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2020.04.002>
23. Faigenbaum, D. C., & June, C. H. (2020). Cytokine Storm. *New England journal of medicine*, 383(23), 2255–2273. <https://doi.org/10.1056/nejmra2026131>
24. Chi, Y., Ge, Y., Wu, B., Zhang, W., Wu, T., Wen, T., Liu, J., Guo, X., Huang, C., Jiao, Y., Zhu, F., Zhu, B., & Cui, L. (2020). Serum Cytokine and Chemokine Profile in Relation to the Severity of Coronavirus Disease 2019 in China. *The Journal of infectious diseases*, 222(5), 746–754. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa363>
25. Hu, B., Huang, S., & Yin, L. (2020). The cytokine storm and COVID-19. *Journal of medical virology*, 93(1), 250–256. <https://doi.org/10.1002/jmv.26232>
26. Xu, Z.-S., Shu, T., Kang, L., Wu, D., Zhou, X., Liao, B.-W., Sun, X.-L., Zhou, X., & Wang, Y.-Y. (2020). Temporal profiling of plasma cytokines, chemokines and growth factors from mild, severe and fatal COVID-19 patients. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 100. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0211-1>
27. Bachelier, F., Ben-Baruch, A., Burkhardt, A. M., Combadiere, C., Farber, J. M., Graham, G. J., Horuk, R., Sparre-Ullrich, A. H., Locati, M., Luster, A. D., Mantovani, A., Matsushima, K., Murphy, P. M., Nibbs, R., Nomiyama, H., Power, C. A., Proudfoot, A. E. I., Rosenkilde, M. M., Rot, A., ... Zlotnik, A. (2013). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIX. Update on the Extended Family of Chemokine Receptors and Introducing a New Nomenclature for Atypical Chemokine Receptors. *Pharmacological reviews*, 66(1), 1–79. <https://doi.org/10.1124/pr.113.007724>
28. Deshmans, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of interferon & cytokine research*, 29(6), 313–326. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
29. Xiong, Y., Liu, Y., Cao, L., Wang, D., Guo, M., Jiang, A., Guo, D., Hu, W., Yang, J., Tang, Z., Wu, H., Lin, Y., Zhang, M., Zhang, Q., Shi, M., Liu, Y., Zhou, Y., Lan, K., & Chen, Y. (2020). Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 761–770. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1747363>
30. Chu, H., Chan, J. F.-W., Wang, Y., Yuen, T. T.-T., Chai, Y., Hou, Y., Shuai, H., Yang, D., Hu, B., Huang, X., Zhang, X., Cai, J.-P., Zhou, J., Yuan, S., Kok, K.-H., To, K. K.-W., Chan, I. H.-Y., Zhang, A. J., Sit, K.-Y., ... Yuen, K.-Y. (2020). Comparative Replication and Immune Activation Profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in Human Lungs: An Ex Vivo Study With Implications for the Pathogenesis of COVID-19. *Clinical infectious diseases*, 71(6), 1400–1409. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa410>
31. Lin, L., Lu, L., Cao, W., & Li, T. (2020). Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection—a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 727–732. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1746199>
32. Xi, X., Guo, Y., Zhu, M., Wei, Y., Li, G., Du, B., & Wang, Y. (2021). Higher expression of monocyte chemotactic protein 1 in mild COVID-19 patients might be correlated with inhibition of Type I IFN signaling. *Virology journal*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01478-9>
33. Xu, Z., Shi, L., Wang, Y., Zhang, J., Huang, L., Zhang, C., Liu, S., Zhao, P., Liu, H., Zhu, L., Tai, Y., Bai, C., Gao, T., Song, J., Xia, P., Dong, J., Zhao, J., & Wang, F.-S. (2020). Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 8(4), 420–422. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(20\)30076-x](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30076-x)
34. Yang, L., Xie, X., Tu, Z., Fu, J., Xu, D., & Zhou, Y. (2021). Correction: The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 326. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00744-8>
35. Shi, H., Wang, W., Yin, J., Ouyang, Y., Pang, L., Feng, Y., Qiao, L., Guo, X., Shi, H., Jin, R., & Chen, D. (2020). The inhibition of IL-2/IL-2R gives rise to CD8+ T cell and lymphocyte decrease through JAK1-STAT5 in critical patients with COVID-19 pneumonia. *Cell death & disease*, 11(6). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2636-4>
36. Qu, R., Ling, Y., Zhang, Y., Wei, L., Chen, X., Li, X., Liu, X., Liu, H., Guo, Z., Ren, H., & Wang, Q. (2020). Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19. *Journal of medical virology*, 92(9), 1533–1541. <https://doi.org/10.1002/jmv.25767>
37. Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., Wang, B., Xiang, H., Cheng, Z., Xiong, Y., Zhao, Y., Li, Y., Wang, X., & Peng, Z. (2020). Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 323(11), 1061. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>

38. Al-Saadi, E. A. K. D., & Abdulnabi, M. A. (2021). Hematological changes associated with COVID-19 infection. *Journal of clinical laboratory analysis*, 36(1), e24064. <https://doi.org/10.1002/jcla.24064>
39. Pasrija, R., & Naime, M. (2022). Resolving the equation between mucormycosis and COVID-19 disease. *Molecular biology reports*, 49(4), 3349-3356. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-07085-3>
40. Wong, C. K., Lam, C. W., Wu, A. K., Ip, W. K., Lee, N. L., Chan, I. H., Lit, L. C., Hui, D. S., Chan, M. H., Chung, S. S., & Sung, J. J. (2004). Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clinical and experimental immunology*, 136(1), 95-103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02415.x>
41. Bortolotti, D., Gentili, V., Rizzo, S., Schiuma, G., Beltrami, S., Strazabosco, G., Fernandez, M., Caccuri, F., Caruso, A., & Rizzo, R. (2021). TLR3 and TLR7 RNA Sensor Activation during SARS-COV-2 Infection. *Microorganisms*, 9(9), 1820. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091820>
42. Pacheco-Hernández, L. M., Ramírez-Noyola, J. A., Gómez-García, I. A., Ignacio-Cortés, S., Zúñiga, J., & Choreño-Parra, J. A. (2022). Comparing the Cytokine Storms of COVID-19 and Pandemic Influenza. *Journal of interferon & cytokine research*, 42(8), 369-392. <https://doi.org/10.1089/jir.2022.0029>



# Патоморфологічний аналіз брунькування в колоректальних карциномах

I. С. Шпонька<sup>1,A,E</sup>, O. В. Пославська<sup>1,\*1,C,E</sup>, I. К. Хархаліс<sup>2,B,C</sup>, Т. В. Шинкаренко<sup>1,C,D</sup>

<sup>1</sup>Дніпровський державний медичний університет, Україна, <sup>2</sup>Ужгородський національний 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

Захворюваність і смертність, спричинена колоректальним раком (КРР), залишається актуальною проблемою сучасної онкології. Інтенсивне брунькування вважають важливим фактором прогнозу гіршого клінічного перебігу КРР, що може впливати на ухвалення клінічних рішень щодо застосування розширених втручань при рТ1 та II стадії, згідно з висновком Міжнародної консенсусної конференції з брунькування пухлин 2016 року.

**Мета роботи** – оцінити прогностичну значущість брунькування залежно від клініко-морфологічних характеристик колоректальних карцином.

**Матеріали та методи.** Дослідили клініко-анатомічний матеріал 31 пацієнта з КРР (14 жінок і 17 чоловіків), що перебували на лікуванні в 2 хірургічному відділенні КП «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня імені І. І. Мечникова» ДОР в період з 2019 до 2021 року. Вік пацієнтів становив 27–84 роки, середній вік –  $62,3 \pm 14,8$  року. Здійснили гістологічне дослідження зразків КРР з оцінюванням «гарячих ділянок» інвазивного фронту та імуногістохімічне дослідження з PАН СК АЕ 1/3, Ki-67, MUC2, caspase-3,  $\beta$ -catenin для розрахунку кількості кластерів пухлинних клітин.

**Результати.** У третині зразків визначили розбіжності не тільки за кількістю кластерів, але й за категорією брунькування в разі забарвлення рутинним та імуногістохімічним методами. Перитуморальне брунькування інвазивного фронту з категорією Bd3 завжди супроводжувалось інтратуморальним брунькуванням різних ступенів інтенсивності. Аналіз розподілу градацій брунькування колоректальних карцином за статтю, віком хворих, локалізацією, гістологічним ступенем диференціювання, наявністю метастазів не показав статистично вірогідні відмінності ( $p > 0,05$ ). Це може свідчити про незалежність цього фактора та прогнозу виживаності пацієнтів. Інтенсивність брунькування колоректальних карцином залежно від експресії маркерів Ki-67, caspase-3 і  $\beta$ -catenin не показала достовірної різниці в підгрупах ( $p > 0,05$ ), але мала тенденцію до збільшення кількості бруньок із підвищенням індексу проліферації та зниженням активності проапоптотичного ензиму caspase-3.

**Висновки.** Якщо кількість бруньок, що визначена стандартизованим методом забарвлення Н & Е, викликає сумніви на межі категорій Bd1 і Bd2 або Bd2 і Bd3, можливе заниження ступеня брунькування порівняно з забарвленням імуногістохімічним методом, оскільки виключені хибно інтерпретовані морфологічні об'єкти як кластери пухлини. Найнадійніший імуногістохімічний маркер для контрастного визначення бруньок – коктейль із цитокератинів.

**Ключові слова:**  
колоректальна карцинома, імуногістохімія, брунькування, цитокератини.

**Патологія.** 2023.  
Т. 20, № 2(58).  
С. 135-140

**\*E-mail:**  
alexandra.poslavskaya@  
gmail.com

## Pathomorphological analysis of budding in colorectal carcinomas

I. S. Shponka, O. V. Poslavska, I. K. Kharkhalis, T. V. Shynkarenko

Morbidity and mortality from colorectal cancer (CRC) remains a current problem of modern oncology. Intensive budding is an important prognostic factor for a worse clinical course of CRC and may influence clinical decision-making regarding the use of extended interventions in pT1 and stage II, according to the conclusion of the 2016 International Consensus Conference on Tumor Budding.

**The aim** of the work is to evaluate the prognostic significance of budding depending on the clinical and morphological characteristics of colorectal carcinomas.

**Materials and methods.** The article deals with clinical and anatomical material of 31 patients with CRC (14 women and 17 men) who were treated in the 2nd surgical department of the SE "Dnipropetrovsk Regional Clinical Hospital" in the period from 2019 to 2021. The age of the patients varied of 27–84 years old (average age –  $62.3 \pm 14.8$  years old). A histological examination of CRC samples was carried out with an assessment of "hot areas" of the invasive front and an immunohistochemical examination with PАН СК АЕ 1/3, Ki-67, MUC2, caspase-3,  $\beta$ -catenin to calculate the number of tumor cell clusters.

**Results.** In one third of the number of samples, differences were determined not only in the number of clusters, but also in the budding category when stained by routine and immunohistochemical methods. Peritumoral budding of the invasive front with category Bd3 was always accompanied by intratumoral budding of varying degrees of intensity. The analysis of the distribution of gradations of budding of colorectal carcinomas by gender, age, location, histological degree of differentiation, and the presence of metastases did not show a statistically significant difference ( $p > 0.05$ ), which may indicate the independence of this factor on the prognosis of patient survival. The intensity of budding of colorectal carcinomas depending on the expression of markers Ki-67, caspase-3 and  $\beta$ -catenin did not show a significant difference in subgroups ( $p > 0.05$ ) but showed tendencies to increase the number of budding with an increase in the proliferation index and a decrease in the activity of the proapoptotic enzyme caspase-3.

**Key words:**  
colorectal carcinoma, immunohistochemistry, budding, cytokeratin.

**Pathologia,** 2023. 20(2),  
135-140

**Conclusions.** If the number of buds on the border of categories Bd1 and Bd2, or Bd2 and Bd3, determined by the standardized method of H & E staining is doubtful, the degree of budding may be underestimated in comparison with staining by the immunohistochemical method, due to the exclusion of falsely interpreted morphological objects as tumor clusters; the most reliable immunohistochemical marker for contrast separation of buds is a cocktail of cytokeratins.

Захворюваність і смертність, спричинена колоректальним раком (КРР), залишається актуальною проблемою сучасної онкології. Через широке використання скринінгу та розроблення ефективних методів лікування ранніх форм КРР та облігатних передракових станів, мала би простежуватись тенденція до зменшення захворюваності та смертності від КРР в останні роки, і про це повідомляли в деяких розвинених країнах: Австрії, Люксембурзі, Німеччині, Ізраїлі тощо. Однак темпи захворюваності та смертності від КРР у країнах, що розвиваються та раніше мали відносно низькі показники, помітно зросли, як-от у Румунії, Молдові, Еквадорі, Китаї тощо [1,2,3,4,5].

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, КРР є третім за поширеністю раком у світі: у 2022 році зафіксовано 1,85 млн нових випадків і 850 тис. смертей. Прогноз зростання захворюваності на 2040 рік, встановлений на основі статистики, – до 3,2 млн [6,7,8].

У 2021 році КРР посідав провідні місця в структурі захворюваності на злоякісні новоутворення в населення України віком понад 55 років: в чоловіків – 3 та 4 місця з локалізацією в ободовій і прямій кишках відповідно, в жінок – 4 та 5 місця відповідно. Зазначимо, що у структурі смертності від КРР для чоловіків розподіл виявився нижчим за показники захворюваності (4 та 5 місця для ободової та прямої кишки відповідно), а для жінок геть іншим – 2 місце в структурі смертності для пухлин ободової кишки в осіб віком 55–74 роки, 2 і 3 місця – в пацієнок віком понад 75 років з локалізацією в ободовій і прямій кишках відповідно. Причинами вважають якісні зміни в харчових продуктах, що останнім часом є рафінованими і не такими збалансованими, як натуральні, що містили клітковину, вітаміни, мікроелементи в достатніх кількостях [9].

Отже, прогнозують стабільне зростання захворюваності на злоякісні новоутворення ободової та прямої кишок і в чоловіків, і жінок, які проживають в Україні, з переважанням рівня смертності в жінок [9]. Чимало джерел фахової літератури свідчать, що виживаність хворих на КРР безпосередньо залежить від своєчасності виявлення злоякісної пухлини, і тому показник відносної п'ятирічної виживаності хворих із ранніми стадіями КРР у 8–10 разів кращий порівняно з занедбанними клінічними випадками [4,5,6].

Морфологічні дослідження показали: високий рівень пухлинних бруньок інвазивного фронту в колоректальній карциномі асоціюється з гіршим прогнозом, включаючи вищий ризик рецидиву захворювання та зниження загальної виживаності. Пухлинні бруньки – невеликі скупчення злоякісних клітин, що відокремлюються від основної пухлинної маси та проростають у навколишні тканини. Доведено, що при колоректальній карциномі наявність пухлинних бруньок – важливий прогностичний фактор, а отже є корисним під час прогнозування результатів лікування пацієнтів [10].

Крім того, брунькування пов'язане з підвищеною імовірністю метастазування в лімфатичні вузли, що також може погіршити прогноз [4]. Тому наявність і рівень пухлинних бруньок у КРР – важливий фактор для визначення тяжкості захворювання та ухвалення рішення щодо лікування. Це також може допомогти виявити пацієнтів, які потребують більш агресивного лікування або ретельнішого спостереження [11].

## Мета роботи

Оцінити прогностичну значущість брунькування залежно від клініко-морфологічних характеристик колоректальних карцином.

## Матеріали і методи дослідження

Дослідили клініко-анатомічний матеріал 31 пацієнта з КРР (14 жінок і 17 чоловіків), що одержали під час операцій (правобічна геміколектомія, резекція сигмоподібної кишки, операція Гартмана, резекція поперечно-ободової кишки, резекція клубової кишки). Усі хворі перебували на лікуванні в 2 хірургічному відділенні КП «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня імені І. І. Мечникова» ДОР в період з 2019 до 2021 року. Вік пацієнтів становив від 27 до 84 років, середній вік –  $62,3 \pm 14,8$  року.

Дослідження схвалено комісією з біоетики ДВНЗ «Ужгородський національний університет» (витяг з протоколу засідання № 7/16 від 30 вересня 2020 р.), здійснене відповідно до принципів біоетики, що викладені в Гельсінській декларації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людей» та «Загальній декларації про біоетику та права людини (ЮНЕСКО)». Усі пацієнти надали письмову інформовану згоду на участь у дослідженні.

За гістологічною будовою всі спостереження – колоректальні карциноми. Визначили гістологічні підтипи: аденокарцинома (АК) неспецифікована NOS – 17 випадків, зубчаста АК – 5 випадків, мікропапілярна АК – 3 випадки, медулярна АК – 3 випадки, муциозна АК – 1 випадок, перстнеподібноклітинна АК – 1 випадок, АК типу like-adenoma – 1 випадок.

Правобічну локалізацію (у висхідній частині ободової кишки, печінковому куті, поперечно-ободовій кишці) визначили в 17 випадках, лівобічну (в селезінковому куті, ректо-сигмоїдному сполученні, сигмоподібній та прямій кишці) – в 14 випадках. Більшість пухлин локалізувались у сліпій та ободовій кишках.

Матеріал поділили на дві групи залежно від наявності метастазів: без метастазів – 26 КРК, з метастазами – 5 спостережень (4 випадки – у лімфатичних вузлах черевної порожнини, 1 – у печінці).

**Гістологічний метод дослідження.** Зразки пухлин КРР, фіксовані в формаліні й залиті парафіном, взято з архіву КЗ «Дніпровське обласне патолого-анатомічне бюро». Зрізи завтовшки 4 мкм зробили на

мікромомі Microm HM-340, забарвлені за стандартною методикою гематоксиліном та еозином [12].

**Імуногістохімічний метод забарвлення.** Крім звичайного гістологічного дослідження (забарвлення гематоксиліном та еозином), здійснили імуногістохімічний аналіз за протоколами ThermoScientific (TS) з первинними антитілами до кератину, Pan (клон AE1/AE3, RTU), Ki-67 (sp6, 1:250), MUC2 (sp1, RTU), caspase-3 (RB-1197, RTU),  $\beta$ -catenin (Beta Catenin – 1, клон EP35, RTU). Використовували систему візуалізації Lab Vision Quanto (TS, США) з детектуванням білкового ланцюга за допомогою DAB Quanto Chromogen (TS, США) [13].

Під час огляду пухлини зі збільшенням  $\times 100$  обирали «гарячі ділянки» – частини зони інфільтрації з найбільшою кількістю кластерів пухлинних клітин (бруньки – «купки» від 1 до 4 клітин). Після обрахунку кількості кластерів виконували нормалізацію до  $0,78 \text{ мм}^2$ . Завершальний етап – визначення категорії брунькування (табл. 1).

За рекомендаціями N. Melling et al., для статистичного аналізу результати забарвлення маркером Ki-67 поділили на три групи (слабка, помірна, висока) за відсотком Ki-67-позитивних пухлинних клітин: низький Ki-67 – 0–10 %, помірний – 10–25 %, високий – 25 % і більше [14].

За рекомендацією Tahany M. Shams et al., імунореактивність маркера caspase-3 оцінювали так: (–) – негативна, без забарвлення або коричневе забарвлення цитоплазми менше ніж 25 % клітин пухлин; (+1) – слабка, коричневе забарвлення цитоплазми у 25–50 % пухлинних клітин; (+2) – помірна, забарвлення цитоплазми 50–75 % пухлинних клітин; (+3) – інтенсивна, забарвлення більш ніж 75 % пухлинних клітин [15]. Для наступного статистичного опрацювання градації (–) та (+1) об'єднали в «low», а градації (+2) і (+3) – у групу «high» [15].

За рекомендаціями Amani Kazem et al., оцінювання  $\beta$ -catenin ґрунтувалося на його розподілі всередині клітини: мембранна експресія (0–1), цитоплазма (0–2) та ядра (0–2). Показник розраховували шляхом додавання балів: сума ядерних балів (+2 = позитивна експресія; +1 = слабка експресія; 0 = немає експресії), оцінка цитоплазми (+2 = позитивна експресія; +1 = слабка експресія; 0 = немає експресії) та оцінка мембрани (0 = позитивна експресія на мембрані; +1 = негативна мембранна експресія). Отже, «типова експресія» характеризувалась загальним балом 0, показувала лише забарвлення клітинної мембрани, що подібне до такого нормальної слизової оболонки товстої кишки; «каберантна експресія» показувала бали від 1 до загальної оцінки 5 (5 – для пухлин із сильним ядерним забарвленням (+2), дифузним забарвленням цитоплазми (+2) і втраченою клітинною мембраною (+1)) [16].

Для цифрової морфометрії застосували камеру мікроскопа Zeiss Primo Star – AxioCam ERC 5s з ліцензованим програмним забезпеченням ZEN 2 blue edition. Сфотографовані поля зору збережено в форматі \*.jpg, опрацьовано на платформі Fiji з обрахунком кількості кластерів брунькування [17].

Статистичний аналіз здійснили в програмному середовищі R version 3.4.1 (2017-06-30); the R Foundation for Statistical Computing Platform: x86\_64-w64-mingw32/x64 (64-bit), що поширюється безкоштовно за ліцен-

**Таблиця 1.** Класифікація ступеня брунькування

Категорія	Нормалізована кількість кластерів	Рівень брунькування
Bd0	0	нульовий
Bd1	1–4	низький
Bd2	5–9	помірний
Bd3	10 і більше	високий

зією GNU General Public License. Достовірність міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом визначали за допомогою точного тесту Фішера. Відмінність між підгрупами вважали вірогідною при  $p < 0,05$  [18].

## Результати

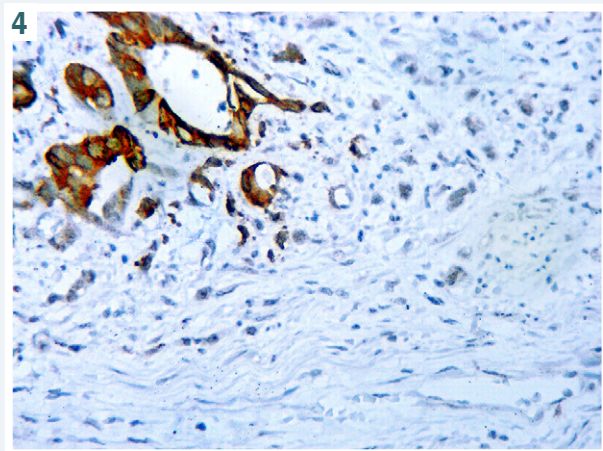
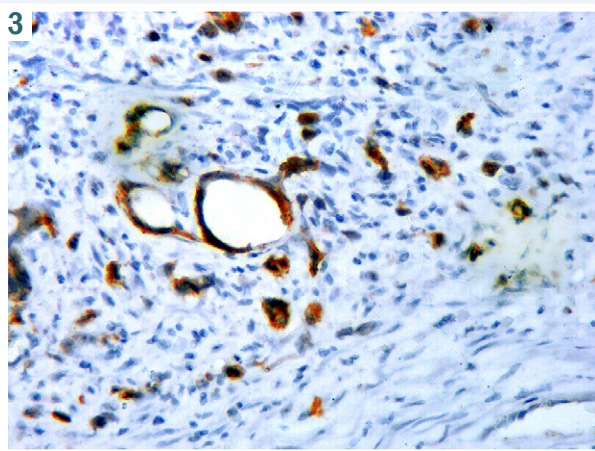
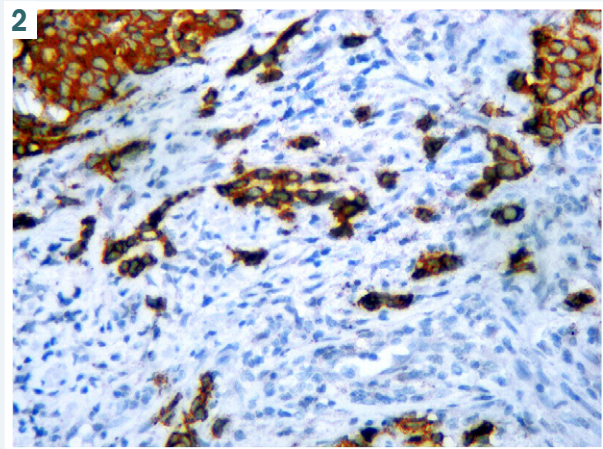
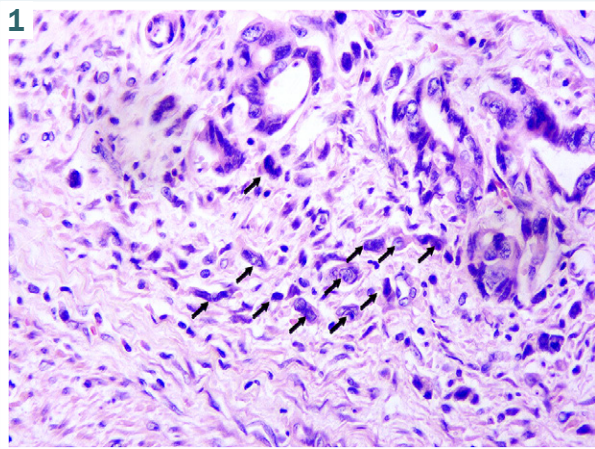
Перитуморальне та внутрішньопухлинне брунькування при KPP ретроспективно проаналізували на післяопераційному матеріалі 31 пацієнта з колоректальною аденокарциномою на зрізах, забарвлених гематоксиліном та еозином, за рекомендаціями Міжнародної консенсусної конференції з брунькування пухлин (International Tumour Budding Consensus Conference, 2016 р.). У 10 (32,26 %) випадках KPP із 31 виявили цільний запальний інфільтрат, що на межі помірного й високого брунькування викликало сумніви щодо правильності інтерпретації морфологічних об'єктів на зрізах, забарвлених гематоксиліном та еозином (рис. 1). Для уточнення стадії брунькування в зразках KPP здійснили імуногістохімічне (ІГХ) дослідження зі специфічними маркерами, що добре відокремлюють пухлинні клітини для наступного комп'ютерного опрацювання зображень: Pan СК 1/3, MUC-2 та  $\beta$ -catenin.

Встановили, що з-поміж цих трьох маркерів найбільшу перевагу мав коктейль з цитокератинів Pan СК 1/3, який показав чітку мембрано-цитоплазматичну реакцію всіх кластерів брунькування (рис. 2). MUC-2 часто давав гранулярний характер забарвлення (dot-like реакції) стромального компонента навколо кластерів, що в разі щільного скупчення клітин ускладнювало інтерпретацію кількості бруньок (рис. 3). Маркер  $\beta$ -catenin, що загалом чітко й інтенсивно забарвлював мембрани пухлинних клітин у залозах і солідних скупченнях KPP, показав тенденцію до зниження експресії в окремих клітинах при брунькуванні (рис. 4). Втрата міжклітинних зв'язків і виникнення активного інвазивного фронту зі зниженням експресії  $\beta$ -catenin роблять цей маркер недоцільним під час аналізу перитуморального брунькування.

Отже, завдяки подвійному контролю (обрахунок кластерів при забарвленні гематоксиліном та еозином (H & E), додаткова перевірка ІГХ-методом із маркером Pan СК 1/3) визначили: KPP із низькою інтенсивністю перитуморального брунькування (Bd0–1) зареєстровано в 7 (22,6 %) випадках, із середньою інтенсивністю (Bd2) – 14 (45,2 %), із високою (Bd3) – 10 (32,2 %).

Зазначимо, що в усіх зразках KPP (100 %) із високим рівнем брунькування (Bd3) та 6 (42,85 %) із 14 випадків із помірним (Bd2) виявили внутрішньопухлинне брунькування різної інтенсивності. Це було зазначено в протоколі дослідження, але не враховано під час статистичного аналізу зв'язків із клініко-морфологічними характеристиками KPP.





**Рис. 1.** Аденокарцинома NOS, забарвлення гематоксилином та еозином,  $\times 400$ . Випадок брунькування на рівні Bd2–3(?) у «гарячій точці» інвазивного фронту серед запального інфільтрату стромі.

**Рис. 2.** Аденокарцинома NOS, мембранно-цитоплазматична реакція з маркером Pan CK 1/3, ІГХ-метод із додатковим забарвлення гематоксилином Майєра,  $\times 400$ . Випадок брунькування на рівні Bd3 у «гарячій точці» інвазивного фронту.

**Рис. 3.** Аденокарцинома NOS, мембранно-цитоплазматична реакція, зокрема dot-like реакція з маркером MUC-2, ІГХ метод з додатковим забарвлення гематоксилином Маєра ( $\times 400$ ). Випадок брунькування на рівні Bd3 у «гарячій точці» інвазивного фронту.

**Рис. 4.** Аденокарцинома NOS, сильна мембранна реакція з маркером  $\beta$ -catenin у залозах, що поступово втрачається в кластерах брунькування, ІГХ-метод із додатковим забарвлення гематоксилином Маєра,  $\times 400$ . Випадок брунькування на рівні Bd3 у «гарячій точці» інвазивного фронту.

Структура за віком і статтю пацієнтів, залучених у дослідження, в цілому відповідала приблизним показникам захворюваності на КРР в Україні: зафіксовано переважання чоловіків в 1,2 раза в вибірці, в 1,3 раза – в Україні (2021–2022 рр.). Середній вік пацієнтів ( $62,3 \pm 14,8$  року, середнє  $\pm$  SD) відповідав піку захворюваності на КРР (старше за 55 років, часто – діапазон 70–79 років), враховуючи меншу кількість осіб цієї вікової групи, особливо чоловіків. Однак інтенсивність брунькування не показала статистично достовірної залежності від статі та віку пацієнтів із КРР ( $p = 0,564$  і  $p = 0,111$  відповідно) (табл. 2).

Аналіз розподілу випадків КРР за локалізацією, гістологічним ступенем диференціювання та наявністю метастазів також не виявив статистично вірогідні відмінності в групах із різним ступенем брунькування ( $p = 0,722$ ,  $p = 0,527$ ,  $p = 0,472$  відповідно). Втім, виявили тенденції до значного переважання випадків КРР із

Bd2 і 3 (разом), порівняно з Bd0 і 1 (разом) у лівобічних КРР – 12 проти 2 (85,71 % проти 14,29 %), в низькодиференційованих КРР G3 – 4 проти 0 (табл. 2). Відомості щодо залежності клініко-морфологічних характеристик від стадії брунькування наведено в таблиці 2.

Проаналізували зв'язок експресії деяких маркерів зі стадією брунькування: проліферативну активність за маркером Ki-67, апоптотичну активність за маркером caspase-3, міжклітинну адгезію за маркером  $\beta$ -catenin. Тенденцію до переважання випадків КРР з Bd2 і 3 (разом) порівняно з Bd0 і 1 (разом) встановили в КРР із високою проліферативною активністю, де індекс проліферації становив понад 25 % – 11 проти 0 (100 %), в КРР із низькою експресією маркера caspase-3 – 13 проти 3 (81,25 % проти 18,75 %), але статистично достовірну різницю не встановили ( $p > 0,05$ ). Відомості щодо розподілу наведено в таблиці 3.

## Обговорення

На думку багатьох дослідників, брунькування пухлини – потенційно корисний прогностичний біомаркер колоректального раку та інших солідних типів карцином [4,5,6,7]. Пухлинні бруньки зазвичай визначають як ізольовані поодинокі ракові клітини або скупчення до чотирьох неопластичних клітин, розташованих у відділі інвазивного фронту пухлини [5].

Прогностичну цінність брунькування пухлини підтверджено. Так, у публікації Qiao Qu et al., які здійснили метааналіз 1503 пацієнтів із дев'яти ретроспективних когортних досліджень, показано: пацієнти з КРР і високим показником брунькування пухлини мали нижчу виживаність порівняно з випадками низького брунькування КРР ( $p < 0,001$ ) [2]. У нашому дослідженні не виявили зв'язки стадійності брунькування та характеристик, що наведені в таблицях 2, 3. Це може свідчити про незалежність цього прогностичного фактора виживаності або про недоліки дослідження, як-от недостатня вибірка чи некоректність градації брунькування. Звісно, застосування індексів брунькування пухлини в клінічній практиці потребує стандартизованої системи оцінювання, яку треба адаптувати до конкретних типів пухлин і клінічних випадків.

Щодо КРР, то брунькування пухлин часто оцінюють за методом, що ухвалений на Міжнародній консенсусній конференції з брунькування пухлин (International Tumour Budding Consensus Conference) у 2016 році. Метод передбачає застосування напівкількісної шкали оцінювання брунькування: Vd0 – без бруньок; Vd1 – 1–4 бруньки; Vd2 – 5–9 бруньок; Vd3 –  $\geq 10$  бруньок [5].

За такою системою оцінювання визначили, що брунькування є незалежним предиктором метастатичного ураження лімфатичних вузлів для пацієнтів із КРР pT1 та зниження загальної виживаності пацієнтів із КРР II стадії. Загальна концепція брунькування – «чим більше пухлинних бруньок, тим гірший клінічний результат» [5,6,7].

У зв'язку з певною суб'єктивністю оцінювання брунькування на Міжнародній консенсусній конференції з брунькування пухлин визначено правила для стандартизації висновків щодо КРР:

1. брунькування пухлини розраховують за забарвленням H & E;
2. його оцінюють в одній «гарячій точці» (у полі розміром 0,785 мм<sup>2</sup>) на інвазивному фронті;
3. рекомендовано використовувати тріривневу систему разом з обрахунком бруньок, щоб полегшити стратифікацію ризику КРР;
4. не поєднувати поняття брунькування пухлини та стадію пухлини [6].

У контексті таких положень постає питання щодо доцільності контрастного відокремлення клітин бруньок від клітин запального інфільтрату або стромальної десмопластичної реакції завдяки імуногістохімічному забарвленню зразків КРР. Дійсно, під час нашого дослідження виникла проблема з визначення градації брунькування в щільному запальному інфільтраті, для чого використано такі імуногістохімічні маркери, як коктейль цитокератинів, ЕМА,  $\beta$ -catenin і муцин 2 типу.

Спільні погляди дослідників щодо застосування H & E та імуногістохімії для оцінювання брунькування

**Таблиця 2.** Інтенсивність брунькування колоректальних карцином залежно від клініко-морфологічних характеристик,  $n = 31$

Клініко-морфологічна характеристика КРР	n (%)	Категорія брунькування			p
		Vd0–1	Vd2	Vd3	
Чоловіки	17 (54,84)	5	7	5	0,722
Жінки	14 (45,16)	2	7	5	
Вік (роки)					
<50	7 (22,58)	2	3	2	0,397
50–75	18 (58,07)	4	10	4	
>75	6 (19,35)	1	1	4	
Правобічні	17 (54,84)	5	7	5	0,722
Лівобічні	14 (45,16)	2	7	5	
AK NOS	17 (54,84)	4	7	6	p*
Зубчаста АК	5 (16,13)	2	3	0	
Мікропапілярна АК	3 (9,68)	1	0	2	
Медулярна АК	3 (9,68)	0	2	1	
Муцинозна АК	1 (3,23)	0	1	0	
Перснеподібна АК	1 (3,23)	0	1	0	
AK типу adenoma-like	1 (3,23)	0	0	1	
G2	27 (87,10)	7	11	9	0,527
G3	4 (12,90)	0	3	1	
Без метастазів	26 (83,87)	5	13	8	0,472
3 метастазами	5 (16,13)	2	1	2	

p: вірогідність міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом визначали за точним тестом Фішера; p\*: статистичний аналіз даних не здійснили через відсутність зразків у деяких підгрупах.

**Таблиця 3.** Інтенсивність брунькування колоректальних карцином залежно від експресії імуногістохімічних маркерів,  $n = 31$

Клініко-морфологічна характеристика КРР	n (%)	Категорія брунькування			p
		Vd0–1	Vd2	Vd3	
Ki-67					
<10 %	3 (9,68)	1	2	0	0,114
10–25 %	17 (54,84)	6	6	5	
>25 %	11 (35,48)	0	6	5	
Caspase 3 high	15 (48,39)	4	7	4	0,811
Caspase 3 low	16 (51,61)	3	7	6	
$\beta$ -catenin high	20 (64,52)	5	10	5	0,620
$\beta$ -catenin low	11 (35,48)	2	4	5	

p: вірогідність міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом визначали за точним тестом Фішера.

КРР, що видається логічною і збігається з результатами наших спостережень, підсумовано твердженнями:

1. брунькування КРР треба оцінювати за допомогою H & E, коли немає ознак, що обмежують його визначення, наприклад, перитуморальне запалення, нетипова стромальна реакція, фрагментація залоз, тощо;
2. імуногістохімічне забарвлення (як надійніший інструмент візуалізації) треба застосовувати у випадках КРР, коли оцінювання за допомогою рутинного забарвлення H & E обмежене;
3. на імуногістохімічно забарвлених слайдах випадків КРР об'єктивний обрахунок бруньок можна здійснити завдяки цифровому програмному забезпеченню, наприклад на платформі Fijii.

## Висновки

1. Якщо кількість бруньок, що визначена стандартизованим методом забарвлення H & E, викликає



сумніви на межі категорій Vd1 і Vd2 або Vd2 і Vd3, можливе заниження ступеня брунькування порівняно з забарвленням імуногістохімічним методом, оскільки виключені хибно інтерпретовані морфологічні об'єкти як кластери пухлини. Найнадійніший імуногістохімічний маркер для контрастного визначення бруньок – коктейль із цитокератинів.

2. Перитуморальне брунькування інвазивного фронту з категорією Vd3 завжди супроводжувалось інтрамуральним брунькуванням різних ступенів інтенсивності.

3. Аналіз розподілу градацій брунькування колоректальних карцином за статтю, віком хворих, локалізацією, гістологічним ступенем диференціювання, наявністю метастазів не показав статистично достовірні відмінності ( $p > 0,05$ ). Це може свідчити про незалежність цього фактора та прогнозу виживаності пацієнтів.

4. Інтенсивність брунькування колоректальних карцином залежно від експресії маркерів Ki-67, caspase-3 та  $\beta$ -catenin не показала вірогідної різниці в підгрупах ( $p > 0,05$ ), але мала тенденцію до збільшення кількості бруньок із підвищенням індексу проліферації та зниженням активності проапоптотичного ензиму caspase-3.

**Перспективи подальших досліджень.** Продовження вивчення потребують відомості щодо впливу біологічних властивостей колоректальної аденокарциноми на прогноз перебігу неопластичного процесу та визначення оптимальної тактики ведення пацієнтів.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 22.05.2023

Після доопрацювання / Revised: 09.06.2023

Схвалено до друку / Accepted: 28.06.2023

#### Відомості про авторів:

Шпонька І. С., д-р мед. наук, професор, перший проректор Дніпровського державного медичного університету, Україна.  
ORCID ID: 0000-0002-7561-6489

Пославська О. В., д-р мед. наук, доцент, в. о. зав. каф. патологічної анатомії, судової медицини та патологічної фізіології, Дніпровський державний медичний університет, Україна.  
ORCID ID: 0000-0002-3133-8413

Хархаліс І. К., асистент каф. шкірних та венеричних хвороб, Ужгородський національний університет, Україна.  
ORCID ID: 0000-0001-9487-4785

Шинкаренко Т. В., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної анатомії, судової медицини та патологічної фізіології, Дніпровський державний медичний університет, Україна.  
ORCID ID: 0000-0002-3428-7949

#### Information about authors:

Shponka I. S., MD, PhD, DSc, Professor, First Vice-Rector of Dnipro State Medical University, Ukraine.

Poslavskaya O. V., MD, PhD, DSc, Associate Professor, Acting Head of the Department of Pathological Anatomy, Forensic Medicine and Pathological Physiology, Dnipro State Medical University, Ukraine.

Kharkhalis I. K., MD, Assistant of the Department of Skin and Venereal Diseases, Uzhhorod National University, Ukraine.

Shynkarenko T. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Anatomy, Forensic Medicine and Pathological Physiology, Dnipro State Medical University, Ukraine.

#### References

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Qu, Q., Wu, D., Li, Z., & Yin, H. (2023). Tumor budding and the prognosis of patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *International journal of colorectal disease*, 38(1), 141. <https://doi.org/10.1007/s00384-023-04423-8>
- Lugli, A., Zlobec, I., Berger, M. D., Kirsch, R., & Nagtegaal, I. D. (2021). Tumour budding in solid cancers. *Nature reviews. Clinical oncology*, 18(2), 101-115. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0422-y>
- Ulase, D., Heckl, S., Behrens, H. M., Krüger, S., & Röcken, C. (2020). Prognostic significance of tumour budding assessed in gastric carcinoma according to the criteria of the International Tumour Budding Consensus Conference. *Histopathology*, 76(3), 433-446. <https://doi.org/10.1111/his.13997>
- Lugli, A., Kirsch, R., Ajioka, Y., Bosman, F., Cathomas, G., Dawson, H., El Zimaity, H., Fléjou, J. F., Hansen, T. P., Hartmann, A., Kakar, S., Langner, C., Nagtegaal, I., Puppa, G., Riddell, R., Ristimäki, A., Sheahan, K., Smyrk, T., Sugihara, K., Terris, B., ... Quirke, P. (2017). Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumour Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern pathology*, 30(9), 1299-1311. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.46>
- Baidoun, F., Elshawi, K., Elkeraie, Y., Merjaneh, Z., Khoudari, G., Sarmini, M. T., Gad, M., Al-Husseini, M., & Saad, A. (2021). Colorectal Cancer Epidemiology: Recent Trends and Impact on Outcomes. *Current drug targets*, 22(9), 998-1009. <https://doi.org/10.2174/1389450121999201117115717>
- Chhikara, B. S., & Parang, K. (2023). Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chemical Biology Letters*, 10(1), 451-451.
- Mitrovic, B., Handley, K., Assarzagdegan, N., Chang, H. L., Dawson, H. A. E., Grin, A., Hutchins, G. G. A., Magill, L., Quirke, P., Riddell, R. H., Gray, R. G., Kirsch, R., & QUASAR Collaborative Group (2021). Prognostic and Predictive Value of Tumor Budding in Colorectal Cancer. *Clinical colorectal cancer*, 20(3), 256-264. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2021.05.003>
- Fedorenko, Z. P., Hulak, L. O., Mykhailovych, Yu. Y., Horokh, Ye. L., Ryzhov, A. Yu., Sumkina, O. V., & Kutsenko, L. B. (2021). Rak v Ukraini, 2019-2020. Zakhvoriuvaniist, smertnist, pokaznyky dialnosti onkologichnoi sluzhby [Cancer in Ukraine, 2019-2020. Morbidity, mortality, performance indicators of the oncology service]. *Bulletin of the National Chancery Register of Ukraine*, 22. [in Ukrainian]. [http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL\\_22/](http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_22/)
- Marx, A. H., Mickler, C., Sauter, G., Simon, R., Terracciano, L. M., Izbicki, J. R., & Clauditz, T. S. (2020). High-grade intratumoral tumor budding is a predictor for lymphovascular invasion and adverse outcome in stage II colorectal cancer. *International journal of colorectal disease*, 35(2), 259-268. <https://doi.org/10.1007/s00384-019-03478-w>
- Zlobec, I., & Lugli, A. (2018). Tumour budding in colorectal cancer: molecular rationale for clinical translation. *Nature reviews. Cancer*, 18(4), 203-204. <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.1>
- Vareniuk I. M., & Dzerzhynskiy M. E. (2019). *Metody tsyto-histolohichnoi diahnozistyky* [Methods of cyto-histological diagnosis]. Kyiv: Interservis. [in Ukrainian].
- Nguyen, T. (2022). *Immunohistochemistry: A Technical Guide to Current Practices*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Melling, N., Kowitz, C. M., Simon, R., Bokemeyer, C., Terracciano, L., Sauter, G., Izbicki, J. R., & Marx, A. H. (2016). High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *Journal of clinical pathology*, 69(3), 209-214. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-202985>
- Shams, T. M., Atwa, M. M., & Shams, M. E. (2012). Negative correlation between caspase-3 and COX-2 expression in colon cancer. *Egyptian Journal of Pathology*, 32(1), 68-74. <https://doi.org/10.1097/01.xej.0000417555.65230.8d>
- Kazem, A., Sayed, K. E., & Kern, Y. E. (2014). Prognostic significance of COX-2 and  $\beta$ -catenin in colorectal carcinoma. *Alexandria journal of medicine*, 50(3), 211-220. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2013.05.007>
- Poslavskaya, O. V. (2015). Metodolohiia vykorystannia prohramnoho zabezpechennia dia analizu tsyfrovoykh mikrofotohrafii na bazi kursu patomorfologii z metoiu pidvyshchennia profesiinoho rivnia studentiv i naukotsiv [The methodology of using software for the analysis of digital photomicrographs based on the course of pathomorphology in order to improve the professional level of students and scientists]. *Morphologia*, 9(3), 122-126. [in Ukrainian].
- Strakhova, O. P., & Androsov, O. I. (2021). *Statystychni metody opratsiuvannia rezul'tativ medyko-biologichnykh doslidzhen* [Statistical methods of processing the results of medical and biological research]. Lviv: Karavela. [in Ukrainian].



# Оцінювання виразності депресивних станів і їхній зв'язок із супутнім цукровим діабетом 2 типу, ожирінням у хворих на хронічну серцеву недостатність ішемічного походження

К. М. Боровик<sup>ID</sup>\*, А. В. С. Д., Н. Г. Риндіна<sup>ID</sup>\*, А. Е., О. І. Кадикова<sup>ID</sup>\*, С. Д., П. Г. Кравчун<sup>ID</sup>\*, Е. Ф.

Харківський національний медичний університет, Україна

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

**Мета роботи** – оцінити поширеність і виразність депресивних розладів у хворих на хронічну серцеву недостатність (ХСН) ішемічного походження залежно від наявності супутніх цукрового діабету 2 типу, ожиріння та їх поєднаного перебігу, а також визначити вплив метаболічних порушень на розвиток депресії в цих пацієнтів.

**Матеріали та методи.** У дослідження залучили 154 хворих на ХСН ішемічного ґенезу. У 1 групі – пацієнти з ХСН на фоні ішемічної хвороби серця (ІХС), цукрового діабету 2 типу (ЦД 2 типу) й ожиріння (n = 42); другу групу склали хворі на ХСН, ІХС і супутній ЦД 2 типу (n = 46); третю – із супутнім ожирінням (n = 36). Четверту групу (зіставлення) сформовано з хворих з ознаками ХСН ішемічного ґенезу без метаболічних порушень (n = 30). Для оцінювання наявності та характеру депресивних порушень використали шкалу Бека (Beck Depression Inventory).

**Результати.** У 60 % хворих на ізольовану ХСН ішемічного ґенезу виявлено депресію, згідно з результатами оцінювання за шкалою Бека. У 2 групі депресію встановили у 80,6 % випадків, у 3 групі – у 91,3 % пацієнтів. Депресивні розлади мали 95,2 % хворих із 1 групи (із ХСН при ІХС, комбінацією ЦД 2 типу й ожиріння).

У хворих 1 групи середнє значення балів вірогідно перевищувало таке у пацієнтів 4 групи (майже вдвічі). Порівняння балів у хворих 2, 3 груп із параметрами 4 групи показало їх підвищення на 57 % і 36 % відповідно.

Проаналізувавши тяжкість депресивного розладу, встановили: в третини хворих на ХСН ішемічного ґенезу на тлі поєднаного перебігу ЦД 2 типу виявлено легку депресію, у чверті пацієнтів визначили прояви помірної депресії, 9,5 % осіб мали тяжку, 4,8 % – легку депресію.

**Висновки.** Наявність метаболічних порушень, як-от цукрового діабету 2 типу, асоціюється з виникненням депресії у хворих на хронічну серцеву недостатність ішемічного походження. Поєднаний перебіг цукрового діабету 2 типу та ожиріння – фактор ризику виникнення депресії та її прогресування до виразної / тяжкої форми.

## Ключові слова:

хронічна серцева недостатність, ожиріння, цукровий діабет 2 типу, депресія.

## Патологія. 2023.

Т. 20, № 2(58).

С. 141-146

## \*E-mail:

borovyk.kateryna@gmail.com

## The assessment of the depressive states severity and their relationship with concomitant type 2 diabetes and obesity in patients with chronic heart failure of ischemic origin

K. M. Borovyk, N. H. Ryndina, O. I. Kadykova, P. H. Kravchun

**The aim** is to assess the prevalence and expressiveness of depressive disorders in patients with chronic heart failure (CHF) of the ischemic origin, depending on the presence of concomitant type 2 diabetes mellitus (T2DM), obesity and their combined course, as well as to assess the influence of existing metabolic disorders on the development of depression in individuals of this cohort.

**Materials and methods.** The study included 154 patients with CHF of ischemic origin. Group 1 included patients with CHF with coronary heart disease (CHD), T2DM and obesity (n = 42). The second group consisted of patients with CHF on the background of CHD with concomitant T2DM (n = 46), and the third group – with concomitant obesity (n = 36).

The comparison group was formed from patients who had signs of CHF of ischemic origin without metabolic disorders (n = 30). The Beck Depression Inventory (BDI) was used to assess the presence and nature of depressive disorders.

**Results.** In patients with isolated CHF of ischemic origin, depression was found in 60 % of cases, according to BDI. In the second group depression was manifested in 80.6 % of cases, and in the third group – in 91.3 % of cases. 95.2 % of patients of the first group had depressive disorders. The average value of scores in patients of the first group significantly exceeded that of the patients of the fourth group by almost two times.

Comparing the scores of patients of the second and third groups with the fourth group determined their increase by 57 % and 36 %, respectively. It was established that in patients with CHF of ischemic origin against the background of the combined course of T2DM, mild depression was found in 1/3 of patients, a quarter of patients had manifestations of moderate depression, 9.5 % of patients had severe depression and 4.8 % of people in this group had symptoms of mild depression.

**Conclusions.** The presence of type 2 diabetes mellitus is associated with the development of depression in patients with chronic heart failure of ischemic origin. The combined course of type 2 diabetes mellitus and obesity is a risk factor for the development of depression and its progression to a marked/severe form.

## Key words:

heart failure, obesity, type 2 diabetes mellitus, depression.

## Pathologia, 2023.

20(2), 141-146

Ішемічна хвороба серця (ІХС) і депресія – основні захворювання, що становлять велику загрозу для здоров'я населення. Відомо, що вони можуть мати несприятливий взаємний вплив у разі одночасного перебігу [1]. З одного боку, в пацієнтів з ІХС частіше діагностують психічні розлади, оскільки вони зазвичай спонтанно мають неприємні симптоми (як-от стенокардія) і змушені приймати кілька видів ліків протягом усього життя; це спричиняє появу негативних емоцій, особливо тривоги, або депресії [2]. Статистичні дані останніх досліджень показали, що у 20–30 % пацієнтів із захворюваннями серця діагностовано тривожність або депресивні розлади [3]. Відомо, що відсоток пацієнтів із тривожно-депресивними проявами зростає до 15–43 % протягом року після гострої серцевої події [4]. З іншого боку, в пацієнтів із хронічним коронарним синдромом, котрі мали депресію в анамнезі, зафіксували вдвічі вищий рівень смертності, значно більшу частоту основних несприятливих серцево-судинних подій і гіршу якість життя протягом 12 місяців спостереження порівняно з пацієнтами без депресії [5].

Завдяки кільком патологічним та епідеміологічним дослідженням стало відомо, що депресія може бути тригером імунного запалення через активацію прозапальних цитокінів [6,7], а також ініціює порушення функції ендотелію та тромбоцитів [8]. Сукупність цих факторів може спричинити виникнення та прогресування ІХС, а отже і хронічної серцевої недостатності (ХСН).

У когортному дослідженні, що здійснене в Сполучених Штатах Америки в 2007–2016 роках, встановили: поширеність депресії серед пацієнтів із ХСН становила 17 % [9]. Разом із тим, дослідники з Південної Африки виявили майже 54 % пацієнтів із депресивним розладом на тлі ХСН [10].

Показано зв'язок із серцевими захворюваннями. Так, ризик виникнення великої повторної серцево-судинної події в пацієнтів із легкими та важкими симптомами депресії в 1,96 і 2,81 раза відповідно вищий, ніж у хворих без симптомів депресії [11].

Згідно з даними Міжнародної діабетичної федерації за 2021 рік, глобальна захворюваність на цукровий діабет (ЦД) становить 10,5 %, і прогнозують, цей показник зростає до 12,2 % до 2045 року. ЦД – одна з глобальних подій з надзвичайно швидким поширенням у сфері охорони здоров'я XXI століття [12].

Депресія є поширеним супутнім захворюванням ЦД 2 типу. У дослідженні International Prevalence and Treatment of Diabetes and Depression (INTERPRET-DD) показано: частота виявлення великого депресивного розладу в пацієнтів із T2DM становила майже 10,6 % [13].

У багатьох дослідженнях показано: ожиріння є незалежним фактором ризику серцево-судинних захворювань. Адипокіни, що вивільняються жировою тканиною, можуть спричинити ендотеліальну дисфункцію, системне запалення та резистентність до інсуліну, що може підвищити ризик прогресування атеросклерозу [14].

Отже, можна припустити, що є спільні патогенетичні ланки, завдяки яким депресія й ожиріння можуть взаємно стимулювати відповідні патофізіологічні

механізми, щоб спричинити ішемічну хворобу серця та, як наслідок, ХСН.

## Мета роботи

Оцінити поширеність і виразність депресивних розладів у хворих на хронічну серцеву недостатність ішемічного походження залежно від наявності супутніх цукрового діабету 2 типу, ожиріння та їх поєданого перебігу, а також визначити вплив метаболічних порушень на розвиток депресії в цих пацієнтів.

## Матеріали і методи дослідження

У дослідження залучили 154 хворих на ХСН ішемічного ґенезу, які перебували на лікуванні в кардіологічному відділенні КЗОЗ «Міська клінічна лікарня № 27» ХМР. Хворих поділили на групи залежно від виявлених метаболічних порушень. У 1 групу залучили пацієнтів із ХСН на фоні ІХС, ЦД 2 типу й ожирінням (n = 42). Другу групу склали хворі на ХСН, ІХС і супутній ЦД 2 типу (n = 46), третю – із супутнім ожирінням (n = 36). Групу зіставлення (четверту) сформовано з хворих, які мали ознаки ХСН ішемічного ґенезу без метаболічних порушень (n = 30). Групи обстежених зіставні за віком і статтю пацієнтів.

Для оцінювання наявності та характеру депресивних порушень використали шкалу Бека (Beck Depression Inventory) [15]. Це один із перших тестів, що вирізняється високою релевантністю та специфічністю, розроблений для використання у клінічній практиці для діагностики й оцінювання рівня депресивних розладів. Опитувальник обрали, ґрунтуючись на даних низки робіт, пов'язаних із соматичним здоров'ям, що доцільно під час анкетування пацієнтів із кардіоваскулярною патологією та метаболічними розладами. Опитувальник включає 21 групу запитань. Для відповіді на кожне запитання запропоновано обрати пункти (відповідають кількості балів) – 0, 1, 2 або 3, що найкраще описують самопочуття пацієнта протягом останнього тижня. Пункти 1–13 належать до когнітивно-афективної субшкали, 14–21 – субшкали соматичних проявів депресії. Сума балів, що дорівнює 10 балів і більше, свідчить про наявність депресії, 10–15 – субдепресії чи легкої депресії, 16–19 – помірної, 20–29 – вираженої, 30–63 – тяжкої депресії. Шкала депресії Бека допомагає оцінити динаміку депресивних розладів, що в перспективі нашого дослідження дасть змогу застосовувати обрану методику для визначення якості лікувальної стратегії.

Дослідження схвалені комісією з питань біомедичної етики Харківського національного медичного університету та здійснені відповідно до принципів біоетики, що викладені в Гельсінській декларації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людей» і «Загальній декларації про біоетику та права людини (ЮНЕСКО)». Усі учасники надали письмову інформовану згоду на участь.

Статистично результати опрацювали за допомогою програми Statistica, версія 10.0. Для оцінювання різниці показників, що вивчали, застосували критерій F Фішера. Для визначення відносного ризику

**Таблиця 1.** Бали за шкалою депресії в пацієнтів з ізольованою ХСН ішемічного ґенезу та при поєднанні метаболічних порушень

Показник	ХСН			
	ІХС + ЦД 2 типу + ожиріння (n = 42)	ІХС + ЦД 2 типу (n = 46)	ІХС + ожиріння (n = 36)	ІХС (n = 30)
Бали за шкалою депресії Бека	19,39 ± 0,93	15,48 ± 0,71 P <sub>1,2</sub> < 0,01	13,32 ± 0,54 P <sub>1,3</sub> < 0,01	9,80 ± 0,42 P <sub>1,4</sub> < 0,01 P <sub>2,4</sub> < 0,01 P <sub>3,4</sub> < 0,01

**Таблиця 2.** Тяжкість депресивних розладів у хворих на ХСН ішемічного ґенезу й супутні метаболічні патології, n (%)

Показник	Хворі на ХСН			
	ІХС + ЦД 2 типу + ожиріння (n = 42)	ІХС + ЦД 2 типу (n = 46)	ІХС + ожиріння (n = 36)	ІХС (n = 30)
Депресії немає	2 (4,8 %)	4 (8,7 %)	7 (19,4 %)	12 (40,0 %)
Депресія легка	14 (33,5 %)	24 (52,2 %)	20 (55,6 %)	18 (60,0 %)
Депресія помірна	11 (26,2 %)	10 (21,7 %)	9 (25,0%)	–
Депресія виразна	11 (26,0 %)	7 (15,2 %)	–	–
Депресія тяжка	4 (9,5 %)	1 (3,1 %)	–	–

(вплив ожиріння та/або ЦД 2 типу на виникнення депресивних розладів) розраховували відношення шансів (ВШ). Як відсутність зв'язку визначали ВШ, що дорівнювало 1; як позитивний зв'язок – ВШ >1; як негативний результат (низький ризик) – ВШ <1. Довірчий інтервал (ДІ) – діапазон значень, у межах якого з імовірністю 95 % знаходиться прогностичне значення ВШ. Відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

## Результати

На рис. 1 наведено аналіз проявів депресії у хворих на ХСН ішемічного ґенезу залежно від наявності та характеру супутніх метаболічних порушень. У 60 % пацієнтів з ізольованою ХСН ішемічного ґенезу, які залучені в 4 групу, виявлено депресію за шкалою Бека. У 2 групі (хворі на ХСН при ІХС і ЦД 2 типу) депресію встановили у 80,6 % випадків, у 3 групі (пацієнти з ХСН при ІХС та ожирінні) – у 91,3 %. Депресивні розлади мали 95,2 % хворих першої групи (пацієнти з ХСН, ІХС і комбінацією ЦД 2 типу та ожиріння). Такі результати свідчать про значно більшу поширеність депресивних розладів у хворих на ХСН за тлі метаболічних порушень.

У таблиці 1 наведено бали за шкалою Бека, що одержали під час опитування. У хворих 1 групи середнє значення балів достовірно перевищувало таке в пацієнтів 4 групи (майже вдвічі). Порівняння балів у хворих 2 і 3 груп з параметрами 4 групи показало їх збільшення на 57 % і 36 % відповідно. Тобто у хворих на ХСН при ІХС спостерігали збільшення середніх значень балів депресії за шкалою Бека, якщо в них були метаболічні порушення (ЦД 2 типу, ожиріння чи їх комбінації), порівняно з пацієнтами з ізольованою ХСН ішемічного ґенезу. Проаналізували зміни рівнів балів за шкалою депресії Бека у підгрупах пацієнтів із ХСН залежно від характеру супутніх метаболічних порушень. Встановили, що бали за шкалою депресії Бека у хворих на ХСН ішемічного ґенезу та ЦД 2 типу вищі на 16,2 %, ніж при коморбідності ХСН, ІХС та ожиріння. Зіставлення балів за шкалою депресії в пацієнтів із ХСН при ІХС та комбінації метаболічних

порушень (ЦД 2 типу та ожиріння) з параметром підгрупи хворих на ХСН і ЦД 2 типу або ХСН та ожиріння визначило відмінності. Так, у хворих 1 групи бали за шкалою депресії достовірно перевищували такі у пацієнтів 2 і 3 груп – на 45,5 % і 16,2 % відповідно.

У результаті дослідження виявлено, що за наявності метаболічних порушень відбувається погіршення емоційного стану хворих на ХСН, особливо в підгрупі з поєднаним перебігом ЦД 2 типу й ожиріння.

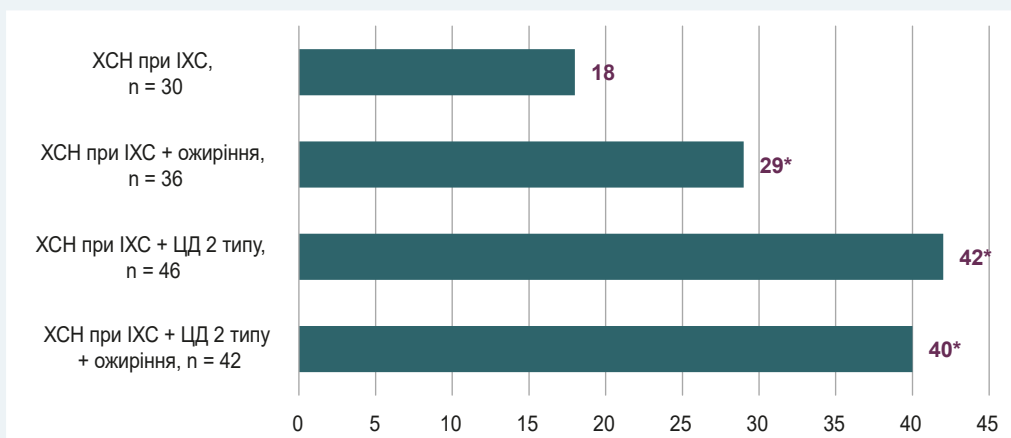
Втім, збільшення кількості балів депресії не відбиває тяжкість змін емоційного стану у хворих на ХСН ішемічного ґенезу при супутньому ЦД 2 типу, ожирінні чи їх поліморбідності. Тому наступний етап дослідження – аналіз тяжкості депресивних розладів у пацієнтів із ХСН відповідно до супутньої патології. Результати наведено в таблиці 2.

У результаті аналізу груп хворих визначили: частина обстежених не мали ознак депресії, а в осіб із депресією встановили різні ступені тяжкості її перебігу (легка, помірна, виразна, тяжка).

У хворих на ізольовану ХСН ішемічного ґенезу визначили тільки прояви легкої депресії. Проаналізувавши параметри пацієнтів з ХСН при ІХС, які мали супутній ЦД 2 типу або ожиріння, встановили переважання осіб із легкою депресією (52,0 % і 55,6 % відповідно); менше хворих із цих груп мали помірно виражену депресію: 1/5 обстежених із коморбідним перебігом ХСН при ІХС та ЦД 2 типу, 1/4 осіб з ожирінням. Виразну і тяжку депресію у хворих з ХСН ішемічного ґенезу на тлі супутнього ожиріння не виявили. Інші результати одержали у групі хворих на ХСН при ІХС і ЦД 2 типу: 2,4 % контингенту мали ознаки тяжкої депресії, 15,2 % – виразної.

У групі ХСН ішемічного ґенезу на тлі поєданого перебігу ЦД 2 типу й ожиріння встановили такий розподіл хворих залежно від тяжкості проявів депресії: в 1/3 хворих – легка, в 1/4 – помірна. Виявили збільшення відсотка осіб цієї групи з виразною депресією – більше ніж в 1/4 випадків. Крім того, 9,5 % хворих на ХСН ішемічного походження, поєднаний перебіг ЦД 2 типу й ожиріння мали тяжку депресію, за результатами оцінювання за шкалою Бека. Легкий перебіг депресії визначили тільки у 4,8 % осіб цієї групи.





**Рис. 1.** Поширеність депресії у хворих на ХСН ішемічного ґенезу на тлі супутніх метаболічних розладів.

\*:  $p < 0,05$  порівняно з групою хворих на ХСН ішемічного ґенезу.

**Таблиця 3.** Вплив ожиріння та ЦД 2 типу на розвиток депресії в пацієнтів із ХСН ішемічного ґенезу

Показник	Депресія у хворих з ХСН при ІХС		
	ВШ (95 % ДІ)	95 % ДІ	p
Ожиріння	2,7	0,6098–12,5097	0,1800
ЦД 2 типу	7,1667	1,4070–36,5038	0,0177
ЦД 2 типу + ожиріння	30,0	4,4782–200,9700	0,0005

**Таблиця 4.** Вплив ожиріння та ЦД 2 типу на розвиток виразної / тяжкої депресії у хворих на ХСН ішемічного ґенезу

Показник	Депресія у хворих на ХСН при ІХС		
	ВШ (95 % ДІ)	95 % ДІ	p
ЦД 2 типу + ожиріння	2,6584	1,0315–6,8511	0,0429

Для оцінювання впливу метаболічних порушень на розвиток депресивних розладів використали відношення шансів. У таблиці 3 наведені показники ВШ та довірчого інтервалу впливу ожиріння та ЦД 2 типу на виникнення депресивних розладів у хворих на ХСН ішемічного походження.

За даними, що наведені в таблиці 3, наявність ЦД 2 типу мала вірогідний вплив на виникнення депресивних розладів у хворих на ХСН ішемічного ґенезу. Отже, за результатами дослідження, і ЦД 2 типу, і його поєднання з ожирінням можна вважати фактором ризику розвитку депресії у хворих на ХСН при ІХС. У пацієнтів із ХСН ішемічного ґенезу комбінація метаболічних порушень (ЦД 2 типу й ожиріння) мала сильніший вплив на вираженість депресивних розладів, ніж наявність лише ЦД 2 типу ( $p = 0,0005$  проти  $p = 0,0177$ ).

Поєднання ЦД 2 типу й ожиріння асоціювалося зі збільшенням ризику розвитку виразної / тяжкої депресії у хворих на ХСН ішемічного походження порівняно з пацієнтами з ХСН і ЦД 2 типу (ВШ 95 % ДІ 2,6584; 95 % ДІ 1,0315–6,8511;  $p = 0,0429$ ) (табл. 4).

У нашому дослідженні встановили, що метаболічні порушення у хворих на ХСН ішемічного ґенезу впливали на поширеність депресивних розладів і їхню тяжкість. Зауважимо, що ЦД 2 типу істотніше впливав на виразність депресії, ніж ожиріння, адже при коморбідності ХСН та ожиріння не зафіксували випадки виразної чи тяжкої депресії. На відміну від групи хворих на ХСН і супутнє ожиріння, при поєдна-

нню перебігу ХСН і ЦД 2 типу майже в 1/5 обстежених діагностували виразну / тяжку депресію. Комбінація ЦД 2 типу й ожиріння у хворих на ХСН при ІХС збільшила відсоток випадків виразної / тяжкої депресії (більш ніж третина від усіх хворих із групи).

## Обговорення

Результати дослідження збігаються з даними A. Fetahi et al., які виявили помірні депресивні розлади у майже 22 % хворих на ХСН та ожиріння або неконтрольований діабет [16]. За даними Y. Wang et al., протягом 2-річного періоду спостереження у 10 % хворих на ХСН і супутній ЦД 2 типу зафіксували прояви тяжкого депресивного епізоду [17]. Luppino F. S. et al. у мета-аналізі (8 багаторічних досліджень) зробили висновок про наявність двобічного зв'язку між депресією та ожирінням [18]. Автори встановили, що у хворих на ожиріння ризик виникнення депресії з часом підвищується на 55 %, а в пацієнтів із депресією ризик ожиріння зростає на 58 %. Крім того, зв'язок між ожирінням і депресією сильніший, ніж зв'язок між надмірною вагою та депресією.

У когортному дослідженні Tae Kyung Yoo et al. показано негативний вплив збільшення кількості ментальних розладів, як-от депресія, тривожність, біполярні розлади, безсоння та шизофренія, на перебіг ХСН у когорті хворих на ЦД 2 типу [19]. Дослідження показало найбільший вплив прогресування ментальних порушень на збільшення ризиків декомпенсації ХСН в осіб віком  $\leq 40$  років.

У дослідженні C. Polcwiartek et al., в яке залучили 20 906 учасників – громадян США, виявили: клінічну СН у пацієнтів із тяжкими психічними розладами (шизофренія, біполярний розлад і тяжка депресія) виявляли на 7 років раніше, ніж у загальній популяції [20]. Найвищі показники смертності в цій когорті хворих встановили в чоловіків із тяжкими психічними розладами порівняно з особами без ментальних порушень. Втім, у цьому дослідженні не оцінювали ризик СН.

У роботі R. E. Roberts і H. T. Duong, які здійснили дослідження із залученням підліткового контингенту, не виявлено незалежний зв'язок між депресією та ожирінням, а зв'язок пояснено факторами образу тіла

[21]. За даними J. R. Vittengl, зв'язок між ожирінням і депресією значущий тільки в жінок, зважаючи на емоційні, фізичні та соціальні особливості [22].

## Висновки

1. Вищі бали за шкалою депресії Бека встановили у хворих на хронічну серцеву недостатність ішемічного ґенезу при коморбідності цукрового діабету 2 типу, ожиріння або поєднаного перебігу цих метаболічних патологій порівняно з параметрами пацієнтів з ізольованою хронічною серцевою недостатністю на тлі ішемічної хвороби серця. У групі хворих на хронічну серцеву недостатність ішемічного походження та при поєднанні хронічної серцевої недостатності з цукровим діабетом 2 типу або ожирінням переважали особи з легкою депресією (52–60 %). Поєднаний перебіг цукрового діабету 2 типу й ожиріння в пацієнтів із хронічною серцевою недостатністю на тлі ішемічної хвороби серця знижує відсоток випадків із проявами легкої депресії до 1/3 від загальної кількості осіб у групі. В 1/5–1/4 пацієнтів із хронічною серцевою недостатністю ішемічного ґенезу діагностовано помірну депресію (залежно від супутнього цукрового діабету 2 типу або ожиріння). Коморбідність цукрового діабету 2 типу або його комбінації з ожирінням у хворих на хронічну серцеву недостатність (прояв ішемічної хвороби серця) характеризується високим відсотком випадків виразної / тяжкої депресії (до 26 %).

2. Наявність метаболічних порушень, як-от цукрового діабету 2 типу, асоціюється з виникненням депресії в пацієнтів із хронічною серцевою недостатністю ішемічного походження. Поєднаний перебіг цукрового діабету 2 типу й ожиріння – фактор ризику виникнення депресії та її прогресування до виразної / тяжкої форми. У хворих на хронічну серцеву недостатність на тлі ішемічної хвороби серця наявність комбінації супутніх цукрового діабету 2 типу й ожиріння є впливовішим фактором ризику виникнення депресивних розладів, ніж поєднання ХСН лише з цукровим діабетом 2 типу.

**Перспективи подальших досліджень.** Після детальнішого дослідження зв'язку між прогресуванням депресії та наявністю метаболічних розладів у пацієнтів із серцевою недостатністю важливим кроком є персоналізація лікувально-діагностичної стратегії цих хворих.

## Фінансування

Дослідження виконане в рамках НДР Харківського національного медичного університету: «Розробка стратегії діагностики, лікування та прогнозування перебігу хронічної серцевої недостатності ішемічного ґенезу на тлі метаболічних порушень», за програмою наукових досліджень і розробок, що фінансується з державного бюджету, держреєстрація № 0122U000119 (2022–2024).

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 19.05.2023

Після доопрацювання / Revised: 05.06.2023

Схвалено до друку / Accepted: 16.06.2023

## Відомості про авторів:

Боровик К. М., канд. мед. наук, доцент каф. внутрішньої медицини № 2, клінічної імунології та алергології імені академіка А. Т. Малої, Харківський національний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0003-2155-4865](https://orcid.org/0000-0003-2155-4865)

Риндіна Н. Г., д-р мед. наук, професор каф. внутрішньої медицини № 2, клінічної імунології та алергології імені академіка А. Т. Малої, Харківський національний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0003-2731-4491](https://orcid.org/0000-0003-2731-4491)

Кадикова О. І., д-р мед. наук, професор каф. внутрішньої медицини № 2, клінічної імунології та алергології імені академіка А. Т. Малої, Харківський національний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-0108-0597](https://orcid.org/0000-0002-0108-0597)

Кравчун П. Г., д-р мед. наук, професор каф. внутрішньої медицини № 2, клінічної імунології та алергології імені академіка А. Т. Малої, Харківський національний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-8285-6763](https://orcid.org/0000-0002-8285-6763)

## Information about the authors:

Borovyk K. M., PhD, Associate Professor of the Department of Internal Medicine 2, Clinical Immunology and Allergology named after Academician L. T. Malaya, Kharkiv National Medical University, Ukraine.

Ryndina N. H., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Internal Medicine 2, Clinical Immunology and Allergology named after Academician L. T. Malaya, Kharkiv National Medical University, Ukraine.

Kadykova O. I., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Internal Medicine 2, Clinical Immunology and Allergology named after Academician L. T. Malaya, Kharkiv National Medical University, Ukraine.

Kravchun P. H., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Internal Medicine 2, Clinical Immunology and Allergology named after Academician L. T. Malaya, Kharkiv National Medical University, Ukraine.

## References

- Dixon, D. D., Xu, M., Akwo, E. A., Nair, D., Schlundt, D., Wang, T. J., Blot, W. J., Lipworth, L., & Gupta, D. K. (2022). Depressive Symptoms and Incident Heart Failure Risk in the Southern Community Cohort Study. *JACC. Heart failure*, 10(4), 254-262. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2021.11.007>
- Wu, Y., Chen, Z., Duan, J., Huang, K., Zhu, B., Yang, L., & Zheng, L. (2021). Serum Levels of FGF21, β-Klotho, and BDNF in Stable Coronary Artery Disease Patients With Depressive Symptoms: A Cross-Sectional Single-Center Study. *Frontiers in psychiatry*, 11, 587492. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.587492>
- Larsen, K. K., Vestergaard, C. H., Schougaard, L. M., Larsen, L. P., Jessen, A., May, O., & Hjollund, N. H. (2016). Contacts to general practice and antidepressant treatment initiation after screening for anxiety and depression in patients with heart disease. *Danish medical journal*, 63(2), A5185.
- Murphy, B., Le Grande, M., Alvarenga, M., Worcester, M., & Jackson, A. (2020). Anxiety and Depression After a Cardiac Event: Prevalence and Predictors. *Frontiers in psychology*, 10, 3010. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.03010>
- De Luca, L., Temporelli, P. L., Amico, A. F., Gonzini, L., Ugucioni, M., Varani, E., Brunetti, N. D., Colivicchi, F., Gabrielli, D., & Gulizia, M. M. (2021). Impact of history of depression on 1-year outcomes in patients with chronic coronary syndromes: An analysis of a contemporary, prospective, nationwide registry. *International journal of cardiology*, 331, 273-280. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2020.12.086>
- Horowitz, M. A., & Zunszain, P. A. (2015). Neuroimmune and neuroendocrine abnormalities in depression: two sides of the same coin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1351, 68-79. <https://doi.org/10.1111/nyas.12781>
- Gold, S. M., & Irwin, M. R. (2009). Depression and immunity: inflammation and depressive symptoms in multiple sclerosis. *Immunology and allergy clinics of North America*, 29(2), 309-320. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2009.02.008>
- Von Känel, R. (2004). Platelet hyperactivity in clinical depression and the beneficial effect of antidepressant drug treatment: how strong is the

- evidence?. *Acta psychiatrica Scandinavica*, 110(3), 163-177. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2004.00308.x>
9. Chobufo, M. D., Khan, S., Agbor, V. N., Rahman, E., Foryoung, J. B., Jolayemi, A., Jonnadula, S., Patel, N., Enoru, S., Dufresne, A., & Nfor, T. (2020). 10-Year trend in the prevalence and predictors of depression among patients with heart failure in the USA from 2007-2016. *International journal of cardiology*, 301, 123-126. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.09.028>
  10. Tsabedze, N., Kinsey, J. H., Mpanya, D., Mogashoa, V., Klug, E., & Manga, P. (2021). The prevalence of depression, stress and anxiety symptoms in patients with chronic heart failure. *International journal of mental health systems*, 15(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s13033-021-00467-x>
  11. Dadkhah-Tirani, H., Salari, A., Ashouri, A., Nouri-Saeed, A., & Javazadeh-Moghtader, A. (2020). Depressive symptoms and major adverse cardiovascular events: 12-month follow-up in patients undergoing angiography. *ARYA atherosclerosis*, 16(4), 185-191. <https://doi.org/10.22122/arya.v16i4.1955>
  12. Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B. B., Stein, C., Basit, A., Chan, J. C. N., Mbanya, J. C., Pavkov, M. E., Ramachandaran, A., Wild, S. H., James, S., Herman, W. H., Zhang, P., Bommer, C., Kuo, S., Boyko, E. J., & Magliano, D. J. (2022). IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice*, 183, 109119. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119>
  13. Lloyd, C. E., Nouwen, A., Sartorius, N., Ahmed, H. U., Alvarez, A., Bahendeka, S., Basangwa, D., Bobrov, A. E., Boden, S., Bulgari, V., Burti, L., Chaturvedi, S. K., Cimino, L. C., Gaebel, W., de Girolamo, G., Gondek, T. M., de Braude, M. G., Guntupalli, A., Heinze, M. G., Ji, L., Xin, Y. (2018). Prevalence and correlates of depressive disorders in people with Type 2 diabetes: results from the International Prevalence and Treatment of Diabetes and Depression (INTERPRET-DD) study, a collaborative study carried out in 14 countries. *Diabetic medicine*, 35(6), 760-769. <https://doi.org/10.1111/dme.13611>
  14. Liu, L., Shi, Z., Ji, X., Zhang, W., Luan, J., Zahr, T., & Qiang, L. (2022). Adipokines, adiposity, and atherosclerosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 79(5), 272. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04286-2>
  15. Jackson-Koku, G. (2016). Beck Depression Inventory. *Occupational medicine*, 66(2), 174-175. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqv087>
  16. Fetahu, A., Rrustemi, K., Henein, M. Y., Bytyci, B., Mehmeti, F., Bytyci, I., & Kamberi, L. (2021). Obesity and Uncontrolled Diabetes Predict Depression in HF Patients. *Journal of clinical medicine*, 10(23), 5663. <https://doi.org/10.3390/jcm10235663>
  17. Wang, Y., Yang, H., Nolan, M., Burgess, J., Negishi, K., & Marwick, T. H. (2018). Association of depression with evolution of heart failure in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovascular diabetology*, 17(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0664-5>
  18. Luppino, F. S., de Wit, L. M., Bouvy, P. F., Stijnen, T., Cuijpers, P., Penninx, B. W., & Zitman, F. G. (2010). Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Archives of general psychiatry*, 67(3), 220-229. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.2>
  19. Yoo, T. K., Han, K. D., Rhee, E. J., & Lee, W. Y. (2023). Impact of mental disorders on the risk of heart failure among Korean patients with diabetes: a cohort study. *Cardiovascular diabetology*, 22(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s12933-023-01809-4>
  20. Polcwiartek, C., Loewenstein, D., Friedman, D. J., Johansson, K. G., Graff, C., Sørensen, P. L., Nielsen, R. E., Kragholm, K., Torp-Pedersen, C., Søgaard, P., Jensen, S. E., Jackson, K. P., & Atwater, B. D. (2021). Clinical Heart Failure Among Patients With and Without Severe Mental Illness and the Association With Long-Term Outcomes. *Circulation. Heart Failure*, 14(10), e008364. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.121.008364>
  21. Roberts, R. E., & Duong, H. T. (2015). Does major depression affect risk for adolescent obesity?. *Journal of affective disorders*, 186, 162-167. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.06.030>
  22. Vittengl, J. R. (2018). Mediation of the bidirectional relations between obesity and depression among women. *Psychiatry research*, 264, 254-259. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2018.03.023>

# The influence of acelysin and nimotop on the cellular response of the hippocampus during the dynamics of experimental subarachnoid hemorrhage

O. Yu. Polkovnikov<sup>1</sup> \*A,B,D,E,F, S. I. Tertyshnyi<sup>1</sup> C,E

Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine

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

**Aim.** Immunohistochemical study of rat hippocampal neurons and astrocytes at different time-points of experimental brain hemorrhage treated with acelysin and nimotop.

**Materials and methods.** Subarachnoid hemorrhage (SAH) was modeled according to R. V. Dudhani et al. using 35 Wistar rats which were divided into 7 groups. Animals of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> groups, for 4 and 7 days respectively received acelysin at a dose of 15 mg/kg once a day; animals of the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> groups received nimodipine at a dose of 0.3 mg/kg every 8 hours for 4 and 7 days. In groups 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> (control), SAH was modeled without treatment with observation periods of 4 and 7 days, respectively. The 7<sup>th</sup> group consisted of intact animals. Hippocampal CA1 fields were studied immunohistochemically evaluating the expression of CASP3, NeuN, GFAP by the relative area of immunostaining in ImageJ.

**Results.** CASP3 expression in hippocampal neurons increases by 2.3 and 5.7 times on day 4 and by 1.8 and 3.9 times on day 7 of experimental SAH (groups 1–4) compared to intact group. GFAP expression increases in all observation groups compared to intact animals with the maximum values in the 5<sup>th</sup> group – by 8.14 times. The dynamics of NeuN expression in hippocampal neurons when using acelysin and nimotop corresponds to the inverse dynamics of CASP3 expression. The NeuN expression increases maximally on the 7<sup>th</sup> day of acelysin use and is equal to 91.76 % of the intact group values.

**Conclusions.** The experimental SAH is accompanied by a change in the expression of CASP3, NeuN in neurons and GFAP in astrocytes. The use of acelysin and nimotop leads to decrease in CASP3 expression in hippocampal neurons on the 4<sup>th</sup> day by 3.82 and 1.54 times compared to control group, and on the 7<sup>th</sup> day by 4.00 and 1.84 times, respectively, which reflects the positive effect of the therapy on the prevention of apoptotic death of hippocampal neurons. Compared with nimotop, the use of acelysin significantly increases the expression of NeuN on day 4 and 7 – by 1.84 and 1.95 times, respectively, which indicates a more pronounced neuroprotective effect of acelysin on hippocampal neurons in SAH. Increased GFAP expression reflects the dynamic reactive remodeling of astrocytes, while the use of acelysin and nimotop does not affect the reduction of GFAP levels on days 4 and 7 of SAH and their return to baseline values. The results of the present experimental study provide a theoretical justification of the feasibility of including metabolotropic drugs in the basic therapy of SAH.

**Key words:**  
subarachnoid hemorrhage, cerebral aneurysm rupture, GFAP, NeuN, CASP3.

**Pathologia, 2023. 20(2), 147-153**

**\*E-mail:**  
aupolkovnikov@gmail.com

## Вплив ацелізіну та німотопу на клітинну відповідь гіпокампа в динаміці експериментального субарахноїдального крововиливу

О. Ю. Полковніков, С. І. Тертишний

**Мета роботи** – імуногістохімічне дослідження нейронів та астроцитів гіпокампа шурів у різні терміни експериментального крововиливу в умовах застосування ацелізіну та німотопу.

**Матеріали та методи.** Субарахноїдальний крововилив (САК) моделювали на 35 щурах лінії Вістар, яких поділили на 7 груп. Тварини 1 і 2 груп протягом 4 і 7 діб відповідно отримували ацелізіну у дозі 15 мг/кг один раз на добу; тварини 3 і 4 груп упродовж 4 і 7 діб одержували німодипін у дозі 0,3 мг/кг кожні 8 годин. У 5 і 6 групах (контрольні) моделювали САК без лікування, терміни спостереження – 4 і 7 діб відповідно. Інтактні тварини сформували 7 групу. Модель САК відтворена з урахуванням методики R. V. Dudhani et al. У гістологічних зразках поля CA1 гіпокампа за допомогою програми ImageJ оцінювали відносну площу імуногістохімічної експресії CASP3 та NeuN у нейронах, GFAP в астроцитах тварин усіх груп.

**Результати.** Експресія CASP3 у нейронах гіпокампа зростає у 2,3 та 5,7 раза на 4 добу, в 1,8 та 3,9 раза – на 7 добу експериментального САК (групи 1–4) щодо показника інтактної групи. Експресія GFAP суттєво зростає в усіх групах спостереження щодо параметрів інтактних тварин, максимальні показники зафіксовано в 5 групі – збільшення експресії в 8,14 раза. Динаміка експресії NeuN в нейронах гіпокампа при використанні ацелізіну й німотопу відповідає зворотній динаміці експресії CASP3. Експресія NeuN максимально підвищується на 7 добу використання ацелізіну і становить 91,76 % від показників інтактної групи.

**Висновки.** Розвиток САК в експерименті супроводжується зміною експресії CASP3, NeuN у нейронах і GFAP в астроцитах. Застосування ацелізіну й німотопу спричиняє зниження експресії CASP3 у нейронах гіпокампа на 4 добу в 3,82 та 1,54 раза порівняно з контрольною групою, на 7 добу – в 4,00 та 1,84 раза відповідно. Це відбиває позитивний вплив призначеної терапії щодо запобігання загибелі нейронів гіпокампа. Ацелізіну порівняно з німотопом суттєвіше підвищує експресію NeuN на 4 і 7 дні – в 1,84 і 1,95 раза відповідно. Це свідчить про більш виражений нейропротекторний вплив

**Ключові слова:**  
САК, розрив церебральної аневризми, GFAP, NeuN, CASP3.

**Патологія, 2023. Т. 20, № 2(58), С. 147-153**



ацелізіну на нейрони гіпокампа при САК. Посилення експресії GFAP при САК відбиває динамічне реактивне ремоделювання астроцитів, а використання ацелізіну та німотопу не впливає на зниження рівнів GFAP на 4, 7 добу САК і повернення їх до вихідних показників. Експериментальне дослідження теоретично обґрунтовує доцільність включення метаболіто-тропних препаратів до базисної терапії САК.

Rupture of cerebral arterial aneurysms in the majority of cases manifests by subarachnoid hemorrhage (SAH) of varying severity. The latter is complicated by the formation of parenchymal hematoma in 39.8 % and intraventricular hemorrhage in 44.3 % of cases [1].

The early complications of SAH at the first 72 hours are represented by the early brain injury, while during next 4–30 days delayed complications develop in form of delayed brain injury. Aneurysm rupture triggers pathophysiological processes that lead to brain damage and impairment of the latter's function. Neuronal death and damage to the endothelium leads to cytotoxic edema and destruction of the blood-brain barrier, followed by the development of vasogenic edema [2]. In addition, cell death is caused by insufficiency of microcirculation, microthrombosis, changes in ion homeostasis, excitotoxicity, oxidative stress, and neuronal edema [3]. Historically, it was believed that delayed cerebral ischemia (DCI) is a frequent complication of SAH and is one of the main causes of poor functional outcome. It was supposed that DCI is caused by cerebral vasospasm, but recent clinical trials failed to confirm this hypothesis. Since then, human and animal studies have evidenced the multifactorial pathophysiology of DCI [4].

In order to study the molecular mechanisms of SAH, as well as the action of potential neuroprotectors, the expression and synthesis of proteins that regulate the cell cycle and modulate compensatory cellular reactions during ischemia are currently being actively studied. Among these proteins, caspases play a special role being the main companions of cellular apoptosis / necrosis as well as strong instigators of the pro-inflammatory response [5], GFAP (glial fibrillary acidic protein), the marker of damage and reactive responses of astrocytes [6], as well as NeuN – loss of the immunoreactivity is indicative for neuronal damage.

Currently, both surgical and therapeutic methods are used to reduce the complications of aneurysmal subarachnoid hemorrhage, in particular delayed cerebral ischemia. According to previous studies, nimodipine treatment of aneurysmal subarachnoid hemorrhage reduces secondary ischemia and shows a favorable trend in mortality, and although nimodipine is a component of the most current guidelines for the drug therapy of SAH, there is no reliable confirmation of its effectiveness [7].

The search for pharmacological agents which can reduce complications of cerebral aneurysm rupture continues. One of such agents is aspirin. Regular use of aspirin can positively affect the risk of DCI and the outcomes of patients with SAH, without increasing the risk of clinically significant bleeding [8]. The injectable form of acetylsalicylic acid is acelysin, which properties increase its bioavailability and analgesic effect. The drug penetrates most body tissues, including synovial, cerebrospinal, and peritoneal fluids. It is hydrolyzed in the blood, forming acetylsalicylic acid and lysine. Lysine, in turn, is able to transform into pipercolic acid and increase the affinity of

GABA receptors, which leads to a decrease in anxiety and fear and providing anxiolytic effect. In addition, L-lysine reduces NMDA hyperexcitability, excitotoxicity, and preserves the viability of neurons in the hippocampus and sensorimotor cortex [9].

Thus, nimodipine and acelysin can be considered important elements of drug therapy of subarachnoid hemorrhage, necessary for the prevention of secondary complications of a cerebral aneurysm rupture. Despite some positive experience of using these drugs in the treatment of subarachnoid hemorrhages [10,11,12], their influence on the mechanisms of brain cellular damage, reactivity and death still remains insufficiently studied.

## Aim

Immunohistochemical study of rat hippocampal neurons and astrocytes at different time-points of experimental brain hemorrhage treated with acelysin and nimotop.

## Materials and methods

The experimental study was performed using 35 Wistar rats of both sexes weighing 170–230 g (10–12 weeks old), which underwent preliminary acclimatization for 14 days.

Care, maintenance and feeding of animals was carried out in standard conditions of a stable microclimate of the educational and scientific medical and laboratory center of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University under conditions of a 12-hour daylight. Animals were fed by standardized ration feed "Rezon-1" KP-120-1 with free access to food and water and exclusion of stress factors. Rats were housed in standard conventional polycarbonate cages (Tecniplast S.p.A., Italy) measuring 610 × 435 × 215 mm or 335 × 235 × 190 mm, 5 animals each.

Animals were divided into 7 experimental groups: animals receiving acelysin in a standard therapeutic dose (15 mg/kg once a day), animals receiving nimodipine in a standard therapeutic dose (0.3 mg/kg every 8 hours (8:00 a. m., 4:00 p. m. and 12:00 p. m.)), two control and one intact group:

- Group 1 – SAH treated with acelysin for 4 days (n = 5);
- Group 2 – SAH treated with acelysin for 7 days (n = 5);
- Group 3 – SAH treated with nimotop for 4 days (n = 5);
- Group 4 – SAH treated with nimotop for 7 days (n = 5);
- Group 5 (control) – SAH untreated, 4 days (n = 5);
- Group 6 (control) – SAH untreated, 7 days (n = 5);
- Group 7 – intact animals (n = 5).

Only healthy animals were included in the study. Before the beginning of the study, the commission on bioethics of the Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University checked and approved the study protocol, as well as all procedures related to the maintenance of animals, their humane treatment and their use in the experiment. All procedures were conducted according to

the European convention for the protection of vertebrate animals (Strasbourg, 18 March 1986; ETS No. 123) and the Directive 2010/63/EU.

**Experiment design:** The SAH was modeled according to R. V. Dudhani et al. [13], but without aspiration of cisternal cerebrospinal fluid and with a single injection of autoblood. Anesthesia was performed by slow intravenous administration of sodium thiopental 40 mg/kg through the tail vein using a 26 G needle. Rats were prewarmed under heat lamp for 5 minutes to dilate the tail vein before sodium thiopental administration. Surgical intervention was run under aseptic conditions on a heated table (37 °C) to maintain body temperature during the procedure. For disinfection, the tail and suboccipital puncture sites were treated with chlorhexidine in 70 % ethanol. Blood aspirated by incision of the tail vein in a volume of 0.20 ml was drawn into a syringe with heparin immediately before injection. A puncture of the large occipital cistern was performed, after which 0.20 ml of collected autologous blood was injected. SAH as a manifestation of hemorrhagic stroke developed immediately after blood injection into the subarachnoid space. After the operation, a 6 % glucose solution was given to the drinker next to the water bowl. Food was also placed on the bottom of the cage to facilitate its intake. Nimodipine was administered intraperitoneally at a dose of 0.3 mg/kg every 8 hours (8:00 a. m., 4:00 p. m. and 12:00 p. m.), acelysin 15 mg/kg once a day at 10.00 a. m. Animals were withdrawn from the experiment on days 4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup>.

The cerebral hemispheres were fixed in a 10 % neutral formalin and dehydrated in a battery of ethyl alcohol. For general histopathology, sections were stained with hematoxylin and eosin. Paraffin sections of 3 µm thickness were used for immunohistochemical studies. Deparaffinization, rehydration, and antigen unmasking were performed by heating in a citrate buffer of pH 6.0 using the PT Thermo Fisher Scientific module. Endogenous peroxidase was blocked with a 3 % hydrogen peroxide. After conditioning with Ultra V Block, incubation with antibodies was carried out in accordance with the instructions of the antibody manufacturer. Visualization was performed using the UltraVision Quanto HRP + DAB system with additional staining with Mayer's hematoxylin. Mouse Monoclonal Antibody GFAP (2E1) sc-33673, LOTG1819 (Santa Cruz Biotechnology, inc.), Mouse Monoclonal Antibody Caspase 3 (CASP3) p17 (D-12) sc-373730, LOTJ15t2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and Mouse Monoclonal Antibody NeuN (0.N.211) sc- 71667, LOTL2807 (Santa Cruz Biotechnology, inc.) were used.

The object of study was the hippocampus as the fairly plastic brain region which plays a crucial role in various forms of behavioral plasticity and response to adverse environmental factors.

The expression of caspase 3 and NeuN in hippocampal (fields CA 1) neurons and GFAP in adjacent astrocytes was assessed in the treated and control groups on the 4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> experimental day as well as in the intact rats as the relative area of immunopositive labels to the total area of standardized field of view (SFV) of the microscope "Primo Star" with videosystem "Axiolab" (CarlZeiss, Germany) at magnification  $\times 400$  using ImageJ software. At least

10 samples were studied for each observational period in each group.

Statistical analysis was performed using the software Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., No. JPZ8041382130ARCN10-J). Obtained data were expressed as median (Me), lower and upper quartiles (Q1; Q3). Comparison between 3 groups or more was performed using one-way Kruskal–Wallis analysis of variance. The differences between the compared values were considered statistically significant at the level of 95 % ( $p < 0.05$ ).

## Results

The subarachnoid hemorrhage led to pronounced structural changes in the neuronal population of the hippocampus. Focal or total hyperchromatosis was noted in a significant part of neurons (Fig. 1). The neurons were of different sizes, there were "shadow cells" and areas of neuronal loss, which disrupted the orderly cellular architecture of the hippocampus. In preserved individual neurons, condensation of chromatin and different sized nucleoli were noted, as well as nuclear and cytoplasmic vacuolation.

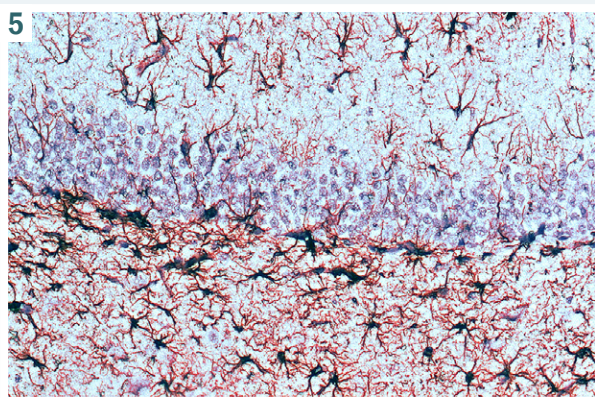
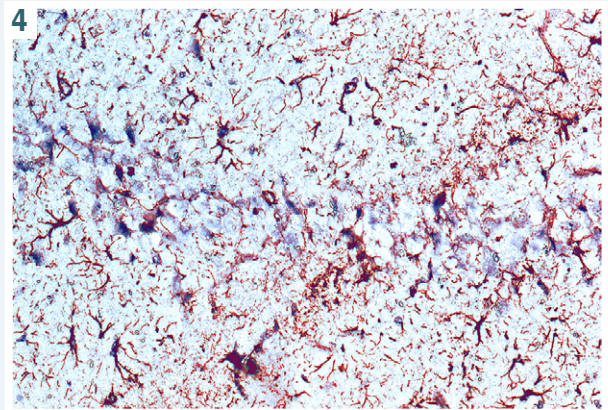
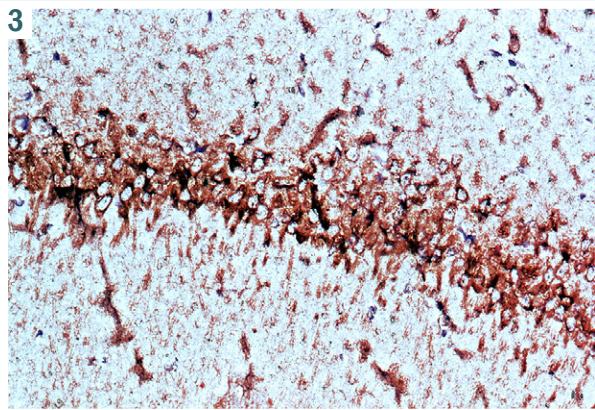
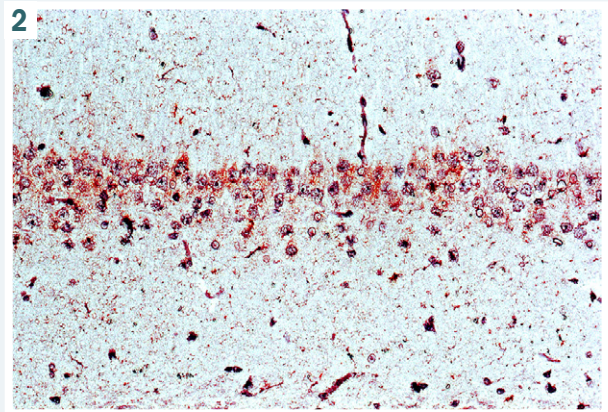
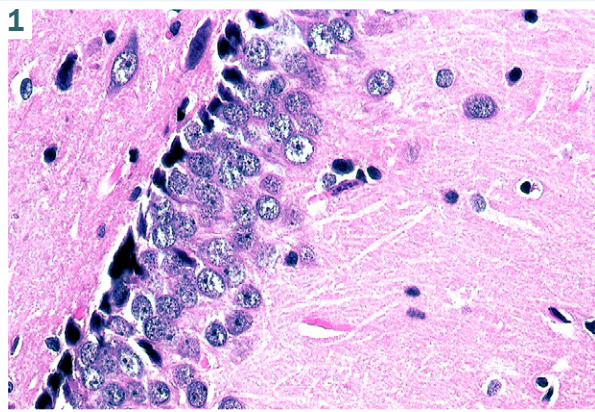
Modeling of subarachnoid hemorrhage led to statistically significant changes in the GFAP, NeuN and CASP3 expression. The dynamics of the protein's expression was different depending on the experimental group and terms.

Minimal cytoplasmic expression of CASP3 in neurons was noted in the intact group, which was comparable to the background staining (Fig. 2). SAH led to a significant increase in CASP3 levels in neurons of control groups 5 and 6 – respectively 8.8 and 7.2 times higher than in intact animals (Fig. 3).

After treatment by acelysin and nimotop on the 4<sup>th</sup> day of the experiment, the expression of CASP3 in neurons was increased compared to intact group by 2.3 and 5.7 times, respectively. On the 7<sup>th</sup> day, these indicators were 1.8 and 3.9 times, respectively, which reflected the beneficial effect of these drugs in terms of prevention against apoptotic neuronal death. The antiapoptotic effect of acelysin was expressed to a greater degree compared to nimotop. Thus, in the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> groups, CASP3 expression in neurons was smaller by 59.64 % and 53.84 %, respectively, compared to the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> observed groups. Uneven expression of CASP3 in the neurons of the affected hippocampal zones could be explained by the regionally different tolerance of the neurons to ischemia.

GFAP expression in astrocytes showed increase in all observation groups compared to the intact group, where expression was equal to 1.4 % (Fig. 4). In the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> groups, the expression was increased by 4.57 and 4.71 times, with a statistically unreliable difference between these two periods. In the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> groups, GFAP expression was increased by 6.21 and 4.71 times, respectively, with a statistically significant difference between the two observation periods. In control groups, on the 4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day the expression was increased by 8.14 and 5.85 times, respectively, in relation to intact group. Thus, the most pronounced expression of GFAP was noted in the control 5<sup>th</sup> group on the day 4. In these observations, the layer of pyramidal neurons was sur-





**Fig. 1.** Hyperchromatosis of hippocampal neurons on the 4<sup>th</sup> day of experimental SAH. Hematoxylin and eosin staining. Mag. ×400.

**Fig. 2.** Hippocampal expression of caspase 3 in the intact rat. Mo Monoclonal Antibody Anti-Caspase 3 p17 (D-12) sc-373730. Mag. ×100.

**Fig. 3.** Hippocampal expression of caspase 3 in control rat (group 5, day 4). Mo Monoclonal Antibody Anti-Caspase 3 p17 (D-12) sc-373730. Mag. ×100.

**Fig. 4.** Hippocampal expression of GFAP in the intact rat. Mo Monoclonal Antibody Anti-GFAP (2E1) sc-33673. Mag. ×100.

**Fig. 5.** Hippocampal expression of GFAP in control rat (group 5, day 4). Mo Monoclonal Antibody Anti-GFAP (2E1) sc-33673. Mag. ×100.

**Table 1.** Levels of CASP3 and NeuN in neurons and GFAP in astrocytes in the hippocampus of rats with SAH on the 4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day and in intact group

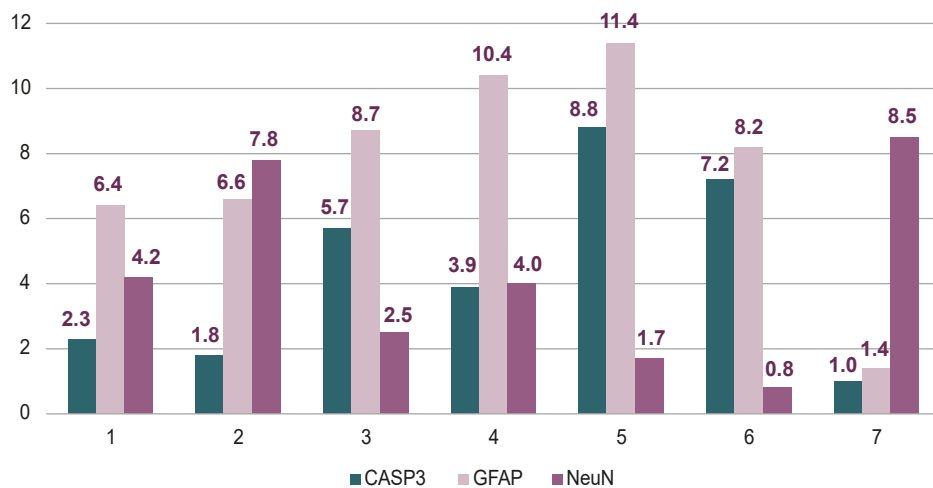
Groups	CASP3	GFAP	NeuN
Group 1, SAH + acelysin, day 4, n = 5	2.3 (2.0; 2.4)*	6.4 (5.7; 7.7)*	4.2 (3.9; 4.5)*
Group 2, SAH + acelysin, day 7, n = 5	1.8 (1.5; 2.2)**	6.6 (6.1; 7.2)*	7.8 (7.7; 8.3)**
Group 3, SAH + nimotop day 4, n = 5	5.7 (5.0; 6.57)*	8.7 (8.0; 9.2)*	2.5 (1.2; 2.9)*
Group 4, SAH + nimotop day 7, n = 5	3.9 (3.6; 4.2)**	10.4 (10.0; 10.7)**	4.0 (3.5; 4.3)**
Group 5, control, day 4, n = 5	8.8 (8.1; 9.4)	11.4 (10.5; 12.1)	1.7 (1.3; 2.0)
Group 6, control; day 7, n = 5	7.2 (7.0; 7.7)	8.2 (7.9; 8.7)	0.8 (0.7; 1.1)
Intact, n = 5	1.0 (0.7; 1.2)	1.4 (0.9; 1.7)	8.5 (7.7; 8.9)

\*: p < 0.05 compared to the control; \*\*: p < 0.05 compared to 4 days SAH animals.

rounded by a dense network of astrocyte bodies and their processes (Fig. 5).

NeuN immunoreactivity in neurons was mainly nuclear and to a lesser extent was detected in the perinuclear cytoplasm. In control observations, the NeuN expression was minimal: 1.7 % and 0.8 % on the 4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day, respectively, which indicated the growth of delayed cerebral ischemia in the indicated periods. The dynamics of NeuN expression in neurons when using acelysin and nimotop indirectly corresponded to the dynamics of CASP3 expression in these cells. Thus, the increase in neuronal NeuN was associated with decrease in their CASP3 expression. This supports the mention of protective properties of acelysin and nimotop in terms of reducing the apoptotic neuronal death. Quantitative indicators of the expression of the studied markers are provided in Table 1 and Fig. 6.





**Fig. 6.** Hippocampal expression of CASP3 and NeuN in neurons and GFAP in astrocytes in rats with SAH and intact rats on days 4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup>, expressed in the relative area of the immunopositive labels.

**Group 1** – SAH with acelysin treatment for 4 days;  
**Group 2** – SAH with acelysin treatment for 7 days;  
**Group 3** – SAH with nimotop treatment for 4 days;  
**Group 4** – SAH with nimotop treatment for 7 days;  
**Group 5** (control) – untreated SAH, day 4;  
**Group 6** (control) – untreated SAH, day 7;  
**Group 7** – intact.

## Discussion

We obtained the data regarding the CASP3 and NeuN expression in neurons and GFAP in astrocytes demonstrate predictable changes in the hippocampus cell populations in response to subarachnoid hemorrhage and the associated ischemic damage. The multidirectional expression dynamics of individual markers recorded on the experimental days 4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup>, to some extent reflect the processes of intensification of both neurodegeneration and neuroplasticity, as well as the influence of the studied drugs. It is known that in the acute period of ischemia, the processes of cellular death are started in the form of necrosis/apoptosis with subsequent hyperexpression of proapoptotic proteins, including caspases. Increased expression of caspase, which also takes part in postischemic activation of neuroplasticity, gradually decreases during the subacute period. Increased caspase expression associated with ischemic damage has been described both in experimental studies [14] and in patients with stroke [15]. However, according to several authors, cell apoptosis can play an important role in brain damage after SAH [16]. The decline in neuronal CASP3 under action of acelysin and nimotop indicates a decrease in the processes of apoptosis when using pharmacological treatment. Herewith, the most pronounced decrease in CASP3 was observed 7 days after the use of acelysin, which supports the possibility of effective use of this drug to alleviate ischemic brain trauma after SAH. In the same period (7 days), the maximum expression of NeuN in neurons indicates the minimally expressed processes of cell death in this period under the conditions of acelysin use. It is believed that neuronal NeuN acts as a protein synthesis and protein expression modulator during cellular response to ischemia.

The effectiveness of the aspirin use in SAH is controversial, which follows from numerous scientific studies devoted to this issue [17,18,19]. Some data indicate that short-term (up to 3 months) aspirin use is associated with an increased risk of aneurysmal SAH [20]. Another study emphasizes that long-term aspirin use is not associated with mortality or complications after SAH [21]. Although

the exact effect of antiplatelet agents on the outcome after aneurysmal SAH is not sufficiently elucidated, there is still an assumption that platelet adhesion inhibitors reduce the risk of delayed cerebral ischemia and, thus, have a beneficial effect on clinical outcomes [22].

Upregulation of GFAP is widely considered as indicative sign for reactive state and morphological remodeling of astroglia in response to different neuropathologies with ischemic and complex mechanisms [23]. Significant increase in GFAP expression in the acute period of SAH also points to reactive astroglial remodeling. Literature data show that the level of GFAP significantly increases in the blood of patients with SAH during the development of hemorrhage and 24 hours after it. Elevated blood GFAP levels at hospital admission predicted mortality and poor outcome in patients with SAH [24,25]. Experimental studies evidenced, that GFAP levels in astrocytes increased after SAH, with subsequent recovery to the initial level [26].

The role of astrocytes in the recovery after SAH remains controversial, since reactive astrocytes are classified into at least 2 types: neurotoxic A1 and neuroprotective A2 [27]. A1 astrocytes induce cell death by releasing proinflammatory factors after SAH. Acelysin and nimotop increased GFAP expression on day 4 and day 7, respectively, but it is not known which type of reactive astrocytes prevailed during experimental SAH. This question requires the use of specific markers for A1 and A2 subtype astrocytes, respectively.

Apparently, the anti-apoptotic effect of L-lysine and its derivatives is realized through an increase in the expression of HSP70 in the cytosol and mitochondria of neurons of the sensorimotor cortex and hippocampus. HSP70 blocks the Fas/Apo-1 apoptosis trigger receptor and also inhibits apoptosis in mitochondria. HSP70 acts in the step between cytochrome c release and procaspase-9 cleavage [28].

Our results to some extent reflect the molecular mechanisms of neurodestruction in SAH at different time-points of the modelled pathology, as well as represent an experimental justification for the use of nimodipine and acelysin as effective neuroprotectors in SAH.

## Conclusions

1. Experimental SAH is accompanied by the abnormal expression of CASP3 and NeuN in neurons and GFAP in astrocytes. The expression depends on the duration of SAH and the applied experimental therapy.

2. The use of acelysin and nimotop leads to decrease in CASP3 expression in neurons on the 4<sup>th</sup> day by 3.82 and 1.54 times compared to control group, and on the 7<sup>th</sup> day by 4.00 and 1.84 times, respectively, which reflects the positive effect of the therapy on the prevention of apoptotic death of hippocampal neurons.

3. Immunoreactivity to neuronal nuclei antigen NeuN is inversely related to the dynamics of CASP3 expression in neurons. An increase in CASP3 expression in neurons is accompanied by the disappearance of the nuclear protein from damaged and dead hippocampal pyramidal neurons. The NeuN expression in neurons under acelysin treatment compared to nimotop increases by 1.84 and 1.95 times on day 4 and 7, respectively, which indicates a more pronounced neuroprotective effect of acelysin on hippocampal neurons.

4. Increased GFAP expression in astrocytes during SAH reflects the reactivity of astrocytes, which can have both a negative and a positive effect on the recovery due to different functionality of reactive astroglia. The use of acelysin and nimotop does not affect the decrease in GFAP expression in astrocytes on the 4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day of SAH and its return to baseline values.

5. The results of the experimental study represent a theoretical justification for the feasibility of including nimodipine and acelysin in the basic therapy of SAH.

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

Надійшла до редакції / Received: 04.05.2023

Після доопрацювання / Revised: 22.05.2023

Схвалено до друку / Accepted: 07.06.2023

## Information about authors:

Polkovnikov O. Yu., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Disaster Medicine, Military Medicine and Neurosurgery, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0003-2174-9849

Tertyshnyi S. I., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Pathologic Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0003-3856-4234

## Відомості про авторів:

Полковников О. Ю., канд. мед. наук, доцент каф. медицини катастроф, військової медицини та нейрохірургії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.  
Тертишний С. І., д-р мед. наук, професор, зав. каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

## References

- Darkwah Oppong, M., Buffen, K., Pierscianek, D., Herten, A., Ahmadipour, Y., Dammann, P., Rauschenbach, L., Forsting, M., Sure, U., & Jabbari, R. (2019). Secondary hemorrhagic complications in aneurysmal subarachnoid hemorrhage: when the impact hits hard. *Journal of neurosurgery*, 1-8. Advance online publication. <https://doi.org/10.3171/2018.9.JNS182105>
- Weimer, J. M., Jones, S. E., & Frontera, J. A. (2017). Acute Cytotoxic and Vasogenic Edema after Subarachnoid Hemorrhage: A Quantitative MRI Study. *AJNR. American journal of neuroradiology*, 38(5), 928-934. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A5181>
- De Oliveira Manoel, A. L., Goffi, A., Marotta, T. R., Schweizer, T. A., Abrahamson, S., & Macdonald, R. L. (2016). The critical care management of poor-grade subarachnoid haemorrhage. *Critical care*, 20, 21. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1193-9>
- Geraghty, J. R., & Testai, F. D. (2017). Delayed Cerebral Ischemia after Subarachnoid Hemorrhage: Beyond Vasospasm and Towards a Multifactorial Pathophysiology. *Current atherosclerosis reports*, 19(12), 50. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0690-x>
- Kerr, N., Lee, S. W., Perez-Barcena, J., Crespi, C., Ibañez, J., Bullock, M. R., Dietrich, W. D., Keane, R. W., & de Rivero Vaccari, J. P. (2018). Inflammasome proteins as biomarkers of traumatic brain injury. *PLoS one*, 13(12), e0210128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210128>
- Rodríguez-Rodríguez, A., Egea-Guerrero, J. J., Ruiz de Azúa-López, Z., & Murillo-Cabezas, F. (2014). Biomarkers of vasospasm development and outcome in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Journal of the neurological sciences*, 341(1-2), 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.04.020>
- Subarachnoid haemorrhage caused by a ruptured aneurysm: diagnosis and management, NICE guideline NG228. (2022, November 23). <https://www.nice.org.uk/guidance/ng228>
- Ditz, C., Machner, B., Schacht, H., Neumann, A., Schramm, P., Tronnier, V. M., & Kuchler, J. (2021). Effects of post-interventional antiplatelet therapy on angiographic vasospasm, delayed cerebral ischemia, and clinical outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a single-center experience. *Neurosurgical review*, 44(5), 2899-2912. <https://doi.org/10.1007/s10143-021-01477-6>
- Belenichev, I. F., Bak, P. G., Popazova, O. O., Bukhtiyarova, N. V., & Yadlovsky, O. Yu. (2022). Nitric oxide-dependent mechanism of endothelial dysfunction formation is a promising target link for pharmacological management. *Biopolymers and Cell*, 38(3), 145-157. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A79>
- Enriquez-Marulanda, A., Salem, M. M., Ravindran, K., Ascanio, L. C., Maragkos, G. A., Gomez-Paz, S., Alturki, A. Y., Ogilvy, C. S., Thomas, A. J., & Moore, J. (2019). Effect of Premorbid Antiplatelet Medication Use on Delayed Cerebral Ischemia After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Propensity Score-matched Study. *Cureus*, 11(9), e5603. <https://doi.org/10.7759/cureus.5603>
- Wallace, A. N., Kayan, Y., Almandoz, J. E. D., Mulder, M., Milner, A. A., Scholz, J. M., Stiernagle, K., Contestabile, E., & Tippis, M. E. (2020). Dual antiplatelet therapy does not improve outcomes after aneurysmal subarachnoid hemorrhage compared with aspirin monotherapy. *Clinical neurology and neurosurgery*, 195, 106038. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2020.106038>
- Yang, S., Liu, T., Wu, Y., Xu, N., Xia, L., & Yu, X. (2021). The Role of Aspirin in the Management of Intracranial Aneurysms: A Systematic Review and Meta-Analyses. *Frontiers in neurology*, 12, 646613. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.646613>
- Dudhani, R. V., Kyle, M., Dedeo, C., Riordan, M., & Deshaies, E. M. (2013). A low mortality rat model to assess delayed cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (71), e4157. <https://doi.org/10.3791/4157>
- Zhang, B., Zhang, H. X., Shi, S. T., Bai, Y. L., Zhe, X., Zhang, S. J., & Li, Y. J. (2019). Interleukin-11 treatment protected against cerebral ischemia/reperfusion injury. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedicine & pharmacotherapie*, 115, 108816. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108816>
- Teertam, S. K., & Phanithi, P. B. (2022). Up-regulation of Sirtuin-1/autophagy signaling in human cerebral ischemia: possible role in caspase-3 mediated apoptosis. *Heliyon*, 8(12), e12278. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12278>
- Li, R., Zhao, M., Yao, D., Zhou, X., Lenahan, C., Wang, L., Ou, Y., & He, Y. (2022). The role of the astrocyte in subarachnoid hemorrhage and its therapeutic implications. *Frontiers in immunology*, 13, 1008795. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1008795>
- Evans, D., Flood, R., Davies, O., Wareham, J., & Mortimer, A. (2021). Impact of Intravenous Aspirin Administration on Ventriculostomy-Associated Hemorrhage in Coiled Acute Subarachnoid Hemorrhage Patients. *Neurointervention*, 16(2), 141-148. <https://doi.org/10.5469/neuroint.2021.00150>
- Huang, W. Y., Saver, J. L., Wu, Y. L., Lin, C. J., Lee, M., & Ovbiagele, B. (2019). Frequency of Intracranial Hemorrhage With Low-Dose Aspirin in Individuals Without Symptomatic Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA neurology*, 76(8), 906-914. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.1120>
- Can, A., Rudy, R. F., Castro, V. M., Yu, S., Dligach, D., Finan, S., Gainer, V., Shadick, N. A., Savova, G., Murphy, S., Cai, T., Weiss, S. T., & Du, R. (2018). Association between aspirin dose and subarachnoid

- hemorrhage from saccular aneurysms: A case-control study. *Neurology*, 91(12), e1175-e1181. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006200>
20. Phan, K., Moore, J. M., Griessenauer, C. J., Ogilvy, C. S., & Thomas, A. J. (2017). Aspirin and Risk of Subarachnoid Hemorrhage: Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke*, 48(5), 1210-1217. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.015674>
  21. Dasenbrock, H. H., Yan, S. C., Gross, B. A., Guttieres, D., Gormley, W. B., Frerichs, K. U., Ali Aziz-Sultan, M., & Du, R. (2017). The impact of aspirin and anticoagulant usage on outcomes after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a Nationwide Inpatient Sample analysis. *Journal of neurosurgery*, 126(2), 537-547. <https://doi.org/10.3171/2015.12.JNS151107>
  22. Ditz, C., Machner, B., Schacht, H., Neumann, A., Schramm, P., Tronnier, V. M., & Küchler, J. (2021). Effects of post-interventional antiplatelet therapy on angiographic vasospasm, delayed cerebral ischemia, and clinical outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a single-center experience. *Neurosurgical review*, 44(5), 2899-2912. <https://doi.org/10.1007/s10143-021-01477-6>
  23. Shulyatnikova, T. V., & Tumanskiy, V. O. (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>
  24. Gyldenholm, T., Hvas, C. L., Hvas, A. M., & Hviid, C. V. B. (2022). Serum glial fibrillary acidic protein (GFAP) predicts outcome after intracerebral and subarachnoid hemorrhage. *Neurological sciences*, 43(10), 6011-6019. <https://doi.org/10.1007/s10072-022-06274-7>
  25. Cenic, Y., Baydin, A., Çakmak, E., Fidan, M., Aydin, K., Tuncel, Ö. K., & Aslan, K. (2021). The Effect of Biomarkers and Optic Nerve Sheath Diameter in Determining Mortality in non-Traumatic Subarachnoid Hemorrhage. *Clinical neurology and neurosurgery*, 207, 106813. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2021.106813>
  26. Chung, C. L., Huang, Y. H., Lin, C. J., Chong, Y. B., Wu, S. C., Chai, C. Y., Tsai, H. P., & Kwan, A. L. (2022). Therapeutic Effect of Mitochondrial Division Inhibitor-1 (Mdivi-1) on Hyperglycemia-Exacerbated Early and Delayed Brain Injuries after Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *International journal of molecular sciences*, 23(13), 6924. <https://doi.org/10.3390/ijms23136924>
  27. Kwon, H. S., & Koh, S. H. (2020). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Translational neurodegeneration*, 9(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>
  28. Belenichev, I. F., Aliyeva, O. G., Popazova, O. O., & Bukhtiyarova, N. V. (2023). Involvement of heat shock proteins HSP70 in the mechanisms of endogenous neuroprotection: the prospect of using HSP70 modulators. *Frontiers in cellular neuroscience*, 17, 1131683. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1131683>



# Динаміка змін швидкості поширення ультразвуку в кістковій тканині недоношених дітей за даними ультразвукової денситометрії

А. Ю. Цимбал<sup>id</sup>\*<sup>B,C,D</sup>, Ю. В. Котлова<sup>id</sup><sup>A,E,F</sup>

Запорізький державний медико-фармацевтичний 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

**Ключові слова:**  
недоношеність,  
діти, ультразвукова  
денситометрія.

**Патологія. 2023.**  
**Т. 20, № 2(58).**  
**С. 154-161**

\*E-mail:  
annatsymbal26@gmail.  
com

Відсутність фази активної мінералізації кісток *in utero* у недоношених дітей (НД) змінює остеогенез, змінює швидкість поширення ультразвуку в кістковій тканині (SOS, м/с).

**Мета роботи** – оцінити та визначити динаміку змін SOS у недоношених дітей при народженні та протягом терміну інтенсивного виходжування за показниками кількісної ультразвукової денситометрії для діагностики неонатальної остеопенії.

**Матеріали та методи.** Протягом місяця обстежували 70 НД і 20 доношених новонароджених. Оцінювали SOS за критерієм Z-score ультразвукового сонометра «Sunlight Omnisense 9000» (Ізраїль), середній – при  $Z \geq -1,0$  SD, низький – при  $Z$  від  $-1,1$  до  $-2,0$  SD, значно низький – при  $Z \leq -2,0$  SD.

**Результати.** Z-score SOS відповідав нормі у 45,7 % НД із 70 при народженні, у решти визначена остеопенія: у 28,6 % НД – низький, у 25,7 % – значно низький Z-score SOS.

**Висновки.** За перші 4 тижні життя кількість НД з остеопенією збільшилася в 1,4 раза. Найчастіше ( $p < 0,05$ ) збільшення дефіциту кісткової тканини спостерігали в дітей (52,0 %) із нормальними / середніми показниками Z-score SOS. Менший гестаційний вік (ГВ) при народженні підвищує в 3,37 раза шанси остеопенії (OR = 3,37; ДІ 95 % [1,25; 9,09],  $p < 0,05$ ), в 7,50 раза – шанси мати значно низькі показники Z-score (OR = 7,50; ДІ 95 % [1,60; 34,59],  $p < 0,05$ ), в 8,15 раза – шанси залишити значно низькі показники Z-score SOS за перший місяць росту (OR = 8,15; ДІ 95 % [2,23; 29,70],  $p < 0,05$ ), ніж у народжених у пізнішому ГВ. Показники фізичного розвитку НД не дають змоги оцінювати стан мінеральної щільності кісткової тканини та потребують динамічної ультразвукової денситометрії.

**Key words:**  
neonatal  
prematurity,  
children,  
ultrasonography,  
densitometry.

**Pathologia, 2023. 20(2),**  
**154-161**

## Dynamics of changes in the velocity of ultrasound propagation in the bone tissue of premature children according to the data of ultrasound densitometry

A. Yu. Tsybmal, Yu. V. Kotlova

All premature babies lack the intrauterine phase of active mineralization of the bones, osteogenesis changes, speed of ultrasound propagation in bone tissue changes.

**Aim.** The purpose of the article was to determine osteopenia in premature babies (PB) based on ultrasound densitometry at birth and during the period of intensive care.

**Materials and methods.** 70 premature babies and 20 full-term newborns were studied. The authors determined the bone ultrasound speed (SOS, m/s) and its comparative evaluation (Z-score) with the representative base of the ultrasound sonometer "Sunlight Omnisense 9000" (Israel). SOS was defined as average at  $Z \geq -1.0$  SD, as low – at Z from  $-1.1$  to  $-2.0$  SD, and as significantly low –  $Z \leq -2.0$  SD.

**Results.** 54.3 % of PB had osteopenia at birth: low indicators in 28.6 %, significantly low in 25.7 %. Postnatally, an increase in bone tissue deficiency of PB was observed – osteopenia with a low Z was diagnosed in 41.1 %, with a significantly low – in 37.5 % of PB.

**Conclusions.** The number of PB with osteopenia increased 1.4 times, during the first 4 weeks of life. An increase in bone tissue deficiency was most often ( $p < 0.05$ ) observed among children (52.0 %) with normal / average Z-score SOS indicators. Z-score SOS indicators in children with osteopenia were stable during the first month of life. The odds ratio of having osteopenia were 3.37 times higher for those born in GA of 33 weeks or less (OR = 3.37; CI 95 % [1.25, 9.09],  $p < 0.05$ ), and 7.50 times higher odds of having significantly low Z-scores (OR = 7.50; CI 95 % [1.60, 34.59],  $p < 0.05$ ), and 8.15 times higher odds of having significantly low Z-scores after 1 month of life (OR = 8.15; CI 95 % [2.23; 29.70],  $p < 0.05$ ), than in children with greater GA. Indicators of physical development of premature newborns do not allow assessing the state of bone mineral velocity and require dynamic ultrasonic densitometry, despite the presence of correlations of SOS with indicators of the mass or length of infants depending on the gestational timing of birth.

Неонатальна остеопенія (КВ 61.3 (МКХ-XI)), або неонатальна метаболічна хвороба кісток (НМХК) – терміни, що використовують для опису зниження вмісту мінералів у кістках передчасно народжених дітей. Найчастіше виявляють у цих дітей як наслідок переривання транс-

плацентарного перенесення мінералів у третьому триместрі вагітності. Хоча виникнення неонатальної остеопенії в недоношених дітей – багатofакторний процес, саме недоношеність є найважливішим фактором ризику [1,2]. Тому недоношені діти належать

до групи найбільшого ризику розвитку неонатальної остеопенії, а мінеральна щільність їхньої кісткової тканини (МЩКТ) при народженні – важлива детермінанта формування структури та щільності кісткової тканини протягом усього життя [3].

За даними E. V. Schulz, Galaad Torgó-Ferrero, у дітей із дуже низькою й екстремально низькою масою тіла при народженні частота НМХК становить 16–40 % та 50–54 % відповідно. Неонатальна остеопенія може залишатися клінічно непомітною в дітей, поки їхня МЩКТ не знизиться на 20–40 % від стану, який був сформований за скорочений термін внутрішньоутробного розвитку [4,5].

За чинним наказом МОЗ України від 16.04.2022 року № 650 «Про затвердження Уніфікованого клінічного протоколу вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Парентеральне харчування новонароджених дітей» та відповідної «Клінічної настанови, заснованої на доказах», метаболічну хворобу кісток у новонароджених визначають за неповною мінералізацією остеїду з проявами від легкого перебігу без клінічних ознак (лише з наявністю остеопенії) до важкого перебігу з виникненням переломів кісток [6].

У найближчій перспективі неонатальна остеопенія може погіршити респіраторний статус передчасно народженої дитини, може бути фактором розвитку міопії, що пов'язана з порушенням росту черепа, а в третини дітей зумовлює виникнення спонтанних переломів протягом перших 2 років життя [7,8].

Неонатальна остеопенія залишається серйозним супутнім захворюванням у недоношених дітей, незважаючи на удосконалення методів виходжування: технологій вигодовування з використанням фортифікаторів грудного молока та застосування збагачених мінералами сумішей для недоношених, досягнень у галузі інтенсивної терапії, рекомендацій контролю термінів використання у них стероїдних і діуретичних препаратів [7].

Діагностичні критерії НМХК не є уніфікованими через різні методи, що використовують для скринінгу немовлят, – рентгенологічні чи ультразвукові. Нині дослідження МЩКТ, що застосовують для оцінювання стану й адекватності терапії в немовлят, передбачають двоенергетичну рентгенівську абсорбціометрію (ДРА), кількісну комп'ютерну томографію та кількісне ультразвукове дослідження [9]. Останніми роками використання ультразвукових денситометрів істотно поширилось завдяки швидкому технологічному розвитку ультразвукової візуалізації кісток [10]. Застосування ультразвукової денситометрії простіше та безпечніше для немовлят різних гестаційних термінів народження, виключає вплив артефакту руху немовлят та радіаційне опромінення порівняно з рентгенологічними методами дослідження. Створені еталонні бази даних для стандартизованих за умовами вимірів швидкості поширення ультразвуку (speed of sound, SOS) у кістковій тканині дітей відповідних гестаційних термінів при народженні. Це дає змогу здійснювати кількісне ультразвукове дослідження кісткової тканини у новонароджених, а також оцінювати результати порівняно з еталонними параметрами, спостерігати за ними в динаміці [1,11].

За рекомендаціями International Society for Clinical Densitometry (ISCD) (2019), кількісна ультразвукова денситометрія доцільна для характеристики дефіциту кісткової тканини в дітей, коли є необхідне програмне забезпечення, довідкова база даних показників швидкості ультразвуку в певних локусах кісток у дітей відповідних вікових груп, калібрувальні фантоми, а також коли дотримано протоколи експозиції вимірювань [12]. Найчастіше для оцінювання стану кісткової тканини в дітей і дорослих під час ультразвукової денситометрії рекомендують використовувати середньо-квадратичні відхилення (standard deviation, SD) від вікової норми показника SOS (Z-score) за критеріями ВООЗ. Так, Z-score від -1,0 та більше визначають як нормальні показники стану мінеральної щільності кісткової тканини, показник Z-score в інтервалі від -1,1 до -2,5 – як остеопенічний синдром, менше за -2,5 – як остеопороз [13]. Спеціалісти ISCD при формулюванні офіційної позиції оцінювання кісткової системи в педіатрії (2019) рекомендують уникати висновку остеопороз для дітей, використовуючи для оцінювання лише показник Z-score та термін «діапазон, нижчий за очікуваний для цього віку», коли значення Z-score становлять -2,0 та менше [12].

Верифікація остеопенічного стану в недоношених новонароджених залишається предметом наукових дискусій, досі немає критеріїв діагностики неонатальної остеопенії. Відсутність чітких критеріїв остеопенії саме для недоношених новонароджених потребує диференціювання стану остеопенії та природного остеогенезу в недоношених дітей, що, імовірно, вирізняються різними ступенями дефіциту кісткової маси, показниками МЩКТ [14,15].

Вивчення НМХК – важливий аспект у неонатології у зв'язку зі збільшенням виживаності недоношених немовлят, адже важливим є раннє її виявлення, ретельний періодичний контроль мінерального стану кісток для запобігання формуванню остеопорозу та його тяжких наслідків у старшому віці [3].

## Мета роботи

Оцінити та визначити динаміку змін швидкості поширення ультразвуку в кістковій тканині у недоношених дітей при їх народженні та протягом терміну інтенсивного виходжування за показниками кількісної ультразвукової денситометрії для діагностики неонатальної остеопенії.

## Матеріали і методи дослідження

Обсерваційне аналітичне короткострокове когортне дослідження здійснили на базі кафедри дитячих хвороб Запорізького державного медико-фармацевтичного університету (завідувач кафедри – к. мед. н., професор Л. М. Боярська) та КНП «Обласний перинатальний центр» ЗОР (директор – О. Д. Кириллюк) із грудня 2019 до грудня 2021 року в відділеннях реанімації та інтенсивної терапії новонароджених, постінтенсивного догляду та виходжування новонароджених. Публікація матеріалів погоджена Комісією з біоетики Запорізького державного медико-фармацевтичного університету.

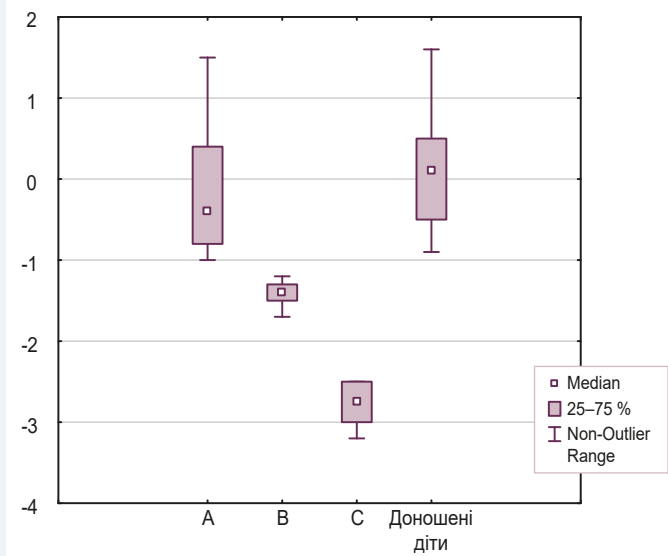


Рис. 1. Показники Z-score  $SOS_1$  у групах спостереження недоношених і доношених новонароджених у перший тиждень життя.

Критерії залучення в дослідження – гестаційний вік (ГВ) недоношених новонароджених від 28 тижнів 0/7 днів до 36 тижнів 6/7 днів, наявність письмової згоди батьків пацієнта на участь у дослідженні. Критерії виключення – діагностована затримка внутрішньоутробного розвитку плода, термін народження 37 тижнів і більше, наявність асфіксії, вад розвитку, судомного синдрому, виявлені патології ендокринних залоз, захворювання печінки, гіпербілірубінемія більше ніж 200 мкмоль/л, некротичний ентероколіт, синдром мальабсорбції, наявність в анамнезі матерів захворювань опорно-кісткового апарату, ендокринопатій, аутоімунних захворювань, незгода батьків пацієнта брати участь у дослідженні з будь-якої причини.

У групу контролю залучили здорових дітей, які народилися в ГВ 37–40 тижнів.

У дослідження залучили 70 (100 %) передчасно народжених дітей у ранньому неонатальному віці: 32 (45,7 %) хлопців і 38 (54,3 %) дівчат, а також 20 доношених новонароджених: 13 (65,0 %) хлопців і 7 (35,0 %) дівчат. За гестаційними термінами народження 33 (47,1 %) дитини із 70 народжені в 33 тижні та менше, 37 (52,9 %) дітей – недоношені, народжені в 34 тижні та пізніше. Обстеження та лікування дітей у стаціонарі тривало  $24,8 \pm 3,9$  доби залежно від терміну гестації при народженні та тяжкості стану. Після перших 7 діб життя із дослідження вибули 14 дітей. Під спостереженням залишилися 56 (100,0 %) немовлят: 29 (51,7 %) дітей, чий ГВ був меншим за 34 тижні, та 27 (48,3%) пацієнтів, чий ГВ становив 34 тижні та більше.

Виходжування недоношених новонароджених дітей здійснювали за чинними наказами МОЗ України № 584 від 29.08.2006 р., № 650 від 16.04.2022 р., за якими передбачений ранній старт ентерального годування в перший день життя молоком матері та/або адаптованою сумішшю для недоношених дітей в об'ємах, що збільшуються; забезпечення щоденних потреб немовлят у макро- та мікронутрієнтах, зо-

крема добових доз катіонів кальцію, здійснювали, використовуючи повне / часткове парентеральне харчування в регламентованих вікових дозах.

Характеристику кісткової тканини новонароджених визначали за кількісним показником швидкості поширення ультразвуку в ділянці діафіза великогомілкової кістки (абсолютний показник – SOS, м/с) та його порівняльним оцінюванням з очікуваним значенням вікової норми репрезентативної бази (критерій Z-score) ультразвукового сонометра «Sunlight Omnisense 9000» (Ізраїль), який сертифікований до використання в Україні (UA 1.001.020758 - 19). Швидкість осевого ультразвуку «Sunlight Omnisense 9000» корелює з МЩКТ.

Z-score SOS класифіковано як середній (нормальний) при значенні SD -1,0 та більше, низький – від -1,1 SD до -2,0 SD, значно низький, – коли становив -2,0 SD та менше. Стан остеопенії визначали при Z-score, що становив -1,1 SD і менше.

Дітей поділили на групи спостереження за  $Z_1$ -score. Немовлят з оцінкою швидкості поширення ультразвуку в кістковій тканині при народженні за Z-score від -1,0 SD і більше включили у групу спостереження А – 32 (45,7 %) випадки із 70; дітей з оцінкою від -1,1 SD до -2,0 SD включили у групу В – 20 (28,6 %) пацієнтів; у групі С – 18 (25,7 %) із 70 новонароджених, які мали SOS за Z-score -2,0 SD і менше. Піділ новонароджених за показниками  $Z_1$ -score  $SOS_1$  у групах спостереження та контролю наведено на рис. 1.

Перше обстеження ( $SOS_1$ ) здійснили в перші 7 діб життя ( $4,0 \pm 2,1$  доби життя), щоб отримати показники, максимально наближені до внутрішньоутробної мінералізації кістки. Під час наступних досліджень (на  $12,7 \pm 3,2$  доби та  $24,8 \pm 3,9$  доби життя) одержали параметри швидкості поширення ультразвуку в кістковій тканині  $SOS_2$ ,  $Z_2$  та  $SOS_3$ ,  $Z_3$  відповідно. Перерозподіл дітей до груп А#, В#, С# здійснили за показником  $Z_3$ .

Фізичний розвиток новонароджених методом стандартних відхилень (SD) оцінювали згідно з рекомендаціями Fenton (2013) [16]. Не виявили статистично достовірні різниці ( $p > 0,05$ ) за показниками фізичного розвитку при народженні (обвід голови, довжина та маса тіла) у недоношених новонароджених усіх груп спостереження та в доношених дітей, крім статистично вірогідної різниці ( $p < 0,05$ ) маси тіла недоношених дітей групи А проти груп В і С: -0,7 [-1,3; 0,2] SD проти 0,0 [-0,8; 0,6] SD, 0,3 [-0,2; 0,8] SD відповідно. В динаміці зростання статистично вірогідну різницю ( $p < 0,05$ ) тільки за меншими темпами збільшення маси тіла виявили в недоношених малюків груп А і С (-1,1 [-1,6; -1,0] SD та -0,5 [-1,0; -0,2] SD відповідно) та недоношених дітей усіх груп спостереження (в тому числі групи В (-0,8 [-1,5; -0,3] SD) проти доношених немовлят (-0,03 [-0,46; 0,67] SD)). Антропометричні показники дітей при народженні та через  $24,8 \pm 3,9$  доби життя наведено в таблиці 1.

Статистично результати дослідження опрацювали, застосувавши програмне забезпечення Statistica 13.0 (StatSoft Inc., № JPZ8041382130ARCN10-J). Нормальність розподілу змінних визначили за допомогою тесту Шапіро–Вілка. Використали описовий метод, при нормальному розподілі кількісні дані наведено як середнє арифметичне  $\pm$  стандартне відхилення;



Таблиця 1. Гестаційний вік та антропометричні показники новонароджених

Групи дітей	ГВ/ПКВ	Маса тіла	Довжина тіла	Обвід голови
Група А (n = 32)	34,0 [33,0; 35,0] <sup>§</sup>	1840 [1650; 2215] <sup>§,§</sup>	45,0 [43,0; 48,0] <sup>§</sup>	30,2 [29,7; 32,0] <sup>§</sup>
Група В (n = 20)	34,0 [32,0; 35,0] <sup>§</sup>	1970 [1670; 2435] <sup>§,§</sup>	44,0[42,0; 47,0] <sup>§</sup>	31,0 [29,0; 31,7] <sup>§</sup>
Група С (n = 18)	31,0 [29,0; 32,0] <sup>§,*</sup>	1370 [1280; 1880] <sup>§,*</sup>	42,0 [41,0; 44,0] <sup>§,*</sup>	29,0 [27,5; 31,0] <sup>§,*</sup>
Доношені діти (n = 20)	39,0 [38,0; 39,5]	3245 [3000; 3520]	52,0 [51,0; 53,0]	34,5 [33,5; 35,0]
Група А# (n = 12)	36,7 [35,0; 37,0] <sup>§</sup>	2130 [2100; 2580] <sup>§,Δ</sup>	45,8 [44,0; 49,0] <sup>§</sup>	32,3 [30,0; 34,3] <sup>§</sup>
Група В# (n = 23)	36,6 [34,0; 37,0] <sup>§</sup>	2360 [2220; 2610] <sup>§,Δ</sup>	45,0 [44,0; 48,0] <sup>§</sup>	32,0 [31,5; 33,0] <sup>§</sup>
Група С# (n = 21)	34,8 [33,0; 36,0] <sup>§</sup>	1480 [1380; 1810] <sup>§,*</sup>	43,0 [40,8; 44,0] <sup>§,*</sup>	30,0 [28,0; 30,8] <sup>§,*</sup>
Доношені діти# (n = 20)	41,5 [41,0; 42,5]	3910 [3550; 4300]	55,0 [52,5; 56,0]	36,0 [34,5; 37,0]

#: групи недоношених новонароджених при перерозподілі за змінами Z-score в динаміці спостереження; §: вірогідна різниця показників у недоношених новонароджених груп А, В, С із параметрами доношених дітей, груп А#, В#, С# із доношеними дитьми#,  $p < 0,05$ ; \*: достовірна різниця показників групи С із параметрами груп А і В, групи С# з групами А# і В#,  $p < 0,05$ ; §: вірогідна різниця між показниками маси тіла при народженні у недоношених дітей у групах А, В,  $p < 0,05$ ; Δ: достовірна різниця між показниками маси тіла в динаміці спостереження в групах А#, В#,  $p < 0,05$ .

непараметричні кількісні дані – як медіана (Me), межі квартильних відрізків [Q25 %; Q75 %]; категоріальні змінні – як абсолютна кількість випадків (n) у групі та частота у відсотках (%). Кількісні ознаки в нез'язаних вибірках порівнювали за критерієм Mann–Whitney U Test, у зв'язаних вибірках – за критерієм Wilcoxon rank test. Перевірку статистичних гіпотез здійснили, застосувавши непараметричний критерій Pearson's chi-squared test і точний критерій Fisher. Використали методи лінійної регресії, застосували рангову кореляцію Spearman Rank Order Correlations ( $\rho$ ). Силу зв'язку між двома параметрами оцінювали за шкалою Cheddocke: висока – при R/ $\rho$ , що перевищувала 0,7, помітна – 0,5–0,7, помірна – 0,3–0,5, слабка – 0,1–0,3. Відмінності вважали достовірними при  $p < 0,05$ .

## Результати

Порівняно з доношеними дітьми всі передчасно народжені діти мали статистично вірогідно ( $p < 0,05$ ) нижчі показники  $SOS_1$  (табл. 2).

Визначили статистично достовірний ( $p < 0,05$ ) прямий високий кореляційний зв'язок ( $R = 0,78$ ) показників  $SOS$  від ГВ новонароджених, що описується рівнянням парної лінійної регресії:  $SOS$  (м/с) =  $1533,3 + 40,1 \times n$ , де  $n$  – ГВ дитини. Збільшення ГВ при народженні на 1 тиждень супроводжувалося збільшенням показника  $SOS$  на 40,1 м/с. Відповідно до коефіцієнта детермінації ( $R^2$ ) врахували 68,9 % досліджених випадків. Однак серед 70 недоношених дітей лише 32 (45,7 %) малюки мали показники  $SOS_1$ , що визначено за  $Z_1$ -score як середні, з розподілом за Z-score, аналогічним до такого в доношених дітей групи контролю. У більшості недоношених новонароджених показники  $SOS_1$  за Z-score були нижчі за середні: у 20 (28,6 %) малюків – низький  $Z_1$ -score (група В), у 18 (25,7 %) пацієнтів – значно низький  $Z_1$ -score (група С).

Вивчили розподіл дітей різних гестаційних термінів народження за  $Z_1$ -score  $SOS_1$ . Серед 33 (100,0 %) малюків, народжених у ГВ 33 тижні та раніше, у 23 (69,7 %) випадках встановили низькі та значно низькі показники Z-score, фізіологічні характеристики МЩКТ мали 10 (30,3 %) дітей. Серед 37 (100,0 %) недоношених дітей пізніших термінів народження фізіологічні внутрішньоутробні темпи формування кісткової маси (група А) мали 22 (59,5 %) пацієнти, остеопенію визначили у 15 (40,5 %) новонароджених. Отже, шанси

наявності остеопенії в дітей, народжених у ГВ 33 тижні та раніше, в 3,37 раза вищі, ніж у дітей більшого ГВ, відмінність шансів статистично значуща ( $OR = 3,37$ ; ДІ 95 % [1,25; 9,09],  $p < 0,05$ ).

Серед дітей з остеопенією, які народжені в ГВ 33 тижні та раніше, значно низький  $Z_1$ -score мала більшість – 15 (65,2 %) випадків з 23 (100,0 %), а також лише 3 (20,0 %) дитини із 15 (100,0 %) недоношених дітей, народжених на пізніх термінах гестації. Отже, при народженні в ГВ 33 тижні та раніше шанси мати остеопенію зі значно низьким Z-score в 7,5 раза вищі, ніж у недоношених дітей, народжених у ГВ 34 тижні та пізніше. Відмінність шансів статистично значуща ( $OR = 7,50$ ; ДІ 95 % [1,60; 34,59],  $p < 0,05$ ).

У віці  $24,8 \pm 3,9$  дня простежили перерозподіл дітей між групами спостереження за показником  $SOS_3$  за  $Z_3$  (табл. 3). У групі А із 25 (100,0 %) новонароджених показник  $SOS_3$  за  $Z_3$  критерієм залишився в межах середніх значень у 12 (48,0 %) немовлят. Остеопенію діагностували в решті немовлят групи А: низький Z-score  $SOS_3$  – у 8 (32,0 %), значно низький – у 5 (20,0 %) дітей.

У групі В у жодного з 16 (100,0 %) новонароджених не відбулося відновлення МЩКТ до фізіологічного рівня. Погіршення показників  $SOS_3$  та  $Z_3$ -score до значно низьких спостерігали у 3 (18,8 %) дітей, які були народжені в ГВ менше ніж 34 тижні.

Під час спостереження статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) частіше спостерігали збільшення дефіциту кісткової тканини в дітей групи А (52,0 % із 25) проти 18,8 % дітей групи В, у яких стан МЩКТ погіршився до значно низьких показників Z-score  $SOS_3$ .

У дітей обох груп А і В встановили статистично значущу ( $p < 0,05$ ) зниження показників Z-score  $SOS_3$  у межах SD коливань відповідних груп: у групі В – до другого тижня життя (з -1,4 [-1,5; -1,3] до -1,6 [-1,8; -1,4]), у групі А – до третього тижня життя (з -0,4 [-0,8; 0,3] до -1,0 [-1,0; -0,8]).

У більшості новонароджених (13 (86,7 %) із 15) групи С показники  $Z_3$ -score до відповідного ГВ залишалися постійно значно низькими, без статистично вірогідної ( $p > 0,05$ ) різниці ( $Z_1$  (-2,6 [-2,9; -2,5] м/с),  $Z_2$  (-2,6 [-3,0; -2,2] м/с),  $Z_3$  (-2,6 [-2,9; -2,2] м/с)). Динамічне збільшення показників  $SOS_3$  за Z-score до низьких значень відбулося тільки у 2 (13,3 %) із 15 дітей групи С. У групі контролю статистично вірогідні зміни Z-score не визначили (0,1 [-0,5; 0,5] до 0,0 [-0,6; 1,1],  $p > 0,05$ ).

Таблиця 2. Показник SOS<sub>3</sub> залежно від ГВ народження дітей

Показник, одиниці вимірювання	Гестаційний вік народження (тижні)		
	28–33 (n = 33)	34–36 (n = 37)	37–40 (n = 20)
SOS <sub>3</sub> , м/с	2762 [2719; 2855]*,&	2921 [2852; 2955]*,&	3076 [3033; 3116]*

\*: вірогідна різниця між показниками недоношених дітей із груп дослідження та групи контролю,  $p < 0,05$ ; &: достовірна різниця між показниками недоношених дітей,  $p < 0,05$ .

Таблиця 3. Перерозподіл дітей між групами в динаміці спостереження у віці 24,8 ± 3,9 дня, n (%)

Групи		Групи динамічного спостереження		
		A# (n = 12)	B# (n = 23)	C# (n = 21)
A (n = 25, 100 %)	ГВ 33 тижні та менше (n = 9, 36,0 %)	4 (16,0 %)	2 (8,0 %)	3 (12,0 %)
	ГВ 34 тижні та більше (n = 16, 64,0 %)	8 (32,0 %)	6 (24,0 %)	2 (8,0 %)
B (n = 16, 100 %)	ГВ 33 тижні та менше (n = 8, 50,0 %)	–	5 (31,3 %)	3 (18,8 %)
	ГВ 34 тижні та більше (n = 8, 50,0 %)	–	8 (50,0 %)	0
C (n = 15, 100 %)	ГВ 33 тижні та менше (n = 12, 80,0 %)	–	1 (6,7 %)	11 (73,3 %)
	ГВ 34 тижні та більше (n = 3, 20,0 %)	–	1 (6,7 %)	2 (13,3 %)

Отже, протягом динамічного спостереження (24,8 ± 3,9 доби життя) недоношених дітей (56 (100,0 %) відбулося збільшення кількості немовлят із дефіцитом кісткової тканини за Z-score SOS<sub>3</sub>: до значно низьких показників – у 21 (37,5 %) дитини, до низького рівня – у 23 (41,1 %) малюків; середні показники залишились лише у 12 (21,4 %) обстежених.

Аналіз динамічних змін SOS<sub>3</sub> залежно від ГВ народження дітей показав, що серед немовлят із ГВ при народженні 33 тижні та менше остеопенія встановлена у 25 (86,2 %) випадках із 29 (100,0 %). У переважній більшості малюків (17 (58,6 %) із 29) встановлено значно низькі Z-score SOS<sub>3</sub>. Серед недоношених дітей, які народжені в ГВ 34 тижні та пізніше, остеопенію діагностували в 19 (70,4 %) випадках із 27 (100,0 %), значно низькі показники встановили у 4 (14,8 %) немовлят. Недоношені діти обох гестаційних інтервалів народження мали однакові шанси розвитку остеопенії (OR = 2,63; ДІ 95 % [0,69; 10,05],  $p > 0,05$ ). Разом із тим, у дітей із меншим ГВ народження шанси мати значно низькі показники МЦКТ залишалися в 8,15 раза вищими, ніж у народжених у пізнішому ГВ (OR = 8,15; ДІ 95 % [2,23; 29,70],  $p < 0,05$ ). Кількість дітей з остеопенією зі значно низьким Z-score збільшилася в 1,5 раза.

Визначили зміну кореляційних зв'язків між показниками швидкості поширення ультразвуку в кістковій тканині та фізичним розвитком новонароджених із груп дослідження. При народженні в недоношених дітей встановили статистично достовірні кореляційні зв'язки: в групі А – зворотний помірної сили ( $\rho = -0,45$ ,  $p < 0,05$ ) Z<sub>1</sub>-score із довжиною тіла; в групі В – прямий помітної сили ( $\rho = 0,61$ ,  $p < 0,05$ ) показника SOS<sub>1</sub> із довжиною тіла; у групі С – зворотний помітний ( $\rho = -0,50$ ,  $p < 0,05$ ) показника SOS<sub>1</sub> із масою тіла. Зі зростанням дітей на третьому тижні життя (24,8 ± 3,9 доби) статистично вірогідні ( $p < 0,05$ ) помітної сили кореляційні зв'язки з тими ж показниками зберігалися, зокрема в групі В# – прямий ( $\rho = 0,61$ ) із довжиною тіла немовлят, у групі С# – зворотний ( $\rho = -0,60$ ) із масою тіла. В групі контролю кореляційні зв'язки між швидкістю поширення ультразвуку в кістковій тканині та показниками фізичного розвитку доношених дітей не виявили.

## Обговорення

Розвиток НМХК (неонатальної остеопенії) залишається актуальним питанням неонатології, оскільки трансплацентарне переривання перенесення мінералів до кісткової тканини плода виникає при кожних передчасних пологах. У недоношених дітей не відбувається внутрішньоутробна фаза активної мінералізації кісток, що має бути в останньому триместрі розвитку *in utero* [17].

Термін передчасного народження – фактор, що має істотний вплив на стан зрілості кісткової системи. Постнатальні адаптаційні зміни обміну речовин і мінералів не сприяють формуванню кісткової маси недоношених новонароджених [18,19]. Саме «значне уповільнення мінералізації білкового матриксу та затримку розвитку кісткової тканини» в недоношених новонароджених визначають як один із варіантів перебігу неонатальної остеопенії – безсимптомної остеопенії без переломів кісток, як наведено в клінічній постанові до наказу МОЗ України від 16.04.2022 року № 650 [6].

Кількісна ультразвукова денситометрія, яку використовують як надійну, безпечну альтернативу рентгенологічним методам дослідження в дітей, рекомендована для оцінювання дефіциту кісткової тканини за Z-score SOS. Встановили, що Z-score менше за -1,0 SD треба визначати як остеопенію в дітей, підлітків і дорослих; якщо цей показник дорівнює чи становить менше ніж -2,0 SD у дітей, слід говорити про «діапазон, нижчий за очікуваний для цього віку» [12,13].

Наявність репрезентативної бази («Sunlight Omnisense 9000») показників SOS до відповідного ГВ народження немовлят дала змогу визначити, що всі абсолютні параметри SOS у передчасно народжених дітей статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) нижчі, ніж у групі контролю доношених дітей, де всі немовлята мали середні показники SOS за Z-score. Це підтверджено і в інших дослідженнях [20,21]. Така залежність описана рівнянням парної лінійної регресії, що врахувало 68,9 % досліджених випадків. Відсутність дефіциту кісткової тканини визначили у 45,7 % пацієнтів з-поміж 70 недоношених дітей, народжених у ГВ 28–36 тижнів, а також у всіх 20 (100,0 %) доношених новонароджених. Решта (54,3 %) недоношених дітей мали прояви остеопенії, зокрема в них встановили показники SOS за Z-score, нижчі за середні для відповідного ГВ: низькі показники (Z від -1,1 SD до -2,0 SD) – у 28,6 % недоношених дітей, значно низькі (Z  $\geq$  -2,0 SD) – у 25,7 % пацієнтів при народженні. За даними E. V. Schulz, Galaad Torró-Ferrero, неонатальну остеопенію діагностували у 10–54 % немовлят, найчастіше у народжених в ГВ, що менший за 34 тижні.

Постнатально збільшення дефіциту кісткової тканини спостерігали у недоношених дітей із груп А і В. Траєкторія змін швидкості поширення ультразвуку в кістковій тканині за критерієм Z-score від народження до 4 тижня життя характеризувалася зменшенням в 2,1 раза (з 45,7 % до 21,4 %) кількості немовлят із середніми показниками Z-score до відповідного постконцептуального віку. Статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) частіше збільшення дефіциту кісткової тканини виявляли в дітей (52,0 % випадки із 25) із нормальними / середніми показниками Z-score SOS,

а в 18,8 % дітей визначили погіршення стану МЩКТ від низьких показників Z-score SOS при народженні до значно низьких. Остеопенію з низьким Z-score діагностували у 41,1 % немовлят, значне зниження зафіксували ще у 37,5 % недоношених дітей. Аналогічні висновки щодо зниження МЩКТ, зокрема за зменшенням швидкості поширення ультразвуку в кістковій тканині в перші місяці життя недоношених малюків, зроблено в більшості досліджень [22,23,24].

У дітей з остеопенією (низьким Z-score) зменшення SOS спостерігали, починаючи з другого тижня життя ( $p < 0,05$ ); у групі з середніми значеннями SOS – дещо пізніше, на третьому тижні життя немовлят. У дітей зі значно низькими показниками Z-score показники SOS залишались такими в більшості немовлят (86,7 %). Різні темпи формування дефіциту кісткової тканини пов'язані з різними резервами мінеральних складових кісток у недоношених дітей. За даними M. F. Faienza et al., недостатній вміст мінералів і вищі метаболічні потреби немовлят при передчасному народженні призводять до аномального моделювання кісток і виникнення неонатальної остеопенії [17]. Зниження МЩКТ у перші тижні життя найчастіше пов'язують із постнатальним недостатнім споживанням мінералів, супутніми хворобами дітей [7]. Корекцію цих змін у недоношених немовлят, народжених у ранні терміни вагітності, здійснюють, використовуючи тривалу інфузійну терапію, що включає і препарати парентерального вигодовування, і добові потреби розчинів електролітів, зокрема кальцію глюконату. Завдяки цьому частково компенсують втрати мінералів, але не відновлюють до оптимальних значень МЩКТ. Про це свідчать результати нашого дослідження динамічних змін за критерієм Z-score SOS і відомості фахової літератури [25].

Більшість науковців стверджують, що ГВ народження – провідний фактор виникнення остеопенії в новонароджених [19,20,21]. Ми встановили показники шансів наявності остеопенії в новонароджених залежно від гестаційних термінів їхнього народження. Менший гестаційний вік народження дітей підвищує в 3,37 раза шанси наявності остеопенії (OR = 3,37; ДІ 95 % [1,25; 9,09],  $p < 0,05$ ), в 7,50 раза – шанси мати саме значно низькі показники Z-score швидкості поширення ультразвуку в кістковій тканині (OR = 7,50; ДІ 95 % [1,60; 34,59],  $p < 0,05$ ), ніж при народженні в 34 тижні гестації та пізніше. Протягом першого місяця зростання в немовлят із меншим ГВ народження шанси залишити значний дефіцит кісткової маси в 8,15 раза вищий, ніж у народжених у старшому ГВ (OR = 8,15; ДІ 95 % [2,23; 29,70],  $p < 0,05$ ).

Фізичний розвиток плода, а надалі новонародженої дитини та формування пренатальної, постнатальної мінералізації кісткової тканини досліджували чимало науковців, отримали доволі різні висновки щодо взаємного впливу цих процесів або навіть не виявляли зв'язки між ними [1,22,26,27,28,29]. У нашому дослідженні лише в недоношених дітей встановили статистично значущі ( $p < 0,05$ ) кореляційні зв'язки між SOS та антропометричними параметрами. Значно низькі показники SOS зворотно корелювали з масою тіла немовлят і при народженні, і при збільшенні

маси тіла в процесі зростання ( $\rho = -0,50$  та  $\rho = -0,60$  відповідно,  $p < 0,05$ ). Низькі показники SOS мали прямі кореляційні зв'язки ( $\rho = 0,61$ ,  $p < 0,05$ ) з довжиною тіла немовлят і при народженні, і під час зростання. Зіставний за силою та протилежний за напрямом кореляційний зв'язок встановили у групі дітей із нормальними показниками SOS. Аналогічні зміни МЩКТ у новонароджених і кореляційні зв'язки з показниками їхнього фізичного розвитку визначили A. deLange et al., E. Ritschl et al., N. Tansug et al. [22,30,31]. Ці кореляції пов'язували з різними темпами зростання плода в терміни від 28 до 37 тижнів вагітності та надалі, в перший місяць життя новонароджених, з різними пренатальними запасами мінералів, зокрема солей кальцію. Втім, характеристики фізичного розвитку не є надійними орієнтирами під час оцінювання стану мінералізації кісткової тканини, що потребує безпосереднього динамічного вимірювання в недоношених дітей.

Градація за критерієм Z-score кількісного показника швидкості поширення ультразвуку в кістковій тканині в недоношених новонароджених різного гестаційного віку, закономірності динамічних змін кісткової тканини протягом періоду інтенсивного виходжування немовлят розкривають питання щодо наявності остеопенії в недоношених дітей, не виключаючи в частині з них транзиторної фази природного остеогенезу, пов'язаного з особливостями генетичного регулювання внутрішньоутробного кісткоутворення, терміном народження та постнатальним метаболізмом кісткової тканини. Тому факт остеопенії лише за критерієм Z-score SOS не може бути вирішальним висновком діагностики неонатальної остеопенії, потребує продовження дослідження, зокрема визначення впливу факторів ризику порушення остеогенезу при внутрішньо- та позаутробному розвитку немовлят, пошуку відповідних змін біохімічних маркерів кісткового метаболізму в новонароджених.

## Висновки

1. Швидкість поширення ультразвуку в кістковій тканині (SOS) за оцінюванням критерію Z-score відповідає нормі у 45,7 % із 70 дітей при народженні в гестаційному віці 28–36 тижнів. У решти недоношених дітей визначена остеопенія з низьким (28,6 % дітей) та значно низьким (25,7 %) Z-score SOS. За перші 4 тижні життя кількість немовлят з остеопенією збільшилася в 1,4 раза (78,6 %).

2. За перші 4 тижні життя статистично достовірно частіше ( $p < 0,05$ ) спостерігали збільшення дефіциту кісткової тканини в дітей (52,0 % випадки з 25) із нормальними / середніми показниками Z-score SOS; у 18,8 % дітей виявили погіршення стану МЩКТ від низьких показників Z-score SOS при народженні до значно низьких. У більшості (86,6 %) дітей зі значно низьким критерієм Z-score при народженні показники залишились сталими.

3. Менший гестаційний вік народження новонароджених підвищує в 3,37 раза шанси наявності остеопенії (OR = 3,37; ДІ 95 % [1,25; 9,09],  $p < 0,05$ ), в 7,50 раза – шанси мати саме значно низькі показники Z-score SOS (OR = 7,50; ДІ 95 % [1,60; 34,59],  $p < 0,05$ ), в 8,15



раза – залишити незмінними низькі показники Z-score SOS протягом першого місяця життя (OR = 8,15; ДІ 95 % [2,23; 29,70],  $p < 0,05$ ), ніж при народженні в 34 тижні гестації та пізніше.

4. Показники фізичного розвитку недоношених новонароджених не дають змоги передбачувати стан і зміни швидкості поширення ультразвуку в кістковій тканині, потребують динамічної ультразвукової денситометрії попри наявність кореляційних зв'язків показників SOS із масою або довжиною тіла немовлят залежно від гестаційних термінів народження.

**Перспективи подальших досліджень.** Продовження вивчення й наукового аналізу потребують пренатальні та постнатальні фактори ризику, що спричиняють формування остеопенії в недоношених дітей, визначення біохімічних змін при остеопенії з низькими та значно низькими показниками Z-score SOS під час кількісної ультразвукової денситометрії для розроблення алгоритмів діагностики, лікування та профілактики метаболічних порушень кісткової тканини в цих дітей.

#### Фінансування

Дослідження здійснене в рамках НДР Запорізького державного медико-фармацевтичного університету «Наукове обґрунтування діагностичних стратегій, оптимізація лікувальних заходів, удосконалення реабілітаційних та профілактичних алгоритмів при спостереженні хворих дітей різного віку», держреєстрація № 0120U101143 (2020–2024).

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 16.05.2023

Після доопрацювання / Revised: 15.06.2023

Схвалено до друку / Accepted: 28.06.2023

#### Відомості про авторів:

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

ORCID ID: 0000-0002-6125-2776

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

ORCID ID: 0000-0003-2202-0873

#### Information about authors:

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

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

#### References

- Wang, J., Zhao, Q., Chen, B., Sun, J., Huang, J., Meng, J., Li, S., Yan, W., Ren, C., & Hao, L. (2022). Risk factors for metabolic bone disease of prematurity: A meta-analysis. *PLoS one*, 17(6), e0269180. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269180>
- Angelika, D., Ugrasena, I. D. G., Etika, R., Rahardjo, P., Bos, A. F., & Sauer, P. J. J. (2021). The incidence of osteopenia of prematurity in preterm infants without phosphate supplementation: A prospective, observational study: A prospective, observational study. *Medicine*, 100(18), e25758. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000025758>
- Rehman, M. U., & Narchi, H. (2015). Metabolic bone disease in the preterm infant: Current state and future directions. *World Journal of Methodology*, 5(3), 115-121. <https://doi.org/10.5662/wjmv.v5.i3.115>
- Stalnakker, K. A., & Poskey, G. A. (2016). Osteopenia of Prematurity: Does Physical Activity Improve Bone Mineralization in Preterm Infants?. *Neonatal network : NN*, 35(2), 95-104. <https://doi.org/10.1891/0730-0832.35.2.95>
- Torró-Ferrero, G., Fernández-Rego, F. J., & Gómez-Conesa, A. (2021). Physical therapy to prevent osteopenia in preterm infants: A systematic review. *Children (Basel, Switzerland)*, 8(8), 664. <https://doi.org/10.3390/children8080664>
- Ministry of Health of Ukraine. (2022). *Unifikovanyi klinichniy protokol "Parenteralne kharchuvannya novonarodzhennykh ditei"* [Unified clinical protocol "Parenteral nutrition of newborn children"]. <https://neonatology.org.ua/news/association/2022/04/570>
- Tong, L., Gopal-Kothandapani, J. S., & Offiah, A. C. (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>
- Viswanathan, S., Khasawneh, W., McNelis, K., Dykstra, C., Amstadt, R., Super, D. M., Groh-Wargo, S., & Kumar, D. (2014). Metabolic bone disease: a continued challenge in extremely low birth weight infants: A continued challenge in extremely low birth weight infants. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, 38(8), 982-990. <https://doi.org/10.1177/0148607113499590>
- Nehra, D., Carlson, S. J., Fallon, E. M., Kalish, B., Potemkin, A. K., Gura, K. M., Simpser, E., Compber, C., Puder, M., & American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. (2013). A.S.P.E.N. clinical guidelines: nutrition support of neonatal patients at risk for metabolic bone disease: Nutrition support of neonatal patients at risk for metabolic bone disease. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, 37(5), 570-598. <https://doi.org/10.1177/0148607113487216>
- Shalof, H., Dimitri, P., Shuweihi, F., & Offiah, A. C. (2021). "Which skeletal imaging modality is best for assessing bone health in children and young adults compared to DXA? A systematic review and meta-analysis". *Bone*, 150, 116013. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.116013>
- Chong, K. H., Poh, B. K., Jamil, N. A., Kamaruddin, N. A., & Deurenberg, P. (2015). Radial quantitative ultrasound and dual energy x-ray absorptiometry: intermethod agreement for bone status assessment in children. *BioMed research international*, 2015, 232876. <https://doi.org/10.1155/2015/232876>
- ISCD. (2019, June). *Official positions 2019 – Pediatric. Skeletal Health Assessment in Children from Infancy to Adolescence*. <https://iscd.org/wp-content/uploads/2021/09/2019-Official-Positions-Pediatric-1.pdf>
- Marushko, Yu. V., Volokha, T. I., & Asonov, S. A. (2016). Ultrazvukova densytometriia (aksialne vymiryuvannia) u diahnozytsi osteopenichnoho syndromu u ditei z riznoiu somatychnoiu patolohiieiu [Ultrasound densitometry (axial dimension) in the diagnosis of osteopenia syndrome in children with various somatic pathology]. *Sovremennaya pediatriya*, (1), 54-58. [in Ukrainian].
- Sethi, A., Priyadarshi, M., & Agarwal, R. (2020). Mineral and bone physiology in the foetus, preterm and full-term neonates. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 25(1), 101076. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2019.101076>
- Kelly, A., Kovatch, K. J., & Garber, S. J. (2014). Metabolic bone disease screening practices among U.S. neonatologists. *Clinical pediatrics*, 53(11), 1077-1083. <https://doi.org/10.1177/0009922814535661>
- 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>
- Faienza, M. F., D'Amato, E., Natale, M. P., Grano, M., Chiarito, M., Brunetti, G., & D'Amato, G. (2019). Metabolic bone disease of prematurity: Diagnosis and management. *Frontiers in pediatrics*, 7. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00143>
- Avila-Alvarez, A., Urisarri, A., Fuentes-Carballal, J., Mandiá, N., Suscas-Alonso, A., & Couce, M. L. (2020). Metabolic bone disease of prematurity: Risk factors and associated short-term outcomes. *Nutrients*, 12(12), 3786. <https://doi.org/10.3390/nu12123786>
- Ramot, R., Kachhawa, G., Kulshreshtha, V., Varshney, S., Sankar, M. J., Devasenthipathy, K., Sreenivas, V., & Khadgawat, R. (2019). Bone Mass in Newborns Assessed by DXA – A Systematic Review and Meta-analysis. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 23(2), 198-205. [https://doi.org/10.4103/ijem.IJEM\\_681\\_18](https://doi.org/10.4103/ijem.IJEM_681_18)
- Mihatsch, W., Dorronsoro Martín, I., Barrios-Sabador, V., Couce, M. L., Martos-Moreno, G. Á., Argente, J., Quero, J., & Saenz de Pipaon, M. (2021). Bone mineral density, body composition, and metabolic health of very low birth weight infants fed in hospital following current macronutrient recommendations during the first 3 years of life. *Nutrients*, 13(3), 1005. <https://doi.org/10.3390/nu13031005>
- Körmann, M. N., Christmann, V., Gradussen, C. J. W., Rodwell, L., Gotthardt, M., Van Goudoever, J. B., & Van Heijst, A. F. J. (2017). Growth and Bone Mineralization of Very Preterm Infants at Term Corrected

- Age in Relation to Different Nutritional Intakes in the Early Postnatal Period. *Nutrients*, 9(12), 1318. <https://doi.org/10.3390/nu9121318>
22. deLange, A., Maaskant, J. M., & vanWeissenbruch, M. M. (2021). Is quantitative ultrasound a measure for metabolic bone disease in preterm-born infants? A prospective subcohort study. *European journal of pediatrics*, 180(9), 3009-3017. <https://doi.org/10.1007/s00431-021-04081-4>
  23. Chen, H.-L., Lee, W.-T., Lee, P.-L., Liu, P.-L., & Yang, R.-C. (2016). Postnatal changes in tibial bone speed of sound of preterm and term infants during infancy. *PLoS One*, 11(11), e0166434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166434>
  24. Zhao, Z., Ding, M., Hu, Z., Dai, Q., Satija, A., Zhou, A., Xu, Y., Zhang, X., Hu, F. B., & Xu, H. (2015). Trajectories of length, weight, and bone mineral density among preterm infants during the first 12 months of corrected age in China. *BMC pediatrics*, 15, 91. <https://doi.org/10.1186/s12887-015-0396-6>
  25. Schulz, E. V., & Wagner, C. L. (2020). History, epidemiology and prevalence of neonatal bone mineral metabolic disorders. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 25(1), 101069. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2019.10106>
  26. McDevitt, H., Tomlinson, C., White, M. P., & Ahmed, S. F. (2007). Changes in quantitative ultrasound in infants born at less than 32 weeks' gestation over the first 2 years of life: influence of clinical and biochemical changes. *Calcified tissue international*, 81(4), 263-269. <https://doi.org/10.1007/s00223-007-9064-7>
  27. Ukarapong, S., Venkatarayappa, S. K. B., Navarrete, C., & Berkovitz, G. (2017). Risk factors of metabolic bone disease of prematurity. *Early Human Development*, 112, 29-34. <https://doi.org/10.1016/j.earhumdev.2017.06.010>
  28. Savino, F., Viola, S., Benetti, S., Ceratto, S., Tarasco, V., Lupica, M. M., & Cordero di Montezemolo, L. (2013). Quantitative ultrasound applied to metacarpal bone in infants. *PeerJ*, 1, e141. <https://doi.org/10.7717/peerj.141>
  29. Jiang, H., Guo, J., Li, J., Li, C., Du, W., Canavese, F., Baker, C., Ying, H., & Hua, J. (2023). Artificial Neural Network Modeling to Predict Neonatal Metabolic Bone Disease in the Prenatal and Postnatal Periods. *JAMA network open*, 6(1), e2251849. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.51849>
  30. Ritschl, E., Wehmeijer, K., DE Terlizzi, F., Wipfler, E., Cadossi, R., Douma, D., Urlesberger, B., & Müller, W. (2005). Assessment of skeletal development in preterm and term infants by quantitative ultrasound. *Pediatric research*, 58(2), 341-346. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000169996.25179.EC>
  31. Tansug, N., Yildirim, S. A., Canda, E., Ozalp, D., Yilmaz, O., Taneli, F., & Ersoy, B. (2011). Changes in quantitative ultrasound in preterm and term infants during the first year of life. *European journal of radiology*, 79(3), 428-431. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2010.03.001>

# Токсикологічні та морфологічні аспекти прояву гострої дії нано-TiO<sub>2</sub> і нано-TiO<sub>2</sub>-Ag на печінку лабораторних мишей

О. П. Яворовський<sup>id</sup> A,C,D,E,F, С. І. Савосько<sup>id</sup> A,B,C,D,E, В. М. Рябовол<sup>id</sup> \*A,B,C,D,E, Т. О. Зінченко<sup>id</sup> B,C,D,E

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, 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:

наночастинки  
діоксиду титану,  
гістологія печінки,  
гепатотоксичність,  
нанотоксичність.

Патологія. 2023.  
Т. 20, № 2(58).  
С. 162-169

\*E-mail:  
riabovol1@ukr.net

**Мета роботи** – дослідження особливостей токсичної дії нанопорошків TiO<sub>2</sub> і TiO<sub>2</sub>-Ag на морфологію та елементний склад печінки лабораторних мишей.

**Матеріали та методи.** У дослідженні використано модель гострої інтоксикації на лабораторних тваринах. Мишам внутрішньоочеревинно вводили нанопорошки TiO<sub>2</sub> і TiO<sub>2</sub>-Ag у дозі 4000 мг/кг, 7000 мг/кг або 10000 мг/кг. Впродовж двох тижнів спостерігали за тваринами, оцінювали летальність, досліджували накопичення нанопорошку в органі та морфологію тканин печінки. У зразках печінки визначали вміст титану та срібла методом оптико-емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язаною плазмою. Мікропрепарати тканини печінки досліджували на світловому мікроскопі Olympus BX51. Мікропрепарати печінки досліджували також сканувальною електронною мікроскопією (SEM) за допомогою приладу Tescan Mira 3, визначали елементний склад за допомогою енергодисперсійного спектрометра Oxford instruments, X-max 80 mm<sup>2</sup>.

**Результати.** Виявили залежність летальності мишей від дози нанопорошків; летальність вища при впливі нано-TiO<sub>2</sub>-Ag порівняно з нано-TiO<sub>2</sub>. Методом пробіт-аналізу розрахували середньосмертельні дози. Для нано-TiO<sub>2</sub> LD<sub>50</sub> становить 4783,30 мг/кг, для нано-TiO<sub>2</sub>-Ag – 724,44 мг/кг. Встановлено накопичення титану, а також титану та срібла в печінці після впливу нано-TiO<sub>2</sub> і нано-TiO<sub>2</sub>-Ag відповідно. Загалом спостерігали тенденцію до посилення залежності вмісту титану в тканині печінки від збільшення введеної дози нанопорошків.

Гістологічними методами досліджували морфологічні зміни в печінці. Найбільш характерні морфологічні ознаки токсичної дії нано-TiO<sub>2</sub> на тканину печінки – дистрофічні зміни на рівні 67,7 % (цитоплазматична вакуолізація в гепатоцитах), а в разі впливу нано-TiO<sub>2</sub>-Ag – початкові некротичні зміни на рівні 70 % (гепатоцити з пікнозом ядер). Зазначимо, що токсичну дію нано-TiO<sub>2</sub> і нано-TiO<sub>2</sub>-Ag значно рідше виявляли за фокальними некрозами та запальними реакціями (фокальна інфільтрація), в окремих випадках визначали адаптаційні зміни – збільшення кількості бінуклеарних гепатоцитів. У зразках печінки виявили агломерати чужорідного матеріалу (кристалічні включення), що досліджували спектрально; встановили високий вміст титану (Ti). За результатами SEM, морфометрія показала, що розміри наночастинок і їхніх агломератів становлять від 80 нм до 20 мкм.

**Висновки.** Летальність мишей виявилась вищою при введенні композиту нано-TiO<sub>2</sub>-Ag порівняно з нано-TiO<sub>2</sub>. За розрахованими середньосмертельними дозами обидва нанопорошки визначені до 3 класу (помірно небезпечні) небезпечності хімічних речовин за ГОСТ 12.1.007-76. Встановлено, що зі збільшенням введеної дози в тканині печінки лабораторних мишей зростає накопичення титану (при дії нано-TiO<sub>2</sub>), титану та срібла (при дії нано-TiO<sub>2</sub>-Ag). Характерні мікроскопічні ознаки токсичної дії нанопорошків TiO<sub>2</sub> та TiO<sub>2</sub>-Ag після внутрішньоочеревинного введення лабораторним мишам – дистрофічні зміни гепатоцитів, некроз паренхіми печінки, а запальні реакції виявляють рідше. SEM і метод елементної картографії титану підтвердили наявність наночастинок TiO<sub>2</sub> та їхніх агломератів у тканині печінки у разі введення нанопорошку TiO<sub>2</sub>.

## Key words:

titanium dioxide  
nanoparticles,  
liver histology,  
hepatotoxicity,  
nanotoxicity.

Pathologia, 2023. 20(2),  
162-169

## Toxicological and morphological aspects of nano-TiO<sub>2</sub> and nano-TiO<sub>2</sub>-Ag acute action on the liver of mice

O. P. Yavorovskiy, S. I. Savosko, V. M. Riabovol, T. O. Zinchenko

**Aim.** To study the toxic effect of TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>-Ag nanopowders on the morphology and elemental composition of the laboratory mice liver.

**Materials and methods.** The study used a model of acute intoxication on laboratory animals. Mice were injected intraperitoneally with TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>-Ag nanopowders at 4000 mg/kg, 7000 mg/kg, or 10000 mg/kg doses. During two weeks, the animals were observed, lethality was assessed, the accumulation of nanopowder in the organ and the morphology of liver tissues were investigated. The content of titanium and silver in liver samples was determined by optical emission spectroscopy with inductively coupled plasma. Liver tissue micropreparations were examined using an Olympus BX51 light microscope. Also, the micropreparations of the liver were examined by scanning electron microscopy (SEM) using the Tescan Mira 3 device, and the elemental composition was determined using an energy dispersive spectrometer Oxford instrument, X-max 80 mm<sup>2</sup>.

**Results.** The dependence of the mice lethality on the nanopowders dose was revealed; mortality was higher when exposed to nano-TiO<sub>2</sub>-Ag compared to nano-TiO<sub>2</sub>. Average lethal doses were calculated using probit analysis. For nano-TiO<sub>2</sub>, the LD<sub>50</sub> is 4783.30 mg/kg; for nano-TiO<sub>2</sub>-Ag – 724.44 mg/kg. The accumulation of titanium, titanium, and silver in the liver after exposure to nano-TiO<sub>2</sub> and nano-TiO<sub>2</sub>-Ag was established. In general, there was a tendency to increase the content of titanium in the skin tissue with an increase in the administered dose of nanopowders.



Morphological changes in the liver were studied by histological methods. The most characteristic morphological signs of the toxic effect of nano-TiO<sub>2</sub> on tissue were dystrophic changes at the level of 67.7 % (cytoplasmic vacuolization in hepatocytes), and when exposed to nano-TiO<sub>2</sub>-Ag – initial necrotic changes at the level of 70 % (hepatocytes with nuclear pyknosis). It is worth noting that the toxic effect of nano-TiO<sub>2</sub> and nano-TiO<sub>2</sub>-Ag is much less often manifested by focal necrosis and inflammatory reactions (focal infiltration), in some cases, there were adaptive changes that provoked an increase in the number of binuclear hepatocytes. In case of detection agglomerates of a foreign object (crystalline inclusions) were obtained, which were examined spectrally and showed a high content of titanium (Ti). SEM morphometry showed that the size of nanoparticles and their agglomerates ranged from 80 nm to 20 μm.

**Conclusions.** The lethality of mice was higher when the composition of nano-TiO<sub>2</sub>-Ag was introduced compared to nano-TiO<sub>2</sub>. Based on the calculated average lethal doses, both nanopowders were assigned to the 3<sup>rd</sup> class (moderately dangerous) of the danger of chemical substances according to the classification of GOST 12.1.007-76. It was established that with an increase in the injected dose in the tissue of the products of laboratory mice, the accumulation of titanium (under the action of nano-TiO<sub>2</sub>) and titanium and silver (under the action of nano-TiO<sub>2</sub>-Ag) increases. Characteristic microscopic signs of the toxic effect of TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>-Ag nanopowders after intraperitoneal injection in laboratory bags are dystrophic changes in hepatocytes, necrosis of parenchymal disease, while inflammatory reactions occur less often. SEM and the method of elemental mapping of titanium confirmed the presence of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and their agglomerates in skin tissue when TiO<sub>2</sub> nanopowder was administered.

Наноматеріали все ширше використовують у різних галузях економічної діяльності, включаючи біологію та медицину. Наночастинки діоксиду титану (нано-TiO<sub>2</sub>) – одні з найефективніших фотокаталізаторів, що застосовують для знешкодження органічних забруднювачів, знезаражування, створення антимікробних і самоочищених поверхонь. Так, наночастинки TiO<sub>2</sub> використовують для очищення та знезараження повітря приміщень, очищення стічних вод. Фотокаталітичну активність наночастинок TiO<sub>2</sub> значно підвищує додавання до нанодіоксиду титану певної кількості срібла (нано-TiO<sub>2</sub>-Ag) [1]. Виражена фотокаталітична активність зумовлює високу біологічну дію наночастинок TiO<sub>2</sub> – віруцидну, бактерицидну, фунгіцидну [2,3].

Як показали попередні дослідження, під час виробництва наноматеріалів наночастинки надходять у повітря робочої зони та можуть потрапляти в організм операторів синтезу інгаляційним шляхом, забруднювати шкіру й спецодяг. Відомо, що наночастинки діоксиду титану чинять шкідливу дію на клітинному рівні через оксидативний стрес, формуючи активні форми кисню [3,4,5,6].

Виявлено зміни, спричинені впливом наночастинок металів, експресії генів, що відповідають за циркадні ритми організму, регуляцію метаболізму та апоптоз клітин [7,8]. У фаховій літературі наведено доволі обмежені дані щодо впливу наночастинок TiO<sub>2</sub> на печінку, хоча добре відомо, що ключову роль у детоксикації екзогенних хімічних речовин відіграє саме цей орган [9,10]. Тому теоретичний і практичний гігієнічний інтерес викликає дослідження впливу нано-TiO<sub>2</sub> і нано-TiO<sub>2</sub>-Ag на структуру органа на рівні і світлової, й електронної мікроскопії, а також накопичення в ньому наночастинок або хімічних елементів, з яких складаються наночастинки.

## Мета роботи

Дослідження особливостей токсичної дії нанопорошків TiO<sub>2</sub> і TiO<sub>2</sub>-Ag на морфологію та елементний склад печінки лабораторних мишей.

## Матеріали і методи дослідження

Експерименти здійснили на лабораторних мишах на базі віварію Національного медичного університету

імені О. О. Богомольця. Для дослідження гострої токсичності нано-TiO<sub>2</sub> випробували 7 доз у діапазоні від 3000 мг/кг до 11000 мг/кг, нано-TiO<sub>2</sub>-Ag – 4 дози в діапазоні від 1000 мг/кг до 10000 мг/кг. Мишей поділили на групи по 6 особин для кожної дози нанопорошків. Середньосмертельні дози (LD<sub>50</sub>) для обох нанопорошків розраховували методом пробіт-аналізу в модифікації В. Б. Прозоровського.

Накопичення хімічних елементів наночастинок і морфологічних змін тканини в печінці вивчали на 45 мишах-самках лінії BALB/c. Миші одноразово отримали нано-TiO<sub>2</sub> і нано-TiO<sub>2</sub>-Ag у дозі 4000 мг/кг, 7000 мг/кг або 10000 мг/кг шляхом внутрішньоочеревинного введення. Для кожної дози нанопорошків сформували дослідну групу із 6 тварин (загалом 6 груп); у контрольній групі – 9 мишей. Суспензію нанопорошків готували на фізіологічному розчині (0,9 % NaCl) з перемішуванням на магнітній мішалці перед введенням. Контрольній групі тварин вводили фізіологічний розчин (0,9 % NaCl), який застосовували як дисперсне середовище. Після введення нанопорошку спостерігали за станом тварин упродовж двох тижнів, оцінювали прояви інтоксикації, здійснювали облік загинув особин. Тварин із контрольної та дослідних груп, які не загинули впродовж двох тижнів, виводили з експерименту на 14 добу методом декапітації під наркозом пропофолу 1 %.

Умови утримання та використання лабораторних тварин відповідали правилам і положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують із дослідними та іншими науковими цілями» (Страсбург, 1986), погоджені комісією з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, протокол № 128 від 23.12.2019 р.

Досліджували нанопорошок TiO<sub>2</sub>, синтезований методом термічного розкладу метатитанової кислоти шляхом нагрівання до температури 700 °C зі швидкістю нагріву 5 °C/хв, та наноккомпозит діоксиду титану зі сріблом (нано-TiO<sub>2</sub>-Ag), отриманий методом хімічного осадження метатитанової кислоти з додаванням нітрату срібла в кількості 4 % від маси композиту при температурі 500–600 °C, які одержані в Інституті проблем матеріалознавства імені І. М. Францевича НАН України. Середній розмір дисперсної фази для TiO<sub>2</sub>

у композитному матеріалі становив 13–20 нм, для Ag – 35–40 нм [1, 11].

Вміст хімічних елементів Ti та Ag у зразках печінки визначали за допомогою методу оптико-емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язаною плазмою (ОЕС-ІЗП) на приладі Optima 2100 DV (Perkin-Elmer, США) [12]. Наважку органів мишей проводили на аналітичних вагах, поміщали в автоклав, додавали 3,0 мл концентрованої нітратної кислоти (Merck) та витримували 30 хв. Потім мінералізували у мікрохвильовій печі MARS-one. Після охолодження пробу переміщували в мірний посуд і доводили об'єм до 5,0 мл деіонізованою водою. Статистично результати опрацьовували за допомогою інсталюваного програмного забезпечення приладу ОЕС-ІЗП WinLab32 в операційній системі Windows XP prof.

Печінку мишей для гістологічного дослідження брали після загибелі чи виведення з експерименту. Зразки органів фіксували у 10 % розчині формаліну (рН 7,4), зневоднювали в ізопропанолі (3 серії, 99,8 %), ущільнювали в парафіні (3 серії) (Leica Surgipath Paraplast Regular). Парафінові зрізи завтовшки 4 мкм виготовляли на мікротомі Thermo Microm HM 360. Зрізи депарафінізували, забарвлювали гематоксиліном та еозином, сіріусом червоним із дозобарвленням гематоксиліном Вейгерта. Мікропрепарати досліджували на мікроскопі Olympus BX51, фотографували при збільшенні  $\times 200$ ,  $\times 400$ . Мікроскопічні зміни печінки оцінювали за методом, що наведено в статті [12].

Із парафінових блоків виготовляли зрізи завтовшки 4 мкм, фіксували на округлі кремнієві скельця діаметром 6–8 мм (знежирені, без покриття). Скельця депарафінізували в ксилолі як для гістологічного дослідження, висушували в установці Samdri-780A у критичній точці  $\text{CO}_2$ . В установці Gatan 682 PECS створювали покриття Au/Pd завтовшки 15 нм. Сканувальну електронну мікроскопію (СЕМ) здійснили, застосувавши прилад Tescan Mira 3 LMU (Чехія). Зразки досліджували в режимі детекції вторинних (вибитих електронів з атомів, SE) та зворотновідбитих (BSE) електронів. Елементний склад і поелементне картування одержали за допомогою енергодисперсійного спектрометра Oxford instruments, X-max 80 mm<sup>2</sup> (Велика Британія).

Статистично результати дослідження опрацьовували, здійснивши перевірку на нормальність розподілу за критерієм W Шапіро–Вілка. Для статистичного опрацьовування використали параметричні критерії: Стюдента, дисперсійний аналіз, метод множинних порівнянь Шеффе. Застосували також непараметричні критерії: W-критерій Вілкоксона, ранговий однокфакторний аналіз Краскела–Волліса, множинні порівняння за критерієм Данна. Відмінність вважали статистично значущою при  $p < 0,05$ . Під час роботи використали пакет програм MedStat v.5.2 (Copyright© 2003–2019) [13].

## Результати

Для визначення гострої токсичності  $\text{TiO}_2$  випробували 7 доз у діапазоні від 3000 мг/кг до 11000 мг/кг.

Гостру токсичність  $\text{TiO}_2$ -Ag оцінювали при введенні 4 доз у діапазоні від 1000 мг/кг до 10000 мг/кг. При введенні  $\text{TiO}_2$  в дозі 5000 мг/кг і більше, а для  $\text{TiO}_2$ -Ag – у дозі 1000 мг/кг і більше спостерігали клініку гострого отруєння: втрату інтересу до їжі та води, зниження рухової активності, загальмованість і пригніченість тварин. Упродовж двох тижнів спостерігали загибель мишей, як правило, кількість випадків підвищувалась зі збільшенням введеної дози. Доза  $\text{TiO}_2$  9000 мг/кг визначена як абсолютно смертельна, доза  $\text{TiO}_2$  4000 мг/кг – максимально переносна. Для  $\text{TiO}_2$ -Ag доза 7000 мг/кг була абсолютно смертельною, максимально переносна доза – менше за 1000 мг/кг. Застосувавши метод пробіт-аналізу в модифікації В. Б. Прозоровського, розрахували середньосмертельні дози нанопорошків, що досліджували. Для  $\text{TiO}_2$  LD<sub>50</sub> становила 4783,30 мг/кг; для  $\text{TiO}_2$ -Ag – 724,44 мг/кг.

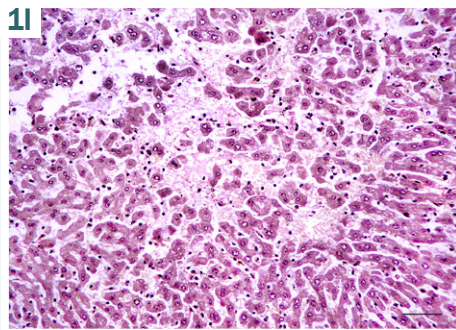
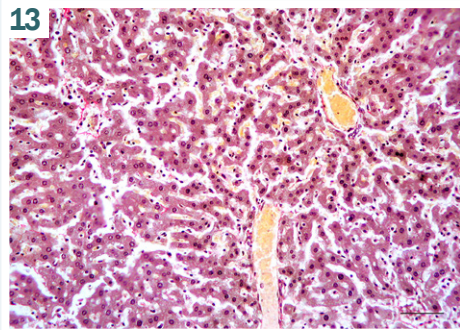
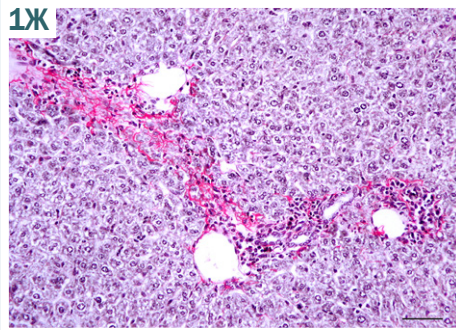
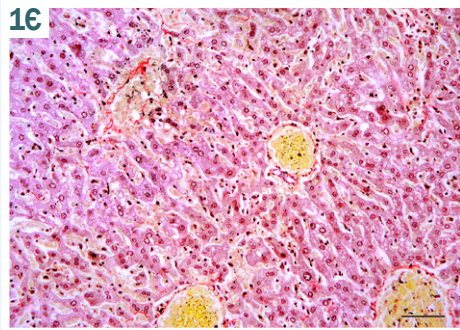
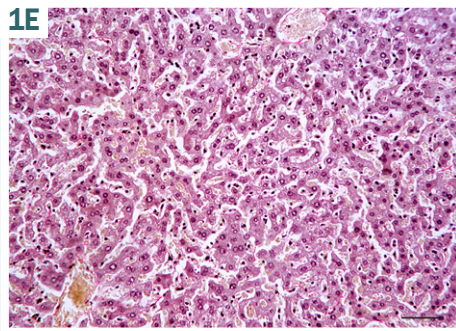
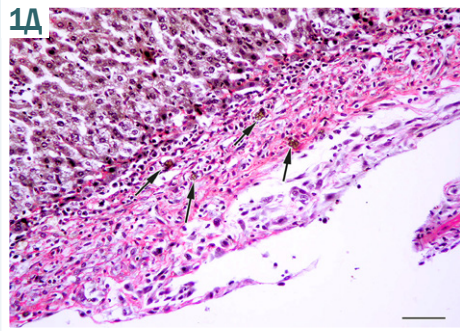
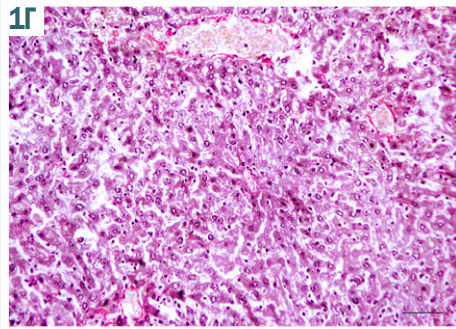
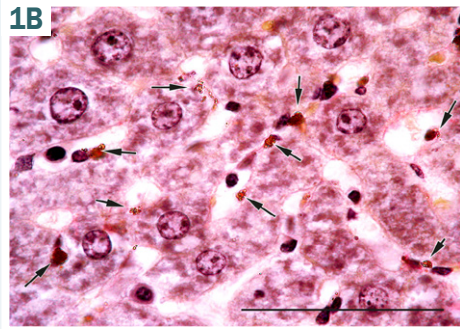
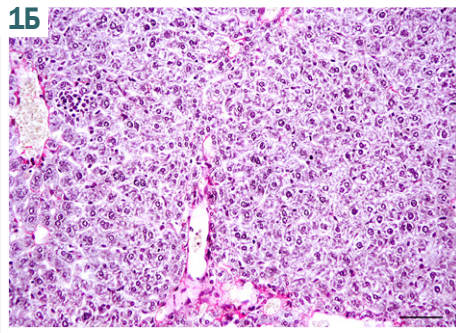
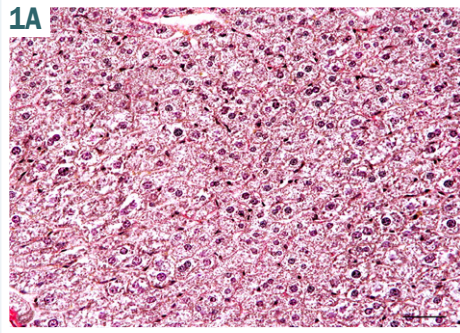
В експерименті на мишах для вивчення накопичення хімічних елементів наночастинок і морфологічних змін тканини в печінці зафіксували летальність дослідних тварин. Так, за результатами спостереження за групами мишей, яким вводили  $\text{TiO}_2$ , виявили: доза 4000 мг/кг не спричиняє загибель, доза 7000 мг/кг зумовлює летальність 33 % особин (загинули наприкінці другої доби), доза 10000 мг/кг призвела до загибелі всіх тварин здебільшого наприкінці першої доби. У групах мишей, яким вводили  $\text{TiO}_2$ -Ag, зафіксували загибель більшості тварин наприкінці першої доби, зокрема доза 4000 мг/кг спричинила летальність на рівні 83 %, дози 7000 мг/кг і 10000 мг/кг – 100 %.

Дані, що характеризують вміст у тканині печінки титану (Ti) та срібла (Ag) при введенні нанопорошків у різних дозах (4000 мг/кг, 7000 мг/кг і 10000 мг/кг), наведено в таблиці 1. Виявили тенденцію до посилення залежності вмісту титану в тканині печінки від збільшення дози нанопорошку. Винятком була доза 4000 мг/кг  $\text{TiO}_2$ , але зауважимо, що її введення не призвело до загибелі тварин до завершення експерименту, а при введенні інших доз зафіксували загибель мишей до кінця першої доби. Припускаємо, що відбувся перерозподіл і накопичення наночастинок  $\text{TiO}_2$  з інших органів і тканин у печінку. Крім того, можна припустити, що у дозі 10000 мг/кг  $\text{TiO}_2$ -Ag, який за LD<sub>50</sub> є більш токсичним, ніж  $\text{TiO}_2$ , інтенсивніше заповнював інтерстиціальний простір у тканині печінки мишей та спричиняв руйнування мембрани гепатоцитів.

Аналогічну залежність виявили щодо накопичення срібла в тканині печінки мишей при введенні нанопорошку  $\text{TiO}_2$ -Ag у дозах 4000 мг/кг, 7000 мг/кг, 10000 мг/кг. Про це свідчать не тільки виявлені достовірні зміни, але й верхня межа вірогідного інтервалу, що зростала з 3,40 мкг/г до 4,42 мкг/г і 6,27 мкг/г при введенні доз 4000 мг/кг, 7000 мг/кг і 10000 мг/кг відповідно.

Внутрішньоочеревинне введення фізіологічного розчину (контроль) не позначилось на морфології паренхіми печінки (рис. 1А), а  $\text{TiO}_2$  та  $\text{TiO}_2$ -Ag спричиняли зміни печінки, зокрема пошкодження клітин печінки гепатоцитів і клітин кровеносних судин (рис. 1Б–Г).





**Рис. 1.** Гістологічні зміни печінки мишей у контролі та після одноразового внутрішньоочеревинного введення  $\text{nano-TiO}_2$  або  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$ .

**А:** печінка тварин контрольної групи;

**Б:** некротичні зміни гепатоцитів, вакуолізація цитоплазми гепатоцитів печінки тварин після введення 4000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2$ , 14 доба;

**В:** включення  $\text{nano-TiO}_2$  (стрілка) у печінці тварин після введення 7000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2$ , 2 доба;

**Г:** некротичні зміни печінки тварин після введення 7000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2$ , 2 доба;

**Д:** включення  $\text{nano-TiO}_2$  (стрілка) та колагеногенез у субкапсулярній ділянці печінки тварин після введення 7000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2$ , 14 доба;

**Е:** розширення капілярів печінки тварин після введення 10000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2$ , 1 доба;

**Є:** розширення капілярів і некроз гепатоцитів печінки тварин після введення 4000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$ , 1 доба;

**Ж:** некротичні зміни печінки тварин після введення 4000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$ , 14 доба;

**З:** розширення капілярів і некроз гепатоцитів печінки тварин після введення 7000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$ , 1 доба;

**И:** ділянки некрозів у печінці тварин після введення 10000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$ , 1 доба.

Забарвлення – сіріус червоний, гематоксилін Вейгерта.  
Шкала 100 мкм.



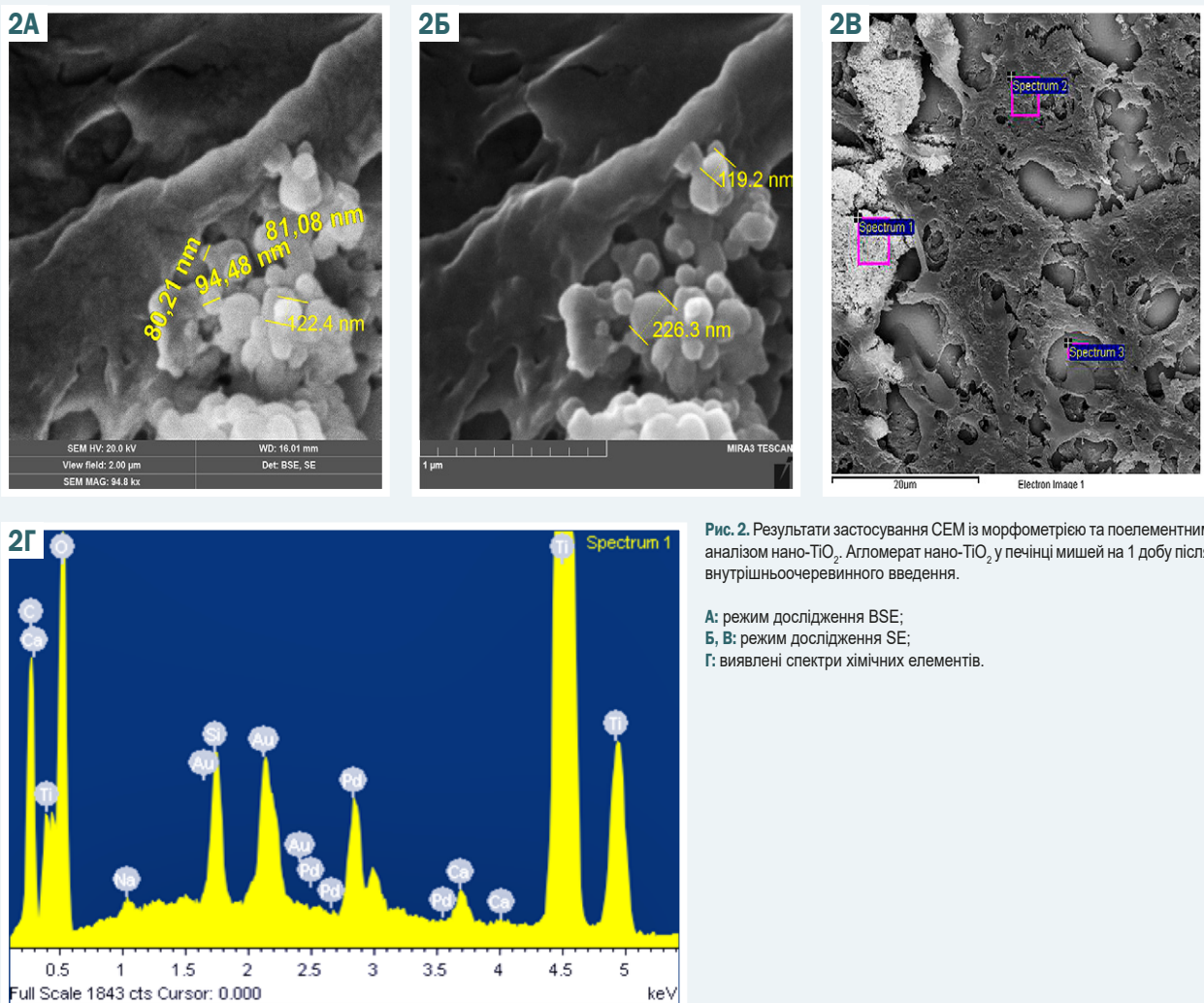


Рис. 2. Результати застосування СЕМ із морфометрією та поелементним аналізом  $\text{TiO}_2$ . Агломерат  $\text{TiO}_2$  у печінці мишей на 1 добу після внутрішньоочеревинного введення.

А: режим дослідження BSE;  
 Б, В: режим дослідження SE;  
 Г: виявлені спектри хімічних елементів.

При введенні нанопорошку  $\text{TiO}_2$  у дозі 7000 мг/кг у зразках печінки виявляли агломерати чужорідного матеріалу (кристалічні включення) і після аутопсії мишей, що загинули наприкінці другої доби (рис. 1В), і в особин, що були виведені з експерименту шляхом декапітації на 14 добу досліді (рис. 1Д). Кристалічні скупчення виявили в інтерстиціальному просторі, поблизу гепатоцитів балок печінкових часточок, вздовж стінки деяких гемокапілярів; в разі великої щільності кристалічних агломератів у паренхімі печінки спостерігали включення у просвіті мікросудин і жовчних проток (рис. 1В).

Неоднорідність виявлення, очевидно, пов'язана з дозою та характером розподілу  $\text{TiO}_2$  та  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$  в очеревині після введення. Виявили реакцію сполучної тканини на чужорідний матеріал, відбувалась інкапсуляція кристалічних включень у ділянках капсули печінки, зафіксували значний колагеногенез в осередках виявлення  $\text{TiO}_2$  та  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$  (рис. 1Д). Дрібноосередкові кристали у паренхімі печінки, які визначали в разі введення нанопорошків у дозах 7000 мг/кг і 10000 мг/кг, спричиняли фокальний некроз гепатоцитів (рис. 1Г, 1І), паренхіма органа, архітектоніка структурно-функціональних одиниць печінки (часточки печінки) суттєво змінені.

На рис. 2 і в таблиці 2 наведено виявлені агломерати  $\text{TiO}_2$  у тканині печінки за результатами СЕМ і їхній елементний склад із високим вмістом Ті. Зразки печінки проаналізували методом спектрометрії, результати наведено як поелементну картограму (табл. 2). Це дало змогу достовірно ідентифікувати наявність Ті у кристалічних включеннях, виявити дифузний розподіл Ті у тканині печінки та встановити локалізацію агломератів  $\text{TiO}_2$  для наступної морфометрії.

Морфометрія показала, що розміри наночастинок і їхніх агломератів становлять від 80 нм до 20 мкм (рис. 2А, 2Б, 2В). Спектрограма дала змогу виявити 9 хімічних елементів. Наявність в спектрах 1, 2 і 3 хімічних елементів вуглецю (С), азоту (N), кисню (O), натрію (Na), магнію (Mg), алюмінію (Al) і кальцію (Ca) має біологічне походження, пов'язане з вмістом клітин тканин печінки. Титан, виявлений у спектрах, підтверджує наявність в тканині печінки наночастинок  $\text{TiO}_2$  (табл. 2).

Головні зміни морфології гепатоцитів (враховуючи посмертні зміни, аутолітичні процеси) – вакуолізація цитоплазми (оптично порожня цитоплазма гепатоцитів), пікноз ядер, збільшення кількості двоядерних гепатоцитів. Набряк гепатоцитів, різка дилатація

**Таблиця 1.** Вміст титану і срібла в печінці мишей після введення наночастинок TiO<sub>2</sub> і TiO<sub>2</sub>-Ag, медіана (95 % ВІ), мкг/г, n = 6

Група	Доза, мг/кг	Хімічний елемент, мкг/г	
		Ti	Ag
Контроль	–	0,34 (95 % ВІ 0,30–0,42)	0,003 (95 % ВІ 0,003–0,003)
Нано-TiO <sub>2</sub>	4000	124,29 (95 % ВІ 11,54–275,92)*	–
	7000	49,72 (95 % ВІ 19,09–263,19)	–
	10000	78,37 (95 % ВІ 18,17–121,67)	–
Нано-TiO <sub>2</sub> -Ag	4000	30,80 (95 % ВІ 4,60–137,80)	2,53 (95 % ВІ 1,38–3,40)*
	7000	42,77 (95 % ВІ 4,60–666,42)	2,75 (95 % ВІ 0,74–4,42)*
	10000	299,25 (95 % ВІ 7,72–449,72)*	1,75 (95 % ВІ 1,14–6,27)*

\*: p < 0,05, статистично вірогідна відмінність порівняно з контролем.

**Таблиця 2.** Результати аналізу поелементного складу в агломератах нано-TiO<sub>2</sub> в печінці (спектр 1) і контрольне дослідження біологічного зразка (спектр 2), скла (спектр 3)

Спектр	C	N	O	Na	Mg	Al	Si	Ca	Ti	Загалом
Спектр 1, Ti-вмісні об'єкти	24,5	–	40,5	0,4	–	–	1,2	0,4	33,0	100,0
Спектр 2, органічний матеріал	59,8	12,9	14,2	1,6	0,5	0,2	8,7	1,6	0,3	100,0
Спектр 3, тест-об'єкт скло	35,0	–	33,8	4,3	1,2	0,3	20,4	4,0	0,7	100,0

**Таблиця 3.** Мікроскопічні зміни печінки після внутрішньоочеревинного введення нано-TiO<sub>2</sub> та нано-TiO<sub>2</sub>-Ag

Характер змін	Тип гістопатологічних змін	Відсоток (%) домінуючих змін від загальної кількості тварин у групі під впливом нано-TiO <sub>2</sub> , n = 12	Відсоток (%) домінуючих змін від загальної кількості тварин у групі під впливом нано-TiO <sub>2</sub> -Ag, n = 10
Дистрофічні	Цитоплазматична вакуолізація (гідропічна дистрофія) в гепатоцитах	66,7	60,0
Переднекротичні	Гепатоцити з пікнозом ядер	25,0	70,0
Некротичні	Фокальні некрози	8,3	30,0
Запальні	Фокальна інфільтрація запальних клітин	8,3	20,0
Адаптаційні	Збільшення кількості бінуклеарних гепатоцитів	8,3	40,0

синусоїдних капілярів печінки, некроз клітин судин на 14 добу після введення нано-TiO<sub>2</sub> та нано-TiO<sub>2</sub>-Ag свідчать про їхню токсичну дію та порушення бар'єрної функції судин печінки, а отже й ураження гепатоцитів. У разі введення нано-TiO<sub>2</sub> у дозах 4000 мг/кг і 10000 мг/кг на 14 добу експерименту мікроскопічно виявляли більшу кількість двоядерних гепатоцитів порівняно зі зразками контрольної групи. Це може свідчити про певні адаптаційні та репаративні зміни в гепатоцитах.

При внутрішньоочеревинному введенні нано-TiO<sub>2</sub> та нано-TiO<sub>2</sub>-Ag відбулось розширення мікросудин паренхіми печінки, зокрема синусоїдних капілярів, центральної вени, портальної вени у триадах. Судини триад у портальних часточках різко кровонаповнені, а мікроциркуляція синусоїдними капілярами відрізнялася, була неоднорідною. Летальність лабораторних мишей після внутрішньоочеревинного введення нано-TiO<sub>2</sub>-Ag могла бути спричинена токсичною дією на клітини кровоносних судин.

Зрідка виявляли фокальну запальну інфільтрацію (макрофаги, лімфоцити). На 14 добу макрофаги фагоцитували клітинний детрит. Однак навіть у ділянках, де виявлено кристалічний чужорідний матеріал, не виникала запальна інфільтрація. Імовірність розвитку запального процесу у відповідь на внутрішньоочеревинне введення нано-TiO<sub>2</sub> та нано-TiO<sub>2</sub>-Ag невисока. TiO<sub>2</sub> може взаємодіяти з білками і ферментами в інтерстиціальному просторі печінки, спричиняючи генерацію активних форм кисню, що можуть індукувати запальну відповідь. Але у нашому

дослідженні виявлено неспецифічні явища некрозу, що домінували над імовірністю виникнення запальної реакції. Наведені зміни печінки систематизовано і наведено в таблиці 3.

Зробили висновок, що найбільш характерні мікроскопічні ознаки токсичної дії нано-TiO<sub>2</sub> – дистрофічні зміни на рівні 67,7 % (цитоплазматична вакуолізація в гепатоцитах), а при впливі нано-TiO<sub>2</sub>-Ag – початкові некротичні зміни на рівні 70,0 % (гепатоцити з пікнозом ядер). Зазначимо, що токсичну дію нано-TiO<sub>2</sub> і нано-TiO<sub>2</sub>-Ag значно рідше виявляли за фокальними некрозами та запальними реакціями (фокальна інфільтрація), в окремих випадках спостерігали адаптаційні зміни – збільшення кількості бінуклеарних гепатоцитів.

## Обговорення

Протягом дослідження порівняли вплив гострої дії нано-TiO<sub>2</sub> і нано-TiO<sub>2</sub>-Ag на токсикологічні, морфологічні зміни і вміст металів у печінці лабораторних мишей. Встановлено, що нано-TiO<sub>2</sub>-Ag більш токсичний, ніж нано-TiO<sub>2</sub> за величиною середньосмертельної дози. Показано, що зі збільшенням введеної дози (від 4000 мг/кг до 10000 мг/кг) в тканині печінки лабораторних мишей зростає накопичення титану (при дії нано-TiO<sub>2</sub>), титану та срібла (при дії нано-TiO<sub>2</sub>-Ag).

За результатами світлової мікроскопії встановили, що характерними ознаками токсичної дії нано-TiO<sub>2</sub> виявились дистрофічні зміни на рівні 67,7 % (цитоплазматична вакуолізація в гепатоцитах), а при впливі на-

но- $\text{TiO}_2$ -Ag – початкові некротичні зміни на рівні 70,0 % (гепатоцити з пікнозом ядер). Наголосимо, що токсична дія нано- $\text{TiO}_2$  і нано- $\text{TiO}_2$ -Ag значно рідше проявлялась фокальними некрозами та запальними реакціями (фокальна інфільтрація), в окремих випадках виявляли адаптаційні й репаративні зміни, зокрема збільшення кількості бінуклеарних гепатоцитів. Застосування СЕМ і методу картографії дало змогу виявити дифузний розподіл титану в тканині печінки та встановити локалізацію, розміри наночастинок і їхніх агломератів.

Дані, що одержали, відповідають результатам дослідження W. G. Kreyling et al. [14]: наночастинок  $\text{TiO}_2$  вибірково накопичуються, крім інших внутрішніх органів, в печінці лабораторних тварин. За даними авторів, виведення наночастинок відбувається достатньо повільно, що посилює їхній токсичний вплив на організм [14].

Результати нашого дослідження доповнюють відомості, викладені в роботі Rupal Shrivastava et al. [4]. Так, застосувавши методи електронної мікроскопії автори показали, що наночастинок накопичуються в різних компартментах гепатоцитів і клітинах Купфера.

Разом з тим, відомості, що ми встановили, відрізняються від результатів дослідження A. T. Saber et al. [15], які зробили висновок, що головним проявом токсичної дії нано- $\text{TiO}_2$  є запальні зміни в тканині печінки. Ці відмінності можна пояснити тим, що основну частину морфологічних змін ми виявили на аутопсійному матеріалі, а також різним дизайном експериментів, дозами, способами введення, різною дисперсністю наноматеріалу тощо.

Загалом результати, встановлені у цьому дослідженні, показали: потрапляння в організм високих доз нано- $\text{TiO}_2$  або нано- $\text{TiO}_2$ -Ag може бути причиною не тільки дистрофічних, запальних змін, але й некрозу паренхіми печінки. Це зумовлює необхідність продовження вивчення ролі наночастинок діоксиду титану в печінці, особливо щодо відновних процесів в органах.

## Висновки

1. Встановили залежність летальності лабораторних тварин від дози нанопорошків  $\text{TiO}_2$  і  $\text{TiO}_2$ -Ag, введених внутрішньоочеревинним шляхом. Летальність виявилась вищою при введенні композиту нано- $\text{TiO}_2$ -Ag порівняно з нано- $\text{TiO}_2$ .  $\text{LD}_{50}$  для нанопорошку  $\text{TiO}_2$  дорівнює 4783,30 мг/кг,  $\text{LD}_{50}$  для нанопорошку  $\text{TiO}_2$ -Ag – 724,44 мг/кг. Це дає підстави визначити їх до 3 класу (помірно небезпечні) небезпечності хімічних речовин за ГОСТ 12.1.007-76.

2. Нанопорошки  $\text{TiO}_2$  і  $\text{TiO}_2$ -Ag накопичуються у печінці лабораторних тварин при внутрішньоочеревинному введенні. Встановлено, що зі збільшенням введеної дози (від 4000 мг/кг до 10000 мг/кг) в тканині печінки лабораторних мишей зростає накопичення титану (при дії нано- $\text{TiO}_2$ ), титану та срібла (при дії нано- $\text{TiO}_2$ -Ag).

3. Характерні мікроскопічні ознаки токсичної дії нанопорошків  $\text{TiO}_2$  та  $\text{TiO}_2$ -Ag після внутрішньоочеревинного введення лабораторним мишам – дистрофічні зміни гепатоцитів, некроз паренхіми печінки, а запальні реакції виявляють рідше.

4. СЕМ і метод елементної картографії титану підтвердив наявність наночастинок  $\text{TiO}_2$  та їхніх агломератів у тканині печінки при введенні нанопорошку  $\text{TiO}_2$ .

**Перспективи подальших досліджень.** Результати експериментальних досліджень будуть враховані під час обґрунтування гранично допустимого вмісту нанопорошків  $\text{TiO}_2$  та  $\text{TiO}_2$ -Ag у повітрі робочої зони підприємств з їх одержання та застосування.

## Подяка

Висловлюємо вдячність за допомогу у виконанні сканувальної електронної мікроскопії завідувачу лабораторії електронної мікроскопії № 43 Інституту металофізики імені Г. В. Курдюмова НАН України М. А. Скоріку.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 27.04.2023

Після доопрацювання / Revised: 08.06.2023

Схвалено до друку / Accepted: 21.06.2023

## Відомості про авторів:

Яворовський О. П., д-р мед. наук, професор, зав. каф. гігієни та екології № 2, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ; академік Національної академії медичних наук України.

ORCID ID: 0000-0002-4573-8039

Савосько С. І., канд. біол. наук, доцент каф. гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-5145-2195

Рябовол В. М., аспірант, асистент каф. гігієни та екології № 2, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-1582-7188

Зінченко Т. О., канд. мед. наук, доцент каф. гігієни та екології № 2, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-6652-2800

## Information about authors:

Yavorovskiy O. P., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Hygiene and Ecology 2, Bogomolets National Medical University, Kyiv; Academician of National Academy of Medical Sciences of Ukraine.

Savosko S. I., PhD, Associate Professor of the Department of Histology and Embryology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Riabovol V. M., Postgraduate Student, Assistant of the Department of Hygiene and Ecology 2, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Zinchenko T. O., PhD, Associate Professor of the Department of Hygiene and Ecology 2, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

## References

- Zahornyi, M. M., Yavorovsky, O. P., Riabovol, V. M., Tyschenko, N. I., Lobunets, T. F., Tomila, T. V., Shirokov O. V., Ragulya A. V. (2022). Morfolohichni, spektralni y toksykologichni osoblyvosti novoho kompozytno materialu nanodioksydu tytanu z nanosriblom dlia vykorystannia v medytsyni ta biolohii [Morphological, spectral and toxicological features of new composite material of titanium nanodioxide with nanosilver for use in medicine and biology]. *Medycini Perspektivi*, 27(1), 152-159. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2022.1.254381>
- Pankivska, Yu. B., Biliavska, L. O., Povnitsa, O. Yu., Zagorniy, M. M., Ragulya, A. V., Kharchuk, M. S., & Zagorodnya, S. D. (2019). Antyade-



- novirusna aktyvnist nanochastynok dioksydu tytanu [Antiadenoviral activity of titanium dioxide nanoparticles]. *Mikrobiolohichniy zhurnal*, 81(5), 73-84. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/microbiolj81.05.073>
3. Ahmadpour Kermani, S., Salari, S., & Ghasemi Nejad Almani, P. (2021). Comparison of antifungal and cytotoxicity activities of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles with amphotericin B against different *Candida* species: In vitro evaluation. *Journal of clinical laboratory analysis*, 35(1), e23577. <https://doi.org/10.1002/jcla.23577>
  4. Shrivastava, R., Raza, S., Yadav, A., Kushwaha, P., & Flora, S. J. (2014). Effects of sub-acute exposure to TiO<sub>2</sub>, ZnO and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. *Drug and chemical toxicology*, 37(3), 336-347. <https://doi.org/10.31009/01480545.2013.866134>
  5. Hong, F., Ji, J., Ze, X., Zhou, Y., & Ze, Y. (2020). Liver Inflammation and Fibrosis Induced by Long-Term Exposure to Nano Titanium Dioxide (TiO<sub>2</sub>) Nanoparticles in Mice and Its Molecular Mechanism. *Journal of biomedical nanotechnology*, 16(5), 616-625. <https://doi.org/10.1166/jbn.2020.2921>
  6. Jia, X., Wang, S., Zhou, L., & Sun, L. (2017). The Potential Liver, Brain, and Embryo Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles on Mice. *Nanoscale research letters*, 12(1), 478. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2242-2>
  7. Minchenko, D. O., Tsymbal, D. O., Yavorovsky, O. P., Solokha, N. V., & Minchenko, O. H. (2017). Expression of genes encoding IGFBPs, SNARK, CD36, and PECAM1 in the liver of mice treated with chromium disilicide and titanium nitride nanoparticles. *Endocrine regulations*, 51(2), 84-95. <https://doi.org/10.1515/enr-2017-0008>
  8. Yavorovskiy, O., Omelchuk, S., Sokurenko, L., Zinchenko, T., Solokha, N., Aleksichuk, V., & Brukhno, R. (2019). Environmental and occupational hazards of metal nanocompounds production and application: hygienic, clinical and toxicological aspects. *Wiadomosci lekarskie*, 72(8), 1504-1511.
  9. Apte, U., Krishnamurthy, P. (2011). Detoxification Functions of the Liver. In: S. Monga (Ed.). *Molecular Pathology of Liver Diseases* (Vol. 5, pp. 147-163). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7107-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7107-4_11)
  10. Grant, D. M. (1991). Detoxification pathways in the liver. *Journal of inherited metabolic disease*, 14(4), 421-430. <https://doi.org/10.1007/BF01797915>
  11. Riabovol, V. M. (2020). Osoblyvosti budovy, fizyko-khimichnykh i toksykolohichnykh vlastyvoitei nanochastynok dioksydu tytanu, odezhanoho za tekhnolohiieiu termichnoho rozkladu (literaturnyi ohliad i vlasni doslidzhennia) [Features of structure, physico-chemical and toxicological properties of titanium dioxide nanoparticles obtained by thermal decomposition technology (literary review and own research)]. *Dovkilia ta zdorovia*, (4), 63-70. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.32402/dovkil2020.04.063>
  12. Modrzynska, J., Mortensen, A., Berthing, T., Ravn-Haren, G., Szarek, J., Saber, A. T., & Vogel, U. (2021). Effect on Mouse Liver Morphology of CeO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> and Carbon Black Nanoparticles Translocated from Lungs or Deposited Intravenously. *Applied Nano*, 2(3), 222-241. <https://doi.org/10.3390/applnano2030016>
  13. Antononov, M. Iu. (2018). *Matematycheskaia obrabotka y analiz medyko-byolohycheskykh dannykh* [Mathematical processing and analysis of biomedical data]. Kyiv: MYTs "Medinform". [in Russian].
  14. Kreyling, W. G., Holzwarth, U., Haberl, N., Kozempel, J., Hirn, S., Wenk, A., Schleh, C., Schäffler, M., Lipka, J., Semmler-Behnke, M., & Gibson, N. (2017). Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after intravenous injection in rats: Part 1. *Nanotoxicology*, 11(4), 434-442. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1306892>
  15. Saber, A. T., Jacobsen, N. R., Mortensen, A., Szarek, J., Jackson, P., Madsen, A. M., Jensen, K. A., Koponen, I. K., Brunborg, G., Gützkow, K. B., Vogel, U., & Wallin, H. (2012). Nanotitanium dioxide toxicity in mouse lung is reduced in sanding dust from paint. *Particle and fibre toxicology*, 9, 4. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-4>

# Pelvic veins ultrasound changes after surgical correction in patients with pelvic congestion syndrome

B. S. Havrylenko<sup>1,2,A-E</sup>, A. O. Nykonenko<sup>1,2,A,E,F</sup>

<sup>1</sup>Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine, <sup>2</sup>Communal Non-Profit Enterprise “Zaporizhzhia Regional Clinical Hospital” of the 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

## Key words:

pelvic congestion syndrome, pelvic venous disorders, ultrasonography, chronic pelvic pain, gonadal veins, ovarian veins, Nutcracker syndrome, May–Thurner syndrome.

Pathologia, 2023. 20(2), 170-174

\*E-mail:  
boryazp@gmail.com

Pelvic congestion syndrome is a form of varicose disease, which is considered to be one of the main causes of chronic pelvic pain in women, which is associated with a violation of pelvic veins hemodynamics.

Pelvic venous disorders are invisible to clinicians due to the lack of pathognomonic symptoms and manual disease criteria, but it has significant consequences.

Today, one of the main diagnostic methods of pelvic venous disorders is a transvaginal US of pelvic veins, including gonadal veins (ovarian veins in women). Thanks to this non-invasive and simple diagnostic method that does not require specific preparation and has no contraindications, we have significant opportunities in diagnosis, as well as in the further evaluation of the postoperative results of surgical correction of pelvic congestion syndrome.

**The aim** of the study was to analyze changes of pelvic veins in patients with pelvic congestion syndrome before and after surgical intervention using the transvaginal US method.

**Materials and methods.** The study included 35 patients which underwent surgical treatment using open surgery and endovascular procedure between April 2019 and February 2022 with pelvic congestion syndrome. All patients underwent transvaginal ultrasound of the pelvic veins before surgery. A control examination was performed after surgical treatment in 4–6 months. The examination was performed on an expert-class ultrasound system “Toshiba Aplio 500” using all international standards for transvaginal examination of pelvic veins to evaluate the changes of iliac, paraovarian, parametrial and ovarian veins from the left side and from the right side in patients with pelvic venous disorders.

**Conclusions.** Transvaginal ultrasound of the pelvic veins can be considered one of the key diagnostic methods, with the help of which it is possible to investigate and evaluate hemodynamic disorders in the veins of the pelvis and pelvic organs in real time. Also, this method can be considered optimal for the control examination of patients who underwent surgical correction of pelvic congestion syndrome.

## Ключові слова:

синдром тазового венозного повнокров'я, варикозне розширення вен таза, ультразвукове дослідження, хронічний тазовий біль, гонадні вени, оваріальні вени, синдром Лускунчика, синдром Мея–Тернера.

Патологія. 2023. Т. 20, № 2(58). С. 170-174

## Динаміка змін при ультразвуковому дослідженні вен таза в пацієнтів після хірургічної корекції синдрому тазового венозного повнокров'я

Б. С. Гавриленко, А. О. Никоненко

Синдром тазового венозного повнокров'я – форма варикозної хвороби, яку вважають однією з основних причин хронічного тазового болю в жінок, що пов'язано з порушенням гемодинаміки вен таза.

Тазові венозні порушення є невидимі для клініцистів патологією через відсутність патогномічних симптомів, мануальних критеріїв захворювання та має складні наслідки.

Нині один з основних методів діагностики цієї патології – трансвагінальне дослідження вен таза, зокрема гонадних вен (оваріальні вени у жінок). Завдяки цьому неінвазивному та доволі простому методу діагностики, що не потребує спеціальної підготовки та не має протипоказань, істотно розширилися можливості діагностики й наступного оцінювання післяопераційних результатів корекції тазового венозного повнокров'я.

**Мета роботи** – оцінити зміни в тазових венах у пацієнтів із синдромом тазового венозного повнокров'я до та після хірургічного лікування за допомогою методу трансвагінального ультразвукового дослідження.

**Матеріали та методи.** У дослідження залучили 35 пацієнок із синдромом тазового венозного повнокров'я, котрі перебували на лікуванні в період з квітня 2019 року до лютого 2022 року. Хворим здійснили хірургічну корекцію відкритим та ендovasкулярним методами. Усім пацієнткам до операції виконали трансвагінальне УЗД вен таза. Контрольне дослідження здійснили після хірургічного лікування через 4–6 місяців. Дослідження виконали на ультразвуковій системі експертного класу «Toshiba Aplio 500» із дотриманням усіх міжнародних стандартів щодо трансвагінального дослідження вен таза для оцінювання стану клубових, параоваріальних, параметральних та оваріальних вен з обох боків.

**Висновки.** Трансвагінальне УЗД вен таза можна вважати одним із ключових методів діагностики, за допомогою якого в режимі реального часу можна дослідити й оцінити гемодинамічні порушення у венах таза й тазових органів. Цей метод можна вважати оптимальним і для контрольного обстеження пацієнтів, котрим здійснили хірургічну корекцію синдрому тазового венозного повнокров'я.

Pelvic congestion syndrome is a form of varicose disease, which is considered to be one of the main causes of chronic pelvic pain in women, which is associated with a violation of pelvic veins hemodynamics.

Pelvic congestion syndrome (PCS) is one of the existing causes of chronic pelvic pain (CPP) in women, which consists of dilation and stasis of the pelvic venous plexus. CPP is defined as a noncyclical pain in the hypogastric, lumbosacral, or perineal area, which lasts 6 months or longer. It is quite an important health problem that causes up to 40% of referrals for gynecology units [1,2].

The common causes of chronic pelvic pain include ovarian varicoceles, endometriosis, pelvic adhesions, atypical menstrual pain, urologic disorders, irritable bowel syndrome, and psychosocial issues. Pelvic varicoceles are found in approximately half of the women with chronic pelvic pain [3].

Currently, the diagnosis of PCS remains a challenge, given that there are not universally accepted criteria for enlarged pelvic venous vessels. In recent years, the Symptoms – Varices – Pathology (SVP) classification has been published for pelvic venous disorders, encompassing three domains: symptoms, varices, and pathophysiology, while also including the anatomy of abdominal and pelvic veins associated with hemodynamic anomalies and etiology. This instrument, once validated, could help to obtain homogeneous study groups with unified diagnostic criteria [4].

In comparison with other techniques, transvaginal ultrasound (US) is an easily accessible, nonionizing, and minimally invasive technique. It allows for the measurement of pelvic veins and blood flow identification in real time [5].

## Aim

The aim of the study was to analyze changes of pelvic veins in patients with pelvic congestion syndrome before and after surgical intervention using the transvaginal US method.

## Materials and methods

The study included 35 patients which underwent surgical treatment using open surgery and endovascular procedure between April 2019 and February 2022 with pelvic congestion syndrome.

Inclusion criteria: female, age 18 years or more, symptomatic pelvic venous disorders, and chronic pelvic pain more than 6 month, indications for surgical correction, no significant comorbidities or contraindications for surgery intervention.

Exclusion criteria: male, age under 18 years, asymptomatic pelvic venous disorders, significant comorbide pathology, active oncopathology, contraindications for surgical intervention.

All patients are women. The mean age of the patients was  $43.5 \pm 9.0$  years (from 27 to 55 years). The body mass index (BMI) was  $20.0 \pm 3.1$ . Pain manifestations before surgery according to the visual analogue scale (VAS) were 5 (from 4 to 8) points. The pain syndrome had the following manifestations: abdominal pain was

in 60 %, lumbar pain was in 18 %, pain in the left upper quadrant – 40 %, pain in the left flank – 25 %, pelvic pain was observed in almost all patients and was 80%, which usually increased after physical activity (Table 1).

To confirm the diagnosis of pelvic congestion syndrome, all patients underwent a standard diagnostic algorithm: multispiral computer tomography (Toshiba Activion TSX-031A), transabdominal ultrasound of the pelvic and retroperitoneal veins (General Electric VIVID 7). All patients underwent transvaginal ultrasound of the pelvic veins before surgery. A control examination was performed after surgical treatment in 4–6 months.

The examination was performed on an expert-class ultrasound system “Toshiba Aplio 500” using all international standards for transvaginal examination of pelvic veins to evaluate the changes of iliac, paraovarian, parametrial and ovarian veins from the left and from the right in patients with pelvic venous disorders.

Patients were placed in the gynecological position right after urinating in order to perform the assessment with an empty bladder, as is usual procedure for gynecological ultrasonography assessment [6].

Pain was subjectively assessed based on a visual analog scale (VAS) before surgical treatment and in 4–6 month after the intervention.

All 35 patients (100 %) underwent surgical treatment: ligation of left ovarian vein using open access in 17 (49 %) cases, endovascular embolization of left ovarian vein combined with sclerotherapy of pelvic veins in 18 (51 %) cases.

## Results

The diagnosis of pelvic congestion syndrome was made on the basis of clinical features and findings on computer tomography angiography. With transvaginal US we examined all patients who underwent surgical treatment and were clinically suspected with diagnosis of pelvic congestion syndrome on the basis of complains and physical examination. All patients had a history of chronic pelvic pain for more than 6 months.

The diagnosis of pelvic congestion syndrome was confirmed in all patients (100 %) during examination with transvaginal ultrasound. Performing transvaginal US, we evaluated such parameters as: the diameter of the iliac veins, the diameter of the veins of the paraovarian plexus, the diameter of the veins of the parametric plexus, as well as the diameter of the ovarian veins. Also, we evaluated flow direction (reflux) of the following veins with color Doppler sonography.

We used diagnostic measurements of pelvic veins which were dilatated and varicose changed more than 5–6 mm in diameter around the ovary and uterus (Table 2).

The diameter of the iliac veins on the right was  $11.3 \pm 1.6$  mm, on the left –  $11.4 \pm 1.6$  mm, the diameter of the paraovarian veins on the right was  $5.9 \pm 1.6$  mm, on the left –  $7.6 \pm 1.6$  mm. The diameter of the parametrial veins was  $5.4 \pm 1.6$  mm on the right,  $7.0 \pm 1.8$  mm on the left. The diameter of the right ovarian vein was  $5.9 \pm 1.6$  mm, the diameter of the left ovarian vein was  $8.4 \pm 1.8$  mm with significant reflux in all cases (100 %). After performing a diagnostic protocol which include CT,



**Table 1.** VAS specification

Parameter	%	VAS(m)	VASmin	VASmax
Abdominal pain	60	5	4	8
Upper left quadrant pain	40	5	0	6
Lumbar pain	18	5	2	8
Pelvic pain	80	5	0	7

**Table 2.** Veins measurements (before surgery)

Parameter	Right, mm	Reflux	Left, mm	Reflux
Iliac veins	11.3 ± 1.6	–	11.4 ± 1.6	+
Paraovarian plexus	5.9 ± 1.6	+	7.6 ± 1.6	+
Parametral plexus	5.4 ± 1.6	+	7.0 ± 1.8	+
Gonadal veins	5.9 ± 1.6	+	8.4 ± 1.8	+

**Table 3.** Veins measurements (after surgery)

Parameter	Right, mm	Reflux	Left, mm	Reflux
Iliac veins	11.1 ± 1.6	–	11.4 ± 1.0	–
Paraovarian plexus	5.2 ± 1.2	–	5.7 ± 1.4	–
Parametral plexus	5.4 ± 1.3	–	4.6 ± 1.8	–
Gonadal veins	5.6 ± 1.0	–	Not visualized	–

**Table 4.** Comparison of vein sizes (before and after surgery)

Parameter	Before intervention		After intervention		p
	Right, mm	Left, mm	Right, mm	Left, mm	
Paraovarian plexus	5.9 ± 1.6	7.6 ± 1.6	5.2 ± 1.2	5.7 ± 1.4	<0.05
Parametral plexus	5.4 ± 1.6	7.0 ± 1.8	5.4 ± 1.3	4.6 ± 1.8	<0.05
Ovarian veins	5.9 ± 1.6	8.4 ± 1.8	5.6 ± 1.0	Not visualized	<0.05

**Table 5.** Comparison of vein sizes in 2 groups (open and endovascular surgery)

Parameter	Open surgery		Endovascular surgery	
	Right, mm	Left, mm	Right, mm	Left, mm
Paraovarian plexus	5.25 ± 1.17	5.75 ± 1.40	5.05 ± 0.86	5.80 ± 0.84
Parametral plexus	5.40 ± 1.03	4.63 ± 1.84	4.94 ± 1.08	4.89 ± 1.20
Gonadal veins	5.68 ± 1.06	Not visualized	6.03 ± 0.91	Not visualized

transabdominal and transvaginal ultrasound, all patients (n = 35) underwent surgery intervention.

49 % (n = 17) patients underwent open surgical treatment in the volume of the ligation of the left ovarian vein combined with sclerotherapy of pelvic veins. We used an oblique-transverse retroperitoneal approach on the left side of the abdomen after which the lower third of ovarian vein was dissected in order to ligate all its inflows to avoid recurrence of the disease. After that we performed ligation of the ovarian vein with 2 ligatures – proximal and distal using a Prolene 5/0. A 3 % – 2 ml solution of ethoxysclerol was injected into the distal end of the vein which was prepared according to the standard method.

51 % (n = 18) of the patients underwent endovascular procedure for correction of pelvic congestive syndrome. We performed the intervention via right common femoral vein under local anesthesia, with using a 5-Fr introducer. Catheterization of the left ovarian vein was accomplished with a 5-Fr Cobra catheter (Terumo Europe). After cath-

eterization of left renal vein retrograde venography was performed using Valsalva's maneuver. We used embolization coils (Tornado type in 11 cases, Nestor type in 7 cases) and installed them at the lower third of the ovarian vein. After performing control venography we injected 3 % – 2 ml solution of ethoxysclerol during Valsalva's maneuver. At the end of the procedure a control venography is necessary.

A follow-up examination of all patients was performed in 4–6 months after the intervention, including CT and transvaginal US of the pelvic veins. The following results were obtained during transvaginal sonography of the pelvic and ovarian veins (Table 3).

The diameter of the right iliac vein was 11.1 ± 1.6 mm, on the left – 11.4 ± 1.0 mm. The diameter of the paraovarian veins on the right was 5.2 ± 1.2 mm; on the left – 5.7 ± 1.4 mm. The diameter of the parametral veins on the right was 5.4 ± 1.3 mm; on the left – 4.6 ± 1.8 mm. The diameter of the right ovarian vein was 5.6 ± 1.0 mm; the left ovarian vein was not visualized due to its obliteration. Reflux through the veins of the pelvis was not defined in all patients after the intervention.

Comparing the size of the veins (paraovarian, parametral, ovarian veins) before and after the surgical intervention, we obtained a statistically significant result, which is shown below (Table 4).

All patients (n = 35) were interviewed according to the VAS in the postoperative period. All patients were given a choice on a scale from 0 to 10 (where 0 – pain was absent, 10 – intolerable pain, which was relieved only by analgesics). VAS was 1 point average (from 0 points to 2 points) in 4–6 months after surgical treatment.

We also compared the results of transvaginal ultrasound in different groups: group 1 – patients who underwent open surgical treatment (ligation of the left ovarian vein), group 2 – endovascular embolization. In both groups, pelvic vein sclerotherapy was performed. It can be noted that in the early postoperative period in patients after open surgical treatment, a higher pain syndrome was observed, which was decreased by small doses of analgesics, which was associated with an external incision of the skin (5–7 cm). Also, one of the advantages of endovascular treatment was local anesthesia (2 % solution of lidocaine), despite the fact that open correction requires general anesthesia with mechanical ventilation, as well as a longer hospitalization at the surgical department. But our study showed that in the long-term follow-up period, there was no difference in the advantages of one or the other method of surgical treatment (Table 5).

## Discussion

The causes of ovarian varicoceles are probably multifactorial, involving both mechanical and hormonal factors. During pregnancy, the vascular capacity of the ovarian veins may increase up to 60 times the normal value and remain this way for months after delivery [7]. Although an association between pelvic congestion syndrome and pelvic varicosities has been known for many years, uncertainty regarding its cause results in different therapeutic approaches, producing variable results. Longterm clinical studies revealed that coil embolization of patients with

pelvic congestion syndrome had provided symptomatic relief in 68–74 % of patients [8,9].

However, the proper diagnosis is often missed because women lie down for a pelvic examination. In this position, the ovarian veins will not fill enough with blood to reveal the vascular changes. It should be remembered that a standard transvaginal US will not reveal vascular changes and is reliable only when duplex Doppler modality is implemented [10].

Also, to confirm the diagnosis of pelvic venous disorders, diagnostic laparoscopy is often used. Laparoscopy is the most used diagnostic technique in women with chronic pelvic pain. This direct visualization is an excellent tool to exclude other pelvic pathologic conditions such as extragenital endometriosis. It is, however, not useful for varicose vein diagnosis because it requires women to lie down for the procedure and involves insufflations of carbon dioxide that conceals pathological vessels and, as a rule, has unsatisfactory results [10]. Based on our experience, we also believe that laparoscopy cannot be considered the golden diagnostic method due to the reasons described above. Also, diagnostic laparoscopy is a serious invasive intervention that can be avoided using the diagnostic algorithm, including CT and transvaginal US.

Transvaginal US may be the preferred first-line test to investigate for other pathologies with a high probability of visualizing the peri-uterine veins [11]. Whiteley M. S. et al. evaluated the use of transvaginal US in the diagnosis of pelvic congestion syndrome and proposed this to be the new gold standard, however this diagnostic imaging modality is limited by the inability to demonstrate the course of the ovarian veins and potential higher obstructions that may include the Nutcracker phenomenon or May–Thurner syndrome [12].

It is also noninvasive, widely available, cost-effective, and lacks the radiation or the use of contrast as compared to other imaging modalities. The greatest benefit of this modality is the dynamic feature where patients are able to change position, as well, as perform the Valsalva maneuver [11].

The current literature is lacking any prospective, randomized controlled trials addressing the optimal imaging diagnostic modality for pelvic congestion syndrome. There are many case reports and small case series that utilize various imaging modalities including ultrasound [11].

More recently, authors suggested that transvaginal US could replace venography as the criterion standard screening imaging method [13,14]. Unlike CT and MRI, ultrasound may be performed in a semiupright position and with provocative maneuvers (Valsalva maneuver) to best simulate anatomic conditions and accentuate venous reflux for visualization [15].

## Conclusions

1. Transvaginal US examination of the pelvic veins is one of the key methods in the diagnosis of pelvic congestion syndrome.

2. Transvaginal US is noninvasive, cost-effective, widely available diagnostic method which can be performed in a semiupright position with provocative

maneuvers and position changes with all benefits of position changes.

3. Transvaginal US of the pelvic veins must be combined with other diagnostic methods such as CT and ultrasound of the retroperitoneal veins to determine the cause of the pelvic varicosities, which allow to plan the correct treatment tactic and surgical intervention.

4. Transvaginal US of the pelvic veins can be considered the optimal method in patients for follow-up examination after surgery intervention in 4–6 months.

5. Transvaginal US in our study in patients after surgical treatment shows a regression of the manifestations of varicose veins, as well as the presence of caudal blood flow through the venous plexuses of the pelvis.

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

Надійшла до редакції / Received: 07.04.2023  
Після доопрацювання / Revised: 18.04.2023  
Прийнято до друку / Accepted: 08.05.2023

## Information about authors:

Havrylenko B. S., MD, PhD student of the Department of Hospital Surgery, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University; Communal Non-Profit Enterprise “Zaporizhzhia Regional Clinical Hospital” of the Zaporizhzhia Regional Council, Ukraine.  
ORCID ID: 0000-0002-4927-0306

Nykonenko A. O., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Hospital Surgery, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University; Communal Non-Profit Enterprise “Zaporizhzhia Regional Clinical Hospital” of the Zaporizhzhia Regional Council, Ukraine.  
ORCID ID: 0000-0002-5720-2602

## Відомості про авторів:

Гавриленко Б. С., аспірант каф. госпітальної хірургії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет; КНП «Запорізька обласна клінічна лікарня» ЗОР, Україна.  
Никоненко А. О., д-р мед. наук, професор каф. госпітальної хірургії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет; КНП «Запорізька обласна клінічна лікарня» ЗОР, Україна.

## References

1. Taylor H. C., Jr (1949). Vascular congestion and hyperemia; their effect on structure and function in the female reproductive system. *American journal of obstetrics and gynecology*, 57(2), 211-230. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(49\)90422-6](https://doi.org/10.1016/0002-9378(49)90422-6)
2. Beard, R. W., Highman, J. H., Pearce, S., & Reginald, P. W. (1984). Diagnosis of pelvic varicosities in women with chronic pelvic pain. *Lancet*, 2(8409), 946-949. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)91165-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)91165-6)
3. Park, S. J., Lim, J. W., Ko, Y. T., Lee, D. H., Yoon, Y., Oh, J. H., Lee, H. K., & Huh, C. Y. (2004). Diagnosis of pelvic congestion syndrome using transabdominal and transvaginal sonography. *AJR. American journal of roentgenology*, 182(3), 683-688. <https://doi.org/10.2214/ajr.182.3.1820683>
4. Meissner, M. H., Khilnani, N. M., Labropoulos, N., Gasparis, A. P., Gibson, K., Greiner, M., Learman, L. A., Atashroo, D., Lurie, F., Passman, M. A., Basile, A., Lazarshvili, Z., Lohr, J., Kim, M. D., Nicolini, P. H., Pabon-Ramos, W. M., & Rosenblatt, M. (2021). The Symptoms-Varices-Pathophysiology classification of pelvic venous disorders: A report of the American Vein & Lymphatic Society International Working Group on Pelvic Venous Disorders. *Phlebology*, 36(5), 342-360. <https://doi.org/10.1177/0268355521999559>
5. Whiteley, M. S., DosSantos, S. J., Harrison, C. C., Holdstock, J. M., & Lopez, A. J. (2015). Transvaginal duplex ultrasonography appears to be the gold standard investigation for the haemodynamic evaluation of pelvic venous reflux in the ovarian and internal iliac veins in women. *Phlebology*, 30(10), 706-713. <https://doi.org/10.1177/0268355514554638>

6. Valero, I., Garcia-Jimenez, R., Valdevieso, P., Garcia-Mejido, J. A., Gonzalez-Herráez, J. V., Pelayo-Delgado, I., Fernandez-Palacin, A., & Sainz-Bueno, J. A. (2022). Identification of Pelvic Congestion Syndrome Using Transvaginal Ultrasonography. A Useful Tool. *Tomography*, 8(1), 89-99. <https://doi.org/10.3390/tomography8010008>
7. Hodgkinson, C. P. (1953). Physiology of the ovarian veins during pregnancy. *Obstetrics and gynecology*, 1(1), 26-37.
8. Maleux, G., Stockx, L., Wilms, G., & Marchal, G. (2000). Ovarian vein embolization for the treatment of pelvic congestion syndrome: long-term technical and clinical results. *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR*, 11(7), 859-864. [https://doi.org/10.1016/s1051-0443\(07\)61801-6](https://doi.org/10.1016/s1051-0443(07)61801-6)
9. Capasso, P., Simons, C., Trotteur, G., Dondelinger, R. F., Henroteaux, D., & Gaspard, U. (1997). Treatment of symptomatic pelvic varices by ovarian vein embolization. *Cardiovascular and interventional radiology*, 20(2), 107-111. <https://doi.org/10.1007/s002709900116>
10. Dorobisz, T. A., Garcarek, J. S., Kurcz, J., Korta, K., Dorobisz, A. T., Podgórski, P., Skóra, J., & Szyber, P. (2017). Diagnosis and treatment of pelvic congestion syndrome: Single-centre experiences. *Advances in clinical and experimental medicine*, 26(2), 269-276. <https://doi.org/10.17219/acem/68158>
11. Labropoulos, N., Jasinski, P. T., Adrahtas, D., Gasparis, A. P., & Meissner, M. H. (2017). A standardized ultrasound approach to pelvic congestion syndrome. *Phlebology*, 32(9), 608-619. <https://doi.org/10.1177/0268355516677135>
12. Whiteley, M. S., Dos Santos, S. J., Harrison, C. C., Holdstock, J. M., & Lopez, A. J. (2015). Transvaginal duplex ultrasonography appears to be the gold standard investigation for the haemodynamic evaluation of pelvic venous reflux in the ovarian and internal iliac veins in women. *Phlebology*, 30(10), 706-713. <https://doi.org/10.1177/0268355514554638>
13. Holdstock, J. M., Dos Santos, S. J., Harrison, C. C., Price, B. A., & Whiteley, M. S. (2015). Haemorrhoids are associated with internal iliac vein reflux in up to one-third of women presenting with varicose veins associated with pelvic vein reflux. *Phlebology*, 30(2), 133-139. <https://doi.org/10.1177/0268355514531952>
14. Hansrani, V., Dhorat, Z., & McCollum, C. N. (2017). Diagnosing of pelvic vein incompetence using minimally invasive ultrasound techniques. *Vascular*, 25(3), 253-259. <https://doi.org/10.1177/1708538116670499>
15. Bookwalter, C. A., VanBuren, W. M., Neisen, M. J., & Bjarnason, H. (2019). Imaging Appearance and Nonsurgical Management of Pelvic Venous Congestion Syndrome. *Radiographics*, 39(2), 596-608. <https://doi.org/10.1148/rg.2019180159>



## Morphologic characteristic of rat myocardium in comorbid pathology

V. M. Vasyliuk<sup>id</sup><sup>B,C,D</sup>, V. S. Khabchuk<sup>id</sup><sup>B</sup>, A. Ya. Pavliak<sup>id</sup><sup>E</sup>, O. Ya. Zhurakivska<sup>id</sup><sup>\*A,F</sup>, A. B. Hrechyn<sup>id</sup><sup>B</sup>

Ivano-Frankivsk National 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

Diabetic cardiomyopathy is a serious complication of diabetes mellitus (DM).

**Aim.** Therefore, we aimed to study myocardial changes in adult rats with streptozotocin (STZ)-induced DM exposed to chronic immobilization stress (CIS).

**Materials and methods.** A total of 26 adult albino male rats weighing 180–200 g were examined. All the animals were divided into three groups: Group I included 10 rats with STZ-induced DM exposed to CIS; Group II comprised 10 rats with STZ-induced DM; Group III included 6 intact animals. The samples were collected on the 14<sup>th</sup> and 56<sup>th</sup> days of the experiment. Histological, histochemical, electron microscopy, and biochemical methods were used.

**Results.** On the 14<sup>th</sup> day of the experiment, in Group I and Group II, increased blood flow was observed in the capillaries, venules, and veins, while an arteriolar spasm in the microcirculation was found. In addition, cardiomyocyte surface area in different myocardial regions reduced due to low glycogen content as confirmed by histochemical and ultrastructural studies.

On the 56<sup>th</sup> day of the experiment, in Group I and Group II, hyperemia occurred due to red blood cell aggregation and microthrombi. The surface area of all microcirculatory vessels increased as compared to that of intact animals, as evidenced by an increase in their wall surface area leading to an increase in their wall-to-lumen ratio. Such morphometric changes in the microcirculatory vessels were indicative of decreased vascular permeability and impaired myocardial blood flow. At the histological level, in Group I and Group II, focal cardiomyocyte lysis, moderate to diffuse stromal edema, lymphohistiocytic infiltration were seen. Such changes pointed to sterile inflammation, probably due to myocardial infarction secondary to diabetic microangiopathy. In cardiomyocytes, karyolysis, vacuolar degeneration, apical ballooning, subsarcolemmic edema, fibrosis and lysis of myofibrils, colliquative necrosis were observed.

**Conclusions.** STZ-induced DM and stress resulted in pronounced destructive changes in the myocardium of rats, including interstitial edema, focal cardioclerosis, myolysis. Such changes occurred on the background developing diabetic microangiopathy. The most pronounced myocardial changes were recorded in animals with a comorbidity.

### Key words:

diabetic cardiomyopathies, heart, myocardium, microcirculation, diabetes mellitus, experimental diabetes mellitus, heart failure.

Pathologia, 2023. 20(2), 175-181

### \*E-mail:

zhurakivska.o.ya@gmail.com

## Морфологічна характеристика міокарда щурів за умов коморбідної патології

V. M. Василюк, В. С. Хабчук, А. Я. Павляк, О. Я. Жураківська, А. Б. Гречин

Вагоме місце серед ускладнень цукрового діабету (ЦД) посідає діабетична кардіоміопатія.

**Мета роботи** – дослідити зміни міокарда статевозрілих щурів при стрептозотоциновому ЦД (СЦД) за умов хронічного іммобілізаційного стресу (ХІС).

**Матеріали та методи.** Для дослідження використано 26 статевозрілих білих щурів-самців (масою 180–200 г), яких поділили на 3 групи: перша – тварини з експериментальною коморбідною патологією (10 щурів) – СЦД і ХІС; друга – з СЦД (10 щурів); третя – інтактна (6 щурів, яким не робили жодних маніпуляцій). Матеріал забирали на 14 і 56 доби експерименту. Використали гістологічний, гістохімічний, електронномікроскопічний і біохімічні методи дослідження.

**Результати.** На 14 добу експерименту в 1 і 2 групах виявили повнокров'я капілярів, венул і вен, а в приносній ланці гемомікроциркуляторного русла визначили спазм артеріол. Крім того, встановили зменшення площі кардіоміоцитів різних ділянок міокарда внаслідок зменшення в них вмісту глікогену, що підтверджується гістохімічними й ультраструктурними дослідженнями.

На 56 добу експерименту в 1 і 2 групах виявили повнокров'я в усіх мікрогемосудинах внаслідок переповнення їх еритроцитарними складками, мікротромбами. Площа усіх судин гемомікроциркуляторного русла збільшилася порівняно з інтактними показниками внаслідок збільшення площі їхньої стінки, що спричиняє підвищення індексу Вогенворта. Така морфометрична перебудова мікрогемосудин свідчить про зменшення їхньої пропускної здатності та порушення кровопостачання міокарда. В 1 і 2 групах тварин на гістологічному рівні визначили вогнищевий лізис кардіоміоцитів, набряк строми від помірного до дифузного з явищами гістолейкоцитарної інфільтрації. Такі зміни вказують на асептичне запалення, яке може бути наслідком інфаркту міокарда, зумовленого розвитком діабетичної мікроангіопатії. У кардіоміоцитах визначили каріолізис, явища вакуольної та балонної дистрофії, підсарколемальний набряк, розволокнення та лізис міофібрил, колікваційний некроз.

**Висновки.** Стрептозотоциновий цукровий діабет і стрес призводять до виражених деструктивних змін у міокарді щурів: інтерстиційного набряку, поодиноких дрібних вогнищ кардіосклерозу, міолізу. Такі зміни відбуваються на тлі розвитку діабетичної мікроангіопатії. Найбільш виражені зміни в міокарді зафіксували у тварин із коморбідною патологією.

### Ключові слова:

діабетична кардіоміопатія, серце, міокард, мікроциркуляторне русло, цукровий діабет, експериментальний цукровий діабет, серцева недостатність.

### Патологія. 2023.

Т. 20, № 2(58).  
С. 175-181

On February 24, 2022, Russia launched a full-scale invasion of Ukraine. Constant shelling of the entire territory of our country and the occupation of parts of the regions have led to the majority of the population living under prolonged stress. No person can live with long-term stress as it subtly undermines their health and contributes to the development of chronic pathological conditions, including diabetes mellitus (DM) which has a considerable socioeconomic impact due to its complications. Diabetic cardiomyopathy is a serious DM complication which is often asymptomatic [1,2,3].

The risk of myocardial infarction and death is twice as high in DM patients. DM increases the absolute risk of coronary death by 2.5 times in men and 4.7 in women [4,5]. The high rate of atypical and painless presentation of chronic coronary artery disease and myocardial infarction poses a high risk of “sudden death”. Approximately one-third of patients hospitalized due to heart failure have DM [6].

## Aim

Therefore, we aimed to study myocardial changes in adult rats with streptozotocin (STZ)-induced DM exposed to chronic immobilization stress (CIS).

## Materials and methods

A total of 26 adult albino male rats weighing 180–200 g were examined. All the animals were divided into three groups: Group I included 10 rats with STZ-induced DM exposed to CIS; Group II comprised 10 rats with STZ-induced DM; Group III included 6 intact animals. STZ-induced DM was modeled by a single intraperitoneal injection of STZ (Sigma, USA) dissolved in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5 (6 mg per 100 g body weight). Animals were exposed to CIS by placing them in a closed plastic container for five hours a day (Ukrainian Patent for the Invention No. 125623). In Group I, STZ-induced DM was modeled and on the 14<sup>th</sup> day of the experiment, animals were exposed to CIS. The samples were collected on the 14<sup>th</sup> and 56<sup>th</sup> days of the experiment.

To exclude the influence of circadian rhythms and biological activity on rat metabolism, the samples were collected prior to morning feeding. To measure fasting blood glucose levels in standard vivarium conditions, a droplet of blood was daily collected from the incised tail vein of rats using a portable blood glucose meter Accu-Chek® Active (Roche Diagnostics GmbH, Germany) with a standard set of test strips. Animal testing was performed in the Educational and Scientific Laboratory of Morphological Analysis, the Ivano-Frankivsk National Medical University (IFNMU) Bioelementology Centre, DIAMEB laboratory.

All experiments were conducted in compliance with ethical norms and requirements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986), EU Directive 86/609 (Council of the European Communities, 1986), the Law of Ukraine “On Protection of Animals from Cruel Treatment” as of December 15, 2009, Orders of the Ministry of Health of

Ukraine No. 690 dated September 23, 2009, No. 616 dated August 03, 2012 (Advisory Opinion of the Ethics Committee of IFNMU Protocol No. 111/19 dated November 19, 2019).

Immediately after animals were euthanized and blood samples were collected into tubes at the IFNMU Bioelementology Centre, glucose concentration was measured by the glucose oxidase method with a standard “Glucose-FKD” (Ukraine) reagent kit. Blood glycated hemoglobin (HbA1c) and cortisol levels were determined at the certified laboratory DIAMEB.

Histological (hematoxylin and eosin staining), histochemical (glycogen determination by the Shabadash method), electron microscopy, biochemical, and statistical methods were used. Cutting speed and feed rate were followed when collecting the samples of the ventricular myocardium for generally accepted electron microscopy [7].

For morphometric studies, the histological sections were observed under a Leica DM750 light microscope, then images of histological sections were recorded using a digital CCD camera with a resolution of 1200x1600 and saved as TIF files. Morphometric analysis was performed using ImageJ version 1.47t. The results obtained were statistically processed using the statistical package Statistica (StatSoft, Inc. (2011) STATISTICA (Data Analysis Software System), Version 10). Table variables are presented as M – sample mean, SD – standard deviation, n – sample size (the number of individuals within a group), p – the statistically significant level.

## Results

On the 14<sup>th</sup> day of the experiment, blood glucose and HbA1c levels were the highest in Group I as compared to intact animals: Group I –  $15.21 \pm 1.33$  mmol/l ( $p < 0.001$ ) and  $7.78 \pm 0.58$  % ( $p < 0.01$ ), respectively; Group II –  $13.72 \pm 1.53$  mmol/l ( $p < 0.001$ ) and  $6.08 \pm 0.45$  % ( $p < 0.01$ ), respectively; Group III –  $4.85 \pm 0.63$  mmol/l and  $1.78 \pm 0.18$  %, respectively. Such biochemical changes in Group I and Group II were indicative of developing decompensated STZ-induced DM. Blood cortisol levels were significantly higher in the experimental groups as compared to intact animals: Group I –  $32.17 \pm 2.14$  ng/ml; Group II –  $18.29 \pm 2.27$  ng/ml (in all cases  $p < 0.05$ ); Group III –  $10.06 \pm 0.98$  ng/ml.

Histological specimens obtained from intact animals clearly showed three layers of the ventricular myocardium (Fig. 1a). Most myocardial cardiomyocytes appeared oval and contained moderate amounts of glycogen granules (Fig. 1b). The myocardium was well vascularized, with the sinusoids facilitating efficient venous drainage (Fig. 1a).

On the 14<sup>th</sup> day of the experiment, in Group I and Group II, increased blood flow was observed in the capillaries, venules, and veins (Fig. 1c), while most afferent microcirculatory vessels appeared with slit-like lumen due to their spasm (Fig. 1d). In Group I and Group II, the caliber of arterioles reduced significantly to  $234.12 \pm 20.31$   $\mu\text{m}^2$  and  $241.48 \pm 189.12$   $\mu\text{m}^2$ , respectively (intact animals –  $269.35 \pm 18.34$   $\mu\text{m}^2$ ,  $p < 0.05$ ) due to narrowing of their lumen to  $46.58 \pm 7.26$   $\mu\text{m}^2$  and  $56.35 \pm 7.89$   $\mu\text{m}^2$ ,

respectively (intact animals –  $83.34 \pm 7.35 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0.05$ ). Such morphometric changes in arterioles caused a drastic reduction in their permeability, as evidenced by a significant increase in their wall-to-lumen ratio (WLR) to  $402.62 \pm 39.15 \%$  and  $328.53 \pm 27.64 \%$  in Group I and Group II respectively ( $p < 0.05$ ), as compared to intact animals –  $223.19 \pm 21.04 \%$ .

Morphometric analysis revealed a significant reduction in the surface area of ventricular cardiomyocytes in the early stages of modeling STZ-induced DM and CIS (Table 1). The surface area of cardiomyocyte nuclei remained unchanged and their nuclear-cytoplasmic ratio (N:C ratio) increased (Table 1).

At the ultrastructural level, in the lumen of the microcirculatory vessels, RBC aggregation was detected. Cardiomyocytes underwent cell shrinkage and nuclear fragmentation. The highest degree of variability was observed in the mitochondria: from disorganization and destruction of mitochondrial cristae to mitochondrial swelling and inner mitochondrial membrane damage (Fig. 2a, b). Focal destruction of the intercalated discs was observed (Fig. 2b). Segmental contractions were occasionally found in the myofibrils of ventricular cardiomyocytes. The above-described changes in cardiomyocytes were equally detected in both Group I and Group II. In cardiomyocytes of Group I, however, distinct clusters of large, electron-dense mitochondria with disorganized and partially destructed cristae were seen underneath the sarcolemma and close to the nucleus.

On the 56<sup>th</sup> day of the experiment, blood glucose and HbA1c levels were the highest in Group I as compared to intact animals: Group I –  $20.61 \pm 3.23 \text{ mmol/l}$  ( $p < 0.001$ ) and  $9.25 \pm 0.72 \%$  ( $p < 0.01$ ), respectively; Group II –  $18.55 \pm 2.13 \text{ mmol/l}$  ( $p < 0.001$ ) and  $8.34 \pm 0.48 \%$  ( $p < 0.01$ ), respectively; Group III –  $4.58 \pm 0.56 \text{ mmol/l}$  and  $2.89 \pm 0.17 \%$ , respectively. Such biochemical changes in Group I and Group II were indicative of developing decompensated STZ-induced DM. Blood cortisol levels were significantly higher in the experimental groups as compared to intact animals: Group I –  $14.17 \pm 2.14 \text{ ng/ml}$ ; Group II –  $17.58 \pm 2.15 \text{ ng/ml}$ ; Group III –  $10.06 \pm 0.98 \text{ ng/ml}$ ; however, in both experimental groups, blood cortisol concentration decreased significantly as compared to the previous observation period (in all cases  $p < 0.05$ ).

At the histological level, in Group I and Group II, cardiomyocyte lysis, moderate to diffuse stromal edema, lymphohistiocytic infiltration were occasionally seen (Fig. 1e–f), being more pronounced in animals of Group I (Fig. 1e). Such changes pointed to sterile inflammation due to myocardial infarction secondary to diabetic microangiopathy. Pronounced hyperemia was found; cardio-sclerosis, however, was rarely seen (Fig. 1g). PAS staining showed low quantities of glycogen granules or their absence in the cytoplasm of cardiomyocytes (Fig. 1h). Cardiomyocytes were found to show vacuolar degeneration and apical ballooning (Fig. 1h). The surface area of cardiomyocytes and their nuclei reduced significantly as compared to the values of intact animals and those from the previous observation period, thereby indicating cell atrophy. On the 56<sup>th</sup> day of the experiment, in Group I and Group II, hyperemia occurred due to RBC aggregation

**Table 1.** Morphometric analysis of cardiomyocytes in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus exposed to chronic immobilization stress (M  $\pm$  m)

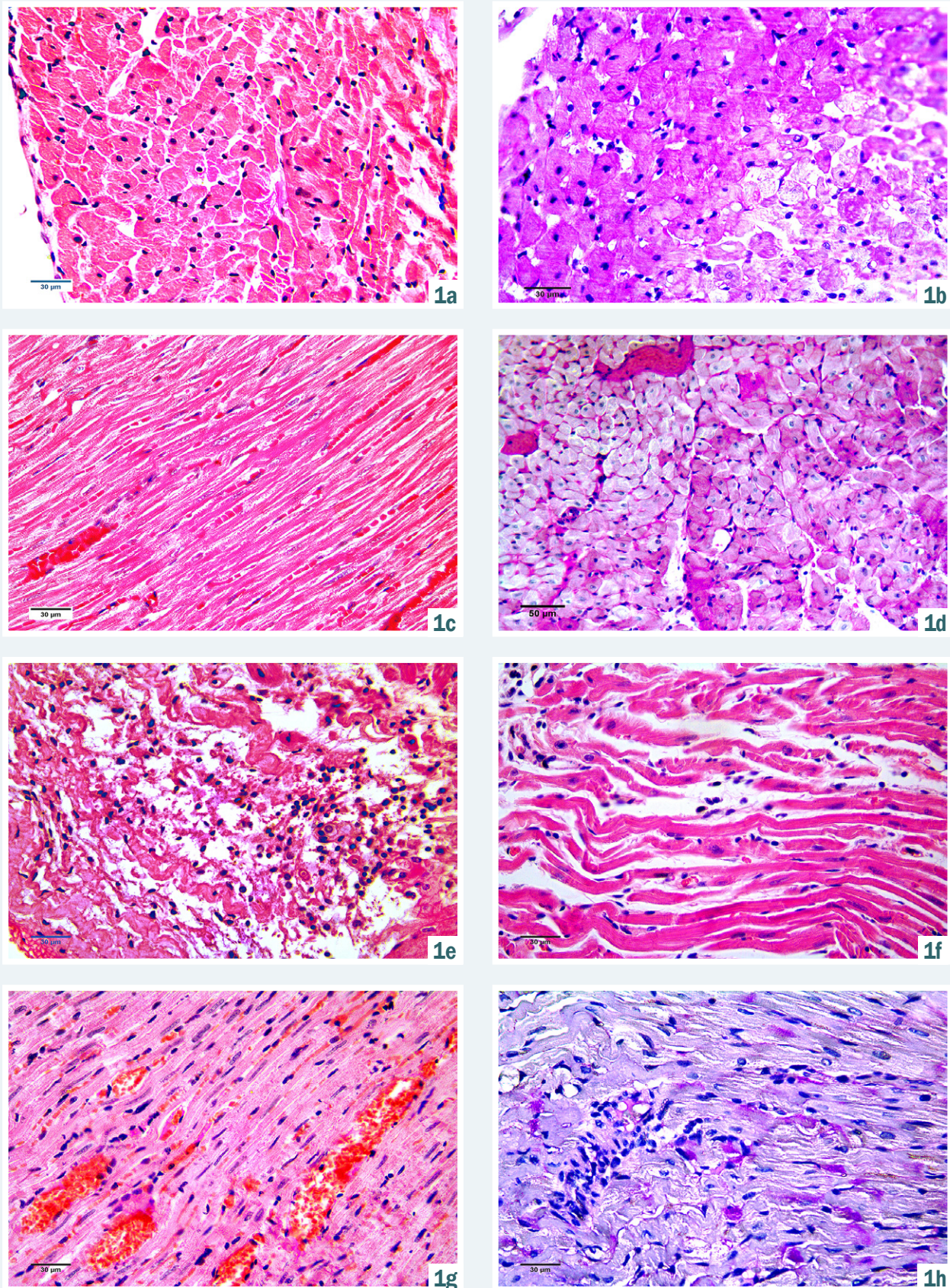
Group	Myo-cardial region	Morphometric indicators of cardiomyocytes		
		Cardiomyocyte surface area, $\mu\text{m}^2$	Nucleus surface area, $\mu\text{m}^2$	N:C ratio, %
<b>14<sup>th</sup> day</b>				
Group I	LV	$309.73 \pm 19.46^*$	$19.92 \pm 1.19$	$6.43 \pm 0.15^*$
	RV	$231.54 \pm 14.73^*$	$17.78 \pm 0.92$	$7.68 \pm 0.23^*$
Group II	LV	$312.49 \pm 19.81^*$	$19.92 \pm 1.19$	$6.37 \pm 0.14^*$
	RV	$242.93 \pm 18.70^*$	$17.78 \pm 0.92$	$7.32 \pm 0.19^*$
Group III	LV	$349.26 \pm 21.85$	$19.61 \pm 1.72$	$5.61 \pm 0.14$
	RV	$271.69 \pm 19.48$	$17.47 \pm 0.53$	$6.43 \pm 0.13$
<b>56<sup>th</sup> day</b>				
Group I	LV	$259.73 \pm 20.46^{*\#}$	$16.53 \pm 1.24^{*\#}$	$6.36 \pm 0.15$
	RV	$201.54 \pm 16.73^{*\#}$	$15.63 \pm 1.25^{*\#}$	$7.75 \pm 0.12$
Group II	LV	$278.31 \pm 19.13^{**}$	$17.98 \pm 1.86^{**}$	$6.46 \pm 0.14$
	RV	$219.61 \pm 20.34^{**}$	$16.93 \pm 0.53^{**}$	$7.89 \pm 0.17^{\beta}$
Group III	LV	$354.28 \pm 19.26$	$19.65 \pm 1.04$	$5.56 \pm 0.18$
	RV	$278.69 \pm 18.63$	$17.34 \pm 1.59$	$6.22 \pm 0.19$

LV: left ventricle; RV: right ventricle; \*:  $p < 0.05$  – the probability of differences as compared to the intact group; #:  $p < 0.05$  – the probability of differences as compared to the previous study period within the same group;  $\beta$ :  $p < 0.05$  – the probability of differences between Group I and Group II indicators during the same study period.

and microthrombi (Fig. 1g). In animals of Group I and Group II, the surface area of all microcirculatory vessels was higher than that in intact animals, as evidenced by an increase in the WLR of arterioles to  $331.32 \pm 29.56 \%$  and  $312.56 \pm 24.83 \%$ , respectively (intact animals –  $223.19 \pm 15.63 \%$ ,  $p < 0.05$ ); an increase in the WLR of capillaries to  $190.05 \pm 16.56 \%$  and  $161.46 \pm 14.72 \%$ , respectively (intact animals –  $72.00 \pm 7.84 \%$ ,  $p < 0.05$ ); an increase in the WLR of venules to  $165.02 \pm 24.33 \%$  and  $137.07 \pm 17.32 \%$  (intact animals –  $62.29 \pm 5.73 \%$ ,  $p < 0.05$ ). Such morphometric changes in the microcirculatory vessels were indicative of decreased vascular permeability and impaired myocardial blood flow.

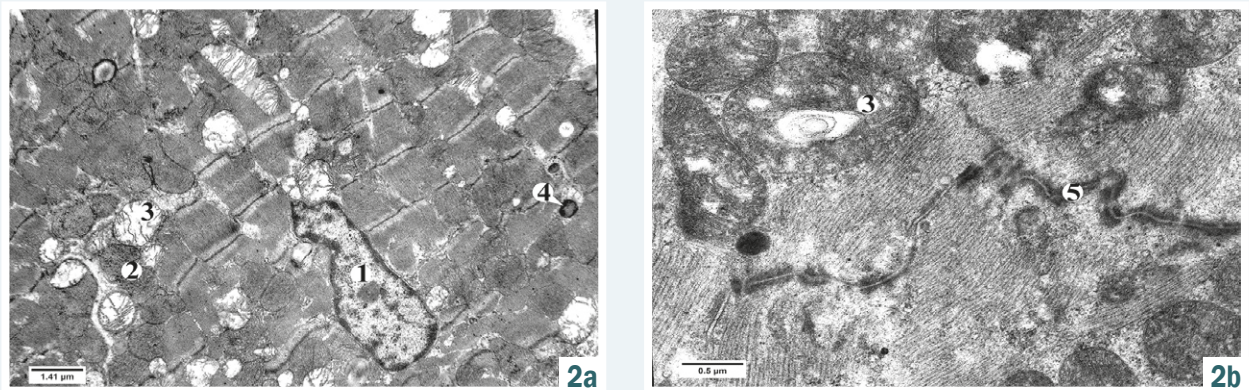
At the ultrastructural level, on the background of hyperglycemia, pronounced microangiopathy was observed, which was manifested by RBC aggregation, microthrombi, platelet and RBC vascular adhesion, vacuolar dystrophy of endothelial cells and myocytes (Fig. 3a). Most capillary basement membranes showed thickening and proliferation in the form of separate layers, thereby indicating DM (Fig. 3b). Severe microangiopathy led to pronounced hypoxic changes in the myocardium. In cardiomyocytes, karyolysis, vacuolar degeneration, apical ballooning, subsarcolemmic edema, fibrosis and lysis of myofibrils were observed (Fig. 3c, d). Such changes were most pronounced in Group I. At the same time, in the myocardium of animals belonging to Group I, colliquative or partial necrosis of cardiomyocytes was occasionally seen (Fig. 3d). The death of individual cardiomyocytes was observed, leading to the subsequent development of cardiosclerosis (Fig. 3e). In Group II, cardiomyocytes exhibited vacuolar degeneration and apical ballooning, colliquative cardiomyocyte necrosis was rarely seen (Fig. 3f). Along with cardiomyocytes with pronounced destructive changes, preserved cells were visualized as well; however, all cardiomyocytes underwent more or less pronounced changes.



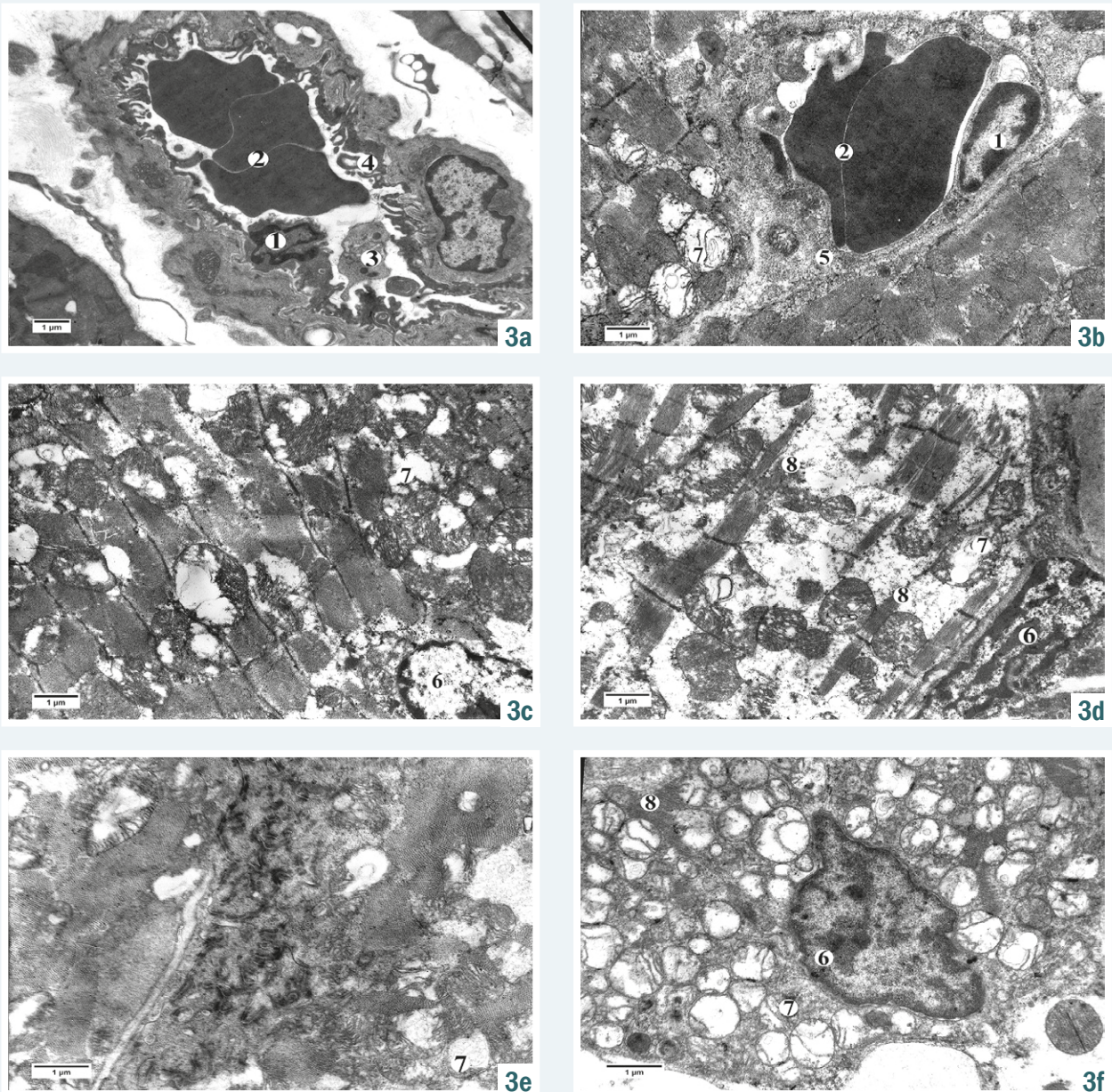


**Fig. 1.** Myocardium of intact animals (a, b). Increased microvascular blood flow (c) and low quantities of glycogen granules (d) in the myocardium of animals belonging to Group I on the 14<sup>th</sup> day of the experiment. Interstitial edema, lymphohistiocytic infiltration and lysis of single cardiomyocytes (e, f), red blood cell (RBC) aggregation (g), focal cardiosclerosis (h) on the 56<sup>th</sup> day of the experiment. Hematoxylin and eosin staining (a, c, e, f, g), periodic acid-Schiff (PAS) staining (b, d, h). Micrographs.





**Fig. 2.** Submicroscopic changes in left ventricular cardiomyocytes on the 14<sup>th</sup> day of simulating STZ-induced DM and CIS. Electron micrographs. **1:** cardiomyocyte nucleus; **2:** reserved mitochondria; **3:** mitochondria that underwent destructive changes; **4:** lipid droplet; **5:** intercalated disc.



**Fig. 3.** Ultrastructure changes cardiomyocytes of myocardium on the 56<sup>th</sup> day of simulating STZ-induced DM and CIS. Electron micrographs. **1:** nucleus of endothelial cells; **2:** RBC aggregation; **3:** thrombocytes; **4:** microclasmatosis; **5:** basement membranes; **6:** cardiomyocyte nucleus; **7:** mitochondria that underwent destructive changes; **8:** lysis myofibrils.



## Discussion

In the early stages of developing comorbid pathology and experimental DM on the background hyperglycemia and cortisolemia, the first signs of myocardial hypoxia due to impaired myocardial blood flow were observed. Arteriolar spasms in the microcirculation with partial or complete occlusion of the arteriolar lumen were first found. Hyperglycemia, hypercortisolemia, high blood levels of adrenocorticotrophic hormone in rats with experimental DM on the 14<sup>th</sup>–28<sup>th</sup> days of the experiment have been described by other authors [8,9].

Impaired myocardial blood flow on the background of the initial signs of diabetic microangiopathy results in destructive mitochondrial changes and vacuolar degeneration which has been described earlier as well [10], however, for the first time ever, we have studied, described, and compared the state of the myocardium in case of a comorbidity. It worth noting that, during all the observation periods, changes were more pronounced in animals of Group I. Mitochondria were the very first organelles being damaged. In Group I and Group II, disorganization and destruction of the inner mitochondrial membrane was seen. In diabetic cardiomyopathy, cardiomyocytes undergo metabolic changes, including oxidative stress due to increased reactive oxygen species production by damaged mitochondria [11,12].

Sciarretta S. et al. have confirmed that stress-induced changes in mitochondrial cytochrome c oxidase can trigger a cascade of biochemical modifications in cardiomyocytes and lead to cardiomyocyte apoptosis [13]. In addition, in the early stages of simulation STZ-induced DM, cardiomyocyte surface area in different myocardial regions reduced, while the surface area of their nuclei remained almost unchanged as compared to intact animals, thereby leading to an increase in the N:C ratio.

According to Cagalinec M. et al., the surface area of cardiomyocytes reduced on the 7<sup>th</sup> day of STZ-induced DM due to their shrinkage [14]. Other researchers studying the effect of experimental DM on skeletal muscles postulate that the underlying cause is a reduction in glycogen content [15]. We hold the viewpoint that, in the early stages of developing STZ-induced DM, cardiomyocyte surface area reduces due to a reduction in glycogen content, as evidenced by the PAS-reaction and confirmed at the ultrastructural level. Glycogen granules filling the sarcoplasm between myofibrils and mitochondria in intact animals, were rarely seen.

On the 56<sup>th</sup> day of the experiment, animals of Group I and Group II developed diabetic cardiomyopathy. Cardiomyocyte atrophy, myolysis, focal fibrosis as well as interstitial and perivascular myocardial edema were observed. Cardiomyocytes were found to show vacuolar degeneration and apical ballooning, colliquative necrosis. Such changes occur due to the progression of insulin deficiency which reduces protein metabolism, provokes intracellular organelle degradation, and promotes increased autolysis in cardiomyocytes followed by a reduction in the content of actin that results in cardiomyocyte atrophy, fibrosis, and dilated cardiomyopathy [2,4].

We are of the opinion that the development of diabetic cardiomyopathy is associated with impaired glucose absorption due to insulin deficiency, impaired cardiomyocyte

metabolism, and developing microangiopathy. The latter progresses especially in the later stages of the experiment and results in impaired myocardial blood flow. Elevated cortisol levels in DM lead to the development of hyperergic inflammation in the vascular endothelium and increase fibrinogen synthesis [9,16,17]. The coagulation system is activated that results in hypercoagulation. Glucocorticoids affect collagen and mucopolysaccharide synthesis causing their excessive deposition in the vascular walls. We can explain the observed changes in the microcirculatory vessels by this very pathogenetic mechanism.

## Conclusions

1. Experimental DM and its combination with CIS in the early stages of the experiment (day 14) led to a reduction in the surface area of ventricular cardiomyocytes in different myocardial regions and vacuolar degeneration. The initial signs of diabetic microangiopathy manifested as increased blood flow in the venules and veins, arteriolar spasm, RBC aggregation in the vascular lumen were found.

2. In the later stages of the experiment (day 56), interstitial edema, focal fibrosis, cardiomyocyte lysis, vacuolar degeneration, apical ballooning, colliquative necrosis were observed in the rat myocardium. Such changes occurred on the background of developing diabetic microangiopathy. The most pronounced myocardial changes were recorded in animals with a comorbidity.

**Prospects for further research.** Future studies of changes in the myocardium of the heart in experimental diabetes mellitus and its correction of various antidiabetic agent are promising. This will allow to create the new pathogenetic antidiabetic treatments for the correction of diabetic cardiomyopathies.

## Funding

The research was performed within the research works of Ivano-Frankivsk National Medical University: "The age features of pathomorphogenesis of some organs of neuroendocrine, cardiovascular, digestive and respiratory systems in diabetes mellitus" (state registration No. 01.16U003598, 2017–2018) which received funding from the Ministry of Health of Ukraine and "Morphological characteristics of the leading pathway of the visual analyzer in experimental diabetes mellitus and its correction in conditions of chronic stress" (state registration No. 01.19U003551, 2020–2024).

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

Надійшла до редакції / Received: 11.05.2023

Після доопрацювання / Revised: 29.05.2023

Схвалено до друку / Accepted: 13.06.2023

## Information about authors:

Vasyliuk V. M., Postgraduate Student of the Department of Pediatric Surgery with a Course in Clinical Anatomy and Operative Surgery, Ivano-Frankivsk National Medical University, Ukraine.

ORCID ID: 0009-0001-1850-7630

Khabchuk V. S., MD, PhD, Assistant of the Department Dentistry of Postgraduate Education, Ivano-Frankivsk National Medical University, Ukraine.

ORCID ID: 0009-0005-5195-7501



Pavliak A. Ya., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Surgical Diseases, Ivano-Frankivsk National Medical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0001-6948-8778

Zhurakivska O. Ya., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Human Anatomy, Ivano-Frankivsk National Medical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0002-1041-4237

Hrechyn A. B., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Human Anatomy, Ivano-Frankivsk National Medical University, Ukraine.

ORCID ID: 0009-0003-8865-135X

### Відомості про авторів:

Василюк В. М., аспірант каф. дитячої хірургії з курсом клінічної анатомії та оперативної хірургії, Івано-Франківський національний медичний університет, Україна.

Хабчук В. С., канд. мед. наук, асистент каф. стоматології післядипломної освіти, Івано-Франківський національний медичний університет, Україна.

Павляк А. Я., канд. мед. наук, доцент каф. хірургічних хвороб, Івано-Франківський національний медичний університет, Україна.

Жураківська О. Я., д-р мед. наук, професор каф. анатомії людини, Івано-Франківський національний медичний університет, Україна.

Гречин А. Б., канд. мед. наук, доцент каф. анатомії людини, Івано-Франківський національний медичний університет, Україна.

### References

- Jia, G., DeMarco, V. G., & Sowers, J. R. (2016). Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nature reviews. Endocrinology*, 12(3), 144-153. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.216>
- Lorenzo-Almorós, A., Cepeda-Rodrigo, J. M., & Lorenzo, Ó. (2022). Diabetic cardiomyopathy. *Revista clinica espanola*, 222(2), 100-111. <https://doi.org/10.1016/j.rceng.2019.10.012>
- Paolillo, S., Marsico, F., Prastaro, M., Renga, F., Esposito, L., De Martino, F., Di Napoli, P., Esposito, I., Ambrosio, A., Ianniruberto, M., Mennella, R., Paolillo, R., & Gargiulo, P. (2019). Diabetic Cardiomyopathy: Definition, Diagnosis, and Therapeutic Implications. *Heart failure clinics*, 15(3), 341-347. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2019.02.003>
- Dillmann, W. H. (2019). Diabetic Cardiomyopathy. *Circulation research*, 124(8), 1160-1162. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESA-HA.118.314665>
- Price, C. S., Corbett, S., Lewis-Barned, N., Morgan, J., Oliver, L. E., & Dovey-Pearce, G. (2011). Implementing a transition pathway in diabetes: a qualitative study of the experiences and suggestions of young people with diabetes. *Child: care, health and development*, 37(6), 852-860. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2214.2011.01241.x>
- Kyyak, Yu. H., Kyyak, H. Yu., & Barnett, O. Yu. (2021). Spetsyfichnist diabetichnoi kardiomiopatii za naiavnosti komorbidnykh sertsevo-sudynnykh zakhvoriuvan: kliniko-ultrastrukturni doslidzhennia [Specifics of Diabetic Cardiomyopathy in the Cases of Concomitant Cardiovascular Diseases: Clinical and Ultrastructural Examinations]. *Mizhnarodnyi endokrynologichnyi zhurnal*, (5), 33-38. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.22141/2224-0721.5.77.2016.78751>
- Bahriy, M. M., Dibrova, V. A., Popadynets, O. H., Hryshchuk, M. I. (2016). *Metodyky morfolohichnykh doslidzhen* [Methods of histological research]. Vinnytsia: Nova knyha. [in Ukrainian].
- Zhurakivska, O. Ya., Zherdova, N. M., Olynyk, R. P., Pobigun, N. G., Kostitska, I. O., Zhurakivskiy, V. M., Miskiv, V. A., Tkachuk, Yu. L., Antymys, O. V., Sahan, N. T., & Khiazevych-Chorna, T. V. (2021). Evidence of apoptosis in parvocellular nuclei of hypothalamus in diabetes mellitus. *Problems of endocrine pathology*, 78(4), 94-103. <https://doi.org/10.21856/j-PEP.2021.4.13>
- Zhurakivska, O. Ya., Zhurakivskiy, V. M., Miskiv, V. A., Dutchak, U. M., Kulynych, H. B., & Tkachuk, Yu. L. (2019). Morfofunktsionalni zminy nadnyrkovykh zaloz u ranni terminy rozvytku streptozototsynovoho tsukrovoho diabetu [Morphofunctional changes in the adrenal glands in the early deadline of the development of streptozotocin diabetes mellitus]. *Klinichna anatomiia ta operatyvna khirurgiia*, 2(18), 82-88. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.24061/1727-0847.18.2.2019.16>
- Zhurakivska, O. Ya., Mykulets, T. I., Dutchak, U. M., Klypych, Ya. I., Miskiv, V. A., Hrechyn, A. B., & Klypych, O. O. (2018). Structural changes of endocrine system of myocardium during the streptozotocin diabetes mellitus. *World of medicine and biology*, (1), 126-130. <https://doi.org/10.26724/2079-8334-2018-1-63-126-130>
- Wang, J., Huang, X., Liu, H., Chen, Y., Li, P., Liu, L., Li, J., Ren, Y., Huang, J., Xiong, E., Tian, Z., & Dai, X. (2022). Empagliflozin Ameliorates Diabetic Cardiomyopathy via Attenuating Oxidative Stress and Improving Mitochondrial Function. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022, 1122494. <https://doi.org/10.1155/2022/1122494>
- Zhao, D., Yang, J., & Yang, L. (2017). Insights for Oxidative Stress and mTOR Signaling in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury under Diabetes. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 6437467. <https://doi.org/10.1155/2017/6437467>
- Sciarretta, S., Maejima, Y., Zablocki, D., & Sadoshima, J. (2018). The Role of Autophagy in the Heart. *Annual review of physiology*, 80, 1-26. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121427>
- Cagalinec, M., Waczuliková, I., Uličná, O., & Chorvat, D., Jr (2013). Morphology and contractility of cardiac myocytes in early stages of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Physiological research*, 62(5), 489-501. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932467>
- Zhurakivska, O. Ya., & Hrad, A. O. (2016). Histo-ultrastructural organization of neuromuscular synapses of the masseter in experimental diabetes mellitus. *Deutscher Wissenschaftsberichter: German Science Herald*, 2, 52-55.
- Shi, Y., & Vanhoutte, P. M. (2017). Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *Journal of diabetes*, 9(5), 434-449. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12521>
- Purnama, U., Castro-Guarda, M., Sahoo, O. S., & Carr, C. A. (2022). Modelling Diabetic Cardiomyopathy: Using Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes to Complement Animal Models. *Metabolites*, 12(9), 832. <https://doi.org/10.3390/metabo12090832>

# Дисбаланс системи протеази-антипротеази на тлі хронічного обструктивного захворювання легень в поєднанні з ішемічною хворобою серця

О. О. Крайдашенко<sup>✉\*</sup>

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна

**Ключові слова:** ішемічна хвороба серця, хронічне обструктивне захворювання легень, матриксна металопротеїназа 9, тканинні інгібітори матриксних металопротеїназ, фіброз.

**Патологія. 2023.**  
Т. 20, № 2(58).  
С. 182-188

\*E-mail:  
Sashko\_kr@ukr.net

**Мета роботи** – оцінювання клінічного значення порушення рівня експресії ММП-9 та ТІМП на тлі хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ) у поєднанні з ішемічною хворобою серця (ІХС).

**Матеріали та методи.** Під спостереженням перебували 26 пацієнтів із ХОЗЛ + ІХС і 22 практично здорові особи. Середній вік пацієнтів – 56,68 ± 1,21 року, з-поміж обстежених 76,92 % чоловіків. Середній вік осіб із групи контролю – 54,37 ± 1,84 року, 72,73 % чоловіків. Об'єкт дослідження – ІХС: стенокардія напруги. Оцінювали функцію зовнішнього дихання, результати тесту 6-хвилинної ходьби, варіабельність серцевого ритму, концентрацію ММП-9 і ТІМП у сироватці крові методом твердофазного імуоферментного аналізу.

**Результати.** Аналіз рівня експресії протеаз та їхнього інгібітора свідчить, що пацієнти з коморбідною патологією ІХС на тлі ХОЗЛ мали в 8,11 раза вищу активність ММП-9 ( $p < 0,05$ ) щодо параметра практично здорових осіб. Показники активності ТІМП у пацієнтів із ІХС на тлі ХОЗЛ становили 1,46 ± 0,03 мкг/мл; це статистично достовірно менше (на 53,21 %,  $p < 0,05$ ) порівняно з даними здорових осіб (3,12 ± 0,01 мкг/мл). У хворих на ІХС у поєднанні з ХОЗЛ виявили порушення ферментативної активності позаклітинного матриксу, що характеризується статистично значущим зростанням рівня експресії матриксних металопротеїназ і зниженою активністю їхнього тканинного інгібітора порівняно з практично здоровими особами. Достовірні кореляційні зв'язки між рівнем ММП-9 і показником ОФВ1 ( $r = -0,67$ ,  $p < 0,05$ ), параметром LF/HF ( $r = -0,74$ ,  $p < 0,05$ ) свідчать, що при елевації рівня експресії ММП-9 визначають виразніше порушення функції зовнішнього дихання та зсув симпато-парасимпатичного балансу в напрямі симпатичної активації та зменшення вагусного тону у модуляції серцевого ритму.

Аналіз частоти виявлення показав, що в осіб у верхньому квартилі ММП-9 вірогідно частіше реєстрували прогностично негативні параметри функції зовнішнього дихання – ізольоване зниження індексу Тифно ( $\chi^2 = 5,2$ ,  $p = 0,03$ ), а також виразність задишки  $\geq 6$  балів за шкалою Борга під час оцінювання переносності фізичних навантажень (тест із 6-хвилинною ходьбою;  $\chi^2 = 7,3$ ,  $p = 0,02$ ).

**Висновки.** Результати дослідження показали, що у хворих на ІХС на тлі ХОЗЛ є виражений протеолітичний дисбаланс і порушення фібротичних процесів порівняно з практично здоровими особами. За результатами кореляційного аналізу, елевація рівня експресії ММП-9 у хворих на ІХС на тлі ХОЗЛ супроводжувалася більшим порушенням функції зовнішнього дихання та активацією симпатичної іннервації.

**Key words:** ischemic heart disease, chronic obstructive pulmonary disease, matrix metalloproteinase 9, tissue inhibitor of metalloproteinases, fibrosis.

**Pathologia, 2023.**  
20(2), 182-188

## Imbalance of the protease-antiprotease system against the background of chronic obstructive pulmonary disease in combination with ischemic heart disease

О. О. Kraidashenko

**The aim of the study:** to evaluate the clinical value of the violation of the expression level of MMP-9 and TIMP against the background of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in combination with ischemic heart disease (IHD).

**Materials and methods.** In accordance with the set goal of the study, 26 people with COPD + IHD and 22 practically healthy people were under observation. The average age of patients was 56.68 ± 1.21 years; 76.92 % were men. In the control group, the average age was 54.37 ± 1.84 years, 72.73 % were men. The object of the study was ischemic heart disease: angina pectoris. Research methods: external respiration function study, six minute walk test, determination of heart rate variability, the concentration of MMP-9 and TIMP in blood serum was determined by the method of solid-phase enzyme immunoassay.

**Results.** The analysis of the level of expression of proteases and its inhibitor shows that patients with comorbid IHD on the background of COPD demonstrated 8.11 times higher activity of MMP-9 ( $p < 0.05$ ) compared to a cohort of practically healthy people. Indicators of TIMP activity in patients with IHD on the background of COPD are 1.46 ± 0.03 µg/ml, which is statistically significantly lower by 53.21 % ( $p < 0.05$ ) compared to healthy people (3.12 ± 0.01 µg/ml). The presence of reliable correlations between the MMP-9 level and the FEV1 indicator ( $r = -0.67$ ,  $p < 0.05$ ), the LF/HF parameter ( $r = -0.74$ ,  $p < 0.05$ ) indicates, that when the level of expression of MMP-9 is elevated, there is a more pronounced violation of the function of external respiration and a shift in the sympatho-parasympathetic balance in the direction of sympathetic activation and a decrease in vagal tone in heart rate modulation.

The analysis of the meeting frequency with the analysis of conjugation tables showed that in persons in the upper quartile of MMP-9, prognostically negative parameters of the function of external breathing – an isolated decrease in the Tifno index ( $\chi^2 = 5.2$  at  $p = 0.03$ ), as well as the expressiveness of shortness of breath – were recorded more often  $\geq 6$  points on the Borg scale when assessing exercise tolerance during the 6-minute walk test ( $\chi^2 = 7.3$  at  $p = 0.02$ ).

**Conclusions.** The obtained data demonstrate that patients with IHD on the background of COPD have a pronounced proteolytic imbalance and disruption of fibrotic processes compared to practically healthy individuals.

Ішемічна хвороба серця (ІХС), зокрема стенокардія напруги, та хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) часто виявляють як коморбідну патологію, вони мають спільні фактори ризику. Поєднання кардіальної та легеневої патології призводить до погіршення прогнозу перебігу обох захворювань, критичного зниження якості життя, ранньої інвалідазації пацієнтів і збільшення фінансового навантаження для суспільства [1].

Забруднення повітря шкідливими компонентами, гіпоксія, системне запалення, ендотеліальна дисфункція, підвищена реактивність тромбоцитів і жорсткість артерій відіграють важливу роль у виникненні ІХС, й ХОЗЛ. У більшості цих пацієнтів смерть настає через серцево-судинні ускладнення незабаром після чергового загострення ХОЗЛ. Крім несприятливого прогнозу, що пов'язаний із супутніми патологіями ІХС і ХОЗЛ, надзвичайно складним завданням є фармакологічне лікування таких пацієнтів [2].

ІХС – одна з найпоширеніших хвороб серцево-судинної системи, її діагностовано у майже 24 % дорослого населення України. Поширеність ХОЗЛ в Україні становить майже 3 тисячі випадків на 100 тисяч населення та щороку зростає на 8 % [3]. ІХС належить місце лідера в рейтингу Глобального тягаря захворювань в осіб, старших за 50 років, а ХОЗЛ – на четвертому місці в осіб віком 50–74 років, на третьому місці в осіб, старших за 75 років [4].

Матричні металопротеїнази (ММП) – протеїнази, що можуть руйнувати всі компоненти позаклітинного матриксу та численні нематричні білки. У результаті клінічних досліджень доведено, що ММП та їхні тканинні інгібітори (TIMPs) залучені в патогенез легеневого фіброзу, оскільки встановлено підвищення рівнів ММП (включаючи ММП-1, ММП-7, ММП-8 і ММП-9) у зразках крові та легень піддослідних тварин [5]. Дослідження легеневого фіброзу на мишачих моделях показали, що більшість ММП спричиняють розвиток фіброзу, включаючи такі механізми ММП: перехід епітелію в мезенхіму (ММП-3 і ММП-7); підвищення рівня або активності профіброзних медіаторів у легенях або зниження рівня антифіброзних медіаторів у легенях (ММП-3, ММП-7 і ММП-8); стимулювання аномальної міграції епітеліальних клітин та інших абераційних процесів відновлення (ММП-3 і ММП-9); індукція перемикання фенотипів легневих макрофагів із типів М1 на М2 (ММП-10 і ММП-28); активація міграції фіброцитів (ММП-8). ММП-13 і ММП-19 мають антифіброзну активність у мишачих моделях легеневого фіброзу, а ММП-1 і ММП-10 – потенціал для обмеження фіброзної реакції на пошкодження [6].

ММП-9,  $Zn^{2+}$ -залежна ендопептидаза, фермент желатиназа показала значну елевацію під час патологічного ремоделювання серця після інфаркту міокарда (ІМ). ММП-9, також відома як желатиназа В, – одна з найбільш вивчених ММП у дослідженнях щодо серцево-судинної системи. ММП-9 може розкладати й еластин, і колаген, оскільки ці субстрати є основними компонентами білка серцевого позаклітинного матриксу [7].

Серед членів родини ММП саме ММП-9 відіграє важливу роль у виникненні ІМ, серцевої недостатно-

сті, діабету, гіпертонії та атеросклерозу. Попередні дослідження показали, що інгібування ММП-9 може покращити наслідки для пацієнтів із ремоделюванням серця, фіброзом, зменшити розмір інфаркту, швидкість його розширення та покращити виживаність після ІМ або під час ішемічно-реперфузійного ушкодження. Однак кардіопротекторний компонент або специфічний механізм інгібування ММП-9 потребує детальнішого вивчення [8].

Повідомляли, що експресія ММП-9 безпосередньо корелює з діастолічною дисфункцією та є біомаркером ремоделювання серця в пацієнтів із серцевою недостатністю. Крім того, цілеспрямована делеція ММП-9 захищає від ішемічно-реперфузійного ушкодження, а отже ММП-9, можливо, відіграє фундаментальну роль у пошкодженні серця. Фармакологічні інгібітори ММП-9, або моноклональні антитіла, спрямовані на ММП-9 (андекаліксимаб, GS-5745), нині перебувають на I та II фазах клінічних випробувань [9].

За нормальних фізіологічних умов рівень експресії генів і білків ММП-9 низький, але експресія та активність ММП-9 значно збільшуються при патологічних станах серця, що визначають під час багатьох серцево-судинних захворювань. Відомі агенти, що підвищують ендогенний серцевий рівень ММП-9 у міокарді після ІМ, – гіпоксія, активні форми кисню, фактори росту, хемокіни, білки, які активують серцевий позаклітинний матрикс, і прозапальні цитокіни. Крім того, ММП-9 рекрутується до інфарктного міокарда через інфільтрацію нерезидентних клітин серця (інфільтрацію нейтрофілів, макрофагів і лейкоцитів) під час ремоделювання після ІМ [10, 11].

Позаклітинну роль ММП-9 доволі добре вивчено, але її внутрішньоклітинна або регуляторна роль у внутрішньоклітинних сигнальних шляхах залишається невідомою. Повідомляли, що абляція експресії та активності ММП-9 покращує скорочувальну здатність кардіоміоцитів при кардіоміопатії [12]. Втім, механізм кардіопротекції, що опосередкована абляцією ММП-9, остаточно не з'ясовано.

Наведені факти свідчать про актуальність дослідження у цьому напрямі для оптимізації діагностики та лікування хворих на стенокардію напруги ішемічного ґенезу, що поєднана з ХОЗЛ, на підставі вивчення стану системи протеази-антипротеази (ММП-9/TIMP-1) та впливу на перебіг ішемії міокарда, структурно-функціональний стан лівого шлуночка [13].

## Мета роботи

Оцінювання клінічного значення порушення рівня експресії ММП-9 та TIMP на тлі хронічного обструктивного захворювання легень у поєднанні з ішемічною хворобою серця.

## Матеріали і методи дослідження

Під спостереженням перебували 26 пацієнтів із ХОЗЛ + ІХС і 22 практично здорові особи. Середній вік пацієнтів –  $56,68 \pm 1,21$  року, з-поміж обстежених 76,92 % чоловіків. Середній вік осіб із групи контролю –  $54,37 \pm 1,84$  року, 72,73 % чоловіків.



Критерії залучення – вік пацієнтів від 40 до 70 років; встановлені діагнози ІХС, стабільна стенокардія напруги II–III ФК (підтверджений за медичною документацією хворого, зокрема наявність ангиографічних змін коронарних артерій або оперативного втручання / процедур реоваскуляризації міокарда); виявлене ХОЗЛ II–III стадії (GOLD 2014, після проведення проби з бронхолітиком короткої дії ОФВ<sub>1</sub>  $\geq 30$  % і  $\leq 80$  %, ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЄЛ  $< 0,7$  (70 %), що визначені через 20 хвилин після інгаляції 400 мкг сальбутамолу); відсутність протипоказань для призначення  $\beta$ -адреноблокаторів, антиагрегантів, статинів. У дослідження залучали тільки пацієнтів, схема лікування або стан яких можуть залишатися стабільними протягом усього періоду участі у дослідженні. Усі обстежені надали письмову інформовану згоду на участь.

Критерії виключення – вагітність, лактація; діагностовані гострий гепатит, гострий пієлонефрит; нестабільна стенокардія; інфаркт міокарда в анамнезі; гострі порушення мозкового кровообігу в анамнезі; виявлена клінічно значуща патологія клапанного апарату серця; атріовентрикулярна блокада II–III ступенів; кардіоміопатії; виражені порушення серцевого ритму; онкологічні захворювання; наявність клінічно значущих відхилень лабораторних показників, що можуть вплинути на результати оцінювання безпеки й ефективності досліджуваного препарату; будь-які інші супутні декомпенсовані захворювання або гострі стани, що можуть вплинути на результати дослідження; приймання будь-яких лікарських засобів, що впливають на метаболізм міокарда, протягом 1 місяця до залучення в дослідження; необхідність супутнього призначення лікарських засобів, нерекомендованих під час дослідження; участь у будь-якому іншому клінічному випробуванні.

Діагностику ХОЗЛ, визначення її стадії та ступеня тяжкості здійснили за критеріями міжнародної програми «Глобальна ініціатива із ХОЗЛ» (GOLD, 2022). Хворі, які брали участь у дослідженні, мали здебільшого ХОЗЛ середнього і важкого ступенів (згідно з GOLD та наказом МОЗ України від 12.03.2007 № 128). Для стенокардії напруження визначили I–IV функціональні класи за класифікацією Канадської асоціації кардіологів.

Функцію зовнішнього дихання оцінювали за стандартною методикою на спірографічному апараті «СПІРОКОМ» з використанням програмного забезпечення відповідно до рекомендацій Американської торакальної та Європейської респіраторної спільнот. Визначали об'єм форсованого видиху за першу секунду (ОФВ<sub>1</sub>), форсовану життєву ємність легень (ФЖЄЛ, %), величину співвідношення об'єму форсованого видиху за першу секунду до форсованої життєвої ємності легень (ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЄЛ), хвилинний об'єм дихання, життєву ємність легень, максимальну об'ємну швидкість (МОШ 25 %, 50 %, 75 %). Зворотність бронхіальної обструкції обраховували стандартним методом до і після 10 хвилин після вдиху сальбутамолу.

Усі хворі отримували традиційну терапію з персоналізованим визначенням препаратів.

Варіабельність серцевого ритму (BCP) визначали під час 5-хвилинної реєстрації ЕКГ відповідно до вимог

стандарту «Варіабельність серцевого ритму. Стандарти вимірювання, фізіологічна інтерпретація і клінічне застосування», що опублікований групою експертів Європейської асоціації кардіології та Північноамериканської асоціації ритмології та електрофізіології. Проаналізували спектральні показники BCP. У спектрі розрізняли такі компоненти: HF (High Frequency) – високочастотний (0,150–0,400 Гц), що здебільшого показує активність парасимпатичного відділу ВНС; LF (Low Frequency) – низькочастотний (0,040–0,150 Гц), що характеризує симпатичний тонус; VLF (Very Low Frequency) – наднизькочастотний (0,003–0,040 Гц), що відбиває ступінь активації вищих вегетативних центрів або ерготропних систем, відповідальних за адаптацію, та характеризує психогенний та енергометаболічний компоненти регуляції серцевого ритму. Крім амплітуди компонентів, визначали TP (Total Power) – загальну потужність спектра, що характеризує сумарну активність вегетативних впливів на серцевий ритм і симпатовагусний індекс, LF/HF – відношення потужності низьких частот до потужності високих, значення якого свідчило про баланс симпатичних і парасимпатичних впливів. Показники вимірювали у мс<sup>2</sup> і нормалізованих одиницях. Оцінювали також потужність високочастотних, низькочастотних, наднизькочастотних коливань серцевого ритму у % до сумарної потужності (HF %, LF %, VLF %).

Усім хворим виконали тест із 6-хвилинною ходьбою, мета якого – оцінювання толерантності до фізичних навантажень, стратифікація ризику, визначення ФК стабільної ІХС. Тест із 6-хвилинною ходьбою виконали вранці, не раніше ніж через 4 години після сніданку, рекомендували обмежити фізичні навантаження та не курити впродовж 2 годин до початку тесту, вдягнути зручний одяг і взуття. Артеріальний тиск (АТ), частоту серцевих скорочень (ЧСС), SpO<sub>2</sub> вимірювали до початку та після ходіння, на другій і десятій хвилині. Після тесту заповнювали протокол тесту 6-хвилинної ходьби, пацієнт визначав індивідуальне сприйняття навантаження за шкалою Борга (від 0 до 10 балів).

Концентрацію ММП-9 і ТІМР у сироватці крові визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу, використовуючи реактиви фірми Bender MedSystems (Австрія) на імуноферментному аналізаторі DigiScan SA400. Оптичну щільність зразків вимірювали за допомогою багатофункціонального фотометра для мікропланшета SynergyMX (BioTek, США). Вміст ММП-9 виражали в нг/мл. Дослідження здійснили на кафедрі клінічної лабораторної діагностики Запорізького державного медико-фармацевтичного університету.

Аналіз нормальності розподілу оцінювали за критерієм Shapiro–Wilk (W). Результати дослідження наведено як середнє арифметичне  $\pm$  стандартна помилка репрезентативності середнього значення. Порівняння груп за якісною ознакою, а також під час дослідження частоти виявлення показників здійснили за допомогою критерію  $\chi^2$  з аналізом таблиць спряженості. Ступінь взаємозв'язку між парами незалежних ознак, що наведені за кількісними шкалами, оцінювали за допомогою коефіцієнта рангової кореляції Пірсона (r).

Результати дослідження опрацювали, застосували програми SPSS 16, Microsoft Excel 2015 та ліцензовану Statistica® for Windows 13.0 (StatSoft Inc., № JPZ804I382130ARCN10-J). Для всіх видів аналізу статистично достовірними вважали відмінності при  $p < 0,05$ .

## Результати

У результаті обстеження визначили рівні експресії ММП-9 і ТІМП, що наведені в таблиці 1.

Аналіз рівня експресії протеаз та її інгібітора свідчить, що пацієнти з коморбідною патологією ІХС на тлі ХОЗЛ мали в 8,11 раза вищу активність ММП-9 ( $p < 0,05$ ) щодо параметрів практично здорових осіб. Так, рівень ММП-9 у пацієнтів із ІХС на тлі ХОЗЛ становив  $7,22 \pm 0,68$  нг/мл, у контрольній групі цей показник становив  $0,89 \pm 0,18$  нг/мл. У пацієнтів із поєднаною кардіально-респіраторною патологією встановили значно нижчу активність тканинних інгібіторів ММП – ТІМП, незважаючи на істотне збільшення експресії протеаз. Показники активності ТІМП у пацієнтів із ІХС на тлі ХОЗЛ становили  $1,46 \pm 0,03$  мкг/мл; це статистично достовірно менше (на 53,21 %,  $p < 0,05$ ) порівняно зі здоровими особами ( $3,12 \pm 0,01$  мкг/мл).

Аналіз співвідношення ММП-9/ТІМП в основній групі та груп контролю виявив аналогічну динаміку зрушень: домінування експресії ММП-9 при дефіциті активності ТІМП в умовах патології ІХС на тлі ХОЗЛ. Це співвідношення в пацієнтів із ІХС на тлі ХОЗЛ становить  $4,94 \pm 0,45$  ум. од., у практично здорових осіб ММП/ТІМП визначено на рівні  $0,29 \pm 0,06$  ум. од.; різниця статистично достовірна, в 17,03 раза менше ( $p < 0,05$ ).

Отже, дані, що одержали, вказують на порушення ферментативної активності позаклітинного матриксу при ІХС на тлі ХОЗЛ порівняно з практично здоровими особами. Визначили підвищення рівня експресії матриксних металопротеїназ і знижену активність тканинного інгібітора металопротеїназ.

Встановили достовірні кореляційні зв'язки між рівнем ММП-9 і показником ОФВ1 ( $r = -0,67$ ,  $p < 0,05$ ), параметром LF/HF ( $r = -0,74$ ,  $p < 0,05$ ). Це дало підстави для висновку, що при елевації рівня експресії ММП-9 відбувається виразніше порушення функції зовнішнього дихання та зсув симпато-парасимпатичного балансу в напрямі симпатичної активації, зменшення вагусного тону в модуляції серцевого ритму.

Аналіз частоти виявлення показав: в пацієнтів з ІХС на тлі ХОЗЛ у верхньому квартилі ММП-9 вірогідно частіше реєстрували прогностично негативні параметри функції зовнішнього дихання – ізольоване зниження індексу Тифно ( $\chi^2 = 5,2$ ,  $p = 0,03$ ), а також виразність задишки  $\geq 6$  балів за шкалою Борга під час оцінювання переносності фізичних навантажень (тест із 6-хвилинною ходьбою,  $\chi^2 = 7,3$ ,  $p = 0,02$ ). Це свідчить про патогенетичну асоціацію порушень ензиматичної активності, як-от підвищення рівня експресії ММП-9 із негативними прогностичними предикторами ІХС / ХОЗЛ (порушення вентиляційних процесів, симпато-вагального балансу та низькою толерантністю до фізичних навантажень).

Таблиця 1. Рівень експресії ММП-9 та ТІМП в обстежених

Показник, одиниці вимірювання	Пацієнти із ІХС на тлі ХОЗЛ, М $\pm$ m	Практично здорові особи, М $\pm$ m	Величина відмінностей
ММП-9, нг/мл	$7,22 \pm 0,68$	$0,89 \pm 0,18$	8,11 раза*
ТІМП, мкг/мл	$1,46 \pm 0,03$	$3,12 \pm 0,01$	-53,21 %*
ММП-9/ТІМП, ум. од.	$4,94 \pm 0,45$	$0,29 \pm 0,06$	17,03 раза*

\*:  $p < 0,05$  порівняно з групою практично здорових осіб.

Отже, у хворих на ІХС і ХОЗЛ виявили виражений протеолітичний дисбаланс і порушення фібротичних процесів порівняно з практично здоровими особами.

## Обговорення

Відомо, що ХОЗЛ пов'язане з аномальною запальною реакцією легенів на шкідливі частки або гази з наступним інтенсивним ремоделюванням стінки дихальних шляхів. У мокротинні визначають підвищені рівні IL-1beta, IL-6, IL-8, фактора некрозу пухлини- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), GRO-альфа та MCP-1, під час загострень спостерігають підвищення надалі. Бронхіолярний епітелій надмірно експресує MCP-1, MIP-1alpha та IL-8. Саме IL-8 може пояснити хемотаксичну активність нейтрофілів мокротиння. TNF- $\alpha$  та IL-1beta стимулюють макрофаги виробляти ММП-9, а бронхіальні епітеліальні клітини – виробляти позаклітинні матричні глікопротеїни [14]. Підвищена експресія бета-трансформувального фактора росту (TGFbeta) і епідермального фактора росту (EGF) відбувається в епітелії та підслизових клітинах. Дослідження генного масиву показали надлишок TGFbeta1, CTGF і PDGFRA при ХОЗЛ. TGFbeta і EGF активують проліферацію фібробластів, а активація рецептора EGF спричиняє експресію гена муцину. Отже, продовження вивчення потребує антицитокінова терапія у формі розчинних рецепторів або нейтралізуючих антитіл, невеликих сполук, що блокують рецептори цитокінів, або неповних і неактивуючих цитокінів, інгібіторів активації білка й інгібіторів сигнальної трансдукції та транскрипції, наприклад, через інгібування мітоген-активованого білка кінази (МАРК) і фактора транскрипції, ядерного фактора карпаВ [15].

ММП сімейство має щонайменше 20 протеолітичних ферментів, що відіграють важливу роль у ремоделюванні тканин. Вважають, що ММП-1 (інтерстиціальна колагеназа), ММП-9 (желатиназа В) і ММП-12 (макрофагальна еластаза) мають важливе значення під час виникнення емфіземи. Дослідники виявили низку природних поліморфізмів промоторів генів ММП людини, що змінюють транскрипційну активність. Останні дані показали: поліморфізм генів ММП-1 і ММП-12, але не ММП-9, є або причинними факторами пов'язаного з курінням ушкодження легенів, або перебувають у нерівноважному зв'язку з причинним поліморфізмом [16].

Крім нашого дослідження, повідомляли про дисбаланс між ММП та їхніми тканинними інгібіторами, як-от ММП-9. Це корелювало із курінням сигарет та обструкцією повітряного потоку в пацієнтів із ХОЗЛ, що показано в роботах інших авторів. Так, встановили концентрації ММП-9 і його інгібітора ТІМП-1 за допомогою імуноферментного аналізу [17]. Кореля-

ційний аналіз показав, що і концентрація ММП-9, і молярне співвідношення ММП-9 до ТІМП-1 (ММП-9/ТІМП-1) корелювали з кількістю викурених сигарет. Ба більше, концентрації ММП-9 обернено пропорційні ОФВ1. У цьому дослідженні доведено, що експресія ММП-9 у паренхімі легень людини пов'язана з курінням сигарет, а також з обструкцією повітряного потоку. Отже, ММП-9 може відігравати певну роль у патогенезі обструкції повітряного потоку, спричиненої сигаретним димом в умовах ХОЗЛ. Ці дані збігаються з результатами, що отримали у нашому дослідженні.

Yan Zhang et al. (2013) здійснили дослідження на тваринній моделі ХОЗЛ, яке формували шляхом внутрішньоочеревинної ін'єкції екстракту сигаретного диму (CSE) у мишей BALB/C. Мишам вводили PBS/CSE і виводили з експерименту на 28 день. Внутрішньоочеревинна ін'єкція CSE спричиняла в мишей деструкцію легеневої паренхіми, зниження легеневої функції, кількості лейкоцитів, пошкодження серцевих і периферичних м'язів, а також посилення легеневої паренхіми АІ, елевачію білка каспази-3, експресію mPINK ММП-2 і ММП-9, зростання рівнів ММП-2 і ММП-9 у легеневій тканині та пригнічення антиоксидантної активності. Це дослідження на тваринній моделі та інші публікації стали підґрунтям для вивчення взаємозв'язку між ММП-9 і патогенезом ХОЗЛ у нашій роботі [18].

Вивчали зв'язок тяжкого перебігу бронхіальної астми з підвищенням рівня ММП-9 у дихальних шляхах порівняно з легким перебігом астми, а також оцінювали вплив алергенів і лікування стероїдами на рівні ММП-9 і ТІМП-1 у мокротинні, що одержали від пацієнтів із бронхіальною астмою різних ступенів тяжкості. У 18 хворих із легкою формою, 10 осіб із тяжкою формою астми, а також у 10 некурців з атопією досліджували мокротиння. Алергенну провокацію здійснили 14 пацієнтам із легкою астмою. Бронхо-альвеолярний лаваж зібрано в 16 хворих із легкою астмою до та після 4-тижневого лікування інгаляційним будесонідом, 800 мкг двічі на добу або плацебо. В пацієнтів із тяжкою астмою встановили підвищені рівні й активність ММП-9 у мокротинні порівняно з хворими на легку астму та практично здоровими особами. Провокація алергеном збільшила співвідношення ММП-9/ТІМП-1 та активність ММП-9. Інгаляційний будесонід не впливав на ММП-9 або ТІМП-1 у пацієнтів із легкою астмою. Отже, як і в нашому дослідженні, результати, що автори одержали, свідчать: ММП-9 може відігравати важливу роль у хронічному запаленні дихальних шляхів і ремодельованні в умовах бронхообструкції, оскільки концентрації підвищуються при важкій, персистентній астмі та після провокації алергеном. Інгаляційні стероїди, імовірно, не впливають на ММП-9 і ТІМП у пацієнтів із легкою астмою, тому необхідні додаткові дослідження у хворих із тяжким перебігом астми [19].

Група авторів досліджувала ММП і тканинні інгібітори металопротеїнази, котрі беруть участь у ремодельованні судин і правого шлуночка при легеневій гіпертензії (ЛГ). ММП-2, ММП-9, ТІМП-1 і ТІМП-4 вимірювали в плазмі та оцінювали їхній потенціал як біомаркерів для ЛГ. У це дослідження залучили пацієнтів, яким здійснили катетеризацію правих відділів серця, з припущенням про наявність ЛГ (пацієнти з

mPAP  $\geq 25$  мм рт. ст. визначені як такі, що мають ЛГ; показники хворих із mPAP  $< 25$  мм рт. ст. встановили як контрольні). Загалом залучили 160 пацієнтів із ЛГ (діопатична легенева артеріальна гіпертензія, легенева артеріальна гіпертензія, пов'язана з захворюванням сполучної тканини, хронічна тромбоемболічна ЛГ та легенева венозна гіпертензія), у дослідженні взяли участь також 44 особи без ЛГ (контроль). Плазму крові після діагностики ЛГ аналізували на рівні ММП-2, ММП-9, ТІМП-1 і ТІМП-4 за допомогою імуноферментного аналізу. У пацієнтів із ЛГ рівні ММП-2, ММП-9, ТІМП-1 і ТІМП-4 корелювали з параметрами гемодинаміки ( $p < 0,05$ ) і дистанцією, що пройдена під час тесту шестихвилинної ходьби ( $p < 0,01$ ). Пацієнти з високим рівнем ММП і ТІМП-1 у плазмі мали значно гіршу 5-річну виживаність, порівняно з хворими з низьким рівнем у плазмі (багатофакторне співвідношення ризику смертності – 2,69 і 4,46 відповідно,  $p < 0,01$ ). Автори встановили, що підвищені рівні названих біомаркерів у плазмі крові не мають діагностичного значення, проте тісно пов'язані з підвищеним ризиком у пацієнтів із ЛГ [20].

У низці джерел фахової літератури показано зміни позаклітинного матриксу в пацієнтів із постійною формою фібриляції передсердь (ФП) порівняно з хворими з синусовим ритмом (СР). Інтраопераційні біопсії вушок правого передсердя (RAA) і вільних стінок (RFW) від 24 пацієнтів з ФП, яким здійснили процедуру мінілабіринту, і від 24 хворих із СР дослідили за допомогою якісного та кількісного імунофлуоресцентного аналізу та Вестерн-блот. Порівняно з хворими із СР, у всіх пацієнтів із ФП виявили дисрегуляцію синтезу / деградації колагену I та III типів. Тканинні інгібітори металопротеїнази (ТІМП-2) значно підвищені лише в RAA при ФП. Порівняно з пацієнтами з СР, колаген VI, матричні металопротеїнази ММП-2, ММП-9 і ТІМП-1 істотно підвищені, а ТІМП-3 і ТІМП-4 залишалися незмінними в усіх групах хворих із ФП. Збагачений цистеїном білок із Kazal (RECK), що індукує реверсію, нещодавно відкритий інгібітор ММП, підвищений у RFW порівняно з RAA при ФП ( $p < 0,05$ ), RFW – при СР ( $p < 0,05$ ). Рівень трансформувального фактора росту TGF-beta1 вищий у разі ФП, ніж СР [21].

У трансгенних мишей (Tg) зі специфічною для серця гіперекспресією фактора некрозу пухлини- $\alpha$  виникає пов'язана зі статтю серцева дилатація, що прогресує, та серцева недостатність. У дослідженнях ехокардіографічні вимірювання здійснили для класифікації тяжкості СН у самців (M) і самок (F) Tg і дикого типу (WT) мишей віком від 4 до 50 тижнів. Серцеві ТІМП-1, ТІМП-2 і ММП-3 (імуноферментний аналіз) і потенційну (ARMA-активовану) активність ММП-9 визначали в однаковому віці. Зимографія *in situ* оцінювала активність тканинної желатинази. Систолічна функція, розміри шлуночків і наявність плевральних випотів показали тяжку СН у молодших мишей M Tg (до 18 тижнів) і старших F Tg ( $> 34$  тижні). Незалежно від віку, статі чи тяжкості серцевої недостатності миші Tg експресували значно більше ТІМП-1 і потенційну активність ММП-9. M Tg експресували підвищений рівень ММП-3, який збільшувався з віком і тяжкістю СН. F Tg не показали збільшення ММП-3 через 4



тижні, але встановили прогресивне збільшення з віком і тяжкістю СН [22].

Вивчали також вплив триметазидину на окиснювальний стрес, експресію ММП-2 і ММП-9 в умовах розриву серця в мишей з інфарктом міокарда. Мишачі моделі ІМ відтворено шляхом перев'язки лівої коронарної артерії в самців мишей C57BL/6. За тваринами, що залучені в групу випадків розриву, ретельно спостерігали протягом 7 днів. Після виявлення мертвих мишей здійснили розтин для встановлення причини смерті. За допомогою ехокардіографії досліджували роботу серця. Маркери окисного стресу та ММП аналізували Вестерн-блоттингом. Встановили, що триметазидин знижує частоту розриву серця після ІМ у мишей. Експресія ММП-2 і ММП-9 у групі, що отримувала триметазидин, значно нижча, ніж у групі, де миші одержували фізіологічний розчин. Препарат також послабив окиснювальний стрес, спричинений ІМ, оскільки триметазидин помітно знижує індуковану  $H_2O_2$  експресію ММП-2 і ММП-9 [23].

Аналіз фахової літератури, де наведено результати досліджень на тваринних моделях і в клінічних умовах, свідчить про достатню кількість робіт із вивчення експресії матриксних металопротеїназ, активності їхнього тканинного інгібітора в умовах або лише легеневої, або лише кардіальної патології, а також незначну кількість робіт, де оцінювали клінічне значення та можливі прогностичні аспекти дисбалансу системи протеази-антипротеази на тлі коморбідного стану ІХС і ХОЗЛ. Це обґрунтовує актуальність і своєчасність нашого дослідження.

Наступні дослідження з цієї теми та нові статистичні дані дадуть змогу обґрунтувати патогенетичну асоціацію порушень ензиматичної активності, а саме підвищення рівня експресії ММП-9 із негативними прогностичними предикторами ІХС / ХОЗЛ (порушення вентиляційних процесів, симпто-вагального балансу та низькою толерантністю до фізичних навантажень). Зазначимо також, що дослідження динаміки співвідношення ММП-9/ТІМР, за даними фахової літератури, свідчить не лише про необхідність моніторингу фібротичних процесів протеолітичного дисбалансу, але й про можливість їх використання як прогностичного предиктора при ІХС на тлі ХОЗЛ.

## Висновки

1. У хворих на ІХС у поєднанні із ХОЗЛ встановили порушення ферментативної активності позаклітинного матриксу, що характеризується статистично значущим зростанням рівня експресії матриксних металопротеїназ і зниженою активністю їхнього тканинного інгібітора порівняно з практично здоровими особами.

2. Аналіз рівня експресії протеаз і їхнього інгібітора свідчить, що пацієнти із коморбідною патологією ІХС на тлі ХОЗЛ мали у 8,11 раза більшу активність ММП-9 ( $p < 0,05$ ) щодо показника практично здорових осіб. Параметри активності ТІМР у пацієнтів із ІХС на тлі ХОЗЛ дорівнювали  $1,46 \pm 0,03$  мкг/мл; це статистично достовірно менше (на 53,21 %,  $p < 0,05$ ) щодо показника здорових осіб ( $3,12 \pm 0,01$  мкг/мл).

3. Достовірні кореляційні зв'язки між рівнем ММП-9 і показником ОФВ1 ( $r = -0,67$ ,  $p < 0,05$ ), параметром LF/HF ( $r = -0,74$ ,  $p < 0,05$ ) свідчать, що при елевації рівня експресії ММП-9 відбувається виразніше порушення функції зовнішнього дихання та зсув симпто-парасимпатичного балансу в напрямі симпатичної активації і зменшення вагусного тону в модуляції серцевого ритму.

4. Аналіз частоти виявлення показав: в осіб у верхньому квартилі ММП-9 достовірно частіше реєстрували прогностично негативні параметри функції зовнішнього дихання – ізольоване зниження індексу Тифно ( $\chi^2 = 5,2$ ,  $p = 0,03$ ), а також виразність задишки  $\geq 6$  балів за шкалою Борга під час оцінювання переносності фізичних навантажень (тест із 6-хвилинною ходьбою,  $\chi^2 = 7,3$ ,  $p = 0,02$ ).

**Перспективи подальших досліджень** полягають в оцінюванні динаміки рівня ММП-9 на тлі різних схем лікування пацієнтів з ІХС у коморбідності з ХОЗЛ.

## Фінансування

Дослідження виконане в рамках НДР Запорізького державного медико-фармацевтичного університету: «Патогенетичні механізми взаємообтяження коморбідного перебігу деяких захворювань внутрішніх органів: клінічні, діагностичні, прогностичні аспекти та можливості оптимізації лікування», № держреєстрації 0121U112262 (2021–2025).

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of interest:** author has no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 03.05.2023

Після доопрацювання / Revised: 21.06.2023

Схвалено до друку / Accepted: 29.06.2023

## Відомості про автора:

Крайдашенко О. О., аспірант каф. внутрішніх хвороб 3, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-8911-3292

## Information about author:

Kraidashenko O. O., MD, Postgraduate student of the Department of Internal Diseases 3, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

## References

1. Wise, R. A., Anderson, J. A., Amarenco, P., Cowans, N. J., Crim, C., Denvir, M. A., Gomez, C. R., Jones, M. P., Morris, A., Niewoehner, D., & Yates, J. C. (2020). Adjudication of cardiovascular events in patients with chronic obstructive pulmonary disease: SUMMIT trial. *Clinical trials*, 17(4), 430-436. <https://doi.org/10.1177/1740774520920897>
2. Güder, G., & Störk, S. (2019). COPD and heart failure: differential diagnosis and comorbidity. *COPD und Herzinsuffizienz: Differenzialdiagnose und Komorbidität. Herz*, 44(6), 502-508. <https://doi.org/10.1007/s00059-019-4814-7>
3. Asanov, E. O. (2018). Yakist zhyttia khvorykh pokhyloho viku z KhOZL [Quality of life of elderly patients with COPD]. *Medicni perspektivi*, 23, (2Part1), 76. [in Ukrainian].
4. Gashynova, K. Yu. (2018). Khronichne obstruktyvne zakhvoriuvannya lehen (KhOZL): vplyv kliniko-anamnestychnykh, antropometrychnykh ta funktsionalnykh kharakterystyk na riven a-1-antytirpsynu (AAT) v syrovatitsi krovii stabilnykh khvorykh [Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): influence of clinical and anamnestic, anthropometric and functional characteristics on the level of  $\alpha$ -1-antitrypsin (AAT) in blood serum of stable patients]. *Medicni perspektivi*, 23(3Part1), 52-60. [in Ukrainian]. [https://doi.org/10.26641/2307-0404.2018.3\(part1\).142334](https://doi.org/10.26641/2307-0404.2018.3(part1).142334)

5. Nandi, S. S., Katsurada, K., Sharma, N. M., Anderson, D. R., Mahata, S. K., & Patel, K. P. (2020). MMP9 inhibition increases autophagic flux in chronic heart failure. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 319(6), H1414-H1437. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00032.2020>
6. Yadav, S. K., Kambis, T. N., Kar, S., Park, S. Y., & Mishra, P. K. (2020). MMP9 mediates acute hyperglycemia-induced human cardiac stem cell death by upregulating apoptosis and pyroptosis in vitro. *Cell death & disease*, 11(3), 186. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2367-6>
7. Liu, N., Wang, X., Wu, H., Lv, X., Xie, H., Guo, Z., Wang, J., Dou, G., Zhang, C., & Sun, M. (2021). Computational study of effective matrix metalloproteinase 9 (MMP9) targeting natural inhibitors. *Aging*, 13(19), 22867-22882. <https://doi.org/10.18632/aging.203581>
8. Zheng, Y. F., Zhu, H. Y., Wang, W., Hu, J. J., Bao, T. P., & Tian, Z. F. (2021). Role of the LRP1-pPyk2-MMP9 pathway in hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. *Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics*, 23(12), 1289-1294. <https://doi.org/10.7499/j.issn.1008-8830.2108125>
9. Wang, C., Li, Q., Yang, H., Gao, C., Du, Q., Zhang, C., Zhu, L., & Li, Q. (2020). MMP9, CXCR1, TLR6, and MPO participant in the progression of coronary artery disease. *Journal of cellular physiology*, 235(11), 8283-8292. <https://doi.org/10.1002/jcp.29485>
10. Yosef, G., Hayun, H., & Papo, N. (2021). Simultaneous targeting of CD44 and MMP9 catalytic and hemopexin domains as a therapeutic strategy. *The Biochemical journal*, 478(5), 1139-1157. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200628>
11. Nishikai-Yan Shen, T., Kado, M., Hagiwara, H., Fujimura, S., Mizuno, H., & Tanaka, R. (2021). MMP9 secreted from mononuclear cell quality and quantity culture mediates STAT3 phosphorylation and fibroblast migration in wounds. *Regenerative therapy*, 18, 464-471. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.10.003>
12. Li, T., Li, X., Liu, X., Yang, J., & Ma, C. (2021). The elevated expression of TLR4 and MMP9 in human abdominal aortic aneurysm tissues and its implication. *BMC cardiovascular disorders*, 21(1), 378. <https://doi.org/10.1186/s12872-021-02193-1>
13. Luo, X., Wu, J., & Wu, G. (2021). PPAR $\gamma$  activation suppresses the expression of MMP9 by downregulating NF- $\kappa$ B post intracerebral hemorrhage. *Neuroscience letters*, 752, 135770. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135770>
14. Fang, X., Chen, J., Wang, W., Feng, G., Li, X., Zhang, X., Zhang, Y., Zhang, J., Xu, Z., Tai, J., & Ni, X. (2020). Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) level and MMP9 -1562C>T in patients with obstructive sleep apnea: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Sleep medicine*, 67, 110-119. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2019.11.1247>
15. Wu, L., Wang, X., He, X., Li, Q., Hua, Q., Liu, R., & Qiu, Z. (2022). MMP9 Expression Correlates With Cisplatin Resistance in Small Cell Lung Cancer Patients. *Frontiers in pharmacology*, 13, 868203. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.868203>
16. Liang, X., He, W., Zhang, H., Luo, D., Zhang, Z., Liu, A., Wang, J., & Huang, H. (2021). Inflammatory Cells Accelerated Carotid Artery Calcification via MMP9: Evidences From Single-Cell Analysis. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 8, 766613. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.766613>
17. Li, Y., Lu, X., Li, W., Shi, Z., Du, W., Xu, H., Liu, Z., & Wu, Y. (2022). The circRERE/miR-144-3p/TLR2/MMP9 signaling axis in COPD pulmonary monocytes promotes the EMT of pulmonary epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 625, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.07.119>
18. Wells, J. M., Parker, M. M., Oster, R. A., Bowler, R. P., Dransfield, M. T., Bhatt, S. P., Cho, M. H., Kim, V., Curtis, J. L., Martinez, F. J., Paine, R., 3rd, O'Neal, W., Labaki, W. W., Kaner, R. J., Barjaktarevic, I., Han, M. K., Silverman, E. K., Crapo, J. D., Barr, R. G., Woodruff, P., ... SPIROMICS and COPD Gene Investigators (2018). Elevated circulating MMP-9 is linked to increased COPD exacerbation risk in SPIROMICS and COPD Gene. *JCI insight*, 3(22), e123614. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.123614>
19. Li, H., Shi, K., Zhao, Y., Du, J., Hu, D., & Liu, Z. (2020). TIMP-1 and MMP-9 expressions in COPD patients complicated with spontaneous pneumothorax and their correlations with treatment outcomes. *Pakistan journal of medical sciences*, 36(2), 192-197. <https://doi.org/10.12669/pjms.36.2.1244>
20. Tiede, S. L., Wassenberg, M., Christ, K., Schermuly, R. T., Seeger, W., Grimminger, F., Ghofrani, H. A., & Gall, H. (2016). Biomarkers of tissue remodeling predict survival in patients with pulmonary hypertension. *International journal of cardiology*, 223, 821-826. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.08.240>
21. Suzan, V., Yavuzer, H., Bag Soytas, R., Bektan Kanat, B., Arman, P., Emiroglu Gedik, T., Unal, D., Atar, O., Bolayirli, I. M., & Doven-tas, A. (2021). The relationship between primary sarcopenia and SARC-F, serum MMP9, TIMP1 levels, and MMP9/TIMP1 ratio in the geriatric patients. *European geriatric medicine*, 12(6), 1229-1235. <https://doi.org/10.1007/s41999-021-00519-y>
22. Lin, Y., Huang, H., Yu, Y., Zhu, F., Xiao, W., Yang, Z., Shao, L., & Shen, Z. (2021). Long non-coding RNA *RP11-465L10.10* promotes vascular smooth muscle cells phenotype switching and MMP9 expression via the NF- $\kappa$ B pathway. *Annals of translational medicine*, 9(24), 1776. <https://doi.org/10.21037/atm-21-6402>
23. Gong, W., Ma, Y., Li, A., Shi, H., & Nie, S. (2018). Trimetazidine suppresses oxidative stress, inhibits MMP-2 and MMP-9 expression, and prevents cardiac rupture in mice with myocardial infarction. *Cardiovascular therapeutics*, 36(5), e12460. <https://doi.org/10.1111/1755-5922.12460>

## Експериментально-морфологічне обґрунтування профілактики ранових ускладнень при фіксації сітчастого імплантата клеєм до тканин черевної стінки

Я. П. Фелештинський<sup>А,В,С,Е,Ф</sup>, К. Д. Деркач<sup>А,В,С,Д</sup>, О. О. Дядик<sup>В,С</sup>, М. В. Онишко<sup>В</sup>, К. М. Шатрова<sup>В,С</sup>

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

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

**Мета роботи** – обґрунтувати профілактику ранових ускладнень при фіксації сітки клеєм із сітчастого поліуретану (СП) до тканин черевної стінки в експериментальних тварин.

**Матеріали та методи.** Експериментальне дослідження здійснили на 60 самцях лабораторних щурів, яких поділили на 3 групи. У I групі (n = 21) сітчастий імплантат і краї рани фіксували клеєм із СП з антисептиком; у II (n = 24) – лігатурами; у III (n = 15) – розріз м'язів і рану зашивали лігатурами. За тваринами спостерігали 30 діб, оцінювали загоєння рани, наявність ускладнень. Морфологічне дослідження виконали на 7 і 30 добу. Оцінювали ознаки проростання сітки сполучною тканиною та наявність запалення тканин навколо сітки.

**Результати.** У I групі частота виникнення ускладнень і терміни загоєння рани були меншими порівняно з II та III групами. Серома виявлена в 1 (5,3 %) тварини з I групи, у 7 (33,3 %) із II групи, у 3 (23,1 %) щурів із III групи; інфікування рани зафіксували в 1 (5,3 %) тварини з I групи, у 4 (19,1 %) із II групи, у 2 (15,4 %) щурів із III групи. Термін загоєння рани у I групі становив 7 (6; 8) днів, у II – 13 (12; 14), у III – 11 (10; 12) днів (p < 0,05). Результати спостереження підтверджені морфологічно. Так, у I групі виявлено швидший процес проростання сітки колагеновими волокнами та загоєння рани, що визначили за переважанням волокнистого компонента над клітинним у динаміці (p < 0,05) та формуванням сполучнотканинної капсули навколо СП із проростанням колагенових волокон вглиб капсули.

**Висновки.** Використання клею на основі сітчастого поліуретану з антисептиком для фіксації сітчастого імплантата до тканин черевної стінки у лабораторних тварин підтверджує його вищу ефективність порівняно з традиційною фіксацією лігатурами. Це спричинено збільшенням відносної площі волокнистого компонента та зменшенням клітинного компонента сполучної тканини в динаміці, меншою вираженістю гемодинамічних порушень на ділянках фіксації сітки та проростанням колагенових волокон вглиб капсули, а також зменшенням частоти виникнення сероми та тривалості загоєння рани. Наведені факти обґрунтовують використання клею на основі сітчастого поліуретану з антисептиком у клінічній практиці для профілактики ранових ускладнень під час аллогерніопластики.

### Ключові слова:

грижа живота, герніопластика, сітчастий імплантат, клей, сітчастий поліуретан, серома, інфікування рани.

### Патологія. 2023.

T. 20, № 2(58).  
С. 189-194

### \*E-mail:

christinagerasum@  
ukr.net

## Experimental and morphological justification of the prevention of wound complications during fixation of the mesh to the abdominal wall tissues with composite

Ya. P. Feleshtynskiy, K. D. Derkach, O. O. Diadyk, M. V. Onyshko, K. M. Shatrova

**The aim** of the study is to justify the prevention of wound complications during fixation of the mesh to abdominal wall tissues with cross-linked polyurethane (CP) composite in experimental animals.

**Materials and methods.** An experimental study was conducted on 60 male laboratory rats, which were divided into 3 groups. In group I (n = 21), the mesh and wound edges were fixed with CP composite with an antiseptic, in group II (n = 24) – with ligatures, in group III (n = 15) muscle incision was performed and the wound was sutured with ligatures. The animals were observed for 30 days, wound healing and the presence of complications were evaluated. Morphological examination was performed on days 7 and 30. Signs of mesh germination by connective tissue and presence of tissue inflammation around the mesh were evaluated.

**Results.** The observation results showed that in group I, the incidence of complications and the duration of wound healing were lower comparing to groups II and III. In group I, seroma was detected in 1 (5.3 %) animal, in group II – in 7 (33.3 %), in group III – in 3 (23.1 %), infection of the wound in 1 (5.3 %) animal of group I, in 4 (19.1 %) of group II and in 2 (15.4 %) of group III. The term of wound healing in group I was 7 (6; 8) days, in group II – 13 (12; 14), in group III – 11 (10; 12) days (p < 0.05). The results of observation were confirmed morphologically, namely, in animals of group I, faster process of mesh germination with collagen fibers and wound healing were revealed, which was confirmed by the predominance of a fibrous component over the cellular one (p < 0.05), and the formation of a connective tissue capsule around the CP with the germination of collagen fibers deep into the capsule.

**Conclusions.** The use of the cross-linked polyurethane composite with an antiseptic to fix the mesh implant to abdominal wall tissues in laboratory animals confirms its higher efficiency compared to traditional ligature fixation, by increasing the fibrous component of connective tissue and reducing the cellular component and hemodynamic disorders in dynamics, by the germination of collagen fibers deep into the capsule in the areas of mesh fixation, reduced occurrence of seroma and duration of wound healing, which justifies its use in clinical practice for prevention of wound complications in allogernioplasty.

### Key words:

abdominal hernia, hernioplasty, mesh, cross-linked polyurethane composite, seroma, wound infection.

### Pathologia. 2023.

20(2), 189-194



Хірургічне лікування гриж живота з використанням сітчастого імплантата є методом вибору, але значущою проблемою залишаються ранові післяопераційні ускладнення (серома, інфікування рани та нориці передньої черевної стінки), що виникають на ділянці фіксації сітки [1,2].

Серома здебільшого виникає після алопластики гриж живота великих і гігантських розмірів, за даними авторів, її виявляють у 9,3–57,0 % пацієнтів [3,4]. Ризик виникнення сероми зростає при формуванні «мертвих» просторів між сіткою, апоневрозом і підшкірно-жировою клітковиною [4,5]. Лікування цього ускладнення передбачає повторні аспірації ексудату під ультразвуковим контролем. Тривала серома може інфікуватись у 2,5–10,3 % випадків [6,7,8]. Інфікування сероми призводить до інфікування післяопераційної рани, подовжуючи термін перебування хворого в стаціонарі. При залученні в процес сітчастого імплантата необхідна повторна операція з його експлантацією та виникненням рецидиву грижі [9,10,11].

Оскільки дном інфікованої рани чи нориці передньої черевної стінки є лігатура або ділянка сітки, що не проросла сполучною тканиною в місці її фіксації лігатурами, необхідно оцінити роль лігатури у патогенезі місцевих післяопераційних ускладнень для пошуку ефективних методів профілактики [12].

На нашу думку, застосування клею на основі сітчастого поліуретану (СП) з антисептиком для фіксації сітки та з'єднання країв підшкірної рани без лігатур знизить ризик виникнення ранових ускладнень після алопластики гриж живота.

### Мета роботи

Обґрунтувати профілактику ранових ускладнень при фіксації поліпропіленової сітки клеєм із сітчастого поліуретану до тканин черевної стінки в експериментальних тварин.

### Матеріали і методи дослідження

Здійснили експериментально-морфологічне дослідження на 60 статевозрілих самцях лабораторних щурів лінії Wistar. Дотримувалися принципів Європейської конвенції з захисту тварин (1986 р.) і закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» [13,14].

Усім тваринам операції виконали під загальною анестезією (тіопентал натрію 0,2 мг/кг в/м). Залежно від вжитих профілактичних заходів щодо ранових ускладнень лабораторних щурів поділили на 3 групи. У тварин I групи (n = 21) під час хірургічного втручання шляхом середньої лапаротомії поліпропіленовий сітчастий імплантат розміщували під м'язами живота та фіксували клеєм на основі сітчастого поліуретану з антисептиком, шкірно-підшкірні краї рани з'єднували також клеєм (рис. 1). Клей на основі сітчастого поліуретану з антисептиком пройшов комплексні медико-біологічні дослідження, доклінічні, клінічні й кваліфікаційні випробування, застосовується у клінічній практиці, зокрема в офтальмології [15,16]. У II групі щурів (n = 24) сітчастий імплантат розміщували під м'язами та фіксували традиційно поліпропіленовими нитками № 3/0, шкірно-підшкірні краї рани також зшивали нитками (рис. 2). У III (контрольній) групі тварин (n = 15) виконували розріз м'язів черевної стінки та зашивали рану поліпропіленовими лігатурами № 3/0. З експерименту тварин виводили у рівній кількості з кожної групи шляхом передозування тіопенталом натрію через 7 та 30 днів після імплантації.

У післяопераційному періоді в умовах віварію щурам забезпечували догляд відповідно до вимог нормативних документів щодо захисту тварин, яких використовують із науковими цілями. Зокрема, протягом перших 3 днів тварин знеболювали 50 % розчином анальгін у дозуванні 50 мг/кг у поєднанні з 1 % розчином димедролу в розрахунку 1,5 мг/кг двічі на день. Антибактеріальну терапію не застосовували [13,14].



Рис. 1. Група I. Фіксація сітки клеєм із сітчастого поліуретану під м'язами черевної стінки.



Рис. 2. Група II. Фіксація сітки лігатурами під м'язами черевної стінки.

За лабораторними тваринами спостерігали протягом 30 днів, оцінювали загоєння післяопераційної рани, наявність ускладнень (серома, інфікування рани) у тварин I, II та III груп, порівнювали показники у групах.

На 7 і 30 добу в експериментальних тварин брали фрагменти тканин черевної стінки разом із фрагментами сітки та лігатурами для морфологічного дослідження, яке здійснили на кафедрі патологічної анатомії та судової медицини Національного університету охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика. Фрагменти тканин, що одержали, фіксували у 10 % розчині нейтрального забуференого формаліну (рН 7.4) протягом 24–48 годин. Після фіксування здійснили стандартне проведення в апараті Excelsior AS (Thermo Fisher Scientific, Велика Британія), залили в парафін на апараті HistoStar (Thermo Fisher Scientific, Велика Британія). Із парафінових блоків на ротаційному мікромомі HM 325 (ThermoShandon, Велика Британія) виготовили серійні гістологічні зрізи завтовшки 2–3 мкм, які потім забарвлювали гематоксином і еозином, пікрофуксином за ван Гізеном [17].

Мікроскопічне та морфометричне дослідження виконали на мікроскопі «Olympus BX-41» (Японія), використавши програму «Olympus DP-soft» version 3.1, при збільшенні  $\times 400$  у 10 полях зору кожного випадку. Визначили відносну площу (%) судинного, клітинного та волокнистого компонентів у грануляційній тканині.

Оцінювали морфологічні ознаки проростання сітчастого імплантата сполучною тканиною та наявність запалення тканин на ділянках фіксації сітки в I та II групах, порівнювали з показниками контрольної групи.

Статистично результати опрацювали, використавши ліцензійну версію програми STATA 12.1 (серійний № 40120578442). Визначаючи метод міжгрупового порівняння, насамперед оцінювали нормальність розподілу за критерієм Шапіро–Вілкі. Групи порівнювали за U-критерієм Краскела–Волліса (P(KW)), а також за критерієм  $\chi^2$ -квадрат (точний критерій Фішера, P(X<sup>2</sup>)) для порівняння відносних показників між двома групами, для порівняння показників у динаміці (пов'язаних сукупностей) застосовували критерій Вілкоксона (P(W)). Результати репрезентовано як медіана та квартилі – Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>).

## Результати

За результатами спостереження, на 3–5 добу після хірургічного втручання виявили ознаки сероми в 1 (5,3 %) тварини з I групи, у 7 (33,3 %) із II групи, у 3 (23,1 %) щурів із III групи ( $p_{\text{II}} < 0,05$ ,  $\chi^2 = 4,91$ ). Інфікування рани зафіксовано в 1 (5,3 %) особини з I групи, у 4 (19,1 %) із II групи, у 2 (15,4 %) лабораторних щурів контрольної групи. У I групі загинули 2 (9,5 %) особини, у II – 3 (12,5 %), у III – 2 (13,3 %) тварини. Термін загоєння рани менший у I групі порівняно з показником II та III груп, становив 7 (6; 8) днів (у II групі – 13 (12; 14), у III – 11 (10; 12) днів) ( $p < 0,05$ ).

Результати спостереження підтверджено даними морфологічного дослідження. На 7 добу в лабораторних тварин I групи визначили початкові прояви регенерації з розростанням молодшої сполучної тканини та залишкові дегенеративні процеси, що характеризувалися здебільшого набряковими змінами. В зоні розростання

грануляційної тканини визначали клітини фібробластичного, макрофагального ряду та поодинокі нейтрофільні лейкоцити, лімфоцити та моноцити. Виявили ділянки грануляційної тканини навколо сітчастого поліуретану з ознаками формування сполучнотканинної капсули, на окремих її ділянках відбувалося проростання тяжів сполучної тканини вглиб полімерного зразка, що мав пористу структуру (рис. 3). Відносна площа волокнистого компонента становила 40,85 (39,52; 41,45) %, виявили її переважання над клітинним (33,65 (32,45; 34,12) %) і судинним (26,10 (25,70; 26,63) %) компонентами.

Під час дослідження зразків, взятих у II групі лабораторних щурів, у ділянках навколо сітки та лігатур визначили набряк, дегенеративні процеси, зафіксували виражену клітинну інфільтрацію з наявністю великої кількості нейтрофільних лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів і гігантських багатоядерних клітин за типом сторонніх тіл. Встановили виражені порушення гемодинаміки, що характеризувалися набряковими змінами, повнокров'ям судин, вогнищевими крововиливами; у судинах виявили дисмукоїдоз, ознаки васкуліту. На окремих ділянках є зони розростання незрілої сполучної тканини (рис. 4). Відносна площа клітинного компонента достовірно більша порівняно з показником I групи ( $p < 0,05$ ), становила 59,72 (58,39; 61,41) %; відносні площі волокнистого та судинного компонентів достовірно ( $p < 0,05$ ) менші: 26,80 (25,84; 26,96) % і 13,30 (12,61; 14,92) % відповідно.

У III (контрольній) групі визначили схожу морфологічну картину. Однак, на відміну від II групи, дегенеративні процеси та гемодинамічні порушення мали здебільшого нерівномірний вогнищевий характер внаслідок набрякових змін. Виявляли поодинокі ділянки з інтенсивною нейтрофільною інфільтрацією, вогнищевою вираженою лімфомакрофагальною з домішкою моноцитів інфільтрацією навколо лігатур (рис. 5). Відносні площі волокнистого, судинного та клітинного компонентів суттєво не відрізнялись від відповідних показників I групи, становлячи 42,56 (40,25; 42,83) %, 23,75 (22,72; 25,48) % і 33,68 (32,85; 34,65) % відповідно. Порівняно з II групою відносні площі волокнистого та судинного компонентів мали достовірно більші значення, а клітинного – вірогідно менші ( $p < 0,05$ ).

На 7 добу в I та II групах виявили тенденцію до проростання імплантата сполучною тканиною, дозрівання якої більш виражене в I групі. Це підтверджено більшою відносною площею волокнистого компонента ( $p < 0,05$ ) в цій групі порівняно з II групою. Втім, у групі II визначили істотніші гемодинамічні порушення внаслідок набрякових змін. На нашу думку, це збільшувало імовірність виникнення сероми в післяопераційному періоді. Виражена лімфогістіоцитарна інфільтрація навколо сітки та лігатур у II та III групах свідчила про підвищений ризик інфікування, особливо у II групі; це підтверджено більшим показником відносної площі клітинного компонента ( $p < 0,05$ ) у II групі порівняно з I та III.

У I, II та III групах на 30 добу збільшувалася кількість локусів грануляційної тканини порівняно з даними на 7 добу, що свідчило про процеси регенерації та загоєння рани. У I групі зменшувалася вираженість порушень гемодинаміки здебільшого внаслідок зменшення вираженості набряку. Кількість кровоносних судин при цьому суттєво зростала, клітинна інфільтрація набувала



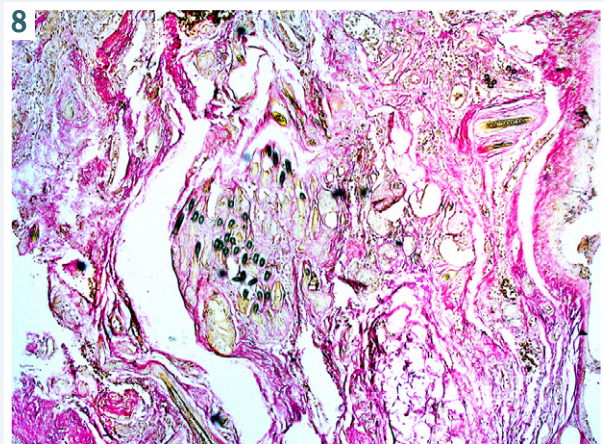
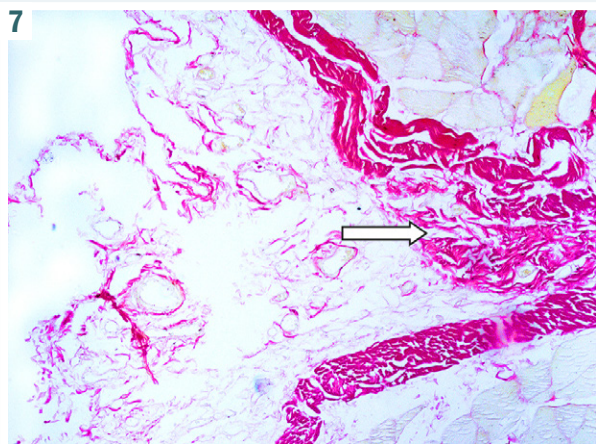
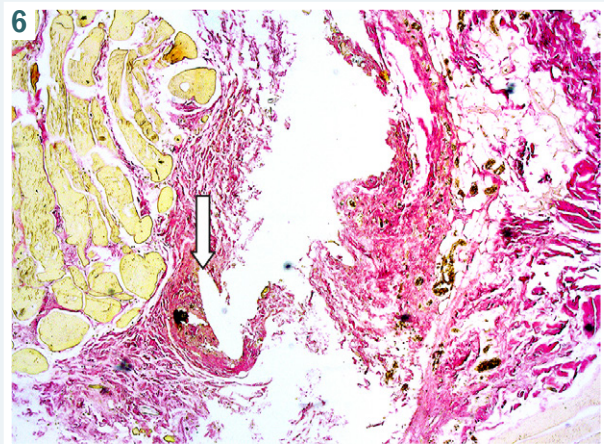
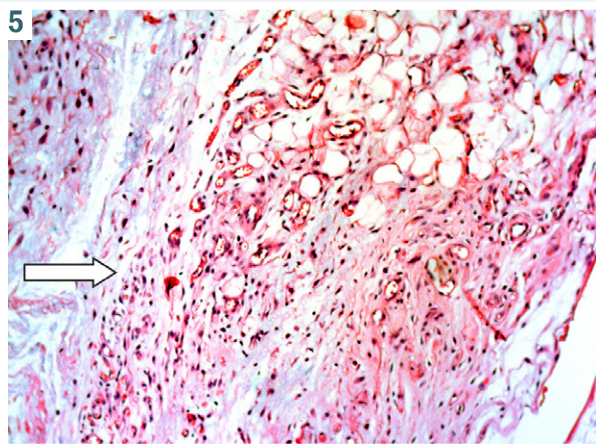
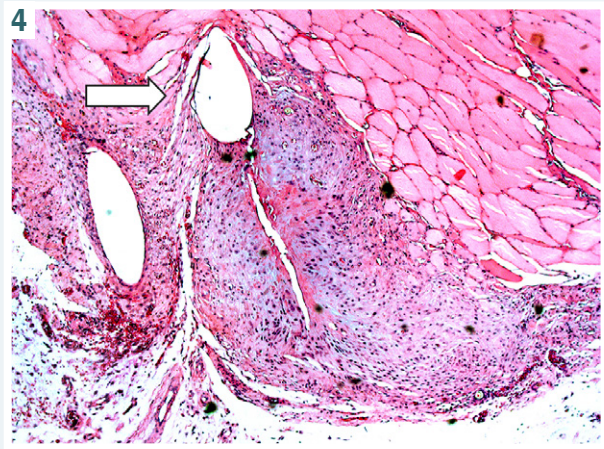
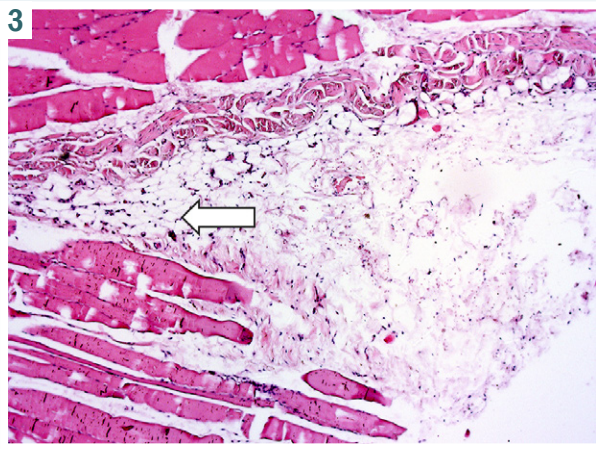


Рис. 3. Група I. Фрагмент тканини з вираженим набряком, початковими проявами розростання незрілої сполучної тканини, вогнищева запальна клітинна інфільтрація (стрілка). Забарвлення гематоксиліном та еозином,  $\times 100$ .

Рис. 4. Група II. Фрагмент тканини з вираженим набряком, запальний клітинний інфільтрат навколо залишків сітки (стрілка), розростання грануляційної тканини, дисмукоїдоз, поодинокі гігантські багатоядерні клітини за типом сторонніх тіл. Забарвлення гематоксиліном та еозином,  $\times 50$ .

Рис. 5. Група III. Фрагмент тканини з набряком, вогнищеве розростання грануляційної тканини, вогнищева клітинна запальна інфільтрація (стрілка). Забарвлення гематоксиліном та еозином,  $\times 100$ .

Рис. 6. Група I. Розростання сполучної тканини, що дозріває, навколо сітки (стрілка), вогнищева клітинна інфільтрація, помірно виражені гемодинамічні порушення. Забарвлення за ван Гізоном,  $\times 50$ .

Рис. 7. Група II. Розростання сполучної тканини різних ступенів зрілості навколо залишків лігатури та сітки (стрілка), слабо виражена вогнищева клітинна інфільтрація. Забарвлення за ван Гізоном,  $\times 50$ .

Рис. 8. Група III. Розростання сполучної тканини різних ступенів зрілості, вогнищева клітинна інфільтрація. Забарвлення за ван Гізоном,  $\times 100$ .



переважно вогнищевому характеру. Волокнистий компонент представлений тонкою зрілою сполучнотканиною капсулою навколо сітчастого поліуретану, а також визначили проростання окремих колагенових волокон у товщу пористої структури СП (рис. 6). Порівняно з 7 добою відносна площа волокнистого компонента збільшилася, становлячи 61,05 (60,32; 61,89) %, а клітинного та судинного компонентів зменшилася – 23,57 (22,45; 24,15) % і 15,90 (14,62; 17,50) % відповідно ( $p < 0,05$ ).

Отже, виявлені на 30 добу патоморфологічні зміни у I групі, де для фіксації сітки використовували клей на основі сітчастого поліуретану з антисептиком, свідчили про регенераторні процеси, зокрема про загоєння рани та рівномірне проростання сітчастого імплантата сполучною тканиною.

У II групі на 30 добу збільшилася відносна площа волокнистого компонента сполучної тканини, становлячи 36,45 (36,25; 38,54) % ( $p < 0,05$ ). Це свідчило про тенденцію до загоєння рани, проте у сполучній тканині, що оточувала сітку та лігатури, гемодинамічні порушення характеризувалися помірними набряковими змінами, повнокров'ям судин, дрібновогнищевими крововиливами. Клітинна інфільтрація мала вогнищевий характер, що підтверджено зменшенням відносної площі клітинного компонента до 41,94 (41,12; 43,21) % ( $p < 0,05$ ), та була здебільшого лімфогістіоцитарною з невеликою кількістю нейтрофільних лейкоцитів, які локалізувалися переважно навколо лігатури та залишків сітки (рис. 7). Порівняно з I групою відносна площа волокнистого компонента достовірно менша, а клітинного – більша ( $p < 0,05$ ). Це свідчило про повільніші процеси регенерації в II групі.

У III групі виявили ознаки загоєння рани, про що свідчило збільшення відносної площі волокнистого компонента до 62,38 (61,37; 63,74) % і зменшення клітинного компонента до 22,97 (21,78; 23,73) % ( $p < 0,05$ ). Втім, навколо лігатур визначили вогнищеву клітинну інфільтрацію та помірні гемодинамічні порушення, схожі на зміни, що виявлені у II групі (рис. 8).

На 30 добу в I, II і III групах спостерігали морфологічні прояви регенерації, зокрема загоєння рани та проростання сітки сполучною тканиною. Втім, у II групі навколо країв сітки та лігатур визначили вогнищеві зони переважно з помірно вираженою лімфогістіоцитарною інфільтрацією, набряк і гемодинамічні порушення, встановили менші показники відносної площі волокнистого компонента, більші – клітинного ( $p < 0,05$ ) порівняно з I та III групами. На нашу думку, це призводить до порушення трофіки тканин цих ділянок, уповільнює загоєння та порушує процес проростання країв сітки сполучною тканиною, а отже може спричинити ранові ускладнення.

## Обговорення

Результати спостереження за тваринами показали, що у I групі частота виникнення сером ( $p_{-II} < 0,05$ ) та терміни загоєння рани були значно меншими порівняно з показниками в II та III групах ( $p < 0,05$ ); це підтверджено результатами морфологічного дослідження. У тварин I групи, яким сітчастий імплантат фіксували клеєм на основі сітчастого поліуретану з антисептиком, спостерігали швидший процес проростання сітки колагеновими воло-

кнами та загоєння рани. Це підтверджено збільшенням відносної площі волокнистого компонента в динаміці (від 40,85 (39,52; 41,45) % до 61,05 (60,32; 61,89) %) та зменшенням клітинного компонента (від 33,65 (32,45; 34,12) % до 23,57 (22,45; 24,15) %) ( $p < 0,05$ ), а також формуванням сполучнотканинної капсули навколо СП із проростанням колагенових волокон вглиб капсули. Скорочення термінів загоєння рани в I групі підтверджено більшою відносною площею волокнистого компонента сполучної тканини на 7 і 30 добу порівняно з показником II групи ( $p_{-II} < 0,05$ ).

За даними фахової літератури, клей із сітчастого поліуретану характеризується високим ступенем адгезії до м'язово-апоневротичної та жирової тканини [15,16]. Це сприяє зменшенню ризику формування «мертвих» просторів між м'язовими та підшкірною-шкірними шарами рани, а отже запобігає виникненню сероми [4,5]. Саме ці процеси спостерігали в експерименті та підтвердили результатами дослідження.

Наявність у складі клею антисептика зменшує ризик інфікування, а відсутність лігатур для фіксації сітки запобігає формуванню лігатурних норичь передньої черевної стінки. Це підтверджено результатами дослідження, оскільки у тварин II групи, у яких фіксацію сітки до тканин черевної стінки виконано традиційно лігатурами, виявили виражені клітинні реакції з лімфогістіоцитарною інфільтрацією навколо сітки та лігатур, встановили більшу відносну площу клітинного компонента сполучної тканини порівняно з параметрами I та III груп ( $p < 0,05$ ), а також спостерігали гемодинамічні порушення внаслідок набрякових змін. Це збігається з відомостями наукової літератури [18,19] та підтверджує вищу ефективність фіксації сітчастого імплантата до тканин черевної стінки клеєм.

## Висновки

1. Використання клею на основі сітчастого поліуретану з антисептиком для фіксації сітчастого імплантата до тканин черевної стінки у лабораторних тварин підтверджує його вищу ефективність порівняно з традиційною фіксацією лігатурами. Так, визначили більшу відносну площу волокнистого компонента сполучної тканини у тварин I групи порівняно з II (40,85 (39,52; 41,45) % та 26,80 (25,84; 26,96) % на 7 добу; 61,05 (60,32; 61,89) % та 36,45 (36,25; 38,54) % на 30 добу ( $p < 0,05$ ) відповідно) та меншу відносну площу клітинного компонента (33,65 (32,45; 34,12) % та 59,72 (58,39; 61,41) % на 7 добу; 23,57 (22,45; 24,15) % та 41,94 (41,12; 43,21) % на 30 добу ( $p < 0,05$ ) відповідно). Це свідчило про швидше дозрівання сполучної тканини.

2. Збільшення відносної площі волокнистого та зменшення відносної площі клітинного компонента в динаміці ( $p < 0,05$ ), а також проростання колагенових волокон вглиб капсули, зменшення на ділянках фіксації сітки гемодинамічних порушень у I групі сприяли швидшому проростанню сітки сполучною тканиною та зменшувало імовірність виникнення ранових ускладнень у цій групі.

3. Скорочення тривалості загоєння рани до 7 (6; 8) днів у I групі, де для фіксації сітки використовували клей із СП з антисептиком, проти 13 (12; 14) днів у II групі, де

сітку фіксували лігатурами, а також зниження частоти виникнення сероми обґрунтовують застосування клею в клінічній практиці для профілактики ранових ускладнень під час алогерніопластики.

**Перспективи подальших досліджень.** Результати експериментально-морфологічного дослідження впроваджені в клінічну практику, зокрема клей на основі СП з антисептиком застосували в 44 пацієнтів із грижами живота для фіксації імплантата та з'єднання шкірно-підшкірних країв рани, спостерігали позитивний ефект [20]. Заплановано наступне оцінювання віддалених результатів. Дані, що отримали під час експерименту, обґрунтовують використання клею з сітчастого поліуретану з антисептиком у клінічній практиці, а отже він може бути рекомендований для профілактики ранових ускладнень під час алопластики гриж живота.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 29.05.2023

Після доопрацювання / Revised: 15.06.2023

Схвалено до друку / Accepted: 27.06.2023

#### Відомості про авторів:

Фелештинський Я. П., д-р мед. наук, професор, зав. каф. хірургії і проктології, Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ.

ORCID ID: 0000-0003-4376-4265

Деркач К. Д., аспірант каф. хірургії і проктології, Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ.

ORCID ID: 0000-0002-7585-6431

Дядик О. О., д-р мед. наук, професор, зав. каф. патологічної анатомії та судової медицини, Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ.

ORCID ID: 0000-0002-9912-4286

Онишко М. В., аспірант каф. хірургії і проктології, Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ.

ORCID ID: 0000-0001-6188-5795

Шатрова К. М., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної анатомії та судової медицини, Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ.

ORCID ID: 0000-0003-2916-5098

#### Information about the authors:

Feleshytynskiy Ya. P., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Surgery and Proctology, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv.

Derkach K. D., PhD student, Department of Surgery and Proctology, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv.

Diadyk O. O., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv.

Onyshko M. V., PhD student, Department of Surgery and Proctology, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv.

Shatrova K. M., MD, PhD, Associated Professor of the Department of Pathologic Anatomy and Forensic Medicine, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv.

#### References

- Shrestha, D., Shrestha, A., & Shrestha, B. (2019). Open mesh versus suture repair of umbilical hernia: Meta-analysis of randomized controlled trials. *International journal of surgery (London, England)*, 62, 62-66. <https://doi.org/10.1016/j.ijso.2018.12.015>
- Christoffersen, M. W., & Henriksen, N. A. (2023). Treatment of primary ventral and incisional hernias. *The British journal of surgery*, znad137. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/bjs/znad137>

- Alhussini, M. A., Awad, A. T., & Kholosy, H. M. (2019). Using quilting sutures in decreasing seroma formation after managing large ventral hernias: a comparative study. *Hernia*, 23(4), 717-722. <https://doi.org/10.1007/s10029-018-1850-9>
- Massey, L. H., Pathak, S., Bhargava, A., Smart, N. J., & Daniels, I. R. (2018). The use of adjuncts to reduce seroma in open incisional hernia repair: a systematic review. *Hernia*, 22(2), 273-283. <https://doi.org/10.1007/s10029-017-1690-z>
- Zamkowski, M., & Śmietański, M. (2023). Efficacy of intraoperative hypertonic saline irrigation in seroma prevention after abdominal wall reconstruction procedures – a pilot cohort study. *ANZ journal of surgery*, 93(6), 1594-1598. <https://doi.org/10.1111/ans.18390>
- Kaafarani, H. M., Hur, K., Hirter, A., Kim, L. T., Thomas, A., Berger, D. H., Reda, D., & Itani, K. M. (2009). Seroma in ventral incisional herniorrhaphy: incidence, predictors and outcome. *American journal of surgery*, 198(5), 639-644. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2009.07.019>
- Biolini, C., de Miranda, J. S., Tanaka, E. Y., Utiyama, E. M., Rasslan, S., & Biolini, D. (2020). The use of synthetic mesh in contaminated and infected abdominal wall repairs: challenging the dogma-A long-term prospective clinical trial. *Hernia*, 24(2), 307-323. <https://doi.org/10.1007/s10029-019-02035-2>
- Kler, A., & Wilson, P. (2020). Total endoscopic-assisted linea alba reconstruction (TESLAR) for treatment of umbilical/paraumbilical hernia and rectus abdominus diastasis is associated with unacceptable persistent seroma formation: a single centre experience. *Hernia*, 24(6), 1379-1385. <https://doi.org/10.1007/s10029-020-02266-8>
- Plymale, M. A., Davenport, D. L., Walsh-Blackmore, S., Hess, J., Griffiths, W. S., Plymale, M. C., Totten, C. F., & Roth, J. S. (2020). Costs and Complications Associated with Infected Mesh for Ventral Hernia Repair. *Surgical infections*, 21(4), 344-349. <https://doi.org/10.1089/sur.2019.183>
- Kao, A. M., Arnold, M. R., Augenstein, V. A., & Heniford, B. T. (2018). Prevention and Treatment Strategies for Mesh Infection in Abdominal Wall Reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery*, 142(3 Suppl), 149S-155S. <https://doi.org/10.1097/PRS.00000000000004871>
- Bueno-Lledó, J., Torregrosa-Gallud, A., Carreño-Saénz, O., García-Pastor, P., Carbonell-Tatay, F., Bonafé-Diana, S., & Iserte-Hernández, J. (2017). Partial versus complete removal of the infected mesh after abdominal wall hernia repair. *American journal of surgery*, 214(1), 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2016.10.022>
- Tuveri, M., Tuveri, A., Nicolo, E., Tsuruma, T., Nagayama, M., Nakano, S., Trombetta, F., Moscato, R., Ghiglione, F., Ciamporcero, T., Galasso, E., Morino, M., Tharao, M., Ndungu, B., Saidi, H., Mwiye, P., Gichere, J., Skipworth, J., Younis, I., Floyd, D., ... Chen, J. (2015). Topic: Incisional Hernia – “Difficult case” as specialistic case: real loss of substance, multi recurrences, infections, fistulas, lombocel, burst abdomen, reconstruction of the entire wall. *Hernia*, 19 Suppl 1, S225-S236. <https://doi.org/10.1007/BF03355359>
- Council of Europe. (1986). *European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes* (No. 123). <https://rm.coe.int/168007a67b>
- Verkhovna Rada of Ukraine. (2006, February 21). *Pro zakhyst tvaryn vid zhorstokoho povodzhennia* [On the Protection of Animals from Brutal Treatment (No. 3447-IV)]. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text>
- Galatenko, N. A., Rozhnova, R. A., Kuliesh, D. V., Visloguzova, T. V., Maletskyy, A. P., & Bigun, N. M. (2020). Response of soft tissues and abdominal organs of rabbits and rats to implanting albucid-containing cross-linked polyurethane composite. *Oftalmolohichnyi zhurnal*, (6), 30-37. <https://doi.org/10.31288/oftalmolzh202063037>
- Lebedev, Ye. V., Galatenko, N. A., Rozhnova, R. A., & Kuliesh, D. V. (2016). Orhanizatsiia serinoho vyrobnytstva vitychyzniano biologichno aktyvnoho kleiu dla vykorystannia v medytsyni [Orhanizatsiia serinoho vyrobnytstva vitychyzniano biologichno aktyvnoho kleiu dla vykorystannia v medytsyni]. *Nauka ta innovatsii*, 12(1), 61-65. [in Ukrainian]. <http://dx.doi.org/10.15407/scin12.01.061>
- Rosai, J. (2011). *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology* (7th ed., Vol. 1). Elsevier Inc.
- Clancy, C., Jordan, P., & Ridgway, P. F. (2019). Polypropylene mesh and systemic side effects in inguinal hernia repair: current evidence. *Irish journal of medical science*, 188(4), 1349-1356. <https://doi.org/10.1007/s11845-019-02008-5>
- Anderson, J. M., Rodriguez, A., & Chang, D. T. (2008). Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in immunology*, 20(2), 86-100. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.004>
- Feleshytynskiy, Y. P., & Derkach, K. D. (2023). Surgical treatment optimisation of recurrent abdominal wall hernias associated with ligature fistula. *Wiadomosci lekarskie*, 76(3), 515-519. <https://doi.org/10.36740/WLek202303108>

# Gestational diabetes mellitus and its complications, role of desynchronosis in pathogenesis (a review)

M. R. Khara \*<sup>A,B,C,D,F</sup>, I. V. Korda <sup>B,C,D,E</sup>, T. I. Podilska <sup>B,C,D</sup>

Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of 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

Diabetes mellitus is the most common metabolic disorder during pregnancy. The International Diabetes Federation estimates that one in six pregnant women (16.8 %) has diabetes. The prevalence of this disease in the human population is striking and, according to various sources, accounts for 14–25 % of all pregnant women. Most cases of hyperglycemia during pregnancy (75–90 %) is due to gestational diabetes mellitus (GDM).

Risk factors, etiology and pathophysiology of GDM are being actively studied, but there are still some controversial issues. For example, the development of GDM in the aspect of circadian rhythm disorders. This problem is especially relevant in connection with pregnancy. After all, there is a two-way relationship here – circadian rhythm disorders affect the course of pregnancy, and pregnancy can be the cause of these disorders. In addition, this problem is relevant for women with a history of endocrine disorders, including diabetes mellitus, as there is a clear link between circadian rhythms and the production of hormones, including insulin.

**The aim** of this review was to show the relationship between the development of GDM, its complications, and circadian rhythm disorders in women.

Pregnancy complicated by GDM can have a negative effect on the myocardium and liver. Moreover, this disease has a significant impact on the myocardium of the offspring. GDM also can cause other complications for the mother's health and fetus or newborn. Scientists have identified a fairly significant number of risk factors for GDM. However, circadian rhythm disorders accompanying pregnancy are often underestimated as a risk factor.

In general, there are many controversies regarding the relationship between long / short sleep duration and quality and the risk of developing diabetes, as well as how melatonin and its precursor serotonin affect metabolism in critical organs. Thus, the role of circadian rhythm disorders in the development of diabetes and its consequences is not yet fully understood. It is likely that solving the problem of circadian rhythm disorders will be the key to overcoming a significant proportion of cases of GDM. Therefore, there is an urgent need for further, larger-scale studies to investigate the causal links between circadian rhythm disorders, diabetes mellitus, and pregnancy.

**Key words:**  
desynchronosis, gestational diabetes, diabetic cardiomyopathies, liver.

**Pathologia, 2023.**  
**20(2), 195-202**

**\*E-mail:**  
khara@tdmu.edu.ua

## Гестаційний цукровий діабет і його ускладнення, роль десинхронозу в патогенезі (огляд літератури)

М. Р. Хара, І. В. Корда, Т. І. Подільська

Цукровий діабет – найпоширеніше порушення обміну речовин під час вагітності. За оцінками Міжнародної діабетичної федерації, в кожній шостій вагітній жінки (16,8 %) виникає діабет. Поширеність цього захворювання в популяції вражає і, за різними даними, становить 14–25 % від усіх вагітних жінок. Більшість випадків гіперглікемії під час вагітності (75–90 %) зумовлена гестаційним цукровим діабетом (ГЦД).

Фактори ризику, етіологію та патофізіологію ГЦД активно вивчають, але окремі питання залишаються дискусійними, як-от щодо розвитку ГЦД внаслідок порушення циркадних ритмів. Особливо актуальною ця проблема є в аспекті вагітності, коли визначають двобічний зв'язок: порушення добового ритму впливають на перебіг вагітності, а вагітність може бути причиною цих порушень. Крім того, ця проблема актуальна для жінок, які мають в анамнезі ендокринні захворювання, зокрема цукровий діабет, оскільки є чіткий зв'язок між циркадними ритмами та продукцією гормонів, як-от інсуліну.

**Мета роботи** – показати зв'язок між розвитком ГЦД, його ускладненнями та порушеннями циркадного ритму в жінок.

Вагітність, ускладнена ГЦД, може мати негативний вплив на міокард і печінку. Це захворювання має значущий вплив і на міокард потомства. ГЦД також може спричинити інші ускладнення для здоров'я матері та плода чи новонародженого. Встановлено чимало факторів ризику ГЦД, але порушення циркадних ритмів, що супроводжують вагітність, часто недооцінюють як фактор ризику.

Дискусійним залишається питання щодо зв'язку між тривалістю сну (довгий чи короткий), його якістю та ризиком розвитку діабету, а також щодо того, як мелатонін і його попередник серотонін впливають на метаболізм у критичних органах. Отже, роль порушення циркадних ритмів у виникненні діабету та його наслідків остаточно не з'ясована. Імовірно, вирішення проблеми розладів циркадних ритмів відкриє шляхи до запобігання й подолання багатьох випадків ГЦД. Тому необхідні наступні масштабні дослідження для вивчення причинно-наслідкових зв'язків між порушеннями циркадних ритмів, цукровим діабетом і вагітністю.

**Ключові слова:**  
десинхроноз, гестаційний цукровий діабет, діабетична кардіоміопатія, печінка.

**Патологія. 2023.**  
**Т. 20, № 2(58).**  
**С. 195-202**



Diabetes mellitus (DM) is the most common metabolic disorder during pregnancy. Pregnant women can have either pregestational diabetes or gestational diabetes (GDM). The International Diabetes Federation estimates that one in six pregnant women (16.8 %) has diabetes. Of this number, 13.6 % suffer from pregestational diabetes, Gestational diabetes mellitus (GDM) is a disorder of glucose tolerance of any type of gestational age, ICD-10 code O.24.4) is a disorder of glucose tolerance of any degree that occurred or was first detected during pregnancy. The prevalence of this disease in the human population is striking and, according to various sources, accounts for 14–25 % of all pregnant women. Most cases of hyperglycemia during pregnancy (75–90 %) is due to GDM [1,2]. Risk factors, etiology and pathophysiology of GDM are being actively studied, but there are still some controversial issues. For example, the development of GDM in the aspect of circadian rhythm disorders.

Shift work, sleep / wake disturbances, frequent traveling across time zones – all of these are at the root of circadian rhythm disorders. It follows that this is an inevitable consequence of the modern lifestyle. Given that such a lifestyle is inherent in modern society, it is advisable to study this problem in more depth to further develop methods to prevent negative consequences. This problem is especially relevant in connection with pregnancy. After all, there is a two-way relationship here – circadian rhythm disorders affect the course of pregnancy, and pregnancy can be the cause of these disorders. In addition, this problem is relevant for women with a history of endocrine disorders, including diabetes mellitus, as there is a clear link between circadian rhythms and the production of hormones, including insulin.

## Aim

Therefore, the purpose of this review was to show the relationship between the development of GDM, its complications, and circadian rhythm disorders in women.

PubMed and Google Scholar were searched to make this review.

Gestational diabetes mellitus is glucose intolerance that first occurs or is first diagnosed during pregnancy. This type of diabetes may first appear during the second [3] or third trimester of pregnancy [4]. During pregnancy, the mother's metabolism undergoes significant changes, which affects insulin sensitivity. This effect increases in the second half of pregnancy due to insulin resistance and subsequent hyperglycemia [5].

The main function of the pancreatic  $\beta$ -cells is to produce and secrete insulin in response to elevated blood glucose levels. However, when  $\beta$ -cells lose sensitivity to serum glucose concentrations or become unable to properly secrete insulin,  $\beta$ -cell dysfunction occurs. Thus, GDM is a consequence of  $\beta$ -cell dysfunction in the setting of chronic insulin resistance during pregnancy. Therefore, these processes are crucial in the pathophysiology of GDM. In addition, as a result of chronic hyperglycemia, which is inevitably present in diabetes,  $\beta$  cells suffer even more. The decreased ability of pancreatic cells to hyperplasm also plays a role in the pathophysiology of GDM. During normal pregnancy,  $\beta$ -cells undergo hyperplasia and hypertrophy to ensure the metabolic demands that increase during pregnancy. Since

tissue sensitivity to insulin decreases, blood glucose levels rise. As insulin sensitivity is restored after childbirth and glucose levels decrease,  $\beta$ -cells return to normal. In contrast, in GDM, the mass and number of  $\beta$ -cells do not increase significantly during pregnancy, and therefore the pancreas is unable to meet the increased metabolic needs. When this inability is combined with reduced insulin sensitivity, persistent hyperglycemia develops, which can be leveled after childbirth or develop into type 2 diabetes [6,7].

The dysfunction of the neurohormonal system is also involved in the pathogenesis of GDM. This system controls the body's metabolism and activity. The most important hormones involved in this process are leptin and adiponectin. In addition, the circadian clock has an important impact on the neurohormonal system [8,9].

Oxidative stress and inflammation are also important components in the pathophysiology of GDM. It was found that GDM is characterized by excessive formation of free radicals and impaired mechanisms of their neutralization. Reactive oxygen species (ROS) inhibit insulin-stimulated glucose uptake by tissues. This leads to even more severe hyperglycemia. Under these conditions, the level of proinflammatory cytokines such as interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  increases. Thus, oxidative stress leads to inflammation, and hyperglycemia mediates between these links [10].

It is important that some organs other than the pancreas can also be involved in the development of GDM and suffer from it. These include the liver, skeletal muscle and myocardium, placenta, and adipose tissue.

**Effect of GDM on the myocardium.** A meta-analysis of data from more than 5 million women showed that GDM remains closely associated with the risk of future cardiovascular events, even in women who did not develop type 2 diabetes after childbirth [11]. Prospective studies have reported that women with GDM have greater relative thickness and mass of the left ventricular wall compared to women with normal pregnancies at 34–39 weeks [12,13]. Physiological hypertrophy of the heart, which occurs during normal pregnancy, is the result of overloading the heart with an increased volume of circulating blood, endocrine changes caused by elevated levels of progesterone and estrogen.

The molecular mechanisms underlying cardiac hypertrophy during pregnancy include activation of the PI3K / Akt (phosphatidylinositol 3-kinase / protein kinase B) and MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) pathways [14]. In the short term, cardiac hypertrophy is a physiological adaptive response of the body. However, in the long term, this becomes a sign of pathology associated with diastolic and systolic dysfunction, arrhythmias, and the development of heart failure. It is important that in healthy women, the size of the heart returns to the pre-pregnancy level within a few months after delivery, whereas pathological hypertrophy is the main manifestation of heart disease in people with type 2 diabetes mellitus (DM2) and occurs even in the absence of vascular complications [15]. Studies on pregnant animals have shown that cardiac hypertrophy is Ca-dependent, which implies activation of the calcineurin-NFAT (nuclear factor of activated T-cells) signaling pathway during normal pregnancy [14,16]. In pregnant animals with DM2, two signaling pathways are activated – CaMKII / HDAC (calci-

um-calmodulin dependent kinase II / histone deacetylase) and calcineurin / NFAT) [15]. It is important that the signaling is initiated in the pre-diabetic, insulin-resistant phase, before the onset of overt hyperglycemia.

Although the mechanisms underlying myocardial hypertrophy during and after pregnancy complicated by GDM are not well known, it can be assumed that some mechanisms are common to hypertrophy in normal pregnancy and DM2. Since calcineurin / NFAT pathway hypertrophy is activated both in type 2 diabetes and in the early stages of normal pregnancy, Nirmal Verma et al. (2021) investigated whether enhanced calcineurin / NFAT signaling contributes to cardiac hypertrophy after GDM-associated pregnancy [17]. Female rats heterozygous for the expression of the human isoform of the pancreatic hormone amylin, in particular in  $\beta$ -cells (HIP-rat), were used as a model of GDM. Under these conditions,  $Ca^{2+}$  / calmodulin-dependent activation of calcineurin phosphatase leads to dephosphorylation of NFAT, causing its translocation to the nucleus, where it activates the transcription of the corresponding gene. The study of calcineurin / NFAT signaling pathway activity in isolated cardiomyocytes, including nuclear and cytosolic localization of NFATc4 (nuclear factor of activated T-cells 4), showed a tendency to decrease the nuclear-cytosolic ratio of NFATc4 immediately (within 1 day) after delivery, which is consistent with data indicating a downregulation of this signaling pathway in late pregnancy [14, 16].

In a normal pregnancy, the activity of this pathway returns to its original level within two months after delivery. It is important to note the significant role of calcipressin-1 (also known as RCAN1 or MCIP1), which is an endogenous calcineurin inhibitor, in activating the calcineurin / NFAT signaling pathway. Its expression in the HIP myocardium of female rats remains significantly elevated even two months after delivery [18]. This may indicate a prolongation of the period of myocardial remodeling in the setting of GDM, because the decrease in calcium content in cardiomyocytes in the postpartum period is much slower [17]. Another calcium-dependent activation pathway, CaMKII / HDAC, plays an important role in the development of myocardial hypertrophy during pregnancy. It involves the release of HDACs from the nucleus after phosphorylation by CaMKII through the expression of the corresponding genes. This mechanism is activated both in normal pregnancy and in GDM. However, in both variants of pregnancy (normal and GDM), the activity of this pathway normalizes two months after delivery in females of both groups [17], which suggests that it is not involved in postpartum myocardial remodeling in animals with GDM.

There is ambiguity in the interpretation of the impact of GDM on the risk of developing heart failure. Some data indicate a positive correlation between GDM and cardiac dysfunction [19], while others deny such a relationship [20]. The denial of such a connection is based on research shortcomings. These shortcomings include the diagnosis of GDM not based on biochemical data, lack of differentiation between perinatal cardiomyopathy and long-term heart failure, neglect of comorbidities (postpartum diabetes mellitus, postpartum hypertension, postpartum coronary artery disease), and insufficient data on cardiovascular risk factors (lipid levels and body mass index, smoking, alcohol consumption, and physical activity). The lack of data on the

subtype of heart failure (HF) for the diagnosis of perinatal cardiomyopathy negatively affects the results of correlation analysis, because the clinical signs and symptoms of HF often coincide with the symptoms of normal pregnancy. There are often no detailed data on the use of medications related to diabetes and HF during and/or after childbirth [21].

Endothelial damage is one of the first consequences of diabetes and a precursor to cardiac damage / dysfunction. Endothelial changes associated with diabetes/hyperglycemia include increased ROS production, impaired nitric oxide (NO) release, and a shift to a proinflammatory phenotype. NO deficiency causes impaired endothelium-mediated vasorelaxation, which can result in diastolic heart failure [22]. A key factor in endothelial damage is mitochondrial dysfunction. In addition to the formation of ROS in endothelial cells through glycolysis, mitochondria play a central role in intracellular signal transduction, calcium homeostasis, amino acid synthesis, and meeting energy needs during proliferation or stress [23]. Mitochondria are also the main source of oxidative stress in endothelial cells due to the formation of superoxide anion during oxidative phosphorylation. In diabetes, mitochondrial ROS production increases, leading to dysfunction, inflammation, and apoptosis [24]. These effects are balanced by the activation of pathways that provide resistance to oxidative stress, such as nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>)-dependent deacetylases [25]. An additional mechanism by which mitochondria can disrupt endothelial function is the release of mitochondrial DNA (mtDNA) and inflammatory reactions [26].

One of the new ways to investigate the mechanisms of endothelial damage / dysfunction is to study extracellular vesicles (EV). EV are the membrane vesicles that are formed ubiquitously under physiological conditions and under stress. Their subpopulations are micro EV, ecosomes, and apoptotic bodies, which differentiate by their biogenesis, release pathway, size, content, and function. EV of different origin are found in biological fluids and their levels change in pathological conditions, including type 1 and type 2 diabetes [27]. In a study of rats with GDM induced by a diet that mirrored several aspects of human pregnancy with GDM, including excessive weight gain during pregnancy, impaired glucose tolerance, and beta-cell dysfunction, the level of circulating endothelial EV and von Willebrand factor was found to increase more than 3-fold. This was indicative of endothelial stress and was confirmed by a deficiency of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) in the aorta and increased levels of EV-related mtDNA. These data prove that mitochondrial damage may play a causal role in vascular damage associated with GDM. A positive correlation between signs of remodeling, diastolic myocardial dysfunction, and endothelial EV levels demonstrates the important role of vascular factor in the development of heart failure [28].

Interestingly, according to [28,29], an increase in the level of circulating EV of endothelial origin was not accompanied by changes in the total EV index. However, C. Salomon et al. (2016) and M. Arias et al. (2019) reported an increase in the rate of all circulating EV in women with GDM [30,31]. The authors of the study used approaches that focused specifically on small EVs. This may mean that GDM may affect different subpopulations of EVs differently. In the context of the analysis, it is noteworthy to report an

increase in the activity of  $Ca^{2+}$  / calmodulin-dependent protein kinase II beta, which is involved in mitochondrial fragmentation in hyperglycemia [32].

GDM has a significant impact on the myocardium of the offspring. The offspring of mothers with GDM are 20.6 times more likely to demonstrate cardiovascular pathology than the offspring of mothers who had a normal pregnancy. The main cardiac manifestation in such newborns is myocardial hypertrophy, which in severe cases can lead to transient subaortic stenosis and congestive heart failure. Also, the offspring of mothers with GDM have a more significant impairment of cardiac function (biventricular systolic dysfunction), their hearts are rounder. Moreover, the effect of GDM on the morphology and function of the fetal heart is manifested from the second trimester [33].

**The effect of GDM on the liver.** Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is defined as an increase in the fat content of hepatocytes in the absence of any secondary cause of steatosis. The prevalence of NAFLD is increasing in parallel with the increase in the prevalence of obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes [34]. In general, there are few scientific studies on the effect of GDM on the liver. Nevertheless, the literature we have analyzed has revealed some patterns. NAFLD was found to be an independent risk factor for the development of type 2 diabetes. However, NAFLD and type 2 diabetes have a common pathophysiological basis – insulin resistance. An insulin-resistant fatty liver overproduces glucose and very low-density lipoprotein. This activates mechanisms that lead to the depletion of the pancreatic beta-cell reserve, which ultimately leads to the development of diabetes. The steatotic and inflamed liver secretes hepatokines such as fetuin-A, fetuin-B, angiotensin-like proteins, fibroblast growth factor 21, and selenoprotein P, which perform endocrine functions in the extrahepatic space, causing insulin resistance and other adverse effects on glucose homeostasis. It is known that there is a link between a history of GDM and NAFLD in women. However, there are few data on whether pre-pregnancy NAFLD can be a risk factor for the development of GDM. You S. Y. et al. (2021) demonstrated that the presence of NAFLD before pregnancy was associated with an increased risk of GDM, in which patients required insulin therapy. Moreover, a stronger correlation was found in the cohort of women without metabolic syndrome before pregnancy. This confirms the hypothesis that NAFLD is an independent risk factor for CKD, regardless of the presence or absence of metabolic syndrome [35].

**GDM and other complications.** In addition to all the risks described above, GDM can cause other threatening conditions. Among the possible negative consequences for the mother's health are preeclampsia, postpartum bleeding, premature rupture of membranes, and the need for labor induction, cesarean section, and instrumental delivery. For the fetus or newborn, GDM is fraught with antenatal and neonatal death, congenital malformations, preterm birth, macrosomia, neonatal hypoglycemia, neonatal jaundice, respiratory distress syndrome, low Apgar score, and hospitalization in the neonatal intensive care unit [36]. Zhu H. et al. (2019) demonstrated that even a short-term exposure of the fetus to maternal T1D in the early stages of development is sufficient to induce permanent changes in DNA methylation and expression of genes that control insulin secretion. This

suggests a methylation-mediated epigenetic mechanism of GDM-induced intergenerational glucose intolerance. In addition, their findings provide experimental evidence of the long-term positive effect of insulin therapy in GDM on the health of offspring [37].

**The role of circadian rhythm disorders in the development of GDM.** Scientists have identified a fairly significant number of risk factors for GDM. The greatest epidemiologic value is body mass index of 25 and above, pregnant woman's age of 25 years and older, hypothyroidism, polycystic ovary syndrome, and family history of diabetes [38,39]. However, circadian rhythm disorders accompanying pregnancy are often underestimated as a risk factor.

**Circadian rhythms.** The rhythmic control of physiological and behavioral processes is carried out by an endogenous molecular clock located inside the suprachiasmatic nucleus. Afferent neuronal pathways, i.e., those that start from light-sensitive retinal ganglion cells, travel to the suprachiasmatic nucleus, where the circadian oscillator is synchronized with the surrounding signals. In this way, autonomous oscillations are generated that have an approximate 24-hour period, which are circadian rhythms. External signals, such as light-dark cycles, are the triggers for the circadian clock to work, ensuring its synchronization with a sunny day [40]. An autonomous molecular oscillator transmits signals to the body's organs and tissues to ensure vital functions. There are many genes that control the circadian clock. They include *Bmal1*, *Clock*, *periodic (Per)*, and *cryptochrome (Cry)*. The expression of these genes is regulated by the principle of negative feedback [41]. Melatonin plays a key role in synchronizing the internal environment with the external environment (namely, with light-dark cycles), which is formed mainly in the pineal gland. Altered sleep patterns disrupt melatonin secretion and can impair reproductive function. For example, high levels of melatonin are associated with delayed puberty and impaired ovulation, while low levels of melatonin are associated with premature puberty. In addition, melatonin, which is found in ovarian follicular fluid, is believed to protect eggs from oxidative stress due to its antioxidant properties [42]. Sleep deprivation suppresses the secretion of endogenous melatonin, which reduces the level of melatonin in the follicular fluid and exposes the follicles to ROS. This reduces the quality and quantity of eggs, which can lead to infertility. This is confirmed by a study in which scientists report that women with idiopathic infertility had significantly lower levels of follicular melatonin compared to controls, which is associated with increased levels of oxidative stress markers [43].

Given the link between melatonin and reproductive function, scientists have tried to assess the possible therapeutic effects of exogenous melatonin. There is evidence that taking melatonin improves the redox balance inside the follicles, and as a result, improves the results of assisted reproductive technologies [43]. Despite this, the use of exogenous melatonin does not always have a positive effect on sleep disorders in women with infertility. A study of 116 women who underwent in vitro fertilization found that melatonin supplementation did not have a dose-response effect on objective sleep measures in these women [44].

A study conducted on mice found that circadian rhythm disorders can affect fertility independently of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis.



lamic-pituitary axis. For example, mice deficient in the Clock and Bmal1 genes suffer from ovulatory dysfunction and reduced fertility [45]. In an experiment using a Clock transgenic mouse model, the formation of the Bmal1-Clock dimer occurred, but the regulation of Per and Cry transcription was lost. This was manifested by a loss of circadian rhythm, as well as an increased incidence of miscarriage. In addition, mice with Per1-Per2 deficiency have a premature decrease in ovarian reserve, irregular estrous cycles, and reduced reproductive performance [46].

The synthesis, secretion, and metabolism of various hormones are synchronized with circadian rhythms and regulated by sleep patterns [47]. For example, gonadotropins, sex steroids, and sex hormone binding globulin (SHBG) show diurnal rhythms in women of reproductive age [48,49]. In the follicular phase of the menstrual cycle, follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone, estrogen, progesterone, and sex hormone binding globulin are released rhythmically, while in the luteal phase only FSH and SHBG are rhythmic [49]. Disruption of the suprachiasmatic nucleus rhythm, which can occur in sleep disorders, leads to changes in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, resulting in the loss of synchronization of sex hormone release [40], which can contribute to changes in reproductive processes [50]. For example, it can affect puberty, ovarian function, fertility, the success of assisted reproductive technologies, and pregnancy.

The occurrence of circadian rhythm disorders may not be related to pregnancy, for example, working in shifts or frequent changes in time zones. Although in some cases, circadian rhythm disorders are caused by pregnancy. For example, in a study by Mindell et al. (2015), 17 % of early pregnant women and 33 % of late pregnant women reported a total sleep duration of 6 hours or less. This study also shows a significant frequency of complaints such as low back pain, reflux, and difficulty finding a comfortable position. Moreover, these complaints increased with each subsequent trimester of pregnancy [51]. Other studies also indicate that sleep quality often deteriorates during pregnancy due to reduced total sleep duration and non-restorative sleep [52]. In the first trimester, the causes include morning sickness, vomiting, and diarrhea. In the second trimester, fetal movements and esophageal reflux usually occur for the first time. And in the third trimester, pregnant women are most often concerned about nocturia, difficulty finding a comfortable position, back and pelvic pain, symptoms of restless legs syndrome, and sleep apnea. In addition, many women experience sleep disturbances due to anxiety about their baby and childbirth [51]. Thus, a combination of psychosocial, biological, and physical factors can lead to insufficient sleep during pregnancy and circadian rhythm disorders.

Wai Man G. C. et al. (2017) found that the coordinated functioning of the circadian clock is important during pregnancy, as it has a positive effect by suppressing the development of inflammatory diseases, including GDM [53]. Reduced sleep duration and/or quality leads to dysregulation of melatonin secretion and can have a negative impact on health. Importantly, melatonin penetrates the placental barrier and has the ability to accelerate the formation of the fetal suprachiasmatic nucleus and reduce fetal oxidative stress. Since the placenta has the ability to produce

melatonin, the level of this hormone in pregnant women is higher than in non-pregnant women. Moreover, with each trimester of pregnancy, the concentration of melatonin in the blood serum increases, and after childbirth it decreases sharply [54].

Some researchers report that polymorphisms in the genes responsible for melatonin receptor expression can affect insulin secretion and pancreatic glucose sensitivity, causing T2D [55,56]. That is, a decrease in melatonin levels is positively correlated with an increased risk of hyperglycemia. Importantly, melatonin supplementation reduces this risk [57]. At the same time, other studies evaluating the association between sleep duration during pregnancy and the risk of developing GDM indicate that extreme sleep duration (not only too little but also too much) during the first and second trimesters of pregnancy was positively correlated with the incidence of GDM [58].

For example, a study was conducted among pregnant women, of whom 7.3 % suffered from GDM [59]. In this experiment, three groups of pregnant women were compared: 1) women who slept 9 hours/day or more (55 %), 2) women who slept less than 7 hours/day (2 %), and 3) women who slept 7-9 hours/day (43 %). Pregnant women who slept 9 hours or more per day had an increased risk of GDM, while those who slept less than 7 hours had a slightly increased risk [59]. Data from other studies, including large-scale prospective cohort studies, also note that both short and long sleep duration, accompanied by sleep-disordered breathing, positively correlate with the incidence of GDM [60,61,62]. In a study involving 46 women with newly diagnosed GDM and 46 healthy pregnant women matched for age, gestational age, body mass index, and race, women with obstructive sleep apnea had a higher risk of GDM [63]. In addition, the severity of sleep apnea in women with GDM correlates with higher glucose levels at night and in the morning [64].

As you know, impaired glucose tolerance can first appear during pregnancy (GDM) or exist before conception (prediabetes). However, there are little data on the pathogenesis of the latter. Asuaje Pfeifer M. et al. (2022) conducted a study using female New Zealand obese (NZO) mice as a model of GDM. It has been shown that GDM is associated with increased levels of serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) in the urine, but the role of this biogenic amine in subpopulations with pre-diabetes remains unclear. 5-HT is synthesized in various tissues, including the islets of Langerhans during pregnancy. In addition, 5-HT receptors are expressed in tissues important for the regulation of glucose homeostasis, such as the liver and pancreas. Interestingly, the researchers found elevated concentrations of 5-HT in the plasma and islets of Langerhans of NZO mice, as well as impaired glucose-stimulated 5-HT secretion. Incubation of isolated islets of NZO females with 5-HT revealed an inhibitory effect on insulin and glucagon secretion. In hepatocytes of NZO females, 5-HT enhances glucose synthesis in the liver, reduces glucose uptake and glycogen content. Treatment with a serotonin receptor antagonist reduced the 5-HT-mediated deterioration in metabolic status. These data indicate that 5-HT is a potential indicator of GDM in mice before conception [65]. Since serotonin is a precursor to melatonin, dissonance arises again. After all, even though melatonin has organ-protective properties, serotonin has a number of the above-described

negative effects on the liver. There is evidence of the negative effect of light desynchronization on myocardial function in pathological conditions.

Given the negative impact of diabetes on the myocardium, especially during pregnancy, it is worth noting that light disturbance also has a negative impact on myocardial metabolism and functional activity. In a rat experiment, it was shown that dark deprivation significantly enhances the pathogenic effect of epinephrine on the myocardium of animals, as evidenced by an increase in the area of cardiomyocyte damage in the model of epinephrine necrosis, high free radical oxidation activity, and a deficiency of antioxidant protection [66], while simultaneously reducing the vagal control of cardiac activity [67].

## Conclusions

1. All these controversies regarding the relationship between long/short sleep duration and quality and the risk of developing diabetes, as well as how melatonin and its precursor serotonin affect metabolism in critical organs, indicate that the role of circadian rhythm disorders in the development of diabetes and its consequences is not yet fully understood. It is likely that solving the problem of circadian rhythm disorders will be the key to overcoming a significant proportion of cases of GDM.

2. Scientists have already investigated main pathophysiology links of GDM development. Also they realize that this disease can impact myocardium, liver and other mother's and fetus' organs. Moreover, scientists have discovered relation between GDM, its complications and desynchronization. Despite many controversial issues regarding the role of circadian rhythm disorders in the development of GDM, there is clear understanding that desynchronization can influence this process.

3. Understanding of cause-effect relations and ability to see and select the main link of pathogenesis will allow to liquidate a pathological process and accelerate the offensive of favorable consequences of illness. Therefore, there is an urgent need for further, larger-scale studies to investigate the causal links between circadian rhythm disorders, diabetes mellitus, and pregnancy.

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

Надійшла до редакції / Received: 06.06.2023  
Після доопрацювання / Revised: 30.06.2023  
Схвалено до друку / Accepted: 04.07.2023

## Information about authors:

Khara M. R., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathological Physiology, Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine.  
ORCID ID: 0000-0002-6028-9876

Korda I. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Obstetrics and Gynaecology No. 2, Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine.  
ORCID ID: 0000-0002-2224-3308

Podilska T. I., 6-year student, Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine.  
ORCID ID: 0000-0003-2028-4656

## Відомості про авторів:

Хара М. Р., д-р мед. наук, професор каф. патологічної фізіології, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.

Корда І. В., канд. мед. наук, доцент каф. акушерства та гінекології № 2, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.

Подільська Т. І., студентка VI курсу, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.

## References

- International Diabetes Federation. (2017). *IDF Diabetes Atlas* (8th ed.). IDF: Brussels, Belgium. <https://diabetesatlas.org/atlas/eighth-edition/>
- World Health Organization (2016). *Global report on diabetes*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9?sequence=1>
- Schlieffsteiner, C., Hirschmugl, B., Kopp, S., Curcic, S., Bernhart, E. M., Marsche, G., Lang, U., Desoye, G., & Wadsack, C. (2017). Maternal Gestational Diabetes Mellitus increases placental and foetal lipoprotein-associated Phospholipase A2 which might exert protective functions against oxidative stress. *Scientific reports*, 7(1), 12628. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13051-6>
- Wu, J. N., Gu, W. R., Xiao, X. R., Zhang, Y., Li, X. T., & Yin, C. M. (2019). Gestational weight gain targets during the second and third trimesters of pregnancy for women with gestational diabetes mellitus in China. *European journal of clinical nutrition*, 73(8), 1155-1163. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0358-9>
- Katra, P., Dereke, J., Nilsson, C., & Hillman, M. (2016). Plasma Levels of the Interleukin-1-Receptor Antagonist Are Lower in Women with Gestational Diabetes Mellitus and Are Particularly Associated with Postpartum Development of Type 2 Diabetes. *PLoS one*, 11(5), e0155701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155701>
- Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. (2018). The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3342. <https://doi.org/10.3390/ijms19113342>
- Gooley, J. J., Mohapatra, L., & Tvan, D. C. K. (2017). The role of sleep duration and sleep disordered breathing in gestational diabetes mellitus. *Neurobiology of sleep and circadian rhythms*, 4, 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.nbscr.2017.11.001>
- Cai, S., Tan, S., Gluckman, P. D., Godfrey, K. M., Saw, S. M., Teoh, O. H., Chong, Y. S., Meaney, M. J., Kramer, M. S., Gooley, J. J., & GUSTO study group (2017). Sleep Quality and Nocturnal Sleep Duration in Pregnancy and Risk of Gestational Diabetes Mellitus. *Sleep*, 40(2), 10.1093/sleep/zsw058. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsw058>
- Facco, F. L., Grobman, W. A., Reid, K. J., Parker, C. B., Hunter, S. M., Silver, R. M., Basner, R. C., Saade, G. R., Pien, G. W., Manchanda, S., Louis, J. M., Nhan-Chang, C. L., Chung, J. H., Wing, D. A., Simhan, H. N., Haas, D. M., Iams, J., Parry, S., & Zee, P. C. (2017). Objectively measured short sleep duration and later sleep midpoint in pregnancy are associated with a higher risk of gestational diabetes. *American journal of obstetrics and gynecology*, 217(4), 447.e1-447.e13. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.05.066>
- Zhu, C., Yang, H., Geng, Q., Ma, Q., Long, Y., Zhou, C., & Chen, M. (2015). Association of oxidative stress biomarkers with gestational diabetes mellitus in pregnant women: a case-control study. *PLoS one*, 10(4), e0126490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126490>
- Kramer, C. K., Campbell, S., & Retnakaran, R. (2019). Gestational diabetes and the risk of cardiovascular disease in women: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia*, 62(6), 905-914. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4840-2>
- Buddeberg, B. S., Sharma, R., O'Driscoll, J. M., Kaelin Agten, A., Khalil, A., & Thilaganathan, B. (2020). Impact of gestational diabetes mellitus on maternal cardiac adaptation to pregnancy. *Ultrasound in obstetrics & gynecology*, 56(2), 240-246. <https://doi.org/10.1002/uog.21941>
- Oliveira, A. P., Calderon, I. M., Costa, R. A., Roscani, M. G., Magalhães, C. G., & Borges, V. T. (2015). Assessment of structural cardiac abnormalities and diastolic function in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes & vascular disease research*, 12(3), 175-180. <https://doi.org/10.1177/1479164114563302>
- Chung, E., & Leinwand, L. A. (2014). Pregnancy as a cardiac stress model. *Cardiovascular research*, 101(4), 561-570. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu013>
- Rospleszcz, S., Schafnitzel, A., Koenig, W., Lorbeer, R., Auweter, S., Huth, C., Rathmann, W., Heier, M., Linkohr, B., Meisinger, C., Hetterich, H., Bamberg, F., & Peters, A. (2018). Association of glycemic status and segmental left ventricular wall thickness in subjects without prior

- cardiovascular disease: a cross-sectional study. *BMC cardiovascular disorders*, 18(1), 162. <https://doi.org/10.1186/s12872-018-0900-7>
16. Chung, E., Yeung, F., & Leinwand, L. A. (2013). Calcineurin activity is required for cardiac remodeling in pregnancy. *Cardiovascular research*, 100(3), 402-410. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt208>
  17. Verma, N., Srodulski, S., Velmurugan, S., Hoskins, A., Pandey, V. K., Despa, F., & Despa, S. (2021). Gestational diabetes triggers postpartum cardiac hypertrophy via activation of calcineurin/NFAT signaling. *Scientific reports*, 11(1), 20926. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00422-3>
  18. Parra, V., & Rothermel, B. A. (2017). Calcineurin signaling in the heart: The importance of time and place. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 103, 121-136. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.12.006>
  19. Appiah, D., Schreiner, P. J., Gunderson, E. P., Konety, S. H., Jacobs, D. R., Jr, Nwabuo, C. C., Ebong, I. A., Whitham, H. K., Goff, D. C., Jr, Lima, J. A., Ku, I. A., & Gidding, S. S. (2016). Association of Gestational Diabetes Mellitus With Left Ventricular Structure and Function: The CARDIA Study. *Diabetes care*, 39(3), 400-407. <https://doi.org/10.2337/dc15-1759>
  20. Savitz, D. A., Danilack, V. A., Elston, B., & Lipkind, H. S. (2014). Pregnancy-induced hypertension and diabetes and the risk of cardiovascular disease, stroke, and diabetes hospitalization in the year following delivery. *American journal of epidemiology*, 180(1), 41-44. <https://doi.org/10.1093/aje/kwu118>
  21. Echouffo-Tcheugui, J. B., Guan, J., Retnakaran, R., & Shah, B. R. (2021). Gestational Diabetes and Incident Heart Failure: A Cohort Study. *Diabetes care*, 44(10), 2346-2352. Advance online publication. <https://doi.org/10.2337/dc21-0552>
  22. Triggie, C. R., Ding, H., Marei, I., Anderson, T. J., & Hollenberg, M. D. (2020). Why the endothelium? The endothelium as a target to reduce diabetes-associated vascular disease. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 98(7), 415-430. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2019-0677>
  23. Li, X., Sun, X., & Carmeliet, P. (2019). Hallmarks of Endothelial Cell Metabolism in Health and Disease. *Cell metabolism*, 30(3), 414-433. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.08.011>
  24. Kluge, M. A., Fetterman, J. L., & Vita, J. A. (2013). Mitochondria and endothelial function. *Circulation research*, 112(8), 1171-1188. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300233>
  25. Meng, T., Qin, W., & Liu, B. (2020). SIRT1 Antagonizes Oxidative Stress in Diabetic Vascular Complication. *Frontiers in endocrinology*, 11, 568861. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.568861>
  26. McElwain, C. J., Tuboly, E., McCarthy, F. P., & McCarthy, C. M. (2020). Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Pre-eclampsia and Gestational Diabetes Mellitus: Windows Into Future Cardiometabolic Health?. *Frontiers in endocrinology*, 11, 655. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00655>
  27. Huang-Doran, I., Zhang, C. Y., & Vidal-Puig, A. (2017). Extracellular Vesicles: Novel Mediators of Cell Communication In Metabolic Disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 28(1), 3-18. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.10.003>
  28. Kereliuk, S. M., Xiao, F., Burger, D., & Dolinsky, V. W. (2022). Extracellular Vesicles as an Index for Endothelial Injury and Cardiac Dysfunction in a Rodent Model of GDM. *International journal of molecular sciences*, 23(9), 4970. <https://doi.org/10.3390/ijms23094970>
  29. Franzago, M., Lanuti, P., Fratlicelli, F., Marchioni, M., Buca, D., Di Nicola, M., Liberati, M., Miscia, S., Stuppia, L., & Vitacolonna, E. (2021). Biological insight into the extracellular vesicles in women with and without gestational diabetes. *Journal of Endocrinological Investigation*, 44(1), 49-61. <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01262-0>
  30. Salomon, C., Scholz-Romero, K., Sarker, S., Sweeney, E., Kobayashi, M., Correa, P., Longo, S., Duncombe, G., Mitchell, M. D., Rice, G. E., & Illanes, S. E. (2016). Gestational Diabetes Mellitus Is Associated With Changes in the Concentration and Bioactivity of Placenta-Derived Exosomes in Maternal Circulation Across Gestation. *Diabetes*, 65(3), 598-609. <https://doi.org/10.2337/db15-0966>
  31. Arias, M., Monteiro, L. J., Acuña-Gallardo, S., Varas-Godoy, M., Rice, G. E., Monckeberg, M., Diaz, P., & Illanes, S. E. (2019). Vesículas extracelulares como predictores tempranos de diabetes gestacional [Extracellular vesicle concentration in maternal plasma as an early marker of gestational diabetes]. *Revista medica de Chile*, 147(12), 1503-1509. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872019001201503>
  32. Zhang, Y., Feng, J., Wang, Q., Zhao, S., Yang, S., Tian, L., Meng, P., Li, J., & Li, H. (2018). Hyperglycaemia Stress-Induced Renal Injury is Caused by Extensive Mitochondrial Fragmentation, Attenuated MKP1 Signalling, and Activated JNK-CaMKII-Fis1 Biological Axis. *Cellular physiology and biochemistry*, 51(4), 1778-1798. <https://doi.org/10.1159/000495681>
  33. Wang, D., Liu, C., Liu, X., Zhang, Y., & Wang, Y. (2021). Evaluation of prenatal changes in fetal cardiac morphology and function in maternal diabetes mellitus using a novel fetal speckle-tracking analysis: a prospective cohort study. *Cardiovascular ultrasound*, 19(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s12947-021-00256-z>
  34. Godoy-Matos, A. F., Silva Júnior, W. S., & Valerio, C. M. (2020). NAFLD as a continuum: from obesity to metabolic syndrome and diabetes. *Diabetology & metabolic syndrome*, 12, 60. <https://doi.org/10.1186/s13098-020-00570-y>
  35. You, S. Y., Han, K., Lee, S. H., & Kim, M. K. (2021). Nonalcoholic fatty liver disease and the risk of insulin-requiring gestational diabetes. *Diabetology & metabolic syndrome*, 13(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s13098-021-00710-y>
  36. Ye, W., Luo, C., Huang, J., Li, C., Liu, Z., & Liu, F. (2022). Gestational diabetes mellitus and adverse pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 377, e067946. <https://doi.org/10.1136/bmj-2021-067946>
  37. Zhu, H., Chen, B., Cheng, Y., Zhou, Y., Yan, Y. S., Luo, Q., Jiang, Y., Sheng, J., Ding, G., & Huang, H. F. (2019). Insulin therapy for gestational diabetes mellitus does not fully protect offspring from diet-induced metabolic disorders. *Diabetes*, 68(4), 696-708. <https://doi.org/10.2337/db18-1151>
  38. Giannakou, K., Evangelou, E., Yiallourou, P., Christophi, C. A., Middleton, N., Papatheodorou, E., & Papatheodorou, S. I. (2019). Risk factors for gestational diabetes: An umbrella review of meta-analyses of observational studies. *PLoS one*, 14(4), e0215372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215372>
  39. Lee, K. W., Ching, S. M., Ramachandran, V., Yee, A., Hoo, F. K., Chia, Y. C., Wan Sulaiman, W. A., Suppiah, S., Mohamed, M. H., & Veettil, S. K. (2018). Prevalence and risk factors of gestational diabetes mellitus in Asia: a systematic review and meta-analysis. *BMC pregnancy and childbirth*, 18(1), 494. <https://doi.org/10.1186/s12884-018-2131-4>
  40. Sciarra, F., Franceschini, E., Campolo, F., Gianfrilli, D., Pallotti, F., Paoli, D., Isidori, A. M., & Venneri, M. A. (2020). Disruption of Circadian Rhythms: A Crucial Factor in the Etiology of Infertility. *International journal of molecular sciences*, 21(11), 3943. <https://doi.org/10.3390/ijms21113943>
  41. Crosby, P., & Partch, C. L. (2020). New insights into non-transcriptional regulation of mammalian core clock proteins. *Journal of cell science*, 133(18), jcs241174. <https://doi.org/10.1242/jcs.241174>
  42. Goldstein, C. A., & Smith, Y. R. (2016, December 1). Sleep, Circadian Rhythms, and Fertility. *Current Sleep Medicine Reports*, 2, 206-217. <https://doi.org/10.1007/s40675-016-0057-9>
  43. Espino, J., Macedo, M., Lozano, G., Ortiz, A., Rodríguez, C., Rodríguez, A. B., & Bejarano, I. (2019). Impact of Melatonin Supplementation in Women with Unexplained Infertility Undergoing Fertility Treatment. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(9), 338. <https://doi.org/10.3390/antiox8090338>
  44. Fernando, S., Biggs, S. N., Home, R. S. C., Vollenhoven, B., Lolaitgis, N., Hope, N., Wong, M., Lawrence, M., Lawrence, A., Russell, C., Leong, K., Thomas, P., Rombauts, L., & Wallace, E. M. (2018). The impact of melatonin on the sleep patterns of women undergoing IVF: a double blind RCT. *Human reproduction open*, 2017(4), hox027. <https://doi.org/10.1093/hropen/hox027>
  45. Sen, A., & Hoffmann, H. M. (2020). Role of core circadian clock genes in hormone release and target tissue sensitivity in the reproductive axis. *Molecular and cellular endocrinology*, 501, 110655. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110655>
  46. Zheng, Y., Liu, C., Li, Y., Jiang, H., Yang, P., Tang, J., Xu, Y., Wang, H., & He, Y. (2019). Loss-of-function mutations with circadian rhythm regulator Per1/Per2 lead to premature ovarian insufficiency†. *Biology of reproduction*, 100(4), 1066-1072. <https://doi.org/10.1093/biore/roy245>
  47. Lateef, O. M., & Akintubosun, M. O. (2020). Sleep and Reproductive Health. *Journal of circadian rhythms*, 18, 1. <https://doi.org/10.5334/jcr.190>
  48. Caetano, G., Bozinovic, I., Dupont, C., Léger, D., Lévy, R., & Sermondade, N. (2021). Impact of sleep on female and male reproductive functions: a systematic review. *Fertility and sterility*, 115(3), 715-731. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.08.1429>
  49. Rahman, S. A., Grant, L. K., Gooley, J. J., Rajaratnam, S. M. W., Czeisler, C. A., & Lockley, S. W. (2019). Endogenous Circadian Regulation of Female Reproductive Hormones. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 104(12), 6049-6059. <https://doi.org/10.1210/je.2019-00803>
  50. Shao, S., Zhao, H., Lu, Z., Lei, X., & Zhang, Y. (2021). Circadian Rhythms Within the Female HPG Axis: From Physiology to Etiology. *Endocrinology*, 162(8), bqab117. <https://doi.org/10.1210/endoor/bqab117>
  51. Mindell, J. A., Cook, R. A., & Nikolovski, J. (2015). Sleep patterns and sleep disturbances across pregnancy. *Sleep medicine*, 16(4), 483-488. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2014.12.006>
  52. Juulia Paavonen, E., Saarenpää-Heikkilä, O., Pölkki, P., Kylliäinen, A., Porkka-Heiskanen, T., & Paunio, T. (2017). Maternal and paternal sleep during pregnancy in the Child-sleep birth cohort. *Sleep medicine*, 29, 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2016.09.011>
  53. Man, G. C. W., Zhang, T., Chen, X., Wang, J., Wu, F., Liu, Y., Wang, C. C., Cheong, Y., & Li, T. C. (2017). The regulations and role of circadian clock and melatonin in uterine receptivity and pregnan-



- cy-An immunological perspective. *American journal of reproductive immunology*, 78(2), 10.1111/aji.12715. <https://doi.org/10.1111/aji.12715>
54. Ejaz, H., Figaro, J. K., Woolner, A. M. F., Thottakam, B. M. V., & Galley, H. F. (2021). Maternal Serum Melatonin Increases During Pregnancy and Falls Immediately After Delivery Implicating the Placenta as a Major Source of Melatonin. *Frontiers in endocrinology*, 11, 623038. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.623038>
  55. Firneisz, G., Rosta, K., Al-Aissa, Z., Hadarits, O., Harreiter, J., Nádasdi, Á., Bancher-Todesca, D., Németh, L., Igaz, P., Rigó, J., Jr, Sziller, I., Kautzky-Willer, A., & Somogyi, A. (2018). The *MTNR1B* rs10830963 Variant in Interaction with Pre-Pregnancy BMI is a Pharmacogenetic Marker for the Initiation of Antenatal Insulin Therapy in Gestational Diabetes Mellitus. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 3734. <https://doi.org/10.3390/ijms19123734>
  56. Nisa, H., Qi, K. H. T., Leng, J., Zhou, T., Liu, H., Li, W., Wang, L., Li, N., Hu, G., & Qi, L. (2018). The Circadian Rhythm-Related *MTNR1B* Genotype, Gestational Weight Gain, and Postpartum Glycemic Changes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 103(6), 2284-2290. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00071>
  57. Laste, G., Silva, A. A. D., Gheno, B. R., & Rychcik, P. M. (2021). Relationship between melatonin and high-risk pregnancy: A review of investigations published between the years 2010 and 2020. *Chronobiology international*, 38(2), 168-181. <https://doi.org/10.1080/07420528.2020.1863975>
  58. Xu, Y. H., Shi, L., Bao, Y. P., Chen, S. J., Shi, J., Zhang, R. L., & Lu, L. (2018). Association between sleep duration during pregnancy and gestational diabetes mellitus: a meta-analysis. *Sleep medicine*, 52, 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2018.07.021>
  59. Wang, H., Leng, J., Li, W., Wang, L., Zhang, C., Li, W., Liu, H., Zhang, S., Chan, J., Hu, G., Yu, Z., & Yang, X. (2017). Sleep duration and quality, and risk of gestational diabetes mellitus in pregnant Chinese women. *Diabetic medicine*, 34(1), 44-50. <https://doi.org/10.1111/dme.13155>
  60. Zhang, X., Zhang, R., Cheng, L., Wang, Y., Ding, X., Fu, J., Dang, J., Moore, J., & Li, R. (2020). The effect of sleep impairment on gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Sleep medicine*, 74, 267-277. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2020.05.014>
  61. Facco, F. L., Parker, C. B., Reddy, U. M., Silver, R. M., Koch, M. A., Louis, J. M., Basner, R. C., Chung, J. H., Nhan-Chang, C. L., Pien, G. W., Redline, S., Grobman, W. A., Wing, D. A., Simhan, H. N., Haas, D. M., Mercer, B. M., Parry, S., Mobley, D., Hunter, S., Saade, G. R., ... Zee, P. C. (2017). Association Between Sleep-Disordered Breathing and Hypertensive Disorders of Pregnancy and Gestational Diabetes Mellitus. *Obstetrics and gynecology*, 129(1), 31-41. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001805>
  62. Bourjeily, G., Danilack, V. A., Bublitz, M. H., Lipkind, H., Muri, J., Caldwell, D., Tong, I., & Rosene-Montella, K. (2017). Obstructive sleep apnea in pregnancy is associated with adverse maternal outcomes: a national cohort. *Sleep medicine*, 38, 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2017.06.035>
  63. Balsarak, B. I., Zhu, B., Grandner, M. A., Jackson, N., & Pien, G. W. (2019). Obstructive sleep apnea in pregnancy: performance of a rapid screening tool. *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung*, 23(2), 425-432. <https://doi.org/10.1007/s11325-018-1724-5>
  64. Newbold, R., Benedetti, A., Kimoff, R. J., Meltzer, S., Garfield, N., Dasgupta, K., Gagnon, R., Lavigne, L., Olha, A., Rey, E., & Pamidi, S. (2021). Maternal Sleep-Disordered Breathing in Pregnancy and Increased Nocturnal Glucose Levels in Women with Gestational Diabetes Mellitus. *Chest*, 159(1), 356-365. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.07.014>
  65. Asuaje Pfeifer, M., Liebmann, M., Beuerle, T., Grupe, K., & Scherneck, S. (2022). Role of Serotonin (5-HT) in GDM Prediction Considering Islet and Liver Interplay in Prediabetic Mice during Gestation. *International journal of molecular sciences*, 23(12), 6434. <https://doi.org/10.3390/ijms23126434>
  66. Klishch, I. M., Bezkorovayna, H. O., & Khara, M. R. (2019). Aktyvnist perekysnoho oksynennia lipidiv ta antyoksydantnoho zakhystu miokarda tvaryn riznoi stati pry poshkodzenni adrenalinom na tii svitlovoho desynkronozu [The activity of lipid peroxidation and antioxidant protection of the myocardium of different sex animals at adrenaline damage on the background of light desynchronization]. *Klinichna ta eksperymentalna patohiia*, 18(4), 30-35. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.24061/1727-4338.XVIII.4.70.2019.5>
  67. Khara, M. R., Bezkorovayna, H. O., Klishch, I. M., & Pelykh, V. Ye. (2020). Sex differences in the cardiac cholinergic response to adrenalin-induced myocardial necrosis and light desynchronization. *Pathologia*, 17(2), 142-148. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2020.2.212727>