

The role of clinical and immunological parameters in predicting the effectiveness of additional immunotropic therapy in oxygen-dependent patients with COVID-19 coronavirus disease

O. V. Riabokon^{ID}*^{A,F}, V. V. Cherkaskyi^{ID}^{B,C,D}, Yu. Yu. Riabokon^{ID}^{C,D,E}, A. V. Vynokurova^{B,C}

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. The purpose of the research is to find out the role of clinical and immunological parameters in predicting the effectiveness of additional immunotropic therapy in oxygen-dependent patients with the coronavirus disease COVID-19.

Material and methods. 79 oxygen-dependent patients with COVID-19 were examined, who received additional therapy with tocilizumab according to current protocols. The patients were divided into groups: I group – 39 patients who recovered; group II – 40 patients with a fatal outcome of the disease. The content of ferritin (Monobind Inc., USA), interleukin (IL) IL-2 (Elabscience, USA), IL-6 (Invitrogen, Austria), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) (Elabscience, USA) was determined in the blood serum of patients and persons of the control group by the method of immunoenzymatic analysis. Statistical processing of the obtained data was carried out in the program Statistica 13 for Windows (StatSoft Inc., No. JPZ8041382130ARCN10-J).

Results. Threshold levels of immunological parameters at different stages of observation, which have prognostic value regarding the risk of a fatal outcome of COVID-19, have been established. After 5 days of tocilizumab administration, the preservation of the indicator of the absolute number of blood lymphocytes $\leq 1.2 \times 10^9/l$ (AUC = 0.631, $p = 0.039$), CRP level >67.5 mg/l (AUC = 0.670, $p = 0.020$), IL-2 >309.45 pg/ml (AUC = 0.761, $p = 0.013$), IL-6 >4.66 pg/ml (AUC = 0.871, $p < 0.001$) indicated a high probability of developing a fatal outcome of the disease in patients with COVID-19. The analysis of the diagnostic significance of ferritin showed the informativeness of the level of its increase as at the time of the start of observation >548.02 ng/ml (AUC = 0.718, $p = 0.004$) and after 5 days the application of additional immunotropic therapy >443.55 ng/ml (AUC = 0.736, $p = 0.026$).

It has been proven that, in addition to immunological parameters, when assessing the probability of a fatal outcome of COVID-19, such clinical parameters as the presence of febrile fever at the time of the appearance of oxygen dependence ($p < 0.05$) and the duration of oxygen dependence at the time of additional immunotropic therapy with tocilizumab are informative ($p < 0.05$). Under the conditions of additional immunotropic therapy with tocilizumab more than 4 days after the onset of oxygen dependence, the probability of ineffectiveness of the specified additional treatment was significant (AUC = 0.756, $p < 0.001$).

Conclusions. The dynamics of immunological parameters in oxygen-dependent patients with COVID-19 during additional immunotropic therapy with tocilizumab has certain features with different treatment results. When predicting the probable risk of a fatal outcome of the disease, clinical parameters are informative, namely the appearance of febrile fever during the development of oxygen dependence and the duration of oxygen dependence until the moment of tocilizumab administration, and immunological parameters, namely the level of the absolute content of lymphocytes, ferritin, CRP, IL-2, IL-6 in the blood.

Key words:

coronavirus disease, COVID-19, viral infection, oxygen dependence, immunology, cytokines, clinic, diagnosis, treatment, prognosis.

Pathologia, 2023, 20(3), 207-217

*E-mail:

ryabokonksmu@ukr.net

Роль клінічних та імунологічних параметрів у прогнозуванні ефективності додаткової імунотропної терапії в кисневозалежних хворих на коронавірусну хворобу COVID-19

О. В. Рябоконе, В. В. Черкаський, Ю. Ю. Рябоконе, А. В. Винокурова

Мета роботи – з'ясувати роль клінічних та імунологічних параметрів у прогнозуванні ефективності додаткової імунотропної терапії в кисневозалежних хворих на коронавірусну хворобу COVID-19.

Матеріали та методи. Обстежили 79 кисневозалежних хворих на COVID-19, які отримали додаткову терапію тоцилізумабом, відповідно до чинних протоколів. Пацієнтів поділили на групи: I – 39 осіб, які одужали; II – 40 хворих із летальним наслідком. Методом імуноферментного аналізу в сироватці крові хворих та осіб контрольної групи визначали вміст феритину (Monobind Inc., USA), інтерлейкіну (IL) IL-2 (Elabscience, USA), IL-6 (Invitrogen, Austria), моноцитарного хемотактичного протеїну-1 (MCP-1) (Elabscience, USA). Статистично результати опрацювали в Statistica 13 for Windows (StatSoft Inc., ліцензія № JPZ8041382130ARCN10-J).

Результати. Встановлено межові рівні імунологічних параметрів на різних етапах спостереження, що мають прогностичне значення щодо ризику летального наслідку COVID-19. Через 5 діб після введення тоцилізумабу збереження показника абсолютної кількості лімфоцитів крові $\leq 1,2 \times 10^9/l$ (AUC = 0,631, $p = 0,039$), рівня CRP $>67,5$ mg/l (AUC = 0,670, $p = 0,020$), IL-2 $>309,45$ pg/ml (AUC = 0,761, $p = 0,013$), IL-6 $>4,66$ pg/ml (AUC = 0,871, $p < 0,001$) свідчило про високу ймовірність настання летального наслідку хвороби в пацієнтів із COVID-19. Аналіз діагностичної значущості феритину

Ключові слова:

коронавірусна хвороба, COVID-19, вірусна інфекція, киснева залежність, імунологія, цитокіни, клініка, діагностика, лікування, прогноз.

Патологія. 2023, Т. 20, № 3(59), С. 207-217

показав інформативність рівня його підвищення і на початку спостереження ($>548,02$ ng/ml; AUC = 0,718, $p = 0,004$), і через 5 діб від застосування додаткової імунотропної терапії ($>443,55$ ng/ml; AUC = 0,736, $p = 0,026$).

Крім імунологічних, під час оцінювання ймовірності летального наслідку COVID-19 інформативними є такі клінічні параметри: наявність фебрильної лихоманки на час виникнення кисневої залежності ($p < 0,05$), тривалість періоду кисневої залежності на час додаткової імунотропної терапії тоцилізумабом ($p < 0,05$). Якщо додаткова імунотропна терапія тоцилізумабом проведена більш ніж через 4 доби від виникнення кисневої залежності, ймовірність неефективності цього додаткового лікування значуща (AUC = 0,756, $p < 0,001$).

Висновки. Динаміка імунологічних параметрів у кисневозалежних хворих на COVID-19 під час додаткової імунотропної терапії тоцилізумабом має певні особливості при різних результатах лікування. Під час прогнозування ймовірного ризику летального наслідку хвороби інформативними є клінічні (виникнення фебрильної лихоманки при розвитку кисневої залежності та тривалість кисневої залежності до введення тоцилізумабу) та імунологічні (рівень абсолютного вмісту лімфоцитів, феритину, CRP, IL-2, IL-6 у крові) параметри.

The coronavirus disease COVID-19 is accompanied by the development of acute respiratory distress syndrome with the appearance of oxygen dependence in almost every fifth patient, which is currently explained by the formation of an excessive immune response with the production of a significant number of pro-inflammatory cytokines [1,2]. Such acute uncontrolled hyperproduction of pro-inflammatory cytokines is called “cytokine storm”, which causes not only lung damage, but also the development of multiple organ insufficiency [1,3]. This explains the role of excessive activation of immunocompetent cells in the formation of adverse consequences of COVID-19 [4,5]. In researches that study the features of the “cytokine storm” in the case of coronavirus disease COVID-19, attention is drawn to a significant increase of IL-6 content [6,7,8]. It is believed that the main role of IL-6 in the immunopathogenesis of COVID-19 is related to the formation of a pro-inflammatory CD4⁺ T-cell response, stimulation of the cytotoxic activity of CD8⁺ lymphocytes, differentiation of B-lymphocytes into plasma cells with subsequent production of antibodies [7,9].

Understanding the leading role of immune-dependent mechanisms in the progression of COVID-19 led to the rapid search for options for effective immunotropic therapy of this disease for oxygen-dependent patients. However, in the conditions of the COVID-19 pandemic, only the repurposing of drugs as a method of developing drugs for the treatment of patients with SARS-CoV-2 infection made it possible to significantly reduce the period of time compared to the creation and research of *de novo* drugs [10].

The first randomized research on the feasibility of using corticosteroids in the treatment of oxygen-dependent patients with COVID-19 made it possible not only to answer this question, but also to determine the minimum dose that has a therapeutic effect [11]. It was proven in the British randomized research RECOVERY that the introduction of dexamethasone at a dose of 6 mg per day, compared to placebo, allowed to reduce the mortality rate (22.9 % vs. 25.7 %) [11]. A subsequent clinical research comparing the efficacy of different doses of dexamethasone in patients with COVID-19 and severe hypoxemia showed that increasing the dose of dexamethasone to 12 mg/day compared to 6 mg/day did not result in a statistically significant mortality reduction when patients were followed for 28 days [12]. Studies that were devoted to finding out the effectiveness of other corticosteroids were stopped immediately after receiving the RECOVERY results. Since that corticosteroids became a standard of

treatment for oxygen-dependent patients with COVID-19 [13,14].

However, on the one hand, insufficient effectiveness of the use of corticosteroids in oxygen-dependent patients, and on the other hand, the appearance of numerous researches, which proved the association of a high level of IL-6 with the development of a severe course of COVID-19 and the risk of a fatal outcome [6,15,16], determined the relevance of the use of cytokine-targeted therapy as an additional treatment by corticosteroids [17]. Therefore, the IL-6 receptor inhibitor (tocilizumab), which is a recombinant humanized monoclonal antibody to IL-6 receptors, was quickly introduced into clinical practice for severe forms of COVID-19, and currently it is used for the treatment of rheumatoid arthritis as an immunobiological drug [18]. However, prescribing tocilizumab for patients with COVID-19 remained outside the instructions for medical use (“off-label”), despite its inclusion in a number of international recommendations [19,20].

In accordance with existing international recommendations, tocilizumab was also included in the Protocol for the provision of medical assistance for the treatment of coronavirus disease (COVID-19) and approved by the Order of the Ministry of Health of Ukraine as an additional therapy to corticosteroids in severe and critical course of the disease, in which rapid decompensation of breathing is noted. This made it possible to use this variant of immunotropic treatment in patients who belong to the risk group due to the presence of comorbid conditions [21,22]. However, the results of various studies regarding the effectiveness of the use of tocilizumab in clinical practice have certain discrepancies. On the one hand, the literature presents research that demonstrate a decrease in the mortality rate among patients with COVID-19 who received additional treatment with tocilizumab [23,24]. On the other hand, according to the results of the research [25], it was proved that there are no advantages of additional treatment with tocilizumab.

Therefore, the above determines the expediency of finding out the dynamics of immunological changes in oxygen-dependent patients with COVID-19 who received additional therapy with tocilizumab, but had different disease outcomes, in order to determine informative prognostic predictors of the effectiveness of such immunotropic treatment. To find out the role of clinical and immunological parameters in predicting the effectiveness of additional immunotropic therapy in oxygen-dependent patients with the coronavirus disease COVID-19.

Material and methods

79 oxygen-dependent patients with COVID-19 were examined, who during 2020–2021 were treated in the Department of Anesthesiology and Intensive Care (ICU) of the Communal Non-Profit Enterprise “Regional Infectious Clinical Hospital of the Zaporizhzhia Regional Council”. The diagnosis of COVID-19 was confirmed by the isolation of RNA-SARS-CoV-2 in nasopharyngeal mucus or sputum by the polymerase chain reaction method. All patients were not vaccinated against COVID-19. The age of the patients was from 28 to 85 years. There were 41 men and 38 women. All patients were examined and treated in accordance with current regulations. Order of the Ukraine Ministry of Health (UMoH) dated 28.03.2020 No. 722 “Organization of medical care for patients with coronavirus disease (COVID-19)” (as amended by the order of the UMoH dated 17.09.2020 No. 2122 “On amendments to the Standards of medical care “Coronavirus disease (COVID-19)”. Order of the UMoH No. 10 dated 07.01.2021 “On approval of Amendments to the Standards of medical care “Coronavirus disease (COVID-19)”. Order of the UMoH from April 6, 2021 No. 638 “Protocol for the provision of medical care for the treatment of coronavirus disease (COVID-19)”.

Taking into account the possibility of additional immunotropic therapy with tocilizumab for oxygen-dependent patients in which a positive effect is not achieved after the appointment of corticosteroids, our research included patients who received additional therapy with tocilizumab at a dose of 800 mg intravenously.

To clarify the role of immunological parameters in predicting the effectiveness of additional immunotropic therapy with tocilizumab in oxygen-dependent patients with the coronavirus disease COVID-19, patients were divided into groups depending on the outcome of the disease: group I – 39 patients who recovered; group II – 40 patients with a fatal outcome of the disease. Charlson's comorbidity index [26] was used to compare groups of patients according to comorbid pathology.

The research was carried out in compliance with the provisions of “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 basis and provided written informed consent.

Special research methods included the determination of ferritin content in the blood serum of all patients with COVID-19 and 20 healthy individuals of the control group by the method of immunoenzymatic analysis of ferritin content (Monobind Inc., USA), interleukin (IL), IL-2 (Elabscience, USA), IL-6 (Invitrogen, Austria), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (Elabscience, USA) according to the instructions provided by the manufacturers. Enzyme immunoassays were conducted on the basis of the Educational Medical Laboratory center of the Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University (scientific consultant – PhD, DSc, Associate Professor R. O. Shcherbina).

Statistical processing of the obtained data was carried out in the program Statistica 13 for Windows (StatSoft Inc., No. JPZ804I382130ARCN10-J). Non-parametric statistical methods were used in the work, the investigated

Table 1. Comparison of basic demographic indicators and oxygen status parameters of oxygen-dependent patients with the coronavirus disease COVID-19

Indicator, units of measurement	Patients with COVID-19	
	I group (n = 39)	II group (n = 40)
Age, Me [Q 25; Q 75]	62.0 [55.0; 71.0]	66.0 [54.0; 71.0]
Men, abs (%)	23 (59.0)	18 (45.0)
Women, abs (%)	16 (41.0)	22 (55.0)
Charlson comorbidity index	5.0 [2.0; 5.0]	5.0 [3.5; 6.0]
Hospitalization to ICU, day of illness	9.0 [8.0; 11.0]	8.5 [7.0; 10.0]
Term of additional use of tocilizumab, day of illness	12.0 [11.0; 14.0]	12.5 [10.0; 14.0]
Air oxygen saturation index at the time of hospitalization in the intensive care unit, %	84.0 [80.0; 88.0]	79.0 [77.5; 84.5]

quantitative parameters are presented in the form of Me [Q25; Q75]. The χ^2 test was used to assess the reliability of differences between qualitative characteristics, the Mann–Whitney test was used between quantitative characteristics in independent samples, the Wilcoxon test was used between quantitative characteristics in dependent samples, and ROC-analysis was used to cut off the threshold level of the indicator.

Results

Based on the results of the analysis of demographic indicators of oxygen-dependent patients with COVID-19 who received additional immunotropic therapy with tocilizumab, it was established that the patients of the I and II studied groups did not statistically differ in terms of age ($p > 0.05$), gender ($\chi^2 = 1.54$, $p > 0.05$), comorbidities according to the Charlson comorbidity index ($p > 0.05$). In addition, the patients of the research groups at the time of hospitalization to ICU with the appearance of oxygen dependence did not statistically differ in terms of duration of the disease ($p > 0.05$); oxygen saturation in air ($p > 0.05$); the day of the disease, on which additional therapy with tocilizumab was applied ($p > 0.05$) (Table 1). In patients of the II group, the fatal outcome of the disease was recorded at 25.5 [18.0; 29.0] day of illness.

Changes in immunological indicators during the development of oxygen dependence were characterized in patients of both research groups by a decrease in the absolute number of lymphocytes, a significant increase the level of acute-phase indicators (CRP and ferritin), pro-inflammatory interleukins (IL-2 and IL-6) and the chemokine MCP-1. The analysis of the changes in these parameters 5 days after the application of additional immunotropic therapy with tocilizumab showed a clear dependence of the dynamics of the absolute number of lymphocytes, CRP, IL-2 and IL-6 on the outcome of the coronavirus disease COVID-19. Thus, in the I group of patients whose disease ended with recovery, 5 days after additional immunotropic therapy with tocilizumab, an increase the absolute number of blood lymphocytes ($p < 0.01$) and a decrease the level of CRP ($p < 0.01$) in blood serum were noted, compared with the corresponding indicators before the use of tocilizumab. In contrast to the patients who recovered, in patients of the II group, a further increase in the level of IL-2 ($p < 0.05$) and IL-6 ($p < 0.05$) in the blood serum was noted against the background of additional immunotropic treatment, as well

Table 2. Dynamics of immunological parameters of oxygen-dependent patients with COVID-19 against the background of additional immunotropic therapy depending on the outcome of the disease

Indicator, units of measurement	Healthy individuals (n = 20)	I group (n = 39)		II group (n = 40)	
		to additional use of tocilizumab	5 days after tocilizumab administration	to additional use of tocilizumab	5 days after tocilizumab administration
Lymphocytes, ×10 ⁹ /l	1.2–3.2	0.70 [0.60; 0.90]	1.20 [0.70; 1.40] ²	0.80 [0.50; 0.95]	0.80 [0.60; 1.00] ³
CRP, mg/l	<5.0	80.4 [47.3; 176.0]	27.1 [6.2; 58.3] ²	97.4 [41.3; 158.2]	70.2 [11.0; 200.0] ³
Ferritin, ng/ml	<150.0	502.7 [404.0; 548.3]	411.5 [217.3; 546.0]	549.0 [521.0; 734.0] ³	523.0 [483.0; 581.0] ³
IL-2, pg/ml	16.82 [2.74; 30.90]	96.70 [45.70; 300.70] ¹	250.0 [151.00; 336.50] ^{1,2}	237.10 [168.70; 309.50] ¹	367.57 [329.46; 494.28] ^{1,2,3}
IL-6, pg/ml	0.62 [0.24; 0.96]	4.28 [2.48; 5.18] ¹	4.46 [4.00; 5.00] ¹	4.60 [3.50; 4.80] ¹	8.49 [5.58; 11.26] ^{1,2,3}
MCP-1, pg/ml	18.3 [15.9; 19.45]	38.42 [20.05; 48.82] ¹	37.65 [20.03; 62.30] ¹	53.50 [36.80; 103.90] ¹	52.05 [19.55; 123.74] ¹

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

as the absence of statistically significant changes in the indicators of the absolute amount lymphocytes and CRP ($p > 0.05$) (Table 2).

Comparison the expressiveness of indicators of immunological changes in patients with COVID-19 showed that with the appearance of oxygen dependence, the absolute content of lymphocytes, the level of CRP, IL-2 and IL-6, the chemokine MCP-1 in patients of the I and II groups did not differ statistically ($p > 0.05$). During this period of observation, only the content of ferritin was higher in patients of the II group ($p < 0.05$) than in the patients of the I group. However, in the dynamics, after 5 days introduction of tocilizumab in patients of the I group, the absolute number of blood lymphocytes was statistically significantly higher ($p < 0.05$), and the content of CRP, ferritin, IL-2 and IL-6 was lower ($p < 0.05$), than in patients of the II group (Table 2).

In our opinion, the peculiarity of the dynamics of changes in immunological parameters in oxygen-dependent patients with COVID-19 with different disease outcomes with the additional use of tocilizumab, determined by us, determined in the further part of the work the expediency of finding out the diagnostic significance of the level of changes in these parameters in predicting the effectiveness of this additional immunotropic therapy in patients at different periods of observation.

When assessing the diagnostic significance of the absolute number of blood lymphocytes at the onset of oxygen dependence in patients with COVID-19, according to the results of the ROC-analysis, it was established that the threshold level of this indicator had no prognostic value (AUC = 0.515, $p = 0.824$) (Fig. 1A). However, in dynamics, after 5 days the introduction of tocilizumab, the threshold level of the absolute number of blood lymphocytes $\leq 1.2 \times 10^9/l$ was established, which indicated a high probability of the development of a fatal outcome of the disease in oxygen-dependent patients with COVID-19 (AUC = 0.631, $p = 0.039$) (sensitivity – 97.50 %, specificity – 33.33 %) (Fig. 1B).

The level of increased CRP in oxygen-dependent patients at the time of the development of oxygen dependence did not have diagnostic value in predicting the probability of a fatal outcome of the disease (AUC = 0.539, $p = 0.587$) (Fig. 2A), however, after 5 days the use of additional immunotropic therapy with tocilizumab the level of CRP increase, which remains at the level of >67.5 mg/l, had a diagnostic value in predicting the probability of a fatal outcome of the di-

sease (AUC = 0.670, $p = 0.020$) (sensitivity – 51.72 %, specificity – 90.00 %) (Fig. 2B).

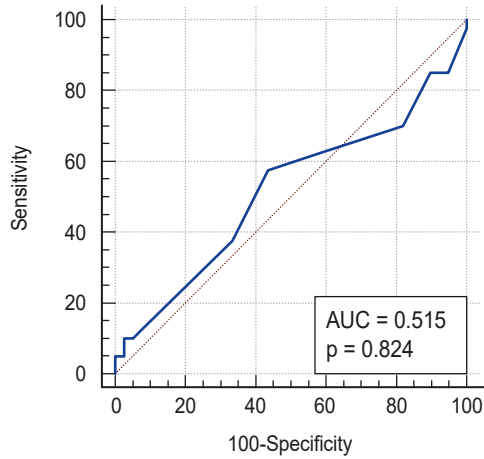
Analysis of the diagnostic significance of another acute-phase indicator, namely ferritin, showed that, unlike CRP, the level of increase of this indicator according to the data of the ROC-analysis had diagnostic significance in terms of predicting the fatal outcome of the disease in patients at the time of observation and 5 days from the moment of application of additional immunotropic therapy. So, with the development of oxygen dependence, the level of ferritin >548.02 ng/ml (AUC = 0.718, $p = 0.004$) (sensitivity – 71.43 %, specificity – 68.00 %) (Fig. 3A), and 5 days after additional use of tocilizumab, the elevated level of ferritin remained >443.55 ng/ml (AUC = 0.736, $p = 0.026$) (sensitivity – 80.00 %, specificity – 71.43 %) (Fig. 3B) indicated to the high probability of a fatal outcome of the disease.

The assessment of diagnostic significance the level of increased IL-2 content in blood serum according to the data of the ROC-analysis demonstrated that at the time of the beginning of the observation, this indicator had no diagnostic significance for assessment the risk of a fatal outcome of the disease (AUC = 0.684, $p = 0.063$) (Fig. 4A). The level of increased IL-2 in blood serum had diagnostic value after 5 days the application of additional immunotropic therapy with tocilizumab, namely, under the conditions of maintaining an elevated IL-2 content in blood serum >309.45 pg/ml, the probability of a fatal outcome was significant (AUC = 0.761, $p = 0.013$) (sensitivity – 83.30 %, specificity – 73.30 %) (Fig. 4B).

A similar pattern was obtained when assessing the diagnostic significance of the increased level of IL-6 in blood serum in dynamics of treatment with a use of additional immunotropic therapy. Thus, at the time of the beginning of observation, this indicator did not have diagnostic significance in terms of assessing the risk of a fatal outcome of the disease (AUC = 0.536, $p = 0.730$) (Fig. 5A). The diagnostic value of the increased level of IL-6 in the blood serum was 5 days after the application of additional immunotropic therapy with tocilizumab, namely, under the conditions of maintaining the elevated content of IL-6 in the blood serum >4.66 pg/ml, the probability of a fatal outcome was significant (AUC = 0.871, $p < 0.001$) (sensitivity – 93.75 %, specificity – 68.75 %) (Fig. 5B).

In addition to directly evaluating changes in immunological parameters and clarifying their diagnostic significance in predicting the probability of a fatal outcome of

1A



1B

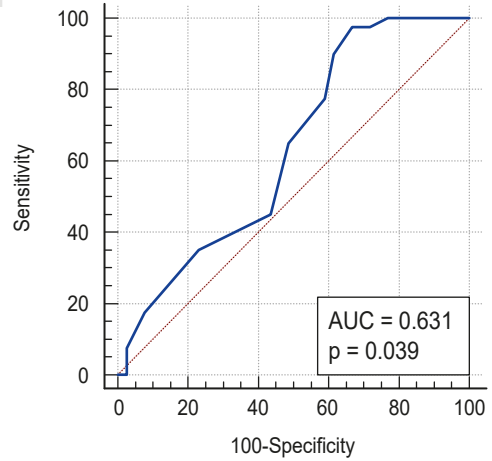
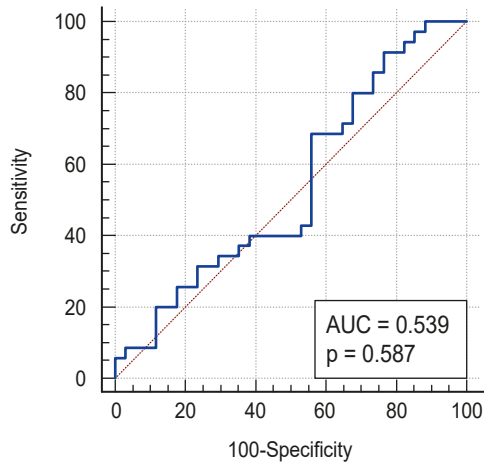


Fig. 1. Prediction of the probability of the development of a fatal outcome of the disease in oxygen-dependent patients with COVID-19 who received additional immunotropic therapy, based on the indicator of the absolute number of blood lymphocytes in the dynamics of observation.

2A



2B

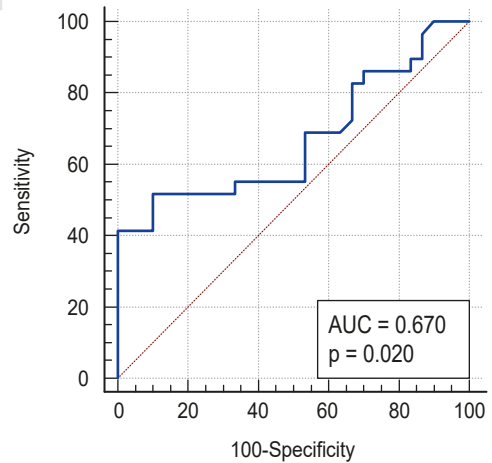
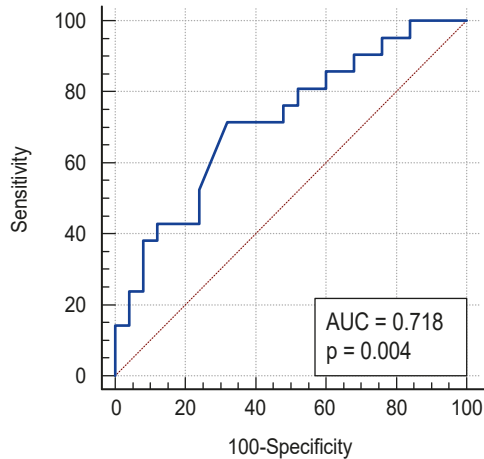


Fig. 2. Prediction of the probability of the development of fatal outcome of the disease in oxygen-dependent patients with COVID-19 who received additional immunotropic therapy, based on the CRP indicator in the blood in dynamics of observation.

3A



3B

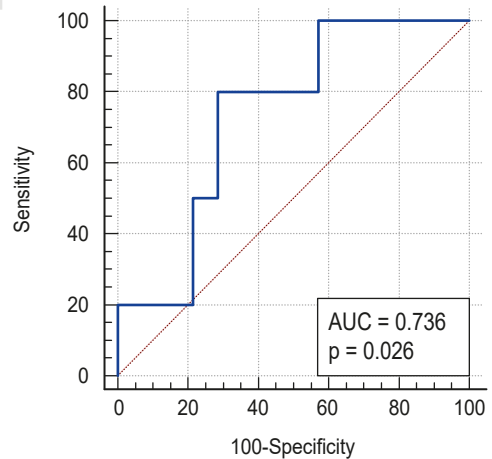


Fig. 3. Prediction of the probability the development of a fatal outcome of the disease in oxygen-dependent patients with COVID-19 who received additional immunotropic therapy, based on the ferritin indicator in the blood in dynamics of observation.

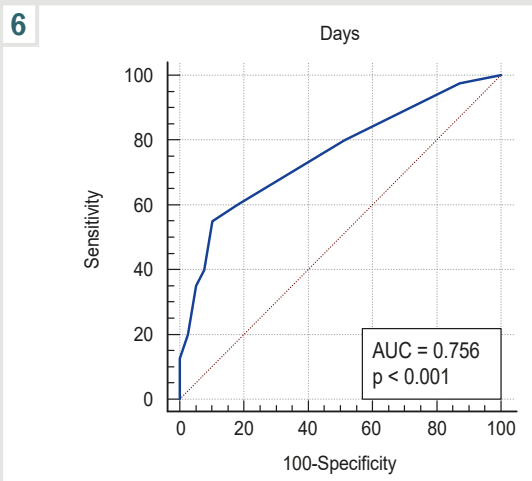
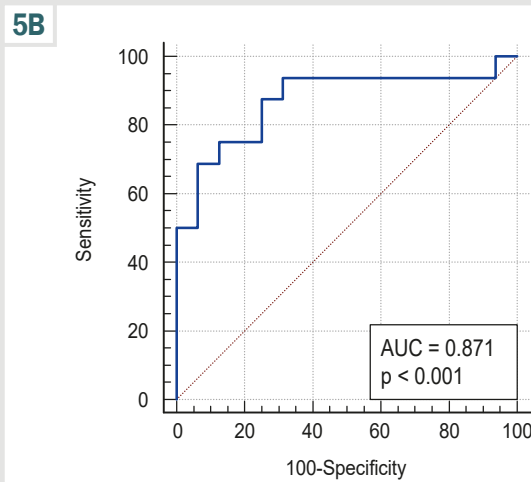
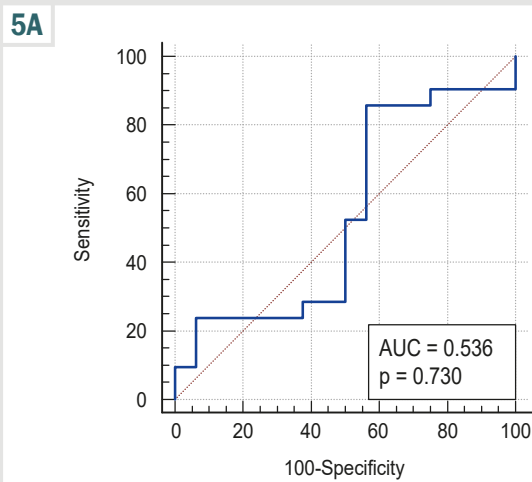
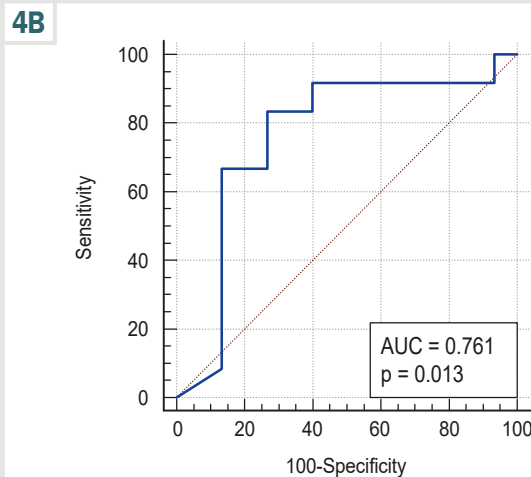
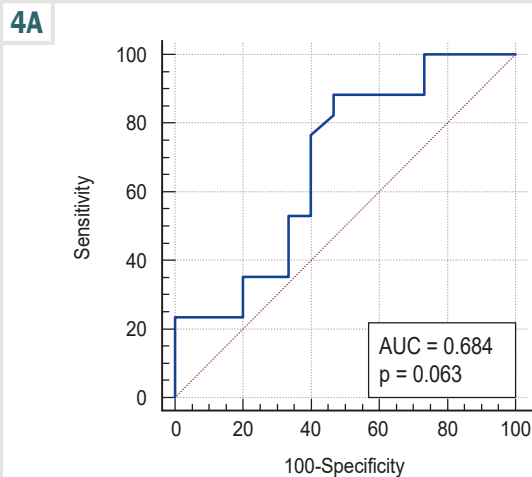


Fig. 4. Prediction of the probability the development of a fatal outcome of the disease in oxygen-dependent patients with COVID-19 who received additional immunotropic therapy, based on the IL-2 indicator in the blood in dynamics of observation.

Fig. 5. Prediction of the probability the development of a fatal outcome of the disease in oxygen-dependent patients with COVID-19 who received additional immunotropic therapy, according to the IL-6 indicator in blood serum in the dynamics of observation.

Fig. 6. Prediction of the probability of ineffectiveness of additional immunotropic therapy with tocilizumab according to the development of the fatal outcome of the disease in oxygen-dependent patients with COVID-19 according to the indicator of the duration of oxygen dependence at the time of application of additional immunotropic treatment.

COVID-19, in our opinion, it is also important to assess the prognostic significance of such clinical components of the “cytokine storm” as the presence of febrile fever at the time of oxygen dependence, the duration time of oxygen dependence at the time of additional immunotropic therapy with tocilizumab.

It should be noted that the patients of both investigated groups did not statistically differ in terms of the day of

illness, on which they were hospitalized to ICU with the appearance of oxygen dependence ($p > 0.05$) (Table 1). However, period of time from the moment of oxygen dependence to the moment of additional immunotropic therapy with tocilizumab in patients of the investigated groups was statistically significantly different. Thus, patients of the I group received additional immunotropic therapy with tocilizumab by 3.0 [2.0; 3.0] day of appea-

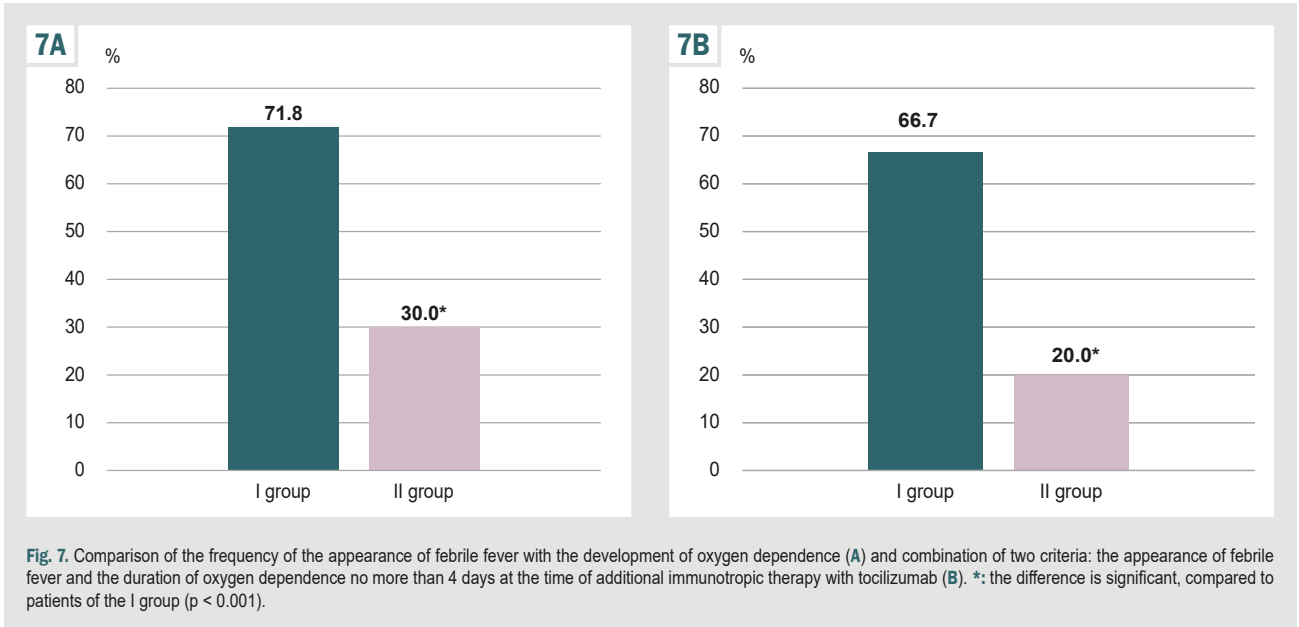


Fig. 7. Comparison of the frequency of the appearance of febrile fever with the development of oxygen dependence (A) and combination of two criteria: the appearance of febrile fever and the duration of oxygen dependence no more than 4 days at the time of additional immunotropic therapy with tocilizumab (B). *: the difference is significant, compared to patients of the I group ($p < 0.001$).

range of oxygen dependence against 5.0 [3.0; 7.0] day of patients of the II group ($p < 0.001$).

Taking into account the statistically significant difference regarding duration of additional immunotropic therapy in patients with different disease outcomes, we conducted ROC-analysis to find out the diagnostic significance of this indicator in predicting the effectiveness of specified additional therapy. According to the results of the ROC-analysis, it was established that under the conditions of additional immunotropic therapy with tocilizumab more than 4 days after the onset of oxygen dependence, the probability of ineffectiveness of the indicated additional treatment, that is the fatal outcome of the disease, was significant (AUC = 0.756, $p < 0.001$) (sensitivity – 55.00 %, specificity – 89.74 %) (Fig. 6).

An analysis of frequency of occurrence febrile fever, which accompanied the development of oxygen dependence in patients with COVID-19, and may be one of the clinical components of the “cytokine storm”, showed that its frequency was statistically significantly higher in patients of the I group who recovered ($\chi^2 = 13.8$, $p = 0.0002$) than in patients of the II group, in which the disease ended fatally: in 28 (71.8 %) versus 12 (30.0 %) patients (Fig. 7A). In addition, the frequency of combination of such two indicators as the presence of febrile fever at the time of the appearance of oxygen dependence and the duration of oxygen dependence no more than 4 days at the time of additional immunotropic therapy with tocilizumab in patients of the I group was statistically significantly higher ($\chi^2 = 21.36$, $p = 0.0001$) than in patients of the II group: in 26 (66.7 %) versus 8 (20.0 %) patients (Fig. 7B).

Discussion

According to the data of many researches [6,7,8] and meta-analysis [7], it was proved that the vast majority of patients with severe and critical course of COVID-19 have high concentrations of IL-6 and higher mortality rate [7]. Taking into account this fact, already at the beginning of the pandemic, it was assumed that the use of

IL-6 receptor antagonist (tocilizumab) is a theoretically justified therapeutic strategy to reduce the consequences of the developing “cytokine storm” [23]. Tocilizumab is a recombinant humanized monoclonal antibody that blocks soluble and membrane IL-6 receptors [27]. Tocilizumab is characterized by a non-linear pharmacological profile and has a relatively long half-life of 5 to 12 days [28]. However, despite the theoretical rationale for the use of tocilizumab, the results in clinical practice are ambiguous [23].

Today, the clinical and laboratory evaluation of the effectiveness of such immunotropic treatment remains relevant, in particular the evaluation of the ability of tocilizumab to restore the number of T-lymphocytes in the blood of patients with severe forms of COVID-19 by blocking the transmission of IL-6 signals [29]. In addition, researches continues to clarify the clinical-pathogenetic and prognostic role of various immunological parameters with the additional use of tocilizumab in patients with COVID-19 who receive systemic corticosteroids and require oxygen therapy or artificial lung ventilation [30,31].

According to the results of our research, such parameters as age, sex, comorbidity according to the Charlson comorbidity index did not have a prognostic value when assessing the risk of an adverse outcome of the disease at the time of appointment of additional immunotropic treatment with tocilizumab ($p > 0.05$). The expediency of additional immunotropic therapy with tocilizumab is also evidenced by the research [32], which demonstrated a significant difference in the mortality rate after 28 days of observation in the group of patients who received tocilizumab and the control group (16.1 % vs. 37.2 %) despite the probably higher index Charlson’s comorbidities in the group of patients who received tocilizumab.

It is known that “cytokine storm” is an uncontrolled dysfunctional immune response, the development of which is accompanied by the appearance of oxygen dependence and multiple organ insufficiency in patients with COVID-19 [33,34]. According to the results of our research, changes in immunological indicators during the development of oxygen dependence in patients

with COVID-19 were characterized in patients of both studied groups by decreasing the absolute number of lymphocytes, a significant increase the level of acute phase indicators (CRP and ferritin), pro-inflammatory interleukins IL-2 and IL-6, and chemokine MCP-1. During the “cytokine storm” in COVID-19, there is a rapid production of pro-inflammatory cytokines, which stimulate such cells as hepatocytes, Kupffer cells, and macrophages to produce acute-phase compounds, in particular, ferritin and CRP [35]. At the same time, it is believed that, on the one hand, an increase in acute phase indicators is the result of excessive immune inflammation, and on the other hand, acute phase compounds are able to activate macrophages to secrete proinflammatory cytokines [30,36].

Data from the literature show that high levels of these acute-phase indicators, caused by excessive inflammation due to infection of various etiologies, are associated with hospitalization in ICU and high mortality. Therefore, in various pathological conditions, the determination of these parameters is appropriate for identifying patients with a high risk of an adverse course of the disease, which makes it possible to justify the direction of therapeutic measures to reduce the signs of inflammation [36,37]. According to the results of our research, a significant increase in the level of ferritin and CRP was established during the development of oxygen dependence in patients with COVID-19, compared to reference values. At the time of admission to the ICU, the ferritin content was higher in patients of the II group ($p < 0.05$) than in patients of the I group, and the performed ROC-analysis showed the diagnostic significance of the level of increased ferritin >548.02 ng/ml (AUC = 0.718, $p = 0.004$) to assess the prognosis of the adverse outcome of the disease.

However, the analysis of the dynamics of acute-phase parameters that we studied during additional immunotropic therapy with tocilizumab showed that 5 days after the administration of tocilizumab, only patients of the I group, in which the disease subsequently ended with recovery, showed a decrease in level of CRP ($p < 0.01$) in the absence of statistically significant changes in the content of ferritin ($p > 0.05$) in blood serum, compared with the corresponding indicators before the use of tocilizumab. The peculiarity of the dynamics of these acute-phase indicators established by us with the additional use of tocilizumab is confirmed by the results of other research. Thus, according to the data [38], the ferritin level was the last laboratory indicator that returned to normal, compared to other acute phase parameters, in particular CRP.

Other researchers [39,40] also demonstrated that only the level of CRP, but not ferritin, was significantly reduced in case of successful treatment. However, it should be noted that assessing the prognostic significance of the dynamics of acute-phase indicators during additional treatment with tocilizumab in patients with a severe course of COVID-19 remains a difficult issue. On the one hand, the lower rate of reduction of ferritin limits its prognostic value [30], but on the other hand, even a rapid significant decrease the level of CRP after the additional administration of tocilizumab does not exclude the risk of a fatal outcome of COVID-19 [31].

When evaluating the prognostic role of the dynamics of changes in the content of cytokines during the addi-

tional administration of tocilizumab in oxygen-dependent patients with COVID-19, IL-6 deserves special attention, since when administering tocilizumab, receptors for this cytokine are blocked. According to the results of our research, it was established that at the time of the start of observation at the onset of oxygen dependence, the level of increased IL-6 did not differ statistically when comparing patients of the I and II groups ($p > 0.05$). However, in dynamics after 5 days from the moment of additional use of tocilizumab in patients of the II group, a further increase in the level of IL-6 ($p < 0.05$) in blood serum was noted, in contrast to the patients of the I group who recovered. Exactly in the dynamics of monitoring patients after additional administration of tocilizumab based on the results of ROC-analysis that it was possible to establish the threshold level of increase of this cytokine. Namely, under the conditions of preservation of the increased content of IL-6 in the blood serum >4.66 pg/ml 5 days after the additional use of tocilizumab, the probability of a fatal outcome turned out to be significant (AUC = 0.871, $p < 0.001$).

The regularity we obtained is confirmed by the results of research by other authors. Thus, researchers [31] during the assessment of the dynamics of IL-6 content in blood serum after the administration of tocilizumab in patients with COVID-19 demonstrated an initial increase, and then, under the conditions of a favorable course of the disease, a decrease the level of IL-6 after the administration of tocilizumab, as expected, given the mechanism of action of IL-6 receptor blocking. And according to the results of a meta-analysis with the inclusion of 2120 patients, it was concluded that the determination of the content of IL-6 in blood serum should be available in a planned manner to assess response to tocilizumab administration [41].

Given the understanding that in the conditions of a “cytokine storm” the production of many pro-inflammatory cytokines is uncontrolled, elucidation of the prognostic significance and dynamics of other cytokines during additional immunotropic treatment with tocilizumab is of particular interest. According to the results of our research, at the time of start observation at the onset of oxygen dependence, the content of IL-2 in the blood serum of patients of both groups was significantly increased, with a tendency to a higher level in patients of the II group. However, after additional immunotropic therapy with tocilizumab, the level of IL-2 in blood serum continued to increase, which was statistically significant in patients of the II group. In the dynamics we managed to establish a threshold level of IL-2 in blood serum >309.45 pg/ml, which indicates a high probability of a fatal outcome (AUC = 0.761, $p = 0.013$).

There are isolated researches in the scientific literature that discuss the possible role of soluble IL-2 receptors as markers of immune aggression that continues even after the administration of tocilizumab [42]. In this research, it was established that the level of soluble IL-2 receptors was increased in more than 53.7 % of patients with a severe course and 69.0 % of patients with a critical course of COVID-19, while their level continued to increase after the introduction of tocilizumab [42]. Today, the reasons for the increase the level of soluble IL-2 receptors after the

administration of tocilizumab remain unclear and require further study. However, taking into account the obtained data, it is suggested that the increase of the level of soluble IL-2 receptors after the additional administration of tocilizumab against the background of corticosteroid treatment may indicate the need for combination immunotropic therapy to modulate more than one hyperinflammatory pathway associated with T-lymphocyte dysregulation in COVID-19 [42].

The need for research in this direction is also evidenced by the results of the study of IL-2 dynamics in blood serum of patients with COVID-19, in which the disease progressed without oxygen dependence and, accordingly, the treatment did not involve the use of immunotropic therapy [43]. Namely, in this research, the normalization of the level of IL-2 was demonstrated in all patients during the period of convalescence [43].

To date, the leading role of immunopathogenetic changes in the formation of severe lung damage in patients with COVID-19 has been proven. In patients with a severe and critical course of COVID-19, lower levels of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes in peripheral blood are determined, which are combined with a higher content of pro-inflammatory cytokines, in particular IL-6 and IL-2, which determine the migration of these cells to lung tissue [44,45]. The specified immune changes explain certain changes in the general blood analysis of patients with manifest clinical forms of COVID-19, in particular, the expressiveness of lymphopenia, which correlates with the severity of the disease and the risk of a fatal outcome [46].

According to the results of our research, an increase the absolute number of lymphocytes in the peripheral blood was noted after the use of additional immunotropic treatment in patients of the I group, who subsequently recovered. When observing the dynamics after 5 days the introduction of tocilizumab, the threshold level of the absolute number of blood lymphocytes $\leq 1.2 \times 10^9/l$ was established, which indicated a high probability of the development of a fatal outcome of the disease in oxygen-dependent patients with COVID-19 (AUC = 0.631, $p = 0.039$).

The results of other researchers [29] confirm that the number of clinical and laboratory parameters that allow evaluating the effectiveness of blocking the transmission of IL-6 signals includes the assessment of the ability of tocilizumab to restore the number of lymphocytes in the peripheral blood by stopping their migration to the lung tissue in patients with severe forms of COVID-19.

The analysis of the data of modern scientific literature and the results obtained in the course of our research indicate the significant complexity of predicting the course of COVID-19 in oxygen-dependent patients, in particular, under the conditions use of additional immunotropic therapy with tocilizumab. When predicting the effectiveness of immunotropic treatment in oxygen-dependent patients with COVID-19, several basic clinical and immunological parameters should be taken into account. In particular, taking into account the appearance of febrile fever during the development of a "cytokine storm" in most patients, researchers [31] noted that use of tocilizumab in the treatment of patients with a severe and critical course of COVID-19 contributed to a significant reduction or

normalization of temperature and many inflammatory biomarkers, however, it did not improve clinical outcomes, namely, it did not accelerate clinical improvement and did not reduce the frequency of fatal outcomes [31].

In our research, we analyzed whether the occurrence of febrile fever during the development of oxygen dependence has an effect on the effectiveness of tocilizumab. We established that the frequency of febrile fever in patients of the I group who recovered was statistically significantly higher (71.8 % vs. 30.0 %, $p = 0.0002$) than in patients of the II in which the disease ended fatally.

In the vast majority of researches devoted to finding out the effectiveness of additional immunotropic therapy with tocilizumab [23,27,28,29], the time period from the moment of oxygen dependence to the moment of tocilizumab administration is not taken into account. Only a few studies have taken this information into account. Thus, according to data [47], in a cohort research including 3924 patients with a critical course of COVID-19, a decrease in hospital mortality by 9.6 % was recorded in patients who received tocilizumab treatment in the first 2 days from the moment of admission to the ICU, compared to patients whose treatment did not include early administration of tocilizumab.

The results of our researches also indicate a higher effectiveness of the use of tocilizumab at an earlier time of the appearance of oxygen dependence ($p < 0.001$). According to the results of the ROC-analysis, we established that under the conditions of additional immunotropic therapy with tocilizumab more than 4 days after the onset of oxygen dependence, the probability of ineffectiveness of the specified additional treatment, namely the fatal outcome of the disease, was significant (AUC = 0.756, $p < 0.001$).

Conclusions

1. Certain clinical and immunological parameters should be taken into account in dynamics when predicting the likely effectiveness of additional immunotropic therapy with tocilizumab in oxygen-dependent patients with COVID-19.
2. Under the conditions of the appearance of febrile fever with the development of oxygen dependence and the combination of febrile fever with the duration of oxygen dependence no more than 4 days at the time of additional immunotropic therapy with tocilizumab, the effectiveness of the indicated treatment is higher.
3. At the time of the development of oxygen dependence the level of ferritin >548.02 ng/ml indicated high probability of fatal outcome of the disease (AUC = 0.718, $p = 0.004$). The dynamics of immunological parameters after 5 days from the moment of additional immunotropic therapy with tocilizumab has a diagnostic value in terms of predicting its effectiveness. Preservation of the absolute number of blood lymphocytes $\leq 1.2 \times 10^9/l$ (AUC = 0.631, $p = 0.039$), increased level of CRP >67.5 mg/l (AUC = 0.670, $p = 0.020$), ferritin >443.55 ng/ml (AUC = 0.736, $p = 0.026$), IL-2 content >309.45 pg/ml (AUC = 0.761, $p = 0.013$) and IL-6 >4.66 pg/ml (AUC = 0.871, $p < 0.001$) has diagnostic value in predicting the probability of a fatal outcome of the disease.

Prospects for further research, in our opinion, consist in the further determination of prognostic factors regarding the effectiveness of immunotropic treatment in patients with various comorbid conditions, which will allow further individualization of treatment.

Funding

The research was carried out as part of the planned research work of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University on topic: "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: 14.09.2023
Після доопрацювання / Revised: 11.10.2023
Схвалено до друку / Accepted: 26.10.2023

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

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

ORCID ID: 0000-0003-2959-8803

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

ORCID ID: 0000-0002-2273-8511

Vynokurova A. V., Leading Specialist of Educational and Scientific Medical Laboratory Center with a Vivarium, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Відомості про авторів:

Рябоконе 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.

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

Винокурова А. В., провідний фахівець, Навчально-науковий медико-лабораторний центр 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., & Ghasemejad, 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>
- 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)
- 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>
- 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>
- 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>
- 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., Najafzadeh, R., Hosseinielki Sari, S., Jafarpour, S., Nezhadseifi, E., Movasseghi, S., Baharvand, E., Beiranvand, S., ... 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- Awadasseid, A., Wu, Y., Tanaka, Y., & Zhang, W. (2021). Effective drugs used to combat SARS-CoV-2 infection and the current status of vaccines. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 137, 111330. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111330>
- The RECOVERY Collaborative Group. (2020). Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19 (textendash) Preliminary Report. *New England Journal of Medicine*, 1–11. Retrieved from <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2021436>
- Russell, L., Uhre, K. R., Lindgaard, A. L. S., Degn, J. F., Wetterlev, M., Sivapalan, P., Anthon, C. T., Mikkelsen, V. S., la Porta, L. C., Jensen, T. S., Levin, C. K., Kronborg, G., Krogh-Madsen, R., Plovsing, R. T. R., Brix, H., Schönemann-Lund, M., Valbjørn, L., Lauritzen, S., Koch, E. B., ... Perner, A. (2021). Effect of 12 mg vs 6 mg of Dexamethasone on the Number of Days Alive Without Life Support in Adults With COVID-19 and Severe Hypoxemia. *JAMA*, 326(18), 1807. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.18295>
- Dequin, P.-F., Heming, N., Meziani, F., Plantevèfe, G., Voirot, G., Badié, J., François, B., Aubron, C., Ricard, J.-D., Ehrmann, S., Jouan, Y., Guillon, A., Leclerc, M., Coffre, C., Bourgoin, H., Lengellé, C., Caille-Fénérol, C., Tavernier, E., Zohar, S., ... Le Gouge, A. (2020). Effect of Hydrocortisone on 21-Day Mortality or Respiratory Support Among Critically Ill Patients With COVID-19. *JAMA*, 324(13), 1298. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.16761>
- Angus, D. C., Derde, L., Al-Beidh, F., Annane, D., Arabi, Y., Beane, A., van Bentum-Puijk, W., Berry, L., Bhimani, Z., Bonten, M., Bradbury, C., Brunkhorst, F., Buxton, M., Buzgau, A., Cheng, A. C., de Jong, M., Detry, M., Estcourt, L., Fitzgerald, M., ... Gordon, A. C. (2020). Effect of Hydrocortisone on Mortality and Organ Support in Patients With Severe COVID-19. *JAMA*, 324(13), 1317. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.17022>
- 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>
- 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>
- Rahmati, M., & Moosavi, M. A. (2020). Cytokine-Targeted Therapy in Severely ill COVID-19 Patients: Options and Cautions. *Eurasian Journal of Medicine and Oncology*. Kare Publishing. <https://doi.org/10.14744/ejmo.2020.72142>
- Smolen, J. S., Landewé, R. B. M., Bijlsma, J. W. J., Burmester, G. R., Dougados, M., Kerschbaumer, A., McInnes, I. B., Sepriano, A., van Vollenhoven, R. F., de Wit, M., Aletaha, D., Aringer, M., Askling, J., Balsa, A., Boers, M., den Broeder, A. A., Buch, M. H., Buttgerit, F., Caporali, R., Cardiel, M. H., ... van der Heijde, D. (2020). EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Annals of the rheumatic diseases*, 79(6), 685–699. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216655>
- Bhimraj, A., Morgan, R. L., Shumaker, A. H., Baden, L., Cheng, V. C. C., Edwards, K. M., Gallagher, J. C., Gandhi, R. T., Muller, W. J., Nakamura, M. M., O'Horo, J. C., Shafer, R. W., Shoham, S., Murad, M. H., Mustafa, R. A., Sultan, S., & Falck-Ytter, Y. (2022). Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Treatment and Management of Patients with COVID-19. *Clinical infectious diseases*. ciac724. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac724>

20. COVID-19 rapid guideline: managing COVID-19. (2022). National Institute for Health and Care Excellence (NICE).
21. Vizir, V. A., Sadoway, A. S., & Demidenko, O. V. (2021). Zastosuvannya tocilizumabu u kompleksnomu likuvanni khvoroho na koronavirusnu khvorobu (COVID-19) iz suputnim revmatoidnym artrytom (klinichnyi vypadok) [Use of tocilizumab in the combination treatment of a COVID-19 patient with concomitant rheumatoid arthritis (a case report)]. *Zaporozhye Medical Journal*, 23(5), 739-748. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2021.5.232322>
22. Riabokon, O. V., Kulesh, I. O., Furyk, O. O., Matvieieva, T. B., & Kalashnyk, K. V. (2022). Clinical experience with tocilizumab in the treatment of pregnant woman with severe COVID-19. *Pathologia*, 19(1), 79-83. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2022.1.253286>
23. Okoh, A. K., Bishburg, E., Grinberg, S., & Nagarakantii, S. (2021). Tocilizumab use in COVID-19-associated pneumonia. *Journal of medical virology*, 93(2), 1023-1028. <https://doi.org/10.1002/jmv.26471>
24. Lan, S.-H., Lai, C.-C., Huang, H.-T., Chang, S.-P., Lu, L.-C., & Hsueh, P.-R. (2020). Tocilizumab for severe COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 56(3), 106103. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106103>
25. Hermine, O., Mariette, X., Tharaux, P.-L., Resche-Rigon, M., Porcher, R., Ravaud, P., Bureau, S., Dougados, M., Tibi, A., Azoulay, E., Cadranel, J., Emmerich, J., Fartoukh, M., Guidet, B., Humbert, M., Lacombe, K., Mahevas, M., Pene, F., Pourchet-Martinez, V., ... Renet, S. (2021). Effect of Tocilizumab vs Usual Care in Adults Hospitalized With COVID-19 and Moderate or Severe Pneumonia. *JAMA Internal Medicine*, 181(1), 32. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.6820>
26. Charlson, M. E., Pompei, P., Ales, K. L., & MacKenzie, C. R. (1987). A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *Journal of Chronic Diseases*, 40(5), 373-383. [https://doi.org/10.1016/0021-9681\(87\)90171-8](https://doi.org/10.1016/0021-9681(87)90171-8)
27. Sheppard, M., Laskou, F., Stapleton, P. P., Hadavi, S., & Dasgupta, B. (2017). Tocilizumab (Actemra). *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 13(9), 1972-1988. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1316909>
28. Scott, L. J. (2017). Tocilizumab: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs*, 77(17), 1865-1879. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0829-7>
29. Atal, S., & Fatima, Z. (2020). IL-6 Inhibitors in the Treatment of Serious COVID-19: A Promising Therapy? *Pharmaceutical Medicine*, 34(4), 223-231. <https://doi.org/10.1007/s40290-020-00342-z>
30. Cheng, L., Li, H., Li, L., Liu, C., Yan, S., Chen, H., & Li, Y. (2020). Ferritin in the coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical laboratory analysis*, 34(10), e23618. <https://doi.org/10.1002/jcla.23618>
31. Hill, J. A., Menon, M. P., Dhanireddy, S., Wurfel, M. M., Green, M., Jain, R., Chan, J. D., Huang, J., Bethune, D., Turtle, C., Johnston, C., Xie, H., Leisenring, W. M., Nina Kim, H., & Cheng, G. S. (2021). Tocilizumab in hospitalized patients with COVID-19: Clinical outcomes, inflammatory marker kinetics, and safety. *Journal of medical virology*, 93(4), 2270-2280. <https://doi.org/10.1002/jmv.26674>
32. Al-Baadani, A., Eltayeb, N., Alsufyani, E., Albahrani, S., Bashari, S., Albayati, H., Batubara, E., Ballool, S., Al Assiri, A., Faqih, F., Musa, A. B., Robert, A. A., Alsherbeeni, N., & Elzein, F. (2021). Efficacy of tocilizumab in patients with severe COVID-19: Survival and clinical outcomes. *Journal of Infection and Public Health*, 14(8), 1021-1027. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.05.015>
33. Moore, J. B., & June, C. H. (2020). Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*, 368(6490), 473-474. <https://doi.org/10.1126/science.abb8925>
34. Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., Xiang, J., Wang, Y., Song, B., Gu, X., Guan, L., Wei, Y., Li, H., Wu, X., Xu, J., Tu, S., Zhang, Y., Chen, H., & Cao, B. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet*, 395(10229), 1054-1062. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30566-3)
35. Torti, F. M., & Torti, S. V. (2002). Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*, 99(10), 3505-3516. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.10.3505>
36. Kernan, K. F., & Carcillo, J. A. (2017). Hyperferritinemia and inflammation. *International Immunology*, 29(9), 401-409. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx031>
37. Carcillo, J. A., Sward, K., Halstead, E. S., Telford, R., Jimenez-Bacardi, A., Shakoory, B., Simon, D., & Hall, M. (2017). A Systemic Inflammation Mortality Risk Assessment Contingency Table for Severe Sepsis*. *Pediatric Critical Care Medicine*, 18(2), 143-150. <https://doi.org/10.1097/pcc.0000000000001029>
38. Li, Y., Hu, Y., Yu, J., & Ma, T. (2020). Retrospective analysis of laboratory testing in 54 patients with severe- or critical-type 2019 novel coronavirus pneumonia. *Laboratory Investigation*, 100(6), 794-800. <https://doi.org/10.1038/s41374-020-0431-6>
39. Ni, M., Tian, F., Xiang, D., & Yu, B. (2020). Characteristics of inflammatory factors and lymphocyte subsets in patients with severe COVID-19. *Journal of Medical Virology*, 92(11), 2600-2606. <https://doi.org/10.1002/jmv.26070>
40. Kox, M., Frenzel, T., Schouten, J., van de Veerendonk, F. L., Koenen, H. J. P. M., & Pickkers, P. (2020). COVID-19 patients exhibit less pronounced immune suppression compared with bacterial septic shock patients. *Critical Care*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s13054-020-02896-5>
41. Sarfraz, A., Sarfraz, Z., Sarfraz, M., Aftab, H., & Pervaiz, Z. (2021). Tocilizumab and covid-19: A meta-analysis of 2120 patients with severe disease and implications for clinical trial methodologies. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 51(3), 890-897. <https://doi.org/10.3906/sag-2010-131>
42. Azmy, V., Kaman, K., Tang, D., Zhao, H., Dela Cruz, C., Topal, J. E., Malinis, M., & Price, C. C. (2021). Cytokine Profiles Before and After Immune Modulation in Hospitalized Patients with COVID-19. *Journal of Clinical Immunology*, 41(4), 738-747. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00949-6>
43. Hasichaolu, Zhang, X., Li, X., Li, X., & Li, D. (2020). Circulating Cytokines and Lymphocyte Subsets in Patients Who Have Recovered from COVID-19. *BioMed Research International*, 2020, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2020/7570981>
44. Diao, B., Wang, C., Tan, Y., Chen, X., Liu, Y., Ning, L., Chen, L., Li, M., Liu, Y., Wang, G., Yuan, Z., Feng, Z., Zhang, Y., Wu, Y., & Chen, Y. (2020). Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00827>
45. Wang, F., Nie, J., Wang, H., Zhao, Q., Xiong, Y., Deng, L., Song, S., Ma, Z., Mo, P., & Zhang, Y. (2020). Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*, 221(11), 1762-1769. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa150>
46. Prompetchara, E., Ketloy, C., & Palaga, T. (2020). Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 38, 1-9. <https://doi.org/10.12932/AP-200220-0772>
47. Gupta, S., Wang, W., Hayek, S. S., Chan, L., Mathews, K. S., Melamed, M. L., Brenner, S. K., Leonberg-Yoo, A., Schenck, E. J., Radbel, J., Reiser, J., Bansal, A., Srivastava, A., Zhou, Y., Finkel, D., Green, A., Mallappallil, M., Faugno, A. J., Zhang, J., ... Leaf, D. E. (2021). Association Between Early Treatment With Tocilizumab and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19. *JAMA Internal Medicine*, 181(1), 41. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.6252>

Експериментальне дослідження патерну генів, активованих багатоденною дією переривчастої гіпоксії, в підшлунковій залозі щурів

Т. В. Іваненко^{ID}*^{A,B,C,D,F}, Ю. М. Колесник^{ID}^{A,E,F}, А. В. Абрамов^{ID}^{A,E,F}

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:
підшлункова залоза, переривчаста гіпоксія, гени *Cops5*, *F10*, *Jmjd6*, *Lgals3*, *Rbpjl*, *Vegfa*.

Патологія. 2023. Т. 20, № 3(59). С. 218-221

*E-mail:
ivanenko.tv@zsmu.zp.ua

Переривчаста гіпоксія впливає на різноманітні патологічні стани в організмі, у медицині її використовують для відтворення саногенного терапевтичного ефекту. Переривчасту гіпоксію за клінічними показаннями застосовують для покращення функціональної здатності легень, поліпшення адаптаційної здатності організму, при синдромі обструктивного апное сну, анеміях та цукровому діабеті. Під час радіотерапії раку переривчасті гіпоксичні тренування сприяють підвищенню чутливості пухлини до лікування. Переривчаста гіпоксія корисна в реабілітаційній медицині для поліпшення фізичного відновлення пацієнтів – після операцій чи травм для покращення функціональних можливостей організму. Однак нині недостатньо вивчено активність генів-регуляторів, що активують молекулярні механізми названих саногенних ефектів впливу переривчастої гіпоксії.

Мета роботи – визначити особливості експресії генів, що пов'язані з гіпоксією, в підшлунковій залозі щурів лінії Вістар за умов впливу переривчастої гіпоксії.

Матеріали та методи. Для аналізу експресії генів використали метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ПЛР) CFX-96 Touch™ (Bio-Rad, США) та набір RT² Profiler™ PCR Array Rat Hypoxia Signaling Pathway (QIAGEN, Німеччина), де об'єктом дослідження у експериментальних тварин були 84 гени, що беруть участь у сигнальному шляху дії гіпоксії та визначені в підшлунковій залозі.

Результати. За результатами ПЛР-дослідження зразків підшлункової залози інтактних тварин і щурів із впливом гіпоксичних тренувань розрізняли активність панелі генів: гени з високою експресією порівняно з інтактною групою тварин; гени з низькою експресією порівняно з інтактною групою щурів; гени, в яких не виявили достовірних змін у зразках щодо параметрів інтактної групи тварин. Встановили, що гени *Cops5*, *F10*, *Jmjd6*, *Lgals3*, *Rbpjl*, *Vegfa* мають високу експресивну активність порівняно з інтактною групою щурів.

Висновки. Збільшення експресії генів *Cops5* (у 10,29 раза), *Lgals3* (в 2,94 раза) і *Rbpjl* (в 5,73 раза) внаслідок дії переривчастої гіпоксії можна визначити як активуючий фактор підвищення проліферації ендокринних та екзокринних клітин підшлункової залози та зростання в них антиапоптотичного потенціалу. Збільшення експресії гена *Jmjd6* (в 3,20 раза) при переривчастій гіпоксії можна інтерпретувати як регуляторні впливи через дегідроксилування білків і сприяння зростанню активності антиапоптотичних білків в ендокринних та екзокринних клітинах підшлункової залози. Збільшений рівень експресії *Vegfa* (в 5,99 раза) може спричиняти ангіогенез у підшлунковій залозі в умовах дії переривчастої гіпоксії.

Key words:
pancreas, hypoxia, *Cops5*, *F10*, *Jmjd6*, *Lgals3*, *Rbpjl*, *Vegfa* genes.

Pathologia, 2023. 20(3), 218-221

Experimental study of the pattern of genes activated by multi-day intermittent hypoxia in the rat pancreas

T. V. Ivanenko, Yu. M. Kolesnyk, A. V. Abramov

Intermittent hypoxia affects a variety of pathological conditions in the body and is used in medicine to reproduce the sanogenic therapeutic effect. Intermittent hypoxia is used for clinical indications to improve lung function; increase the body's adaptive capacity; in obstructive sleep apnoea syndrome; in anaemia, diabetes mellitus. In cancer radiotherapy, intermittent hypoxic training helps to increase the sensitivity of the tumour to treatment. Intermittent hypoxia is useful in rehabilitation medicine to improve the physical recovery of patients after surgery or injury to improve the body's functional capabilities. However, to date, the activity of regulatory genes, that activate the molecular mechanisms of the above-mentioned sanogenic effects of intermittent hypoxia has not been sufficiently studied.

The aim of the study: to determine the expression of hypoxia-related genes in pancreas of Wistar rats under intermittent hypoxia.

Materials and methods. The CFX-96 Touch™ real-time reverse transcription polymerase chain reaction (PCR) (Bio-Rad, USA) and the RT² Profiler™ PCR Array Rat Hypoxia Signalling Pathway kit (QIAGEN, Germany) were used to analyse gene expression in experimental animals, where 84 genes involved in the hypoxia signalling pathway identified in the pancreas were studied.

Results. According to the results of PCR analysis of pancreatic samples from intact animals and animals exposed to hypoxic training, the activity of the gene panel can be distributed as follows: genes with high expression compared to the intact group of animals, genes with low expression compared to the intact group of animals and genes in which no significant changes were detected in the samples compared to the intact group of animals. We have found, that the genes *Cops5*, *F10*, *Jmjd6*, *Lgals3*, *Rbpjl*, *Vegfa* have high expression activity compared to the intact group of animals.

Conclusions. The increase in the expression of *Cops5* by 10.29 times, *Lgals3* by 2.94 times and *Rbpjl* by 5.73 times as a result of intermittent hypoxia can be regarded as an activating factor for the increase in the proliferation of endocrine and exocrine pancreatic cells and the growth of their antiapoptotic potential. The 3.20-fold increase in *Jmjd6* gene expression under intermittent hypoxia can be interpreted as a regulatory effect through protein dehydroxylation and promotion of antiapoptotic protein activity in endocrine and exocrine pancreatic cells. The 5.99-fold increased level of *Vegfa* expression may promote angiogenesis in the pancreas under intermittent hypoxia.

Доведено, що переривчаста гіпоксія впливає на різноманітні патологічні стани в організмі, у медицині її використовують для відтворення саногенного терапевтичного ефекту [1]. Переривчасту гіпоксію за клінічними показаннями застосовують для покращення функціональної здатності легень, поліпшення адаптаційної здатності організму, при синдромі обструктивного апное сну, анеміях [2,3]. Встановлено, що під час радіотерапії раку переривчасті гіпоксичні тренування сприяють підвищенню чутливості пухлини до лікування [4]. Переривчаста гіпоксія є корисною в реабілітаційній медицині для поліпшення фізичного відновлення пацієнтів, наприклад, після операцій чи травм [5]. Наведений перелік не вичерпний, в світі продовжують активно досліджувати саногенні властивості дії переривчастої гіпоксії на перебіг хвороб.

У попередніх роботах з вивчення ендокринного апарату підшлункової залози при експериментальному цукровому діабеті доведено та визначено низку факторів і впливів, що змінюють популяцію ендокриноцитів і їхню секреторну активність залежно від різних умов та експериментально сформованих патологій. Показано, що дозовані гіпоксичні тренування чинять пряму дію на ендокриноцити підшлункової залози при експериментально сформованому цукровому діабеті зі своїм окремим механізмом [6,7,8].

Визначили участь групи найважливіших й найактивніших генів, що беруть участь у формуванні ендокринного апарату підшлункової залози [9]. Механізми диференціювання ендокриноцитів під впливом регуляторних білків, що кодуються цими генами, активні не тільки в період ембріогенезу, але й продовжують регулювати їх утворення в дорослому віці, коли з протокових клітин ектокринного компонента підшлункової залози утворюються нові форми панкреатичних острівців [10].

Нині недостатньо вивченою залишається активність генів-регуляторів, що активують молекулярні механізми названих саногенних ефектів впливу переривчастої гіпоксії.

Набір ПЛП-матриці RT² Profiler™ PCR Array Rat Hypoxia Signaling Pathway призначений для вивчення активності генів, що беруть участь у сигнальному шляху дії гіпоксії в щурів за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ПЛР). Такий сигнальний шлях дії гіпоксії включає серію молекулярних маркерів клітинного генома (генів), зміна експресії яких відбувається у відповідь на низький рівень парціального тиску кисню в організмі, що відіграє вирішальну роль у регуляції різних фізіологічних і патологічних процесів, включаючи виживання клітин, ангіогенез, метаболізм і запалення.

ПЛП-матриця RT² Profiler™ PCR Array Rat Hypoxia Signaling Pathway дає змогу одночасно ампліфікувати та кількісно визначити активність кількох генів у межах сигнального шляху дії гіпоксії, а також дає змогу ство-

рити профіль експресії ключових генів, афільованих із гіпоксією у різних тканинах організму, як-от у скелетних (литкових) м'язах щурів [11]. Це сприяє розширенню знань про молекулярні механізми і саногенної, й патогенної дії гіпоксії як типового патологічного процесу в різних умовах експериментальних або клінічних методів корекції патологічних станів.

Мета роботи

Визначити особливості експресії генів, що пов'язані з гіпоксією, в підшлунковій залозі щурів лінії Вістар за умов впливу переривчастої гіпоксії.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження здійснили на 10 білих статевозрілих щурах лінії Вістар, яких поділили на 2 групи (по 5 тварин у кожній). Тварини 1 групи утворили контрольну (інтактну) групу. Тваринам 2 групи здійснили гіпоксичні тренування за схемою: 15 днів по 6 годин щоденно, зокрема на 1–5 день в умовах барокамери імітували підйом на висоту 1–5 км над рівнем моря, а останні 10 днів – 6 км над рівнем моря.

Після декапітації експериментальних тварин під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг) здійснили забір підшлункової залози, яку фіксували в розчині Буена (20 годин), після стандартної гістологічної обробки заливали в парапласт (MkCormick, США).

Для аналізу експресії генів використали метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ПЛР) CFX-96 Touch™ (Bio-Rad, США) та набір RT² Profiler™ PCR Array Rat Hypoxia Signaling Pathway (QIAGEN, Німеччина), де об'єктом дослідження в експериментальних тварин були 84 гени, що беруть участь у сигнальному шляху дії гіпоксії та визначені в підшлунковій залозі.

Статистичний аналіз даних ПЛР-дослідження здійснили за допомогою програмного забезпечення PCR GeneGlobe (QIAGEN, Німеччина) з використанням $\Delta\Delta Ct$ методу [12].

Результати

За результатами ПЛР-дослідження генів, у зразках підшлункової залози інтактних тварин і щурів із впливом гіпоксичних тренувань розрізняли активність панелі генів: гени з високою експресією порівняно з інтактною групою тварин, де $\Delta\Delta Ct < 30$; гени з низькою експресією щодо інтактної групи щурів, де $\Delta\Delta Ct < 30$; гени, в яких не виявлені достовірні зміни в зразках порівняно з інтактною групою тварин (табл. 1).

Встановлено, що серед 84 генів, пов'язаних із гіпоксією, виявили патерни генів і з високим ($\Delta\Delta Ct < 30$), і з низьким ($\Delta\Delta Ct < 30$) рівнем експресії. До патерну з

Таблиця 1. Активність експресії генів у щурів внаслідок дії переривчастої гіпоксії щодо показників інтактної групи тварин

Гени з високим рівнем експресії порівняно з інтактною групою тварин	Гени з низьким рівнем експресії порівняно з інтактною групою тварин	Гени, в яких не виявили змін у зразках щодо інтактної групи*
<i>Cops5</i> ; * <i>Eif4ebp1</i> ; <i>Eno1</i> ; <i>F10</i> ; * <i>Hmox1</i> ; <i>Hnf4a</i> ; <i>Jmjd6</i> ; * <i>Ldha</i> ; <i>Lgals3</i> ; * <i>Nfkb1</i> ; <i>Pdk1</i> ; <i>Pfkf</i> ; <i>Rbpjl</i> ; * <i>Tfrc</i> ; <i>Vegfa</i> *	<i>Arnt</i> ; <i>Bhlhe40</i> ; * <i>Ctsa</i> ; * <i>Hif1a</i> ; * <i>Lox</i> ; * <i>Nos3</i> ; <i>Pfkfb4</i> ; <i>Pim1</i> ; <i>Slc16a3</i> *	<i>Adm</i> ; <i>Adora2b</i> ; <i>Aldoa</i> ; <i>Angptl4</i> ; <i>Ankrd37</i> ; <i>Anxa2</i> ; <i>Apex1</i> ; <i>Blm</i> ; <i>Bnip3</i> ; <i>Bnip3l</i> ; <i>Bitg1</i> ; <i>Car9</i> ; <i>Ccng2</i> ; <i>Cdkn2a</i> ; <i>Ddit4</i> ; <i>Dnajc5</i> ; <i>Edn1</i> ; <i>Egln1</i> ; <i>Egln2</i> ; <i>Egr1</i> ; <i>Epo</i> ; <i>Ero1a</i> ; <i>F3</i> ; <i>Fos</i> ; <i>Gpi</i> ; <i>Gys1</i> ; <i>Hif1an</i> ; <i>Hif3a</i> ; <i>Hk2</i> ; <i>Ier3</i> ; <i>Igfbp3</i> ; <i>LOC367198</i> ; <i>Map3k1</i> ; <i>Met</i> ; <i>Mif</i> ; <i>Mmp9</i> ; <i>Mxi1</i> ; <i>Nampt</i> ; <i>Ndr1</i> ; <i>Odc1</i> ; <i>P4ha1</i> ; <i>P4hb</i> ; <i>Per1</i> ; <i>Pfkfb3</i> ; <i>Pfkf</i> ; <i>Pgam1</i> ; <i>Pgf</i> ; <i>Pgk1</i> ; <i>Pgm2</i> ; <i>Pkm</i> ; <i>Plau</i> ; <i>Ruvbl2</i> ; <i>Serpine1</i> ; <i>Slc2a1</i> ; <i>Slc2a3</i> ; <i>Trp53</i> ; <i>Tpi1</i> ; <i>Txnip</i> ; <i>Usf2</i> ; <i>Vdac1</i>

*: гени, для яких середній пороговий цикл – $\Delta\Delta Ct < 30$; *: гени, для яких середній пороговий цикл цього гена не визначено (експресія не виявлена).

Таблиця 2. Активовані гіпоксією гени та їхні ефекти

Ген	Контрольована функція
<i>Cops5</i> <i>Lgals3</i>	Ріст і поділ клітини, апоптоз через регуляцію убіквітинування
<i>F10</i>	Регуляція системи згортання крові
<i>Jmjd6</i>	Регуляція структури та активності клітинних білків через їх дегідроксилювання
<i>Rbpjl</i>	Диференціація клітин
<i>Vegfa</i>	Ангіогенез

високим рівнем експресії належать гени *Cops5*, *F10*, *Jmjd6*, *Lgals3*, *Rbpjl* і *Vegfa*, експресія яких статистично вірогідно перевищує показник інтактних тварин. Так, експресія *Cops5* збільшилася в 10,29 раза, *F10* – в 2,09 раза, *Jmjd6* – в 3,20 раза, *Lgals3* – в 2,94 раза, *Rbpjl* – в 5,73 раза, *Vegfa* – в 5,99 раза.

Обговорення

У рамках цієї статті вирішили обмежитися лише аналізом патерну генів із високим рівнем експресії ($\Delta\Delta Ct < 30$) внаслідок багатоденного впливу переривчастої гіпоксії. Вважаємо, що активація цих шести генів сприяє адаптивним змінам у підшлунковій залозі, насамперед внаслідок ендокринного компонента. Раніше ми визначили це як саногенний ефект гіпоксії [6,7,8].

В умовах переривчастої гіпоксії найбільше підвищення експресії зафіксували у гені *Cops5*, який кодує білок, що входить до складу *COP9*-сигнального комплексу і є важливим білковим комплексом у регуляції різних клітинних процесів. Одна з головних функцій *COP9* – регуляція розкладання білків, зокрема через участь в убіквітинуванні. Це важливо для контролю над рівнем білків, що регулюють клітинні процеси, як-от ріст і поділ, трансляція генетичної інформації, апоптоз. Ген *Lgals3* кодує білок Galactin-3, кількість і рівень активності якого у клітинах різних тканин змінюється за умов гіпоксії.

Висока експресія *Cops5* та *Lgals3* у відповідь на проведення гіпоксичних тренувань, яку визначили у цьому дослідженні, може пояснювати отримані раніше результати. Так, згідно з ними, переривчаста гіпоксія впливає на проліферативну активність бета-ендокриноцитів, рівень експресії в них про- й антиапоптотичних білків та змінює функціональний стан бета-клітин у нормі і при діабеті [6].

Досі не виявили прямих зв'язків між геном *F10* (фактором X) і гіпоксією. Відомо, що ген *F10* кодує фактор згортання крові та впливає передусім на процеси гемостазу та згортання крові. Проте в гематології та медицині бувають випадки, коли гіпоксичні стани можуть впливати

на функціонування системи згортання крові. Наприклад, при тривалій гіпоксії (як та, що виникає високогір'ях або внаслідок респіраторних захворювань) може збільшуватися ризик утворення тромбів у судинах. У такому разі можна зробити висновок, що гіпоксія може впливати на різні аспекти системи згортання крові, включаючи активність гена *F10*. Підвищення його експресії зафіксували у результаті нашого дослідження.

Ген *Jmjd6* відіграє важливу роль у регуляції різних біологічних процесів, включаючи вплив відповіді на гіпоксію. Більшість досліджень гена *Jmjd6* у контексті гіпоксії зосереджені на його ролі в регулюванні генетичних процесів і різних сигнальних шляхів, що пов'язані з відповіддю на гіпоксію [13].

Важливий аспект гена *Jmjd6* у контексті гіпоксії – його функція дегідроксилази. Він може дегідроксилювати білки, впливаючи зокрема на структуру й активність білків, що регулюють біохімічні реакції за умов гіпоксії. Так, *Jmjd6* може брати участь у стабілізації гіпоксичну-5'-фосфату (Hypusine) у факторі ініціації трансляції *EIF5A* (eukaryotic initiation factor 5A), який має важливе значення для регуляції біосинтезу білків. Отже, збільшення експресії гена *Jmjd6*, що виявили, можна інтерпретувати як молекулярну регуляцію здатності клітин реагувати на гіпоксію й адаптуватися до неї. Ці висновки підтверджено іншими авторами [14].

Rbpjl – ген, що кодує білок RBPJL. Цей білок відомий за своєю роллю в регуляції генної експресії та впливом на різні біологічні процеси. Один із важливих шляхів, у якому взаємодіє RBPJL, – шлях Notch, який є важливим у багатьох аспектах розвитку та диференціації клітин [15]. Гіпоксичні стани можуть впливати на ген *Rbpjl* та спричиняти зміни його експресії. Виявлені зміни експресії – елемент компенсаторних механізмів організму в адаптації до недостачі кисню, впливають на гомеостаз глюкози. Це показано в попередніх дослідженнях [16,17].

Ген *Vegfa* кодує білок, відомий як фактор росту судин (ангіогенезу) типу А. Цей ген відіграє важливу роль у розвитку та збереженні судин, а також у регуляції постачання кисню до тканин. Під впливом гіпоксії, що виникає при недостатньому надходженні кисню до тканин, активується експресія гена *Vegfa*. Це спостерігали під час дослідження, що здійснили. Умови гіпоксії можуть стати причиною для змін рівня експресії гена *Vegfa*, оскільки організм намагається компенсувати нестачу кисню, сприяючи росту нових судин, що можуть забезпечити активним кровопостачанням тканини й органи [18]. Активація ангіогенезу при дозованій гіпоксії – важливий процес під час загоєння ран, регенерації тканин і розвитку нових судин у відповідь на різні фізіологічні й патологічні стани [5].

Загальні ефекти активованих гіпоксією генів, що виявили у результаті дослідження, наведено в *таблиці 2*.

Отже, одержано нові дані щодо патерну ключових генів, афільованих із гіпоксією, які дають уявлення про окремі молекулярно-генетичні механізми, завдяки яким відтворюється саногенний вплив переривчастої гіпоксії на ендокринний апарат підшлункової залози за умов розвитку експериментального цукрового діабету. Ці факти наведено в попередніх працях [6,7,8,17,18,19].

Аналізу патерну генів із низьким рівнем експресії ($\Delta\Delta Ct < 30$) внаслідок багатоденного впливу переривчастої гіпоксії буде присвячена окрема публікація.

Висновки

1. Збільшення експресії генів *Cops5* (у 10,29 раза), *Lgals3* (в 2,94 раза) і *Rbpjl* (в 5,73 раза) внаслідок дії переривчастої гіпоксії можна визначили як активуючий фактор підвищення проліферації ендокринних та екзокринних клітин підшлункової залози та зростання в них антиапоптотичного потенціалу.

2. Збільшення експресії гена *Jmjd6* (в 3,20 раза) при переривчастій гіпоксії можна інтерпретувати як регуляторні впливи через дегідроксилювання білків і сприяння зростанню активності антиапоптотичних білків в ендокринних та екзокринних клітинах підшлункової залози.

3. Збільшений рівень експресії *Vegfa* (в 5,99 раза) може спричиняти ангіогенез у підшлунковій залозі в умовах дії переривчастої гіпоксії.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: author has no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 03.11.2023

Після доопрацювання / Revised: 29.11.2023

Схвалено до друку / Accepted: 07.12.2023

Відомості про авторів:

Іваненко Т. В., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна. ORCID ID: 0000-0001-6617-5178

Колесник Ю. М., д-р мед. наук, професор каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, ректор Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, заслужений діяч науки і техніки України. ORCID ID: 0000-0002-1556-5085

Абрамов А. В., д-р мед. наук, професор каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна. ORCID ID: 0000-0001-8520-2258

Information about authors:

Ivanenko T. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Physiology with 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, Rector of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Honored Science and Technology Figure of Ukraine. Abramov A. V., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathological Physiology with the Course of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

References

- Navarrete-Opazo, A., & Mitchell, G. S. (2014). Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 307(10), R1181-R1197. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00208.2014>
- Raffay, T. M., & Martin, R. J. (2020). Intermittent hypoxia and bronchial hyperreactivity. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 25(2), 101073. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2019.101073>
- Korkushko, O. V., & Slipchenko, V. H. (Eds.). (2015). *Hipoksiia yak metod pidvyshchennia adaptatsiinoi zdatnosti orhanizmu* [Hypoxia as a method of increasing the adaptive capacity of the body]. Kyiv: NTUU "KPI". [in Ukrainian].
- Infantino, V., Santarsiero, A., Convertini, P., Todisco, S., & Iacobazzi, V. (2021). Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5703. <https://doi.org/10.3390/ijms22115703>
- Gonzalez-Rothi, E. J., Lee, K. Z., Dale, E. A., Reier, P. J., Mitchell, G. S., & Fuller, D. D. (2015). Intermittent hypoxia and neurorehabilitation. *Journal of applied physiology*, 119(12), 1455-1465. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00235.2015>
- Ivanenko, T. V., Kolesnyk, Yu. M., & Abramova, T. V. (2017). Analiz endokrynnoho statusu ta rivnia ekspresii bilkiv apoptozu i proliferatsii v pankreatychnykh ostrivtsiakh shchuriv z eksperymentalnym tsukrovym diabetom pislia zakinchennia pereryvchastykh hipoksychnykh trenuvan. *Patohiia, reabilitatsiia, adaptatsiia*, 15(2), 17-20. [in Ukrainian].
- Ivanenko, T. V. (2015). Vliyanie gipoksicheskikh trenirovok na tsitoarkhitektoniku pankreaticheskikh ostrovkov pri eksperimentalnom sakharom diabetie. *Pathologia*, (1 Suppl), 52-53. [in Russian].
- Ivanenko, T. V., Abramov, A. V., Kolesnyk, Yu. M., Zhulinskii, V. O., & Kovalov, M. M. (2013). Stymulatsiia funktsionalnoho stanu beta-klityn pankreatychnykh ostrivtsiv bahatodennoiu pereryvchastoio hipoksiieiu. *Zdobutky klinichnoi i eksperymentalnoi medytsyny*, (2), 246. [in Ukrainian].
- Ivanenko, T. V., & Vynokurova, A. V. (2021). Kliuchovi molekuliarno-henetychni rehulatory dyferentsiuvannia endokrynotsytiv pidshlunkovoi zalozy [Key molecular genetic regulators of pancreatic endocrinocyte differentiation]. *Klinichna ta eksperymentalna patohiia*, 20(4), 116-121. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.24061/1727-4338.XX.4.78.2021.15>
- Rukstalis, J. M., & Habener, J. F. (2009). Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration. *Islets*, 1(3), 177-184. <https://doi.org/10.4161/isl.1.3.9877>
- Nimker, C., Singh, D. P., Saraswat, D., & Bansal, A. (2016). Preconditioning with ethyl 3,4-dihydroxybenzoate augments aerobic respiration in rat skeletal muscle. *Hypoxia*, 4, 109-120. <https://doi.org/10.2147/HPS.102943>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Mo, C., Xu, M., Wen, C., Chang, R., Huang, C., Zou, W., Zhu, X., & Guo, Q. (2018). Normalizing JMJD6 Expression in Rat Spinal Dorsal Horn Alleviates Hyperalgesia Following Chronic Constriction Injury. *Frontiers in neuroscience*, 12, 542. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00542>
- Xu, G., Chen, H., Wu, S., Chen, J., Zhang, S., Shao, G., Sun, L., Mu, Y., Liu, K., Pan, Q., Li, N., An, X., Lin, S., & Chen, W. (2022). Eukaryotic initiation factor 5A2 mediates hypoxia-induced autophagy and cisplatin resistance. *Cell death & disease*, 13(8), 683. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05033-y>
- Pan, L., Hoffmeister, P., Turkiewicz, A., Huynh, N. N. D., Große-Berkenbusch, A., Knippschild, U., Gebhardt, J. C. M., Baumann, B., Borggrefe, T., & Oswald, F. (2021). Transcription Factor RBPJL Is Able to Repress Notch Target Gene Expression but Is Non-Responsive to Notch Activation. *Cancers*, 13(19), 5027. <https://doi.org/10.3390/cancers13195027>
- Wong, W. P. S., Wang, J. C., Schipma, M. J., Zhang, X., Edwards, J. R., & El Muayed, M. (2021). Cadmium-mediated pancreatic islet transcriptome changes in mice and cultured mouse islets. *Toxicology and applied pharmacology*, 433, 115756. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115756>
- Kolesnik, Yu. M., Abramov, A. V., Ivanenko, T. V., Zhulinskii, V. A., & Gancheva, O. V. (2012). Sanogennoe vliyanie mnogodnevnykh gipoksicheskikh trenirovok na endokrinnyu funktsiyu pankreaticheskikh ostrovkov krys s eksperimentalnym sakharom diabetom. *Fiziologichnyi zhurnal*, 58(4), 67. [in Russian].
- White, A. L., & Bix, G. J. (2023). VEGFA Isoforms as Pro-Angiogenic Therapeutics for Cerebrovascular Diseases. *Biomolecules*, 13(4), 702. <https://doi.org/10.3390/biom13040702>
- Ivanenko, T. V., Abramov, A. V., Kolesnik, Yu. M., & Vasilenko, G. V. (2011). Endokrinnyi status i uroven ekspresii belkov Bcl-2 i p53 v pankreaticheskikh ostrovkakh u krys s eksperimentalnym sakharom diabetom [Endocrine status and the level of Bcl2 and p53 protein expression in pancreatic islets of rats with experimental diabetes mellitus]. *Pathologia*, 8(2), 18-20. [in Russian].

Експериментальне дослідження патерну генів, активованих багатоденною дією переривчастої гіпоксії, в підшлунковій залозі щурів

Т. В. Іваненко^{ID}*^{A,B,C,D,F}, Ю. М. Колесник^{ID}^{A,E,F}, А. В. Абрамов^{ID}^{A,E,F}

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:
підшлункова залоза, переривчаста гіпоксія, гени *Cops5*, *F10*, *Jmjd6*, *Lgals3*, *Rbpjl*, *Vegfa*.

Патологія. 2023. Т. 20, № 3(59). С. 218-221

*E-mail:
ivanenko.tv@zsmu.zp.ua

Переривчаста гіпоксія впливає на різноманітні патологічні стани в організмі, у медицині її використовують для відтворення саногенного терапевтичного ефекту. Переривчасту гіпоксію за клінічними показаннями застосовують для покращення функціональної здатності легень, поліпшення адаптаційної здатності організму, при синдромі обструктивного апное сну, анеміях та цукровому діабеті. Під час радіотерапії раку переривчасті гіпоксичні тренування сприяють підвищенню чутливості пухлини до лікування. Переривчаста гіпоксія корисна в реабілітаційній медицині для поліпшення фізичного відновлення пацієнтів – після операцій чи травм для покращення функціональних можливостей організму. Однак нині недостатньо вивчено активність генів-регуляторів, що активують молекулярні механізми названих саногенних ефектів впливу переривчастої гіпоксії.

Мета роботи – визначити особливості експресії генів, що пов'язані з гіпоксією, в підшлунковій залозі щурів лінії Вістар за умов впливу переривчастої гіпоксії.

Матеріали та методи. Для аналізу експресії генів використали метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ПЛР) CFX-96 Touch™ (Bio-Rad, США) та набір RT² Profiler™ PCR Array Rat Hypoxia Signaling Pathway (QIAGEN, Німеччина), де об'єктом дослідження у експериментальних тварин були 84 гени, що беруть участь у сигнальному шляху дії гіпоксії та визначені в підшлунковій залозі.

Результати. За результатами ПЛР-дослідження зразків підшлункової залози інтактних тварин і щурів із впливом гіпоксичних тренувань розрізняли активність панелі генів: гени з високою експресією порівняно з інтактною групою тварин; гени з низькою експресією порівняно з інтактною групою щурів; гени, в яких не виявили достовірних змін у зразках щодо параметрів інтактної групи тварин. Встановили, що гени *Cops5*, *F10*, *Jmjd6*, *Lgals3*, *Rbpjl*, *Vegfa* мають високу експресивну активність порівняно з інтактною групою щурів.

Висновки. Збільшення експресії генів *Cops5* (у 10,29 раза), *Lgals3* (в 2,94 раза) і *Rbpjl* (в 5,73 раза) внаслідок дії переривчастої гіпоксії можна визначити як активуючий фактор підвищення проліферації ендокринних та екзокринних клітин підшлункової залози та зростання в них антиапоптотичного потенціалу. Збільшення експресії гена *Jmjd6* (в 3,20 раза) при переривчастій гіпоксії можна інтерпретувати як регуляторні впливи через дегідроксилування білків і сприяння зростанню активності антиапоптотичних білків в ендокринних та екзокринних клітинах підшлункової залози. Збільшений рівень експресії *Vegfa* (в 5,99 раза) може спричиняти ангіогенез у підшлунковій залозі в умовах дії переривчастої гіпоксії.

Key words:
pancreas, hypoxia, *Cops5*, *F10*, *Jmjd6*, *Lgals3*, *Rbpjl*, *Vegfa* genes.

Pathologia, 2023. 20(3), 218-221

Experimental study of the pattern of genes activated by multi-day intermittent hypoxia in the rat pancreas

T. V. Ivanenko, Yu. M. Kolesnyk, A. V. Abramov

Intermittent hypoxia affects a variety of pathological conditions in the body and is used in medicine to reproduce the sanogenic therapeutic effect. Intermittent hypoxia is used for clinical indications to improve lung function; increase the body's adaptive capacity; in obstructive sleep apnoea syndrome; in anaemia, diabetes mellitus. In cancer radiotherapy, intermittent hypoxic training helps to increase the sensitivity of the tumour to treatment. Intermittent hypoxia is useful in rehabilitation medicine to improve the physical recovery of patients after surgery or injury to improve the body's functional capabilities. However, to date, the activity of regulatory genes, that activate the molecular mechanisms of the above-mentioned sanogenic effects of intermittent hypoxia has not been sufficiently studied.

The aim of the study: to determine the expression of hypoxia-related genes in pancreas of Wistar rats under intermittent hypoxia.

Materials and methods. The CFX-96 Touch™ real-time reverse transcription polymerase chain reaction (PCR) (Bio-Rad, USA) and the RT² Profiler™ PCR Array Rat Hypoxia Signaling Pathway kit (QIAGEN, Germany) were used to analyse gene expression in experimental animals, where 84 genes involved in the hypoxia signalling pathway identified in the pancreas were studied.

Results. According to the results of PCR analysis of pancreatic samples from intact animals and animals exposed to hypoxic training, the activity of the gene panel can be distributed as follows: genes with high expression compared to the intact group of animals, genes with low expression compared to the intact group of animals and genes in which no significant changes were detected in the samples compared to the intact group of animals. We have found, that the genes *Cops5*, *F10*, *Jmjd6*, *Lgals3*, *Rbpjl*, *Vegfa* have high expression activity compared to the intact group of animals.

Conclusions. The increase in the expression of *Cops5* by 10.29 times, *Lgals3* by 2.94 times and *Rbpjl* by 5.73 times as a result of intermittent hypoxia can be regarded as an activating factor for the increase in the proliferation of endocrine and exocrine pancreatic cells and the growth of their antiapoptotic potential. The 3.20-fold increase in *Jmjd6* gene expression under intermittent hypoxia can be interpreted as a regulatory effect through protein dehydroxylation and promotion of antiapoptotic protein activity in endocrine and exocrine pancreatic cells. The 5.99-fold increased level of *Vegfa* expression may promote angiogenesis in the pancreas under intermittent hypoxia.

Доведено, що переривчаста гіпоксія впливає на різноманітні патологічні стани в організмі, у медицині її використовують для відтворення саногенного терапевтичного ефекту [1]. Переривчасту гіпоксію за клінічними показаннями застосовують для покращення функціональної здатності легень, поліпшення адаптаційної здатності організму, при синдромі обструктивного апное сну, анеміях [2,3]. Встановлено, що під час радіотерапії раку переривчасті гіпоксичні тренування сприяють підвищенню чутливості пухлини до лікування [4]. Переривчаста гіпоксія є корисною в реабілітаційній медицині для поліпшення фізичного відновлення пацієнтів, наприклад, після операцій чи травм [5]. Наведений перелік не вичерпний, в світі продовжують активно досліджувати саногенні властивості дії переривчастої гіпоксії на перебіг хвороб.

У попередніх роботах з вивчення ендокринного апарату підшлункової залози при експериментальному цукровому діабеті доведено та визначено низку факторів і впливів, що змінюють популяцію ендокриноцитів і їхню секреторну активність залежно від різних умов та експериментально сформованих патологій. Показано, що дозовані гіпоксичні тренування чинять пряму дію на ендокриноцити підшлункової залози при експериментально сформованому цукровому діабеті зі своїм окремим механізмом [6,7,8].

Визначили участь групи найважливіших й найактивніших генів, що беруть участь у формуванні ендокринного апарату підшлункової залози [9]. Механізми диференціювання ендокриноцитів під впливом регуляторних білків, що кодуються цими генами, активні не тільки в період ембріогенезу, але й продовжують регулювати їх утворення в дорослому віці, коли з протокових клітин ектокринного компонента підшлункової залози утворюються нові форми панкреатичних острівців [10].

Нині недостатньо вивченою залишається активність генів-регуляторів, що активують молекулярні механізми названих саногенних ефектів впливу переривчастої гіпоксії.

Набір ПЛП-матриці RT² Profiler™ PCR Array Rat Hypoxia Signaling Pathway призначений для вивчення активності генів, що беруть участь у сигнальному шляху дії гіпоксії в щурів за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ПЛР). Такий сигнальний шлях дії гіпоксії включає серію молекулярних маркерів клітинного генома (генів), зміна експресії яких відбувається у відповідь на низький рівень парціального тиску кисню в організмі, що відіграє вирішальну роль у регуляції різних фізіологічних і патологічних процесів, включаючи виживання клітин, ангіогенез, метаболізм і запалення.

ПЛП-матриця RT² Profiler™ PCR Array Rat Hypoxia Signaling Pathway дає змогу одночасно ампліфікувати та кількісно визначити активність кількох генів у межах сигнального шляху дії гіпоксії, а також дає змогу ство-

рити профіль експресії ключових генів, афільованих із гіпоксією у різних тканинах організму, як-от у скелетних (литкових) м'язах щурів [11]. Це сприяє розширенню знань про молекулярні механізми і саногенної, й патогенної дії гіпоксії як типового патологічного процесу в різних умовах експериментальних або клінічних методів корекції патологічних станів.

Мета роботи

Визначити особливості експресії генів, що пов'язані з гіпоксією, в підшлунковій залозі щурів лінії Вістар за умов впливу переривчастої гіпоксії.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження здійснили на 10 білих статевозрілих щурах лінії Вістар, яких поділили на 2 групи (по 5 тварин у кожній). Тварини 1 групи утворили контрольну (інтактну) групу. Тваринам 2 групи здійснили гіпоксичні тренування за схемою: 15 днів по 6 годин щоденно, зокрема на 1–5 день в умовах барокамери імітували підйом на висоту 1–5 км над рівнем моря, а останні 10 днів – 6 км над рівнем моря.

Після декапітації експериментальних тварин під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг) здійснили забір підшлункової залози, яку фіксували в розчині Буена (20 годин), після стандартної гістологічної обробки заливали в парапласт (MkCormick, США).

Для аналізу експресії генів використали метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ПЛР) CFX-96 Touch™ (Bio-Rad, США) та набір RT² Profiler™ PCR Array Rat Hypoxia Signaling Pathway (QIAGEN, Німеччина), де об'єктом дослідження в експериментальних тварин були 84 гени, що беруть участь у сигнальному шляху дії гіпоксії та визначені в підшлунковій залозі.

Статистичний аналіз даних ПЛР-дослідження здійснили за допомогою програмного забезпечення PCR GeneGlobe (QIAGEN, Німеччина) з використанням $\Delta\Delta Ct$ методу [12].

Результати

За результатами ПЛР-дослідження генів, у зразках підшлункової залози інтактних тварин і щурів із впливом гіпоксичних тренувань розрізняли активність панелі генів: гени з високою експресією порівняно з інтактною групою тварин, де $\Delta\Delta Ct < 30$; гени з низькою експресією щодо інтактної групи щурів, де $\Delta\Delta Ct < 30$; гени, в яких не виявлені достовірні зміни в зразках порівняно з інтактною групою тварин (табл. 1).

Встановлено, що серед 84 генів, пов'язаних із гіпоксією, виявили патерни генів і з високим ($\Delta\Delta Ct < 30$), і з низьким ($\Delta\Delta Ct < 30$) рівнем експресії. До патерну з

Таблиця 1. Активність експресії генів у щурів внаслідок дії переривчастої гіпоксії щодо показників інтактної групи тварин

Гени з високим рівнем експресії порівняно з інтактною групою тварин	Гени з низьким рівнем експресії порівняно з інтактною групою тварин	Гени, в яких не виявили змін у зразках щодо інтактної групи*
<i>Cops5</i> ; * <i>Eif4ebp1</i> ; <i>Eno1</i> ; <i>F10</i> ; * <i>Hmox1</i> ; <i>Hnf4a</i> ; <i>Jmjd6</i> ; * <i>Ldha</i> ; <i>Lgals3</i> ; * <i>Nfkb1</i> ; <i>Pdk1</i> ; <i>Pfkf1</i> ; <i>Rbpjl</i> ; * <i>Tfrc</i> ; <i>Vegfa</i> *	<i>Arnt</i> ; <i>Bhlhe40</i> ; * <i>Ctsa</i> ; * <i>Hif1a</i> ; * <i>Lox</i> ; * <i>Nos3</i> ; <i>Pfkfb4</i> ; <i>Pim1</i> ; <i>Slc16a3</i> *	<i>Adm</i> ; <i>Adora2b</i> ; <i>Aldoa</i> ; <i>Angptl4</i> ; <i>Ankrd37</i> ; <i>Anxa2</i> ; <i>Apex1</i> ; <i>Blm</i> ; <i>Bnip3</i> ; <i>Bnip3l</i> ; <i>Bitg1</i> ; <i>Car9</i> ; <i>Ccng2</i> ; <i>Cdkn2a</i> ; <i>Ddit4</i> ; <i>Dnajc5</i> ; <i>Edn1</i> ; <i>Egln1</i> ; <i>Egln2</i> ; <i>Egr1</i> ; <i>Epo</i> ; <i>Ero1a</i> ; <i>F3</i> ; <i>Fos</i> ; <i>Gpi</i> ; <i>Gys1</i> ; <i>Hif1an</i> ; <i>Hif3a</i> ; <i>Hk2</i> ; <i>Ier3</i> ; <i>Igfbp3</i> ; <i>LOC367198</i> ; <i>Map3k1</i> ; <i>Met</i> ; <i>Mif</i> ; <i>Mmp9</i> ; <i>Mxi1</i> ; <i>Nampt</i> ; <i>Ndrg1</i> ; <i>Odc1</i> ; <i>P4ha1</i> ; <i>P4hb</i> ; <i>Per1</i> ; <i>Pfkfb3</i> ; <i>Pfkf3</i> ; <i>Pgam1</i> ; <i>Pgf</i> ; <i>Pgk1</i> ; <i>Pgm2</i> ; <i>Pkm</i> ; <i>Plau</i> ; <i>Ruvbl2</i> ; <i>Serpine1</i> ; <i>Slc2a1</i> ; <i>Slc2a3</i> ; <i>Trp53</i> ; <i>Tpi1</i> ; <i>Txnip</i> ; <i>Usf2</i> ; <i>Vdac1</i>

*: гени, для яких середній пороговий цикл – $\Delta\Delta Ct < 30$; *: гени, для яких середній пороговий цикл цього гена не визначено (експресія не виявлена).

Таблиця 2. Активовані гіпоксією гени та їхні ефекти

Ген	Контрольована функція
<i>Cops5</i> <i>Lgals3</i>	Ріст і поділ клітини, апоптоз через регуляцію убіквітинування
<i>F10</i>	Регуляція системи згортання крові
<i>Jmjd6</i>	Регуляція структури та активності клітинних білків через їх дегідроксилювання
<i>Rbpjl</i>	Диференціація клітин
<i>Vegfa</i>	Ангіогенез

високим рівнем експресії належать гени *Cops5*, *F10*, *Jmjd6*, *Lgals3*, *Rbpjl* і *Vegfa*, експресія яких статистично вірогідно перевищує показник інтактних тварин. Так, експресія *Cops5* збільшилася в 10,29 раза, *F10* – в 2,09 раза, *Jmjd6* – в 3,20 раза, *Lgals3* – в 2,94 раза, *Rbpjl* – в 5,73 раза, *Vegfa* – в 5,99 раза.

Обговорення

У рамках цієї статті вирішили обмежитися лише аналізом патерну генів із високим рівнем експресії ($\Delta\Delta Ct < 30$) внаслідок багатоденного впливу переривчастої гіпоксії. Вважаємо, що активація цих шести генів сприяє адаптивним змінам у підшлунковій залозі, насамперед внаслідок ендокринного компонента. Раніше ми визначили це як саногенний ефект гіпоксії [6,7,8].

В умовах переривчастої гіпоксії найбільше підвищення експресії зафіксували у гені *Cops5*, який кодує білок, що входить до складу *COP9*-сигнального комплексу і є важливим білковим комплексом у регуляції різних клітинних процесів. Одна з головних функцій *COP9* – регуляція розкладання білків, зокрема через участь в убіквітинуванні. Це важливо для контролю над рівнем білків, що регулюють клітинні процеси, як-от ріст і поділ, трансляція генетичної інформації, апоптоз. Ген *Lgals3* кодує білок Galactin-3, кількість і рівень активності якого у клітинах різних тканин змінюється за умов гіпоксії.

Висока експресія *Cops5* та *Lgals3* у відповідь на проведення гіпоксичних тренувань, яку визначили у цьому дослідженні, може пояснювати отримані раніше результати. Так, згідно з ними, переривчаста гіпоксія впливає на проліферативну активність бета-ендокриноцитів, рівень експресії в них про- й антиапоптотичних білків та змінює функціональний стан бета-клітин у нормі і при діабеті [6].

Досі не виявили прямих зв'язків між геном *F10* (фактором X) і гіпоксією. Відомо, що ген *F10* кодує фактор згортання крові та впливає передусім на процеси гемостазу та згортання крові. Проте в гематології та медицині бувають випадки, коли гіпоксичні стани можуть впливати

на функціонування системи згортання крові. Наприклад, при тривалій гіпоксії (як та, що виникає високогір'ях або внаслідок респіраторних захворювань) може збільшуватися ризик утворення тромбів у судинах. У такому разі можна зробити висновок, що гіпоксія може впливати на різні аспекти системи згортання крові, включаючи активність гена *F10*. Підвищення його експресії зафіксували у результаті нашого дослідження.

Ген *Jmjd6* відіграє важливу роль у регуляції різних біологічних процесів, включаючи вплив відповіді на гіпоксію. Більшість досліджень гена *Jmjd6* у контексті гіпоксії зосереджені на його ролі в регулюванні генетичних процесів і різних сигнальних шляхів, що пов'язані з відповіддю на гіпоксію [13].

Важливий аспект гена *Jmjd6* у контексті гіпоксії – його функція дегідроксилази. Він може дегідроксилювати білки, впливаючи зокрема на структуру й активність білків, що регулюють біохімічні реакції за умов гіпоксії. Так, *Jmjd6* може брати участь у стабілізації гіпоксичну-5'-фосфату (Hypusine) у факторі ініціації трансляції *EIF5A* (eukaryotic initiation factor 5A), який має важливе значення для регуляції біосинтезу білків. Отже, збільшення експресії гена *Jmjd6*, що виявили, можна інтерпретувати як молекулярну регуляцію здатності клітин реагувати на гіпоксію й адаптуватися до неї. Ці висновки підтверджено іншими авторами [14].

Rbpjl – ген, що кодує білок RBPJL. Цей білок відомий за своєю роллю в регуляції генної експресії та впливом на різні біологічні процеси. Один із важливих шляхів, у якому взаємодіє RBPJL, – шлях Notch, який є важливим у багатьох аспектах розвитку та диференціації клітин [15]. Гіпоксичні стани можуть впливати на ген *Rbpjl* та спричиняти зміни його експресії. Виявлені зміни експресії – елемент компенсаторних механізмів організму в адаптації до недостачі кисню, впливають на гомеостаз глюкози. Це показано в попередніх дослідженнях [16,17].

Ген *Vegfa* кодує білок, відомий як фактор росту судин (ангіогенезу) типу А. Цей ген відіграє важливу роль у розвитку та збереженні судин, а також у регуляції постачання кисню до тканин. Під впливом гіпоксії, що виникає при недостатньому надходженні кисню до тканин, активується експресія гена *Vegfa*. Це спостерігали під час дослідження, що здійснили. Умови гіпоксії можуть стати причиною для змін рівня експресії гена *Vegfa*, оскільки організм намагається компенсувати нестачу кисню, сприяючи росту нових судин, що можуть забезпечити активним кровопостачанням тканини й органи [18]. Активація ангіогенезу при дозованій гіпоксії – важливий процес під час загоєння ран, регенерації тканин і розвитку нових судин у відповідь на різні фізіологічні й патологічні стани [5].

Загальні ефекти активованих гіпоксією генів, що виявили у результаті дослідження, наведено в таблиці 2.

Отже, одержано нові дані щодо патерну ключових генів, афільованих із гіпоксією, які дають уявлення про окремі молекулярно-генетичні механізми, завдяки яким відтворюється саногенний вплив переривчастої гіпоксії на ендокринний апарат підшлункової залози за умов розвитку експериментального цукрового діабету. Ці факти наведено в попередніх працях [6,7,8,17,18,19].

Аналізу патерну генів із низьким рівнем експресії ($\Delta\Delta Ct < 30$) внаслідок багатоденного впливу переривчастої гіпоксії буде присвячена окрема публікація.

Висновки

1. Збільшення експресії генів *Cops5* (у 10,29 раза), *Lgals3* (в 2,94 раза) і *Rbpjl* (в 5,73 раза) внаслідок дії переривчастої гіпоксії можна визначили як активуючий фактор підвищення проліферації ендокринних та екзокринних клітин підшлункової залози та зростання в них антиапоптотичного потенціалу.

2. Збільшення експресії гена *Jmjd6* (в 3,20 раза) при переривчастій гіпоксії можна інтерпретувати як регуляторні впливи через дегідроксилювання білків і сприяння зростанню активності антиапоптотичних білків в ендокринних та екзокринних клітинах підшлункової залози.

3. Збільшений рівень експресії *Vegfa* (в 5,99 раза) може спричиняти ангіогенез у підшлунковій залозі в умовах дії переривчастої гіпоксії.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: author has no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 03.11.2023

Після доопрацювання / Revised: 29.11.2023

Схвалено до друку / Accepted: 07.12.2023

Відомості про авторів:

Іваненко Т. В., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна. ORCID ID: 0000-0001-6617-5178

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

ORCID ID: 0000-0002-1556-5085

Абрамов А. В., д-р мед. наук, професор каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна. ORCID ID: 0000-0001-8520-2258

Information about authors:

Ivanenko T. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Physiology with 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, Rector of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Honored Science and Technology Figure of Ukraine. Abramov A. V., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathological Physiology with the Course of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

References

- Navarrete-Opazo, A., & Mitchell, G. S. (2014). Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 307(10), R1181-R1197. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00208.2014>
- Raffay, T. M., & Martin, R. J. (2020). Intermittent hypoxia and bronchial hyperreactivity. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 25(2), 101073. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2019.101073>
- Korkushko, O. V., & Slipchenko, V. H. (Eds.). (2015). *Hipoksiia yak metod pidvyshchennia adaptatsiinoi zdatnosti orhanizmu* [Hypoxia as a method of increasing the adaptive capacity of the body]. Kyiv: NTUU "KPI". [in Ukrainian].
- Infantino, V., Santarsiero, A., Convertini, P., Todisco, S., & Iacobazzi, V. (2021). Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5703. <https://doi.org/10.3390/ijms22115703>
- Gonzalez-Rothi, E. J., Lee, K. Z., Dale, E. A., Reier, P. J., Mitchell, G. S., & Fuller, D. D. (2015). Intermittent hypoxia and neurorehabilitation. *Journal of applied physiology*, 119(12), 1455-1465. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00235.2015>
- Ivanenko, T. V., Kolesnyk, Yu. M., & Abramova, T. V. (2017). Analiz endokrynnoho statusu ta rivnia ekspresii bilkiv apoptozu i proliferatsii v pankreatychnykh ostrivtsiakh shchuriv z eksperymentalnym tsukrovym diabetom pislia zakinchennia pereryvchastykh hipoksychnykh trenuvan. *Patohiia, reabilitatsiia, adaptatsiia*, 15(2), 17-20. [in Ukrainian].
- Ivanenko, T. V. (2015). Vliyanie gipoksicheskikh trenirovok na tsitoarkhitektoniku pankreaticheskikh ostrovkov pri eksperimentalnom sakharom diabetie. *Pathologia*, (1 Suppl), 52-53. [in Russian].
- Ivanenko, T. V., Abramov, A. V., Kolesnyk, Yu. M., Zhulinskii, V. O., & Kovalov, M. M. (2013). Stymulatsiia funktsionalnoho stanu beta-klityn pankreatychnykh ostrivtsiv bahatodennoiu pereryvchastoio hipoksiieiu. *Zdobutky klinichnoi i eksperymentalnoi medytsyny*, (2), 246. [in Ukrainian].
- Ivanenko, T. V., & Vynokurova, A. V. (2021). Kliuchovi molekuliarno-henetychni rehulatory dyferentsiuvannia endokrynotsytiv pidshlunkovoi zalozy [Key molecular genetic regulators of pancreatic endocrinocyte differentiation]. *Klinichna ta eksperymentalna patohiia*, 20(4), 116-121. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.24061/1727-4338.XX.4.78.2021.15>
- Rukstalis, J. M., & Habener, J. F. (2009). Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration. *Islets*, 1(3), 177-184. <https://doi.org/10.4161/isl.1.3.9877>
- Nimker, C., Singh, D. P., Saraswat, D., & Bansal, A. (2016). Preconditioning with ethyl 3,4-dihydroxybenzoate augments aerobic respiration in rat skeletal muscle. *Hypoxia*, 4, 109-120. <https://doi.org/10.2147/HPS.102943>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Mo, C., Xu, M., Wen, C., Chang, R., Huang, C., Zou, W., Zhu, X., & Guo, Q. (2018). Normalizing JMJD6 Expression in Rat Spinal Dorsal Horn Alleviates Hyperalgesia Following Chronic Constriction Injury. *Frontiers in neuroscience*, 12, 542. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00542>
- Xu, G., Chen, H., Wu, S., Chen, J., Zhang, S., Shao, G., Sun, L., Mu, Y., Liu, K., Pan, Q., Li, N., An, X., Lin, S., & Chen, W. (2022). Eukaryotic initiation factor 5A2 mediates hypoxia-induced autophagy and cisplatin resistance. *Cell death & disease*, 13(8), 683. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05033-y>
- Pan, L., Hoffmeister, P., Turkiewicz, A., Huynh, N. N. D., Große-Berkenbusch, A., Knippschild, U., Gebhardt, J. C. M., Baumann, B., Borggrefe, T., & Oswald, F. (2021). Transcription Factor RBPJL Is Able to Repress Notch Target Gene Expression but Is Non-Responsive to Notch Activation. *Cancers*, 13(19), 5027. <https://doi.org/10.3390/cancers13195027>
- Wong, W. P. S., Wang, J. C., Schipma, M. J., Zhang, X., Edwards, J. R., & El Muayed, M. (2021). Cadmium-mediated pancreatic islet transcriptome changes in mice and cultured mouse islets. *Toxicology and applied pharmacology*, 433, 115756. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115756>
- Kolesnik, Yu. M., Abramov, A. V., Ivanenko, T. V., Zhulinskii, V. A., & Gancheva, O. V. (2012). Sanogennoe vliyanie mnogodnevnykh gipoksicheskikh trenirovok na endokrinnyu funktsiyu pankreaticheskikh ostrovkov krys s eksperimentalnym sakharym diabetom. *Fiziologichnyi zhurnal*, 58(4), 67. [in Russian].
- White, A. L., & Bix, G. J. (2023). VEGFA Isoforms as Pro-Angiogenic Therapeutics for Cerebrovascular Diseases. *Biomolecules*, 13(4), 702. <https://doi.org/10.3390/biom13040702>
- Ivanenko, T. V., Abramov, A. V., Kolesnik, Yu. M., & Vasilenko, G. V. (2011). Endokrinnyi status i uroven ekspresii belkov Bcl-2 i p53 v pankreaticheskikh ostrovkakh u krys s eksperimentalnym sakharym diabetom [Endocrine status and the level of Bcl2 and p53 protein expression in pancreatic islets of rats with experimental diabetes mellitus]. *Pathologia*, 8(2), 18-20. [in Russian].

Дексаметазон і гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор змінюють представництво клітинних патернів і невротизацію регенераційної невроми

О. М. Грабовий¹, Н. М. Невмержицька^{1*}, О. Б. Альохін²,
Г. Б. Костинський³, Г. Ю. Кондаурова¹

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна, ²Маріупольський державний університет, м. Київ, Україна, ³Приватний 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-
стимулювальний
фактор.

Патологія. 2023.
Т. 20, № 3(59).
С. 222-230

*E-mail:
natalianmu@ukr.net

Мета роботи – оцінити зміни загальної клітинності (*Nuc*) регенераційної невроми (RegN) сідничного нерва щурів і представництва в ній *CD90*, *CD44*, *CD146*, *CD133* позитивних клітин, а також її невротизацію за умов дії дексаметазону (Dex) та гранулоцитарного колонієстимулювального фактора (GCSF).

Матеріали та методи. За умов дії дексаметазону та гранулоцитарного колонієстимулювального фактора у 168 щурів-самців лінії Вістар у регенераційній невромі імуногістохімічно виявляли *CD90*, *CD44*, *CD146* і *CD133* позитивні клітини, визначали її загальну клітинність і невротизацію. Виконали статистичне опрацювання результатів, що одержали.

Результати. Виявили, що дексаметазон і гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор змінюють представництво клітинних патернів і невротизацію регенераційної невроми.

Висновки. Обсяг невротизації регенераційної невроми безпосередньо залежить від питомої кількості шваннівських клітин у її складі. Dex і GCSF, незважаючи на різні механізми дії, призводять до зростання вмісту нейролемоцитів у RegN. GCSF призводить до збільшення у складі RegN кількості мезенхімальних клітин, які експресують маркери, що є прямим (*CD90/Thy1*) і додатковими (*CD44*, *CD146* і *CD133*) критеріями стовбуровості. При невеликому діастазі між кінцями перетнутого нерва помірне зменшення або збільшення кількості клітин мезенхімального ряду не впливає на невротизацію невроми. Dex затримує диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин, що мігрували в невромі; це призводить до їх персистенції. GCSF сприяє накопиченню мезенхімальних стовбурових клітин у RegN. Дія Dex або GCSF результується підвищенням функціональної активності клітин мезенхімального ряду та нейролемоцитів у складі RegN. Dex і GCSF потенціюють ефекти один одного, що спричиняє значне збільшення об'єму невротизації RegN.

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

Pathologia, 2023.
20(3), 222-230

Dexamethasone and granulocyte colony-stimulating factor alter the representation of cellular patterns and neurotisation of regenerative neuroma

O. M. Grabovyi, N. M. Nevmerzhitska, O. B. Aliokhin, H. B. Kostynskyi, H. Yu. Kondaurova

Aim. To evaluate the changes in the total cellularity (*Nuc*) of the rat sciatic nerve regenerative neuroma (RegN) and its representation of CD90, CD44, CD146, and CD133 positive cells, as well as its neurotization under the conditions of dexamethasone (Dex) and granulocyte colony-stimulating factor (GCSF).

Materials and methods. After injections of dexamethasone and granulocyte colony-stimulating factor in the regenerative neuroma of 168 male Wistar rats, CD90, CD44, CD146 and CD133 positive cells were detected immunohistochemically in the regenerative neuroma. Its total cellularity and neurotization were determined and statistical processing of the obtained data was performed.

Results. It was found that dexamethasone and granulocyte colony-stimulating factor change the representation of cellular patterns and neurotization of regenerative neuroma.

Conclusions. The amount of neurotization of the regeneration neuroma directly depends on the specific amount of Schwann cells in its composition. Dex and GCSF, despite different mechanisms of action, lead to an increase in the content of neuroleumocytes in RegN.

Ціллю регенерації пошкодженого периферичного нерва є відновлення невротизації його периферичної частини внаслідок росту відростків нейронів. Це можливо, якщо є відповідне тканинне середовище. У разі повного перетину таке середовище має утворитися *de novo* між відрізками пошкодженого нерва. Обов'язкова умова для проростання нервових волокон – на-

явність шваннівських клітин [1]. Зауважимо, що для їхньої життєдіяльності необхідне сполучнотканинне середовище з кровоносними мікросудинами [2]. Це середовище є дуже гетерогенним за клітинним складом, а також зазнає динамічних змін під час регенерації нерва [3]. Відповідно, можна припустити, що клітини мезенхімального походження різного імунофенотипу

будуть по-різному впливати на регенерацію нервових волокон, й окремі прояви таких впливів можна оцінити, змінюючи клітинний склад регенераційної неврони (PerN) [4].

У цьому контексті кортикостероїди можуть бути дослідницьким інструментом [4], що має суттєво змінювати клітинні реакції при перебігу репаративних процесів [5]. Втім, вони мають неоднозначні ефекти щодо регенерації нервів [6]. Інші агенти, що діють на процеси проліферації, міграції та диференціювання клітин мезенхімального ряду, – фактори росту, які привертають до себе увагу при впливі на регенерацію периферичних нервів [7,8]. Гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор (GCSF) серед них потребує особливої уваги, оскільки активує та мобілізує мезенхімальні стовбурові клітини [9]. Його застосування при пошкодженні периферичних нервів спричиняє низку позитивних ефектів щодо їх відновлення [10,11].

Мета роботи

Оцінити зміни загальної клітинності регенераційної неврони сідничного нерва щурів і представництва в ній *CD90*, *CD44*, *CD146*, *CD133* позитивних клітин, а також її невротизацію за умов дії дексаметазону та гранулоцитарного колонієстимулювального фактора.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження здійснили на 168 щурах-самцях лінії Вістар масою 220–250 г, яких 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 для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), та 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 від 23.12.2019 № 128.

Оперативне втручання виконали під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг внутрішньоочеревинно). На правому стегні щурів видалили шерсть, обробили шкіру 5 % розчином йоду та зробили розріз шкіри по задній поверхні. Тупим шляхом роз'єдали м'язи, перерізали сідничний нерв на рівні середини стегна. Рану зашили пошарово, операційне поле обробили 5 % розчином йоду.

Усіх тварин рандомізовано поділили на 4 групи (по 42 щури):

1 група (контроль, **C**) – з 1 по 5 день після операції підшкірно тваринам вводили 0,5 мл 0,9 % розчину NaCl;

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

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

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

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

Фрагмент нерва з регенераційною невромою для дослідження забирали через 1, 3, 7, 14, 28 і 56 днів після невротомії (по 7 тварин на кожен строк), фіксували в 10 % формаліні (рН 7,4; 40 °С, 48 годин), ущільнювали в парапласт і виготовляли зрізи завтовшки 4 мкм і 10 мкм. Для виявлення осьових циліндрів зрізи завтовшки 10 мкм депарафінували й імпрегнували сріблом, надалі обробляли хлорним золотом. Питому довжину нервових волокон, що регенерували, у PerN визначали за методом лінійного інтегрування [12].

Зрізи завтовшки 4 мкм забарвлювали гематоксином та еозином, а також виконали імуногістохімічні (ІГХ) реакції відповідно до протоколів виробників антитіл. Використали такі первинні антитіла: мишає моноклональне до *CD90/Thy1* (MRC OX-7, Abcam, UK), розведення 1:200; мишає моноклональне до *CD44* (OX49, Abcam, UK), розведення 1:500; кроляче поліклональне до *CD146* (Thermo Fisher Scientific Inc. (Invitrogen)), розведення 1:400; кроляче поліклональне до *CD133* (Thermo Fisher Scientific Inc. (Invitrogen)), розведення 1:250. Продукти реакції візуалізували за допомогою системи детекції на основі діамінобензидину (EnVision FLEX, Dako, Данія).

Отримані препарати досліджували та фотографували за допомогою мікроскопа Olympus B53 з цифровою фотокамерою SP180. На цифрових зображеннях $\times 400$ (300×225 мкм; 1224×920 пікселів RGB, режим освітлення – фото, стандартизована експозиція) визначали експресію ІГХ-маркерів, які досліджували, напівкількісним методом із використанням програмного забезпечення ImageJ 1.46 (Wayne Rasband, NIH, USA) для проведення деконволюції [13]. Вимірювання здійснили в 7 тестових точках у матеріалі від кожної експериментальної тварини.

Числові дані (часові ряди) опрацювали з використанням стандартних статистичних методів, обчислили середнє арифметичне значення, стандартне відхилення та стандартну помилку середнього. Точний тест Колмогорова–Смирнова показав, що всі показники відповідають закону нормального розподілу. Для оцінювання значущості міжгрупових відмінностей використали критерій Стюдента. Відмінності між показниками вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Під час аналізу загальної подібності отриманих часових рядів як міру подібності використали кореляцію Пірсона. Поглиблений порівняльний аналіз динамічних рядів здійснили шляхом аналітичного вирівнювання часових рядів за допомогою логістичної кривої (формула (1)),

$$f(t) = \frac{L}{1 + e^{-k(t-t_0)}}, \quad (1)$$

де L – максимально можливе значення функції $f(t)$; k – швидкість росту (кількість клітин); t , t_0 – час і величина зміщення кривої вздовж осі абсцис щодо початку координат, лінійного регресійного аналізу зв'язків між спостережуваними змінними та змістовної інтерпретації їхніх параметрів.

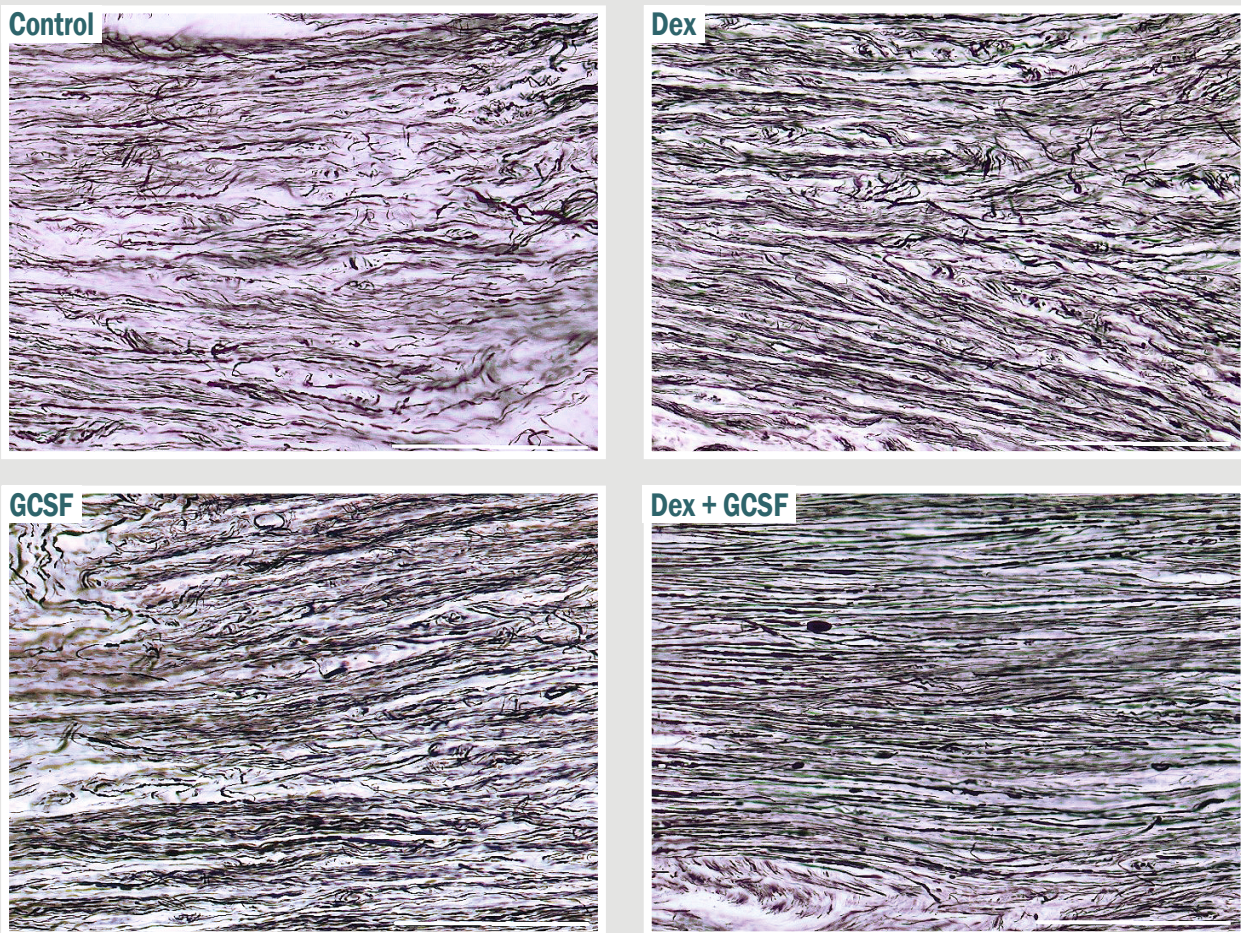


Рис. 1. Осьові циліндри у складі регенераційної невромі сідничного нерва щура через 56 днів після нейротомії. Імпрегнація азотнокислим сріблом, хлорне золото. **Control:** умовно інтактні тварини; **Dex:** тварини, що зазнали дії Dex; **GCSF:** тварини, що зазнали дії GCSF; **Dex + GCSF:** тварини, що зазнали дії Dex і GCSF. 36. ×400.

Результати

У тварин групи контролю регенерація перетнутого сідничного нерва відбувалася за стереотипною кінетикою. У дефект між відрізками нерва, заповнений фібринозно-кров'янистим згустком, проникали лейкоцити, фібробласти та тонкостінні кровоносні судини. З часом у регенераційній невромі, що формувалася, зменшувалася інфільтрація лейкоцитами, збільшувався вміст клітин фібробластичного ряду, починали накопичуватися шваннівські клітини. Саме вони пізніше формували бюгнеровські смужки.

Разом з тим, виявляли пучки (як правило, тонкі) колагенових волокон, що були нерівномірно розподілені в регенераті. Загальна щільність клітин у регенераті зростала протягом перших двох – чотирьох тижнів після невротомії, а потім відбувалося виразне зменшення клітинності новоутвореної ділянки нерва. Через 56 днів спостереження в регенераційній невромі виявляли чимало осьових циліндрів, більшість із них спрямовані в периферичний відрізок нерва (рис. 1, **Control**).

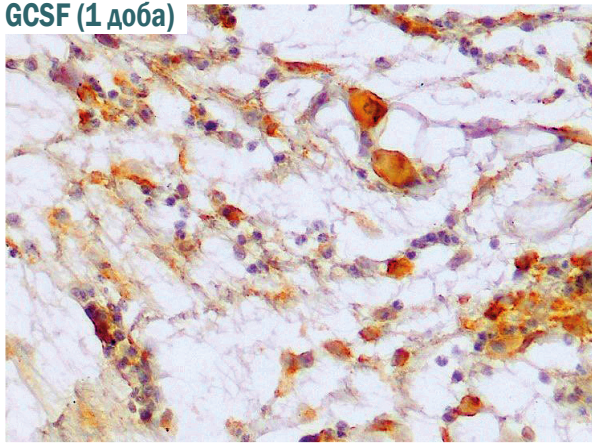
Дія Dex на регенерацію нерва (1–7 доба) призводила до різкого зменшення клітинної запальної інфільтрації, уповільнення, зменшення накопичення фібробластів, а також її васкуляризації. На цьому фоні дещо зростала швидкість накопичення в невро-

мі нейролемоцитів. Спостерігали зменшення обсягу утворення сполучнотканинних волокон і формування масивніших бюгнеровських стрічок. Під впливом Dex РегН загалом мала меншу клітинність, ніж у контролі. Але в ній, на відміну від контролю, з'являлися великі клітини з великим гомогенним округлим ядром. На 7 і 14 добу після невротомії вони подекуди формували скупчення. Як і в контролі, за умов впливу Dex через 56 днів після початку експерименту в новоутвореній ділянці нерва виявляли багато нервових волокон (рис. 1, **Dex**).

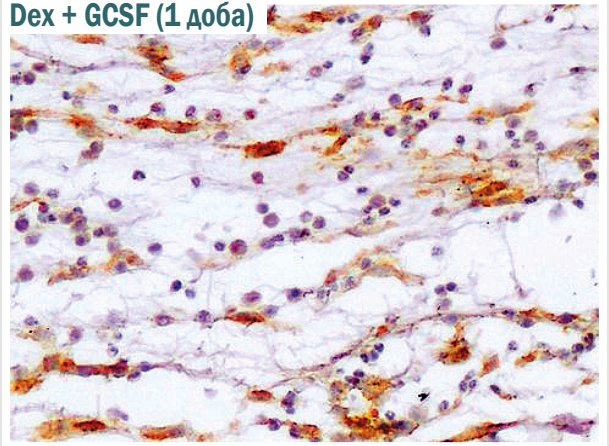
GCSF (1–3 доби) призводив до певного зменшення клітинної запальної інфільтрації РегН, прискорення та посилення мікроангіогенезу. Порівняно з групою **Dex**, у ній зростала кількість клітин неправильної / округлої форми з округлими гомогенними ядрами, але вони зазвичай мали менші розміри. Загалом РегН характеризувалася вищою клітинністю та формуванням масивніших пучків нейролемоцитів. Через 56 днів після початку дослідження в РегН виявили чимало новоутворених нервових волокон (рис. 1, **GCSF**).

При одночасній дії Dex і GCSF спостерігали різке зменшення явищ запалення, уповільнення та зменшення у РегН обсягів накопичення фібробластів і колагеногенезу. Виявили, що регенерат в інтервалі

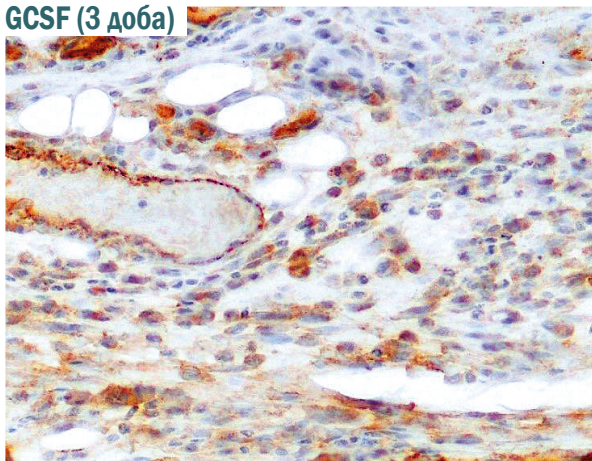
GCSF (1 доба)



Dex + GCSF (1 доба)



GCSF (3 доба)



Dex + GCSF (3 доба)

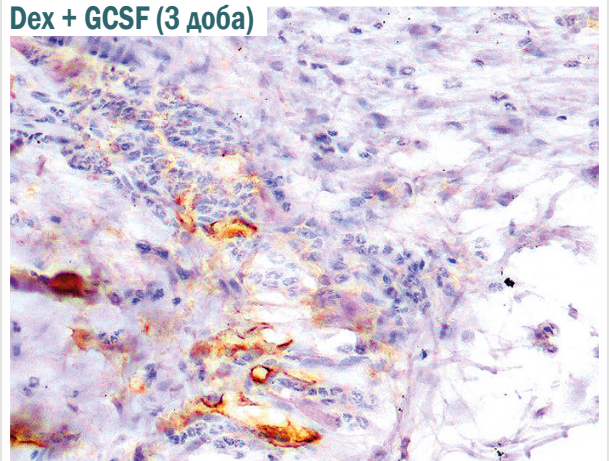


Рис. 2. Експресія *CD90* у клітинах регенераційної неврими сідничного нерва щура через 1 і 3 доби після нейротомії. ІГХ. Мікрофото, об. 40, ок. 10. **GCSF**: тварини, що зазнали дії GCSF; **Dex + GCSF**: тварини, що зазнали дії Dex і GCSF.

1–7–14–(28) днів досліджу мав меншу клітинність, ніж у контролі. Разом із тим, у ньому накопичувалися клітини неправильної / округлої форми, що на 7 і 14 доби могли утворювати скупчення. Нейролемоцити накопичувалися у неврмі швидше, ніж у контролі, мали менші розміри та формували компактні пучки. Порівняно з іншими дослідними групами щурів, будова новоутвореного фрагмента найбільш подібна до такої в інтактного нерва. Наприкінці спостережень у РегН виявляли нервові волокна, щільність сітки яких візуально сприймалася як більша, ніж у контролі (рис. 1, **Dex + GCSF**).

ІГХ-дослідження дали змогу оцінити участь у регенерації нерва окремих патернів клітин, передусім мезенхімальних.

Так, експресію *CD90* виявили в поодиноких клітинах РегН тільки у групах **GCSF**, **Dex + GCSF** і лише через 1 і 3 (в меншій кількості) доби після невротомії. Зауважимо, що Dex зменшував імунореактивність до *CD90*, яку потенціював GCSF (рис. 2).

Більшість клітин мезенхімального типу в РегН, що формувалася, мали низьку або середню цитоплазматичну експресію *CD44*. На ранніх етапах (1 і 3 доби) іноді виявляли клітини лімфоїдної морфології з високою мембранною експресією цього маркера. Застосування

антитіла проти *CD44* у більшому розведенні (1:500) дало змогу підвищити чіткість візуалізації патерну клітин із середньою і високою імунореактивністю до *CD44*. Клітини, що морфологічно верифікували як шваннівські, не мали переконливих ознак експресії *CD44*. Під впливом Dex частина клітин показала високий рівень цитоплазматичної та мембранної експресії *CD44*. Часто такі клітини мали великі розміри та велике округле ядро. Через 7 і 14 днів після невротомії вони могли формувати скупчення. GCSF призводив також до збільшення кількості *CD44*+-клітин із цитоплазматичною експресією в термін 1–7 діб досліджу. У групі **Dex + GCSF** спостерігали збільшення кількості клітин із високою експресією *CD44*+, їх виявляли й на 14 добу після невротомії. Чимала частка таких клітин мала доволі великі розміри, неправильну / округлу форму та велике гомогенне ядро.

Експресія *CD146* у неврмі пов'язана і з мезенхімоподібними клітинами, і з нейролемоцитами, а її динаміка збігалася з загальною клітинністю регенерату.

Патерн *CD133*+клітин у РегН протягом усього періоду спостережень за обсягом конкурував із *CD44*+, але за рівнем експресії суттєво переважав (рис. 3). Загалом експресія цього маркера пов'язана з поліморфними клітинами мезенхімального ряду. Часто

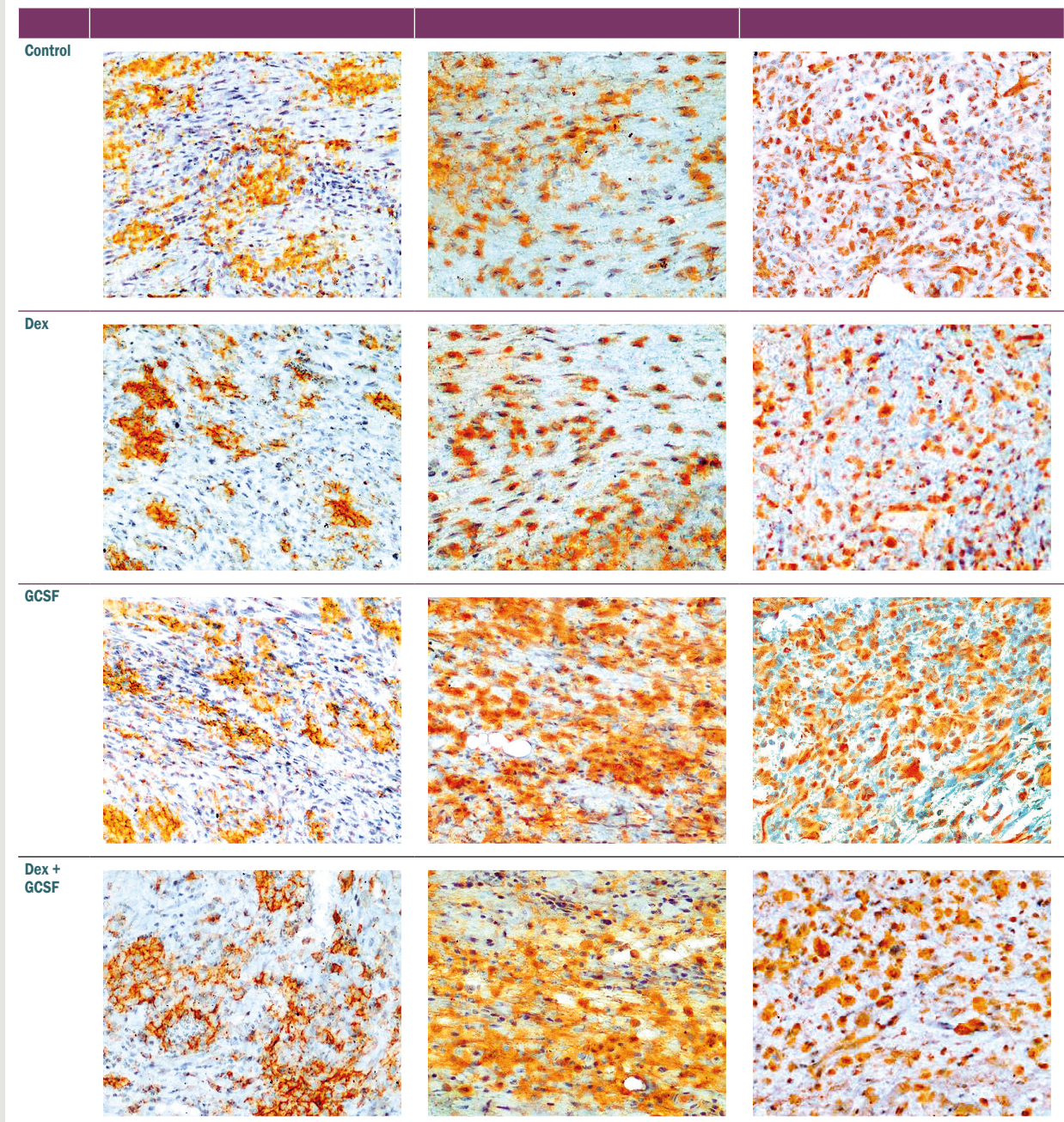


Рис. 3. Експресія *CD44*, *CD146* і *CD133* у клітинах регенераційної невроми сідничного нерва щура через 7 днів після невротомії. ІГХ. Мікрофото, об. 40, ок. 10. **Control:** умовно інтактні тварини; **Dex:** тварини, що зазнали дії Dex; **GCSF:** тварини, що зазнали дії GCSF; **Dex + GCSF:** тварини, що зазнали дії Dex і GCSF.

вони комплексувалися з кровоносними мікросудинами. Клітини, які морфологічно верифікували як шваннівські, не мали переконливих ознак експресії *CD133*.

Виконання деконволюції на цифрових фотографіях зрізів з ІГХ-реакціями дало змогу здійснити порівняльну кількісну характеристику питомої щільності ядер клітин у РегН, що є еквівалентом їхньої кількості (рис. 4). Динаміка показника загальної клітинності (*Nuc*) у всіх експериментальних групах характеризувалася надзвичайно високим рівнем подібності (ступінь близькості всіх кривих контролю перевищує 0,98, табл. 1). У контролі крива накопичення клітин у РегН

мала параболічну форму з максимумом (за лінією тренду) між 14 та 28 добами після невротомії. Dex змінював форму кривої, надаючи їй ознак S-подібної. Це пов'язано з істотним зменшенням швидкості накопичення клітин у регенераті протягом першого тижня досліду та зміщенням максимуму *Nuc* до 28 дня експерименту, супроводжувалося загальним зменшенням клітинності регенерату. Візуально це визначали на першому тижні досліду переважно за клітинами запальної інфільтрації, надалі – за фібробластоподібними клітинами. GCSF, не змінюючи форму кривої, фактично спричиняв збільшення клітинності регенерату протя-

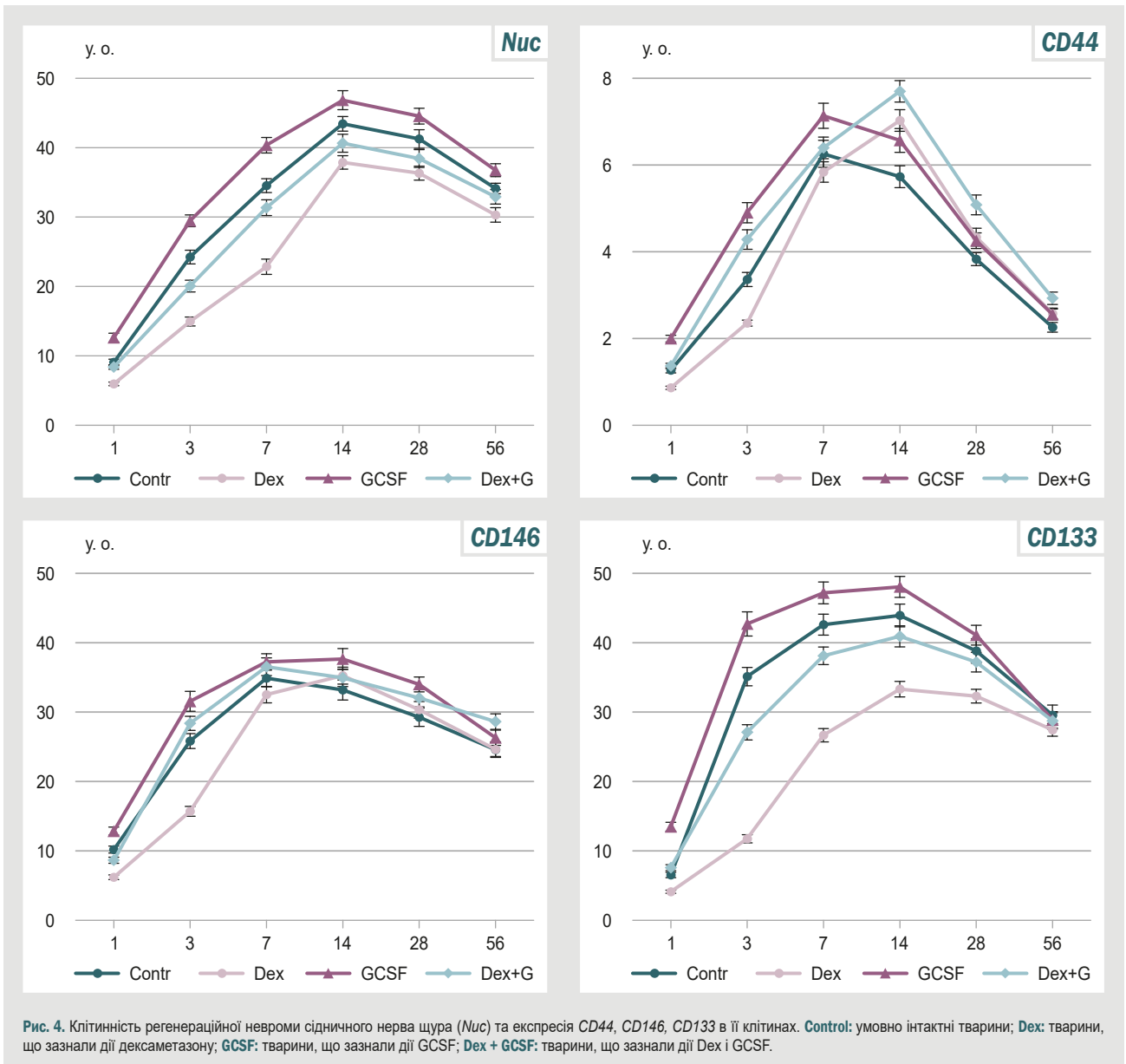


Рис. 4. Клітинність регенераційної невроми сідничного нерва щура (*Nuc*) та експресія *CD44*, *CD146*, *CD133* в її клітинах. **Control**: умовно інтактні тварини; **Dex**: тварини, що зазнали дії дексаметазону; **GCSF**: тварини, що зазнали дії GCSF; **Dex + GCSF**: тварини, що зазнали дії Dex і GCSF.

гом усього періоду спостереження. При одночасній дії Dex і GCSF крива *Nuc* за формою відтворювала таку в контролі, але на нижчому рівні. Застосування GCSF не тільки максимально прискорило процес збільшення кількості клітин (значення параметра k максимальне, дорівнює 0,81, *табл. 2*), але й збільшило потенціал зростання (L також максимальне, становить 42,35). На відміну від групи **GCSF**, у групах **Dex** і **Dex + GCSF** зафіксували зворотний ефект, що зменшив обидва показники порівняно з контролем. Зауважимо, що для **Dex** це мало максимальний прояв щодо швидкості розподілу клітин – показник k знизився майже вдвічі.

Кількісний аналіз експресії *CD44* у клітинах RegH показав: найбільші зміни її динаміки викликав Dex, дещо менші – Dex + GCSF, найменші – GCSF (ступінь близькості відповідних рядів щодо контролю становить 0,942, 0,958 і 0,979 відповідно, *табл. 1*). При цьому Dex суттєво уповільнював збільшення кількості клітин ($k = 1,03$, $t_0 = 2,95$, *табл. 2*), GCSF помітно його при-

скорював ($k = 1,76$, $t_0 = 1,25$), а Dex + GCSF впливав слабо ($k = 1,20$, $t_0 = 1,94$). У всіх експериментальних групах пікові значення показника *CD44* перевищили такий у контролі, а в разі застосування Dex без GCSF і в поєднанні з ним період зростання кількості клітин став тривалішим (*рис. 4*).

На динаміку *CD146* помітно впливав лише Dex, застосування якого призвело до уповільнення (порівняно з контролем) швидкості зростання кількості клітин на початковій стадії формування RegH (*рис. 4*). Втім, це не спричинило відхилення щодо досягнення пікових і фінальних значень порівняно з іншими групами дослідження.

Згідно з даними аналізу, ступінь близькості відповідної кривої з контрольною виявився найменшим (0,887, *табл. 1*) при дуже високому ступені близькості інших кривих (0,986 для **GCSF** і 0,989 для **Dex + GCSF**); швидкість збільшення кількості клітин у групі **Dex** найменша ($k = 0,86$ мінімальна), а перебіг

Таблиця 1. Матриця близькості часових рядів клітинності (*Nuc*) регенераційної неврони та експресії *CD44*, *CD146*, *CD133* в її клітинах

Показник	Contr	Dex	GCSF	Dex + GCSF
<i>Nuc</i>	1,000	0,965	0,995	0,995
<i>CD44</i>	1,000	0,942	0,979	0,958
<i>CD146</i>	1,000	0,887	0,986	0,989
<i>CD133</i>	1,000	0,802	0,976	0,978

Contr: контрольна група щурів; **Dex:** тварини, що зазнали дії Dex; **GCSF:** тварини, що зазнали дії GCSF; **Dex + GCSF:** тварини, що зазнали дії Dex і GCSF.

Таблиця 2. Параметри логістичних функцій (1) як моделей часових рядів

Показник	Contr			Dex			GCSF			Dex + GCSF		
	L	k	t_0	L	k	t_0	L	k	t_0	L	k	t_0
<i>Nuc</i>	38,88	0,70	2,48	34,82	0,37	4,52	42,35	0,81	2,02	37,05	0,52	3,00
<i>CD44</i>	4,51	1,11	1,91	4,95	1,03	2,98	5,13	1,76	1,25	5,52	1,20	1,94
<i>CD146</i>	15,24	1,22	1,57	15,40	0,86	2,83	16,90	1,57	1,31	16,52	1,43	1,73
<i>CD133</i>	19,36	1,94	1,82	15,48	0,61	3,88	20,79	5,22	1,14	18,13	1,22	2,10

Contr: контрольна група щурів; **Dex:** тварини, що зазнали дії Dex; **GCSF:** тварини, що зазнали дії GCSF; **Dex + GCSF:** тварини, що зазнали дії Dex і GCSF; **L:** максимально можливе значення функції $f(t)$; **k:** швидкість росту (кількість клітин); t_0 : час і величина зміщення кривої вздовж осі абсцис щодо початку координат.

Таблиця 3. Значення коефіцієнтів при незалежній змінній рівнянь регресії між показниками *CD44*, *CD146*, *CD133* і *Nuc* у різних експериментальних групах щурів

Маркери	Contr		Dex		GCSF		Dex + GCSF	
	<i>Nuc</i>	<i>CD133</i>	<i>Nuc</i>	<i>CD133</i>	<i>Nuc</i>	<i>CD133</i>	<i>Nuc</i>	<i>CD133</i>
<i>CD44</i>	0,11	0,24	0,14	0,32	0,11	0,28	0,14	0,34
<i>CD146</i>	0,31	0,63	0,39	0,90	0,34	0,69	0,36	0,81
<i>CD133</i>	0,49	–	0,46	–	0,44	–	0,47	–

Contr: контрольна група щурів; **Dex:** тварини, що зазнали дії Dex; **GCSF:** тварини, що зазнали дії GCSF; **Dex + GCSF:** тварини, що зазнали дії Dex та GCSF. Індикатори шапки таблиці – незалежні змінні, а ІГХ-маркери – залежні змінні.

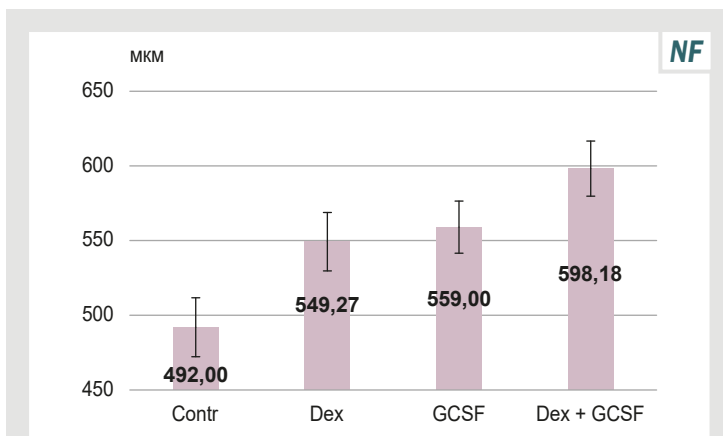


Рис. 5. Питома довжина нервових волокон у РегН щура через 56 днів після невротомії (мкм/130 × 130 мкм зрізу, $M \pm m$). **Control:** умовно інтактні тварини; **Dex:** тварини, що зазнали дії Dex; **GCSF:** тварини, що зазнали дії GCSF; **Dex + GCSF:** тварини, що зазнали дії Dex і GCSF.

самого процесу на стадії зростання істотно уповільнений щодо такого в інших групах ($k = 0,86$ – мінімальний, а $t_0 = 2,83$ – максимальний).

На динаміку кількості *CD133*+клітин значущо впливав Dex. Так, ступінь близькості відповідної кривої до контролю становила 0,802 (табл. 1), а для інших кривих – 0,976 (для **GCSF**) і 0,978 (для **Dex + GCSF**). Зазначимо, що дія цього препарату позначилася на швидкості збільшення кількості клітин ($k = 0,61$ – мінімальна, табл. 2) і загалом уповільнила процес ($t_0 = 3,88$ максимальний). У групі **Dex + GCSF** зберігався цей ефект, але він менш виражений ($k = 1,22$, $t_0 = 2,10$).

На відміну від Dex, застосування GCSF призвело до збільшення швидкості зростання кількості клітин і прискорення процесу загалом ($k = 5,222$, $t_0 = 1,14$, табл. 2).

Робасне оцінювання зміни клітинного складу тканини під впливом досліджених препаратів за допомогою лінійних регресійних моделей і порівняння їхніх коефіцієнтів дало змогу встановити низку закономірностей щодо змін клітинного складу РегН при дії Dex та GCSF (табл. 3).

Dex збільшив (порівняно з контролем) відсоткове співвідношення клітин типу *CD44*, *CD146* з *Nuc* (з 11 % до 14 %, з 31 % до 39 % відповідно, табл. 3) і дещо знизив частку клітин *CD133* (з 49 % до 46 %). Змінилося відсоткове співвідношення клітин перших двох типів до *CD133* (з 24 % до 32 % – для *CD44*, з 61 % до 90 % – для *CD146*).

GCSF не вплинув на пропорції між *CD44* і *Nuc* (11 % у цій і контрольній групі), майже не вплинув на співвідношення *CD146* і *Nuc* (34 % проти 31 % у контролі), але зменшив співвідношення *CD133* і *Nuc* (з 49 % до 44 %). При цьому дещо збільшилася пропорція між *CD44*, *CD146* і *CD133* (з 24 % до 28 % – для *CD44*, з 63 % до 69 % – для *CD146*).

Спільна дія Dex і GCSF для *CD44* щодо *Nuc* зберіглася на рівні, який характерний для впливу лише Dex (14 %, це вище за контроль на 11 %). Для *CD146* цей вплив виявився проміжним за силою порівняно з Dex або GCSF (36 % проти 30 % – для Dex, 34 % – GCSF, але вище за контроль у 31 %). Для *CD133* за силою впливу перевищено дію Dex і GCSF окремо (47 % при спільному застосуванні препаратів, 46 % – у разі використання тільки Dex, 44 % – лише GCSF;

контрольний рівень – 49 %). Співвідношення *CD44* і *CD133* при спільному застосуванні Dex і GCSF виявилося найвищим в усіх дослідних групах (34 %), дещо поступалося показнику в групі **Dex** (81 % проти 90 %).

Кількісне оцінювання невротизації новоутвореної ділянки нерва через 56 днів після невротомії показало (рис. 5): Dex і GCSF, застосовані окремо, збільшують цей показник на 11,6 % і 13,6 % відповідно. Одночасне використання засобів призводить до потенціювання ефекту, і рівень невротизації новоутвореної ділянки нерва на 21,58 % вищий, ніж у контролі.

Обговорення

Отже, під час спостереження зафіксували феномен, який полягає в тому, що Dex і GCSF окремо, призводячи до зменшення або збільшення порівняно з контролем загальної клітинності PerH, зумовлюють зростання рівня її невротизації. Їхня одночасна дія в межах експерименту, що здійснили, спричинила певний від'ємний ефект щодо питомої кількості клітин невроми, а також до значущого збільшення в ній кількості нервових волокон, що регенерують.

Вплив GCSF призвів до появи у PerH шурів із груп **GSCF** та **Dex + GSCF** (у меншій кількості) клітин, що експресують *CD90/Thy1*; їх не виявили в групах контролю та **Dex**. Цей маркер є одним із найдостовірніших для мезенхімальних стовбурових клітин [4], а GSCF призводить до збільшення їхньої кількості у крові [9].

Dex суттєво зменшував швидкість накопичення клітин із високою експресією *CD44+*, а GCSF помітно її збільшував (табл. 2). Наголосимо, що Dex й ізольовано, і в поєднанні з GCSF призводив до появи в регенераті великих клітин із бластоподібним фенотипом, що часто мали високу імунореактивність до *CD44+*. Припускаємо, що це – мезенхімальні стовбурові клітини, а Dex гальмував їхнє диференціювання (передусім у клітини фібробластичного ряду). Якщо Dex і GCSF застосовували одночасно, другий призводив ще й до абсолютного та відносного збільшення вмісту цих клітин у PerH (табл. 2).

Dex, незважаючи на значне зниження *CD146+* на першому тижні формування PerH (рис. 4), надалі спричиняв відносне збільшення представництва таких клітин у невромі. Це можна пояснити пригніченням накопичення мезенхімальних клітин на етапі формування сполучнотканинної основи PerH [1,14], а також стимульовальним впливом на розмноження шваннівських клітин [15], що також експресують *CD146* [16]. GCSF майже не впливав на пропорції вмісту *CD146+* клітин у невромі (табл. 3). Отже, кількість нейролемоцитів зростала пропорційно *Nuc* і вмісту мезенхімальних клітин у PerH. Імовірно, при затримці диференціювання та персистенції мезенхімальних стовбурових клітин у PerH їх секретом [4] у поєднанні з дією Dex [15] відбувається збільшення питомого вмісту шваннівських клітин, а також їхньої активності.

Зменшення / збільшення кількості *CD133+*-клітин збігалось передусім з обсягом васкуляризації регенерату протягом першого тижня спостережень. Це логічно пов'язано з накопиченням мезенхімальних клітин-попередників ендотеліоцитів [17], а на етапі

дозрівання PerH є показником активності поглинання глюкози та трансферину, аутофагії, міжмембранної взаємодії та функції матриксної металопротеїнази [18].

Отже, зіставивши посилення невротизації PerH з її клітинним складом при невеликому діастазі між центральним і периферичним відрізками нерва, вважаємо, що зміна її клітинності в межах норми реакції не впливає на регенерацію. Втім, за цих умов змінюється співвідношення в її складі нейральних і мезенхімальних компонентів, а також змінюється співвідношення деяких патернів мезенхімальних клітин і їхня активність. Незважаючи на різні механізми дії та різну спрямованість змін питомого вмісту клітин у PerH, Dex і GCSF призводять до збільшення абсолютного та відносного вмісту в ній шваннівських клітин, а їх наявність є обов'язковою умовою для проростання нервових волокон.

Крім того, зміни кількості та персистенції деяких патернів мезенхімальних клітин (*CD44+*) можна оцінювати як посилення забезпечення процесу регенерації ростовими / трофічними факторами шляхом секретому [4]. На підвищення функціональної / метаболічної активності клітин невроми опосередковано вказує відносне зростання експресії *CD146* і феномен збільшення експресії *CD73* [8], що особливо виразний для шваннівських клітин при одночасній дії Dex і GCSF. Це закономірно призводить до підвищення рівня невротизації PerH.

Висновки

1. Обсяг невротизації регенераційної невроми безпосередньо залежить від питомої кількості шваннівських клітин у її складі.
2. Dex і GCSF, незважаючи на різні механізми дії, спричиняють збільшення вмісту нейролемоцитів у PerH.
3. GCSF призводить до збільшення у складі PerH кількості мезенхімальних клітин, які експресують маркери, що є прямим (*CD90/Thy1*) і додатковими (*CD44*, *CD146* і *CD133*) критеріями стовбуровості.
4. При невеликому діастазі між кінцями перетнутого нерва помірне зменшення або збільшення кількості клітин мезенхімального ряду не впливає на невротизацію невроми.
5. Dex затримує диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин, що мігрували в невром, спричиняючи їх персистенцію.
6. GCSF сприяє накопиченню мезенхімальних стовбурових клітин у PerH.
7. Дія Dex або GCSF результується підвищенням функціональної активності клітин мезенхімального ряду та нейролемоцитів у складі PerH.
8. Dex і GCSF потенціюють ефекти один одного, спричиняючи істотне збільшення обсягу невротизації PerH.

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: 22.09.2023

Після доопрацювання / Revised: 09.10.2023

Схвалено до друку / Accepted: 31.10.2023

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

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

ORCID ID: 0000-0002-5378-2267

Альоxин 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. Ю., 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

Кондаурова Г. Ю., канд. мед. наук, доцент каф. гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-3908-3881

Information about authors:

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

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

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

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

Kondaurova H. Yu., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Histology and Embryology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

References

- 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>
- 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>
- 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>
- Grabovyi, O. M., Nevmerzhytska, N. M., Yaremenko, L. M., Kostynskiy, H. B., Demydchuk, A. S., & Kondaurova, H. Yu. (2023). Mezenkhimaini stoburovi klityny: riznomanitnist [Mesenchymal stem cells: diversity]. *Pathologia*, 20(1), 76-84. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2023.1.272938>
- Easterling, M. R., Engbrecht, K. M., & Crespi, E. J. (2019). Endocrine regulation of epimorphic regeneration. *Endocrinology*, 160(12), 2969-2980. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00321>
- Charoenlux, P., Utoomprurkpon, N., & Seresirikachorn, K. (2023). The efficacy of corticosteroid after facial nerve neurotomy: 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>
- Grabovyi, O. M., Nevmerzhytska, N. M., Alyokhin, A. B., Kostynskiy, H. B., & Rytikova, N. V. (2023). Moduliatsiia klitynnoho skladu reheneratsiinoi nevromy deksametazonom i hranolutsytarnym koloniestymuliuvalnym faktorom [Modulation of the tissue composition of regenerative neuroma by dexamethasone and granulocyte colony-stimulating factor]. *Pathologia*, 20(2), 118-125. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2023.2.285124>
- 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.2018.18.03.00>
- 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*, 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>
- Grabovoi, A. N. (1999). Effects of noradrenaline and propranolol on the regeneration neuroma of the rat sciatic nerve (1999). *Neurophysiology*, 31(1), 71-73. <https://doi.org/10.1007/BF02515021>
- 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>
- 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>
- 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>
- Shen, Y., Zhu, J., Liu, Q., Ding, S., Dun, X., & He, J. (2021). Up-Regulation of CD146 in Schwann Cells Following Peripheral Nerve Injury Modulates Schwann Cell Function in Regeneration. *Frontiers in cellular neuroscience*, 15, 743532. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.743532>
- Rossi, E., Poirault-Chassac, S., Bieche, I. et al. (2019). Human Endothelial Colony Forming Cells Express Intracellular CD133 that Modulates their Vasculogenic Properties. *Stem Cell Rev and Rep*, 15, 590-600. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09881-8>
- Barzegar Behrooz, A., Syahir, A., & Ahmad, S. (2019). CD133: beyond a cancer stem cell biomarker. *Journal of drug targeting*, 27(3), 257-269. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1479756>

Взаємозв'язок рівня фетуїну-А з клінічними особливостями хворих на ішемічну хворобу серця, асоційовану з залізодефіцитом

М. О. Коновалова^{id}*A,B,C,D,E, Н. С. Михайловська^{id}A,B,C,E,F

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 – оцінити взаємозв'язок рівня фетуїну-А з показниками клінічної гемограми, ферокінетики, вегетативними та структурно-функціональними змінами міокарда у хворих на ішемічну хворобу серця (ІХС), асоційовану з залізодефіцитом (ЗД) різних ступенів.

Матеріали та методи. Обстежили 90 хворих на ІХС: стабільну стенокардію напруги II–III ФК (35 чоловіків, 55 жінок) віком 69 (61; 72) років. У I групу (n = 16) залучили пацієнтів із залізодефіцитною анемією (ЗДА) легкого та середнього ступенів тяжкості, у II (n = 15) – з абсолютним латентним ЗД, у III (n = 14) – із функціональним латентним ЗД; IV (контрольна) група (n = 45) – хворі на ІХС без ЗД. Фізіологічну концентрацію фетуїну-А визначили у 15 умовно здорових осіб. Оцінили результати ехокардіоскопії, моніторингу електрокардіограми за Холтером та їхній зв'язок із рівнем фетуїну-А.

Результати. У хворих на ІХС, що асоційована з ЗД, визначили зменшення концентрації фетуїну-А, прямо пропорційне ступеню прогресування сидеропенії. Кореляційний аналіз показав взаємозв'язок рівня фетуїну-А з концентрацією феритину та насичення трансферину залізом у групі хворих на ЗДА, а також кількістю еритроцитів – у хворих із функціональним ЗД.

У хворих на ЗДА рівень фетуїну-А корелював із товщиною задньої стінки лівого шлуночка ($r = -0,60$, $p < 0,05$), у хворих з абсолютним латентним ЗД – зі співвідношенням E/A ($r = +0,66$, $p < 0,05$). У пацієнтів із ЗДА й абсолютним латентним ЗД також зафіксовано низку кореляційних зв'язків між рівнем фетуїну-А та показниками варіабельності серцевого ритму в активний і пасивний періоди. Низький рівень фетуїну-А при ІХС і ЗД підвищував ризик розвитку гіпертрофії лівого шлуночка (ЛШ) в 1,50 раза, діастолічної дисфункції ЛШ – в 1,60 раза, вегетативної дисфункції – в 2,14 раза в активний період, в 1,95 раза – в пасивний.

Висновки. У хворих на ІХС виявили поступове зниження рівня фетуїну-А залежно від ступеня ЗД. Це призводить до поглиблення порушень показників обміну заліза та клінічної гемограми, негативно впливає на структурно-функціональний стан міокарда та варіабельність серцевого ритму, збільшує ризик розвитку гіпертрофії міокарда, діастолічної дисфункції ЛШ і вегетативного дисбалансу.

Ключові слова:

ішемічна хвороба серця, залізодефіцит, анемія, фетуїн-А, ремоделювання серця, вегетативна дисфункція, ризик.

Патологія. 2023. Т. 20, № 3(59). С. 231-237

*E-mail:

mkonovalova94@gmail.com

The relationship between fetuin-A level and the clinical features of patients with coronary artery disease associated with iron deficiency

M. O. Konovalova, N. S. Mykhailovska

The aim of the study: to assess the relationship between the level of fetuin-A and features of clinical hemogram, ferrokinetic parameters, vegetative and structural-functional changes of the myocardium in patients with coronary artery disease (CAD) associated with different stages of iron deficiency (ID).

Materials and methods. The study involved 90 patients with CAD: stable angina pectoris II–III FC (35 men and 55 women, age – 69 (61; 72)). All patients were divided into 4 clinical groups depending on the parameters of iron metabolism and hemogram: I (n = 16) – patients with absolute ID, II (n = 15) – with latent ID, III (n = 14) – with functional ID; IV (n = 45) – patients CAD without iron metabolism disorders. The physiological concentration of fetuin-A was determined in 15 conditionally healthy people. The results of echocardiography, Holter ECG monitoring and their relationship with the level of fetuin-A were analyzed.

Results. In patients with CAD associated with various stages of ID, there is a decrease in the concentration of fetuin-A in direct proportion to the degree of progression of sideropenia was established. It was established that there is a relationship between the level of fetuin-A and the concentration of ferritin and transferrin saturation for patients with absolute ID as well as the number of erythrocytes in patients with functional ID. It was established that there is a relationship between the level of fetuin-A and PWd ($r_s = -0,60$, $p < 0,05$) for patients with absolute ID; for patients with latent ID – with the E/A ratio ($r_s = +0,66$, $p < 0,05$). In patients with absolute ID and latent ID a number of correlations between fetuin-A level and heart rate variability indicators in active and passive periods was established. The presence of a low level of fetuin-A in patients with CAD and ID increased the risk of left ventricular hypertrophy by 1.5 times, left ventricular diastolic dysfunction by 1.6 times, autonomic dysfunction by 2.14 times in the active period and 1.95 times in the passive period.

Conclusions. In patients with CAD, there is a progressive decrease in the fetuin-A level depending on the degree of ID, which contributes to the deepening of disorders of iron metabolism and clinical hemogram, negatively affects the structural and functional state of the myocardium and heart rate variability, increases the risk of developing myocardial hypertrophy, left ventricular diastolic dysfunction and vegetative imbalance.

Key words:

coronary artery disease, iron deficiency, anemia, fetuin-A, cardiac remodeling, autonomic dysfunction, risk.

Pathologia, 2023. 20(3), 231-237

Фетуїн-А – багатofункціональний глікопротеїн, що секретується переважно печінкою та бере участь у регуляції метаболізму кісткової тканини та кальцію [1], процесу запалення, діє як атерогенний та адипогенний фактор [1,2]. Зазвичай у здорових дорослих осіб у сироватці рівень фетуїну-А становить 300–1000 мкг/мл, не залежить від статі [1].

Нині відомості щодо зв'язку між рівнем фетуїну-А та кардіоваскулярною патологією досить суперечливі [1,3]. Це пов'язано з подвійною функціональністю фетуїну-А як атерогенного фактора або інгібітора кальцифікації судин [1]. Відомості багатьох джерел фахової літератури свідчать: низькі концентрації фетуїну-А, що циркулює, – незалежний предиктор артеріальної жорсткості, ектопічної кальцифікації, серцевого фіброзу, діастолічної та систолічної дисфункції, порушення толерантності до глюкози, накопичення жирової тканини та резистентності до інсуліну, а отже можуть відігравати важливу роль під час оцінювання кардіоваскулярного ризику [4,5]. При цьому високий рівень фетуїну-А може чинити вазопротективну дію, утримуючи кальцій і фосфор у сироватці в розчиненому стані, запобігаючи відкладенню гідроксиапатитів на стінках судин [1,4,6]. Так, у хворих на ІХС, ішемічну кардіоміопатію, стеноз аорти фіксують менші концентрації фетуїну-А порівняно зі здоровими особами [1,8].

Втім, є й протилежні дані про асоціацію високих рівнів фетуїну-А з розвитком інфаркту міокарда або гострого порушення мозкового кровообігу [4,9]. Такі особливості пов'язують з адипогенними властивостями фетуїну-А, який впливає на поглинання та зберігання вільних жирних кислот в адипоцитах та погіршує їхню функцію шляхом інгібіторного фосфорилування PPAR γ – ядерного фактора транскрипції, що відповідає за регуляцію адипогенезу, метаболізм ліпідів, глюкози та чутливість до інсуліну [1,9]. Крім того, фетуїн-А пригнічує активність адипонектину – основного антиатерогенного адипокіну, який бере участь в обміні ліпідів [1,10]. Фетуїн-А опосередковує інгібування рецепторної тирозинкінази інсуліну, що порушує його сигнальний шлях і призводить до інсулінорезистентності (ІР) [1,11,12]. Збільшення рівня фетуїну-А індукує каскад прозапальних реакцій у різних тканинах, зокрема в бета-клітинах підшлункової залози; це також спричиняє посилення ІР [1,13,14]. Отже, через наявність зв'язку фетуїну-А з ІР та дисфункцією адипоцитів вважають, що він має проатерогенний ефект, і завдяки цьому погіршує клінічний перебіг атеросклерозу та серцево-судинних захворювань [1].

Опубліковано відомості й про те, що фетуїн-А має протизапальні властивості, які пов'язані з його опосередкованим антагонізмом із трансформувальним фактором росту-бета (TGF- β) та фактором некрозу пухлини-альфа (TNF- α) [15,16]. Тому підвищений рівень фетуїну-А оцінюють як адаптивну відповідь для запобігання розвитку несприятливих серцево-судинних подій, ремоделюванню серця, фіброзуванню нирок, кальцифікації судин і прискоренню атеросклерозу [15,16].

Отже, клініко-патогенетична роль фетуїну-А при ІХС потребує детальнішого дослідження з одночас-

ним порівнянням динамічних змін рівнів фетуїну-А в сироватці крові з іншими сурогатними біомаркерами запалення та атеросклерозу.

Доведено зв'язок рівня фетуїну-А з анемічним синдромом. Вважають, що експресія гепсидину (негативного регулятора рівня заліза в організмі) може бути індукована фетуїном-А [17,18]. Він є антагоністом TGF- β , який, своєю чергою, активує експресію мРНК гепсидину в гепатоцитах [17,19]. Гепсидин зв'язується з феропортином, трансмембранним білком-переносником заліза, спричиняє його конформаційну зміну та, як наслідок, пригнічення вивільнення заліза ентероцитами, макрофагами та гепатоцитами в плазму [20,21]. Високі рівні гепсидину викликають затримку заліза в макрофагах та еритропоез з обмеженням заліза [22]. Крім того, що концентрація гепсидину в крові зростає при залізодефіцитних станах, вона також збільшується, коли виникає запальний чи інфекційний процес, внаслідок підвищення продукції інтерлейкіну-6 [17,22,23].

Враховуючи неоднозначність впливу фетуїну-А на перебіг серцево-судинних захворювань та анемії, актуальним є дослідження його зв'язку з клінічними особливостями, що притаманні пацієнтам із цією коморбідною патологією.

Мета роботи

Оцінити взаємозв'язок рівня фетуїну-А з показниками клінічної гемограми, ферокінетики, вегетативними та структурно-функціональними змінами міокарда у хворих на ішемічну хворобу серця, асоційовану з залізодефіцитом різних ступенів.

Матеріали і методи дослідження

У дослідження залучили 90 хворих на ІХС: стабільну стенокардію напруги II–III ФК (35 чоловіків, 55 жінок віком 69 (61; 72) років), які перебували на стаціонарному лікуванні на КНП «Міська лікарня № 4» ЗМР (м. Запоріжжя). Залежно від показників клінічної гемограми та ферокінетики всіх пацієнтів поділили на 4 клінічні групи: I (n = 16) – хворі на супутню залізодефіцитну анемію (ЗДА) легкого та середнього ступенів тяжкості; II (n = 15) – з абсолютним латентним залізодефіцитом (ЗД), III – із функціональним латентним ЗД; IV (контрольна) група (n = 45) – хворі на ІХС без порушень ферокінетики. Пацієнти зіставні за статтю, віком, супутніми хворобами та факторами ризику.

Діагностику та верифікацію ЗД здійснили відповідно до критеріїв, що адаптовані для пацієнтів із патологією серцево-судинної системи [23,24,25]. Критерії ЗДА – зниження рівнів гемоглобіну (Hb у венозній крові <130 г/л у чоловіків, <120 г/л у жінок), сироваткового заліза (СЗ) <8,8 нмоль/л, феритину <100 мкг/л, насичення трансферину залізом (НТЗ) <20 %. У цій групі 8 осіб мали супутню ЗДА легкого ступеня тяжкості (Hb – 110,5 (106,0; 114,5) г/л), 8 – помірного (Hb – 87,0 (83,5; 92,5) г/л). Абсолютний латентний залізодефіцит діагностували, коли Hb у венозній крові становив >130 г/л у чоловіків, >120 г/л у жінок; СЗ – <8,8 нмоль/л; феритин – <100 мкг/л, НТЗ – <20 % [23,24]. Функціональний ЗД

визначали, якщо Hb у венозній крові становив >130 г/л у чоловіків, >120 г/л у жінок, СЗ – $<8,8$ нмоль/л, феритин – $100\text{--}299$ мкг/л, НТЗ – $<20\%$ [25].

ІХС верифікована за рекомендаціями European Society of Cardiology (ESC) з діагностики та ведення пацієнтів із хронічними коронарними синдромами (2019 р.) та чинного уніфікованого клінічного протоколу первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Стабільна ішемічна хвороба серця» (наказ МОЗ від 23.12.2021 № 2857). Для діагностики супутнього анемічного синдрому використали рекомендації British Society of Gastroenterology (BSG) з ведення хворих на залізодефіцитну анемію (2021 р.), накази МОЗ України від 02.11.2015 № 709 та від 30.07.2010 № 647 за редакцією від 29.07.2016 р.

Критерії залучення в дослідження – документально підтверджена добровільна згода на участь; повноліття; підтверджена ІХС: стабільна стенокардія напруги II–III ФК; наявність порушень обміну заліза, анемія легкого та середнього ступенів тяжкості. Критерії виключення – відсутність згоди на участь; інфекційні захворювання в гострому періоді; хронічні запальні захворювання у період загострення; виникнення гострої кровотечі в період стаціонарного лікування; задокументовані крововтррати протягом останніх 6 місяців; Hb у венозній крові <80 г/л; онкологічні захворювання, як-от гемобластози; гемолітичні, гіпо-, апластичні, мегалобластні анемії; терапія внутрішньовенними препаратами заліза тривалістю 3 місяці; ХСН із ФВ $\leq 40\%$ або ІV ФК за NYHA; ШКФ ≤ 59 мл/хв/1,73 м²; виникнення гострого коронарного синдрому або гострого порушення мозкового кровообігу; перенесений інфаркт міокарда та інсульт протягом останніх 3 місяців від часу залучення в дослідження; наявність імплантованого електрокардіостимулятора або необхідність імплантації; тяжка коморбідна патологія, що супроводжується органною недостатністю; психоневрологічні розлади тяжкого ступеня.

Під час дослідження дотримувалися морально-етичних норм біоетики відповідно до правил ICH/GCP, Гельсінської декларації прав людини (1964 р.), Конвенції Ради Європи з прав людини і біомедицини (1997 р.), а також чинного законодавства України.

Ферокінетичні показники (феритин, СЗ, загальна залізов'язувальна здатність сироватки (ЗЗЗС)) оцінювали в клініко-біохімічній лабораторії Навчально-наукового медичного центру «Університетська клініка» Запорізького державного медико-фармацевтичного університету.

Як значення латентної залізов'язувальної здатності сироватки (латентна ЗЗС) взяли різницю рівнів ЗЗЗС і СЗ. Насичення трансферину залізом (НТЗ) обрахували за формулою: $\text{НТЗ} (\%) = \text{СЗ} \times 100 / \text{ЗЗЗС}$.

Як референтні ферокінетичні показники використали такі: феритин – $28\text{--}365$ нг/мл, СЗ – $8,8\text{--}29,9$ нмоль/л, ЗЗЗС – $45\text{--}76$ ммоль/л, латентна ЗЗС – $32,0\text{--}46,0$ ммоль/л, НТЗ – $16,0\text{--}50,0\%$.

Рівень фетуїну-А визначили в Навчально-науковому медико-лабораторному центрі з виварієм Запорізького державного медико-фармацевтичного університету (керівник – д. фарм. н. Р. О. Щербина)

шляхом імуноферментного аналізу за допомогою набору реагентів фірми Elabscience (США) на імуноферментному повноплашковому аналізаторі SIRIO S (Італія). Фізіологічний рівень фетуїну-А, що становить $168,86$ ($167,98$; $196,74$) нг/мл, встановили в 15 умовно здорових дорослих осіб.

Пацієнтам здійснили комплексне інструментальне обстеження, що передбачало електрокардіографію (ЕКГ) у 12 відведеннях, добове моніторування ЕКГ за Холтером та еходоплеркардіографію за стандартними методиками [26,27,28,29].

Статистично результати опрацювали відповідно до сучасних вимог, використавши програму Statistica 13.0 (Stat Soft Inc., США, ліцензія № JPZ804I382130ARCN10-J). Для перевірки гіпотез щодо розподілу кількісних показників використали критерій Шапіро–Вілка. Оскільки всі проаналізовані показники не відповідали критеріям нормального розподілу, кількісні ознаки наведено як медіану та міжквартильний інтервал (Me (Q25; Q75)), якісні – у відсотках. Для оцінювання відмінностей між групами виконали ранговий аналіз Краскела–Волліса з наступним попарним зіставленням за допомогою U-критерію Манна–Вітні з поправкою Бонферроні. Взаємозалежність показників клінічної гемограми, обміну заліза, фетуїну-А, кардіального ремоделювання та ВСР визначили за допомогою кореляційного аналізу з розрахунком коефіцієнта кореляції Спірмена. Результати вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати

На попередніх етапах дослідження оцінили стан гематологічних і ферокінетичних показників у хворих на ІХС, визначено їхні особливості залежно від ступеня залізодефіциту [30].

У таблиці 1 наведено концентрації фетуїну-А у хворих на ІХС залежно від супутнього ЗД.

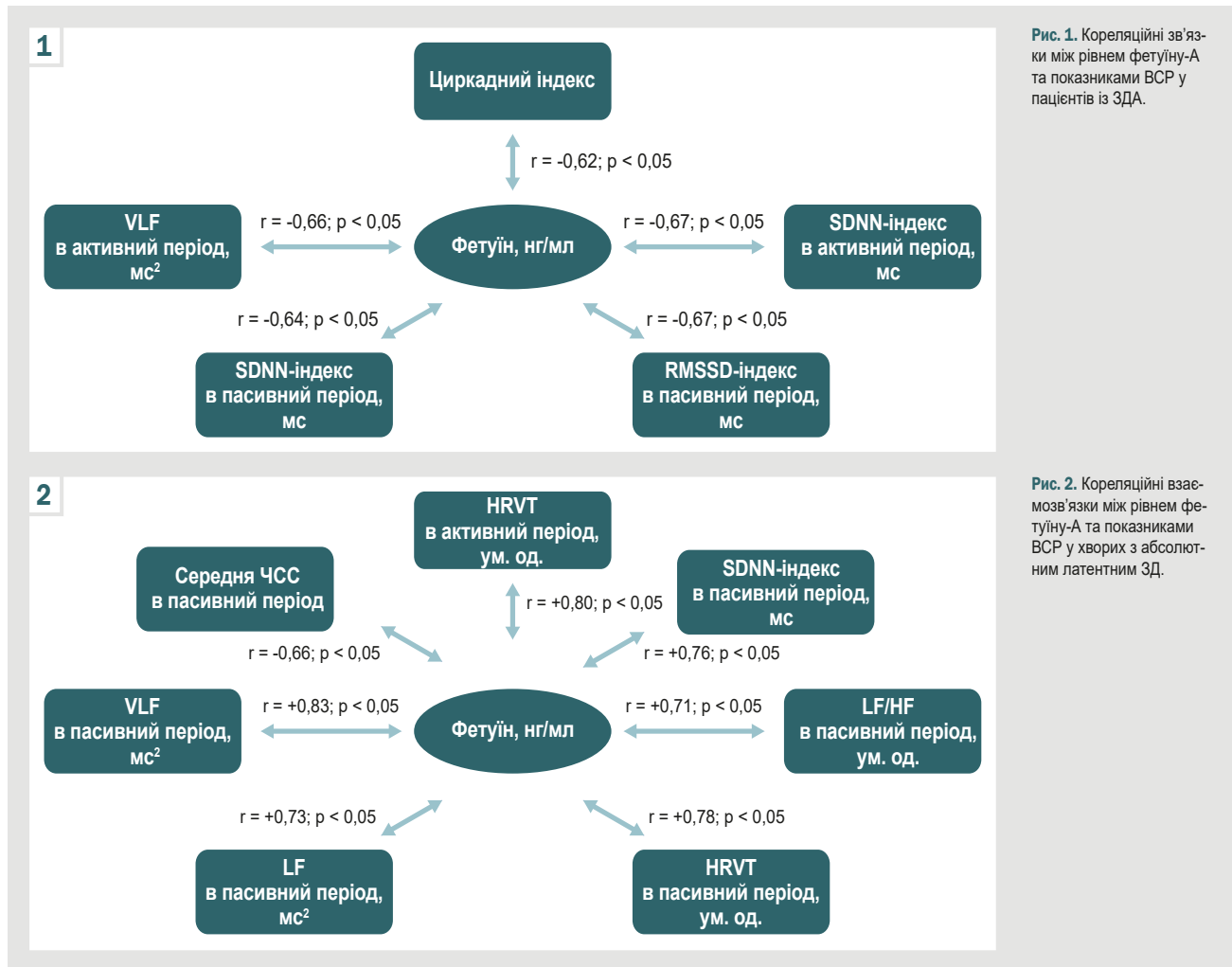
Встановили, що в осіб із супутньою ЗДА рівень фетуїну-А достовірно нижчий за фізіологічний в 1,73 раза ($U = 4,5$; $p < 0,05$). У групі пацієнтів з абсолютним латентним і функціональним ЗД визначили тенденцію до меншої концентрації фетуїну-А, ніж у здорових ($U = 12,0$, $p \approx 0,06$; $U = 3,0$, $p \approx 0,08$ відповідно). Зазначимо, що хворі на ІХС без супутніх порушень ферокінетики також мали вірогідно нижчий (на 13,7 %) рівень фетуїну-А, ніж у контрольній групі ($U = 1,0$, $p < 0,05$).

Хворі на ІХС із супутньою ЗДА мали достовірно нижчий рівень фетуїну-А (на 32,9 %; $U = 5,0$, $p < 0,05$), ніж хворі на ІХС без порушень ферокінетики, а також нижчий (на 13,0 %) рівень, ніж хворі з супутнім абсолютним латентним ЗД ($U = 23,0$, $p < 0,05$). Вірогідної різниці щодо показників групи хворих на ІХС із супутнім функціональним ЗД не зафіксовано. В групі хворих з абсолютним латентним ЗД визначили достовірно меншу (на 22,8 %) концентрацію фетуїну-А, ніж в осіб з ІХС без супутнього ЗД ($U = 2,0$, $p < 0,05$). Вірогідної різниці порівняно з групою хворих на ІХС із супутнім функціональним ЗД не визначили. Порівнявши концентрації фетуїну-А у пацієнтів із супутнім функціональним латентним ЗД і результати інших груп, достовірних відмінностей не виявили.

Таблиця 1. Концентрація фетуїну-А у хворих ІХС залежно від супутнього ЗД

Показник, одиниці вимірювання	Хворі на ІХС з супутнім ЗД (n = 45)			Хворі на ІХС без супутнього ЗД (n = 45)	Контрольна група умовно здорових осіб (n = 15)
	ЗДА (n = 16)	Абсолютний латентний ЗД (n = 15)	Функціональний латентний ЗД (n = 14)		
Фетуїн-А, нг/мл	97,64 (61,75; 112,5) ^{*,^}	112,5 (78,43; 191,23) [*]	150,0 (109,07; 175,0)	145,66 (113,41; 149,09) [*]	168,86 (167,98; 196,74)

^{*}: вірогідність розбіжностей порівняно з контрольною групою (p < 0,05); ^{*}: вірогідність розбіжностей порівняно з хворими на ІХС без порушень обміну заліза (p < 0,05); [^]: вірогідність розбіжностей між хворими на ІХС із ЗДА й абсолютним латентним ЗД (p < 0,05).



Виконали кореляційний аналіз показників ферокінетики, клінічної гемограми та рівня фетуїну-А. Так, у групі хворих із ЗДА рівень фетуїну-А прямо корелював із концентрацією феритину ($r = +0,54$, $p < 0,05$) та НТЗ ($r = +0,75$, $p < 0,05$). У групі пацієнтів із супутнім функціональним ЗД рівень фетуїну-А прямо корелював із кількістю еритроцитів ($r = +0,66$, $p < 0,05$). У хворих з абсолютним латентним ЗД не виявили вірогідних кореляційних взаємозв'язків між показниками ферокінетики, клінічної гемограми та рівнем фетуїну-А.

Особливості ішемічних, вегетативних порушень і стан кардіального ремоделювання у хворих на ІХС із супутнім залізодефіцитом наведено в попередніх публікаціях [30]. Шляхом кореляційного аналізу встановили низку зв'язків між рівнем фетуїну-А та показниками кардіального ремоделювання у хворих на ІХС із супутнім дефіцитом заліза. Так, у пацієнтів із ЗДА

рівень фетуїну-А зворотно корелював із товщиною задньої стінки лівого шлуночка (ЛШ) ($r = -0,60$, $p < 0,05$). У хворих із латентним ЗД виявлено прямі взаємозв'язки між концентрацією фетуїну-А та співвідношенням Е/А ($r = +0,66$, $p < 0,05$). Зауважимо, що у групі хворих із функціональним ЗД не зафіксовано достовірних кореляційних зв'язків між рівнем фетуїну-А та станом кардіального ремоделювання.

Встановлено, що низький рівень фетуїну-А у хворих на ІХС із супутніми порушеннями ферокінетики та без них підвищує в 1,5 раза частоту гіпертрофії міокарда ЛШ (BP = 1,485; 95 % ДІ 1,04–2,13; $p < 0,05$), в 1,6 раза – ризик виникнення діастолічної дисфункції ЛШ (BP = 1,607; 95 % ДІ 1,02–2,54; $p < 0,05$).

Виявили низку зв'язків між рівнем фетуїну-А та показниками варіабельності серцевого ритму. У пацієнтів із ЗДА (рис. 1) зафіксували зворотні взаємозв'язки між рівнем фетуїном-А та циркадним індексом ($r = -0,62$,

$p < 0,05$), SDNN-індексом в активний період ($r = -0,67$, $p < 0,05$), VLF в активний період ($r = -0,66$, $p < 0,05$), SDNN-індексом у пасивний період ($r = -0,64$, $p < 0,05$), RMSSD у пасивний період ($r = -0,67$, $p < 0,05$).

У хворих з абсолютним латентним ЗД встановили низку взаємозв'язків між рівнем фетуїну-А та показниками ВСР і в активний, і в пасивний періоди (рис. 2): середньою ЧСС у пасивний період ($r = -0,66$, $p < 0,05$); HRVT в активний період ($r = +0,80$, $p < 0,05$); SDNN-індексом у пасивний період ($r = +0,76$, $p < 0,05$); HRVT у пасивний період ($r = +0,78$, $p < 0,05$); VLF у пасивний період ($r = +0,83$, $p < 0,05$); LF у пасивний період ($r = +0,73$, $p < 0,05$); LF/HF у пасивний період ($r = +0,71$, $p < 0,05$).

Зазначимо, що у групі пацієнтів із супутнім функціональним ЗД не виявили достовірних кореляційних зв'язків між показниками ВСР і рівнем фетуїну-А.

Серед хворих із рівнем фетуїну-А, що нижчий за фізіологічний, вегетативну дисфункцію внаслідок дисбалансу співвідношення LF/HF виявляли вірогідно частіше і в активний ($\chi^2 = 11,43$, $p < 0,05$), і в пасивний періоди ($\chi^2 = 7,71$; $p < 0,05$). Низький рівень фетуїну-А у хворих на ІХС незалежно від стану обміну заліза підвищував ризик виникнення вегетативної дисфункції: в активний період у 2,14 раза (BP = 2,143; 95 % ДІ 1,22–3,76; $p < 0,05$), у пасивний – у 1,95 раза (BP = 1,952; 95 % ДІ 1,10–3,46; $p < 0,05$).

Обговорення

Встановили, що у пацієнтів з ІХС: стабільною стенокардією напруги незалежно від наявності ЗД визначають нижчі за фізіологічні концентрації фетуїну-А. Такі результати не суперечать даним міжнародних досліджень. Так, у роботі Michael Lichtenauer et al. показано: пацієнти зі стабільною стенокардією мають нижчий рівень фетуїну-А порівняно з хворими без симптомів ($73,1 \pm 22,7$ мкг/мл проти $83,7 \pm 26,2$ мкг/мл, $p = 0,047$) [31]. Зіставні результати отримали Kemal Göçer et al.: рівні сироваткових біомаркерів (зокрема фетуїну-А) значно нижчі в пацієнтів з ІХС, ніж у контрольній групі [32].

У нашому дослідженні встановили, що хворі на ІХС із супутньою ЗДА мали достовірно нижчий рівень фетуїну-А (на 12,8 %), ніж пацієнти з супутнім абсолютним латентним ЗД. У групі хворих з абсолютним латентним ЗД зафіксували тенденцію до нижчого рівня фетуїну-А, ніж у пацієнтів із функціональним латентним ЗД. Це свідчить про поступове зменшення його концентрації прямо пропорційно ступеню прогресування сидеропенії.

У результаті кореляційного аналізу між показниками ферокінетики, клінічної гемограми та рівнем фетуїну-А визначили вірогідні кореляційні взаємозв'язки між концентрацією феритину, НТЗ і рівнем фетуїну-А у групі хворих із ЗДА; між рівнем фетуїну-А та кількістю еритроцитів у групі пацієнтів із супутнім функціональним ЗД.

В експериментальному дослідженні R. H. Ebrahim Ali et al. встановили, що у щурів без порушень обміну заліза з індукованою термінальною хронічною хворобою нирок (ХХН) додаткове введення фетуїну-А

спричиняє істотне зниження сироваткового феритину на тлі збільшення рівня сироваткового заліза та загальної залізов'язувальної здатності сироватки [17]. Під час нашого дослідження виключили пацієнтів із ХНН III–V стадій, що могло зумовити наведені результати.

Згідно з відомостями наукової літератури, низький рівень фетуїну-А може бути пов'язаний із несприятливим впливом на функцію ЛШ та його ремоделювання після перенесених гострих форм ІХС та під час формування ХСН [7,33,34,35]. Зазначимо, що низькі концентрації фетуїну-А зумовлюють збільшення тривалості запального процесу, а отже й надмірний синтез кардіотоксичних цитокінів, що також підвищують ризик ремоделювання ЛШ [34].

Встановили, що у хворих на ІХС із ЗДА рівень фетуїну-А корелював із товщиною задньої стінки ЛШ, у хворих із латентним ЗД – зі співвідношенням Е/А. Крім того, під час нашого дослідження виявили, що незалежно від стадії ЗД хворі на ІХС із низьким рівнем фетуїну-А мали підвищений ризик гіпертрофії міокарда ЛШ (BP = 1,485; 95 % ДІ 1,04–2,13; $p < 0,05$) та його діастолічної дисфункції (BP = 1,607; 95 % ДІ 1,02–2,54; $p < 0,05$).

Gan Y. et al. зробили висновок, що зниження рівня сироваткового фетуїну-А пов'язане з підвищеним ризиком виникнення діастолічної дисфункції у пацієнтів, які перебувають на плановому гемодіалізі [36].

Фетуїн-А має різні функції, одна з них – регуляція кальцифікації кісток і судин шляхом тимчасового утворення розчинних колоїдних сфер, що здатні запобігати кристалізації гідроксиапатиту й аномальній кальцифікації в тканинах [37]. Він є інгібітором позакісткової кальцифікації [1,4,38]. Низькі рівні фетуїну-А в плазмі пов'язані з істотною кальцифікацією коронарних артерій і серцевих клапанів [39], а наявність вираженого кальцинозу клапанів серця через низку нейрогуморальних змін (активація прозапальних цитокінів, факторів росту, специфічних протейнів) впливає на стан ВСР [40,41]. Так, у роботі José M. Torres-Arellano et al. [40] показано: хворі на кальцинуючу хворобу аортального клапана мали вищі значення LF, LF/HF порівняно з особами без змін аортального клапана. Наявність кальцинатів аортального клапана зумовлює дисбаланс вегетативної нервової системи і симпатичного, й парасимпатичного відділів [42]. Hwee-Yeong Ng et al. виявили, що кальцифікація периферичних артерій негативно корелює з LF і HF [43].

У нашому дослідженні встановлено, що при низькому рівні фетуїну-А в плазмі крові у хворих на ІХС з абсолютним латентним ЗД відбувається підвищення VLF у пасивний період, LF у пасивний період, LF/HF у пасивний період. Це можна пояснити активацією симпатичної ланки вегетативної нервової системи на тлі зниження рівня біомаркера, що зумовлює симпто-парасимпатичний дисбаланс.

Втім, у хворих із ЗДА низькі рівні фетуїну-А мали зворотні взаємозв'язки з показниками ВСР: циркадним індексом, SDNN-індексом в активний період, VLF в активний період, SDNN-індексом у пасивний період, RMSSD у пасивний період. Це свідчить про редукцію загальної варіабельності серцевого ритму внаслідок

пригнічення активності парасимпатичної ланки через прогресивне зниження запасів заліза в організмі та рівня фетуїну-А. Крім того, у нашому дослідженні встановили: низький рівень фетуїну-А у хворих на ІХС незалежно від стану обміну заліза підвищував ризик виникнення вегетативної дисфункції (в активний період – у 2,14 раза, в пасивний – в 1,95 раза).

Висновки

1. Встановлено, що у хворих на ІХС, асоційовану з ЗД різних ступенів, відбувається поступове зменшення концентрації фетуїну-А прямо пропорційно ступеню прогресування сидеропенії.

2. Зниження рівня фетуїну-А у хворих на ІХС спричиняє поглиблення порушень показників обміну заліза та клінічної гемограми, негативно впливає на структурно-функціональний стан міокарда та варіабельність серцевого ритму. Це підтверджено відповідними кореляційними зв'язками.

3. Низький рівень фетуїну-А при ІХС і ЗД підвищує ризик виникнення гіпертрофії ЛШ (в 1,5 раза), діастолічної дисфункції ЛШ (в 1,6 раза), вегетативної дисфункції в активний (в 2,14 раза) і пасивний (в 1,95 раза) періоди.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні ефективності комплексного лікування ІХС, що перебігає на тлі анемічного синдрому.

Фінансування

Дослідження виконане в рамках НДР Запорізького державного медико-фармацевтичного університету: «Клініко-патогенетичні, прогностичні та лікувально-діагностичні аспекти кардіоваскулярної патології з різними коморбідними станами», держреєстрація № 0118U007138 (2018–2023).

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 09.10.2023

Після доопрацювання / Revised: 23.11.2023

Схвалено до друку / Accepted: 26.11.2023

Відомості про авторів:

Коновалова М. О., PhD аспірант каф. загальної практики – сімейної медицини та внутрішніх хвороб, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0002-3387-5802

Михайловська Н. С., д-р мед. наук, професор, зав. каф. загальної практики – сімейної медицини та внутрішніх хвороб, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0001-6781-9406

Information about authors:

Konovalova M. O., PhD student of the Department of General Practice (Family Medicine) and Internal Diseases, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Mykhailovska N. S., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of General Practice (Family Medicine) and Internal Diseases, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

References

- Chekol Abebe, E., Tilahun Muche, Z., Behaile T/Mariam, A., Mengie Ayele, T., Mekonnen Agidew, M., Teshome Azezew, M., Abebe Zewde, E., Asmamaw Dejenie, T., & Asmamaw Mengstie, M. (2022). The structure, biosynthesis, and biological roles of fetuin-A: A review. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 945287. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.945287>
- Keçebaş, M., Güllülü, S., Sağ, S., Beşli, F., Açıköz, E., Sarandöl, E., & Aydinlar, A. (2014). Serum fetuin-A levels in patients with systolic heart failure. *Acta cardiologica*, 69(4), 399-405. <https://doi.org/10.1080/ac.69.4.3036656>
- Lin, Y. H., Franc, V., & Heck, A. J. R. (2018). Similar Albeit Not the Same: In-Depth Analysis of Proteoforms of Human Serum, Bovine Serum, and Recombinant Human Fetuin. *Journal of proteome research*, 17(8), 2861-2869. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00318>
- Icer, M. A., & Yildiran, H. (2021). Effects of fetuin-A with diverse functions and multiple mechanisms on human health. *Clinical biochemistry*, 88, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2020.11.004>
- Jahnen-Dechent, W., Heiss, A., Schäfer, C., & Ketteler, M. (2011). Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circulation research*, 108(12), 1494-1509. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.234260>
- Jirak, P., Stechemesser, L., Moré, E., Franzen, M., Topf, A., Mirna, M., Paar, V., Pistulli, R., Kretzschmar, D., Wernly, B., Hoppe, U. C., Lichtenauer, M., & Salmhofer, H. (2019). Clinical implications of fetuin-A. *Advances in clinical chemistry*, 89, 79-130. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.12.003>
- Pagan, L. U., Gatto, M., Martinez, P. F., Okoshi, K., & Okoshi, M. P. (2012). Biomarkers in Cardiovascular Disease: The Role of Fetuin-A. *Biomarcadores em Doenças Cardiovasculares: O Papel da Fetuina-A. Arquivos brasileiros de cardiologia*, 118(1), 22-23. <https://doi.org/10.36660/abc.20210980>
- Carracedo, M., & Bäck, M. (2018). Fetuin-A in aortic stenosis and valve calcification: Not crystal clear. *International journal of cardiology*, 265, 77-78. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.04.115>
- Chattopadhyay, M., Mukherjee, S., Chatterjee, S. K., Chattopadhyay, D., Das, S., Majumdar, S. S., Mukhopadhyay, S., Mukherjee, S., & Bhattacharya, S. (2018). Impairment of energy sensors, SIRT1 and AMPK, in lipid induced inflamed adipocyte is regulated by Fetuin A. *Cellular signalling*, 42, 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.celsig.2017.10.005>
- Sardana, O., Goyal, R., Bedi, O. (2021). Molecular and pathobiological involvement of fetuin-A in the pathogenesis of NAFLD. *Inflammopharmacology*, 29(4), 1061-1074. <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00837-4>
- Gerst, F., Wagner, R., Kaiser, G., Panse, M., Heni, M., Machann, J., Bongers, M. N., Sartorius, T., Sipos, B., Fend, F., Thiel, C., Nadelin, S., Königsrainer, A., Stefan, N., Fritsche, A., Häring, H. U., Ullrich, S., & Siegel-Axel, D. (2017). Metabolic crosstalk between fatty pancreas and fatty liver: effects on local inflammation and insulin secretion. *Diabetologia*, 60(11), 2240-2251. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4385-1>
- Chattopadhyay, D., Das, S., Guria, S., Basu, S., & Mukherjee, S. (2021). Fetuin-A regulates adipose tissue macrophage content and activation in insulin resistant mice through MCP-1 and iNOS: involvement of IFN γ -JAK2-STAT1 pathway. *The Biochemical journal*, 478(22), 4027-4043. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210442>
- Mukhty, A., Fouzder, C., & Kundu, R. (2022). Fetuin-A excess expression amplifies lipid induced apoptosis and β -cell damage. *Journal of cellular physiology*, 237(1), 532-550. <https://doi.org/10.1002/jcp.30499>
- Das, S., Chattopadhyay, D., Chatterjee, S. K., Mondal, S. A., Majumdar, S. S., Mukhopadhyay, S., Saha, N., Velayutham, R., Bhattacharya, S., & Mukherjee, S. (2021). Increase in PPAR γ inhibitory phosphorylation by Fetuin-A through the activation of Ras-MEK-ERK pathway causes insulin resistance. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1867(4), 166050. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2020.166050>
- Komsa-Penkova, R. S., Golemanov, G. M., Radionova, Z. V., Tonchev, P. T., Iliev, S. D., & Penkov, V. V. (2017). Fetuin-A – Alpha2-Heremans-Schmid Glycoprotein: From Structure to a Novel Marker of Chronic Diseases Part 1. Fetuin-A as a Calcium Chaperone and Inflammatory Marker. *Journal of Biomedical and Clinical Research*, 10(2), 90-97. <https://doi.org/10.1515/jbcr-2017-0015>
- Rudloff, S., Janot, M., Rodriguez, S., Dessalle, K., Jahnen-Dechent, W., & Huynh-Do, U. (2021). Fetuin-A is a HIF target that safeguards tissue integrity during hypoxic stress. *Nature communications*, 12(1), 549. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20832-7>
- Ebrahim Ali, R. H., Zamzam, M. S. A., El Nouwairy, H. E. E. D., & Ashour, W. M. (2022). Fetuin A effect on iron status and hepcidin level in adenine induced chronic kidney disease male rat model. *Zagazig University Medical Journal*, 28(4), 839-847. URL: https://zumjournals.ekb.eg/article_214488.html
- Stimberg, M., Maurer, E., Arenz, K., Babler, A., Jahnen-Dechent, W., & Gütschow, M. (2015). Cell surface serine protease matriptase-2

- suppresses fetuin-A/AHSG-mediated induction of hepcidin. *Biological chemistry*, 396(1), 81-93. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0120>
19. Wahedi, M., Wortham, A. M., Kleven, M. D., Zhao, N., Jue, S., Enns, C. A., & Zhang, A. S. (2017). Matriptase-2 suppresses hepcidin expression by cleaving multiple components of the hepcidin induction pathway. *The Journal of biological chemistry*, 292(44), 18354-18371. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.801795>
 20. Agarwal, A. K., & Yee, J. (2019). Hepcidin. *Advances in chronic kidney disease*, 26(4), 298-305. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2019.04.005>
 21. Nemeth, E., & Ganz, T. (2023). Hepcidin and iron in health and disease. *Annual review of medicine*, 74, 261-277. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-043021-032816>
 22. Camaschella, C., Nai, A., & Silvestri, L. (2020). Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica*, 105(2), 260. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.232124>
 23. Weiss G., Ganz T., Goodnough L. T. (2021). Anemia of inflammation. *Blood*, 133(1), 40-50. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-856500>
 24. Anker, S. D., Kirwan, B. A., van Veldhuisen, D. J., Filipatos, G., Comin-Colet, J., Ruschitzka, F., Lüscher, T. F., Arutyunov, G. P., Motro, M., Mori, C., Roubert, B., Pocock, S. J., & Ponikowski, P. (2018). Effects of ferric carboxymaltose on hospitalisations and mortality rates in iron-deficient heart failure patients: an individual patient data meta-analysis. *European journal of heart failure*, 20(1), 125-133. <https://doi.org/10.1002/ejhf.823>
 25. Snook, J., Bhala, N., Beales, I. L. P., Cannings, D., Kightley, C., Logan, R. P., Pritchard, D. M., Sidhu, R., Surgenor, S., Thomas, W., Verma, A. M., & Goddard, A. F. (2021). British Society of Gastroenterology guidelines for the management of iron deficiency anaemia in adults. *Gut*, 70(11), 2030-2051. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-325210>
 26. Lazoryshynets, V. V., Kovalenko, V. M., Potashev, S. V., Fedkiv, S. V., Rudenko, A. V., Vitovskiy, R. M., Sychov, O. S., Rudenko, S. A., Ivaniv, Yu. A., Krikunov, O. A., Mazur, O. A., Hrubyak, L. M., Rusnak, A. O., Osovsk, N. Yu., Deyak, S. I., Verich, N. M., & Beshlyaga, V. M. (2020). Ekhokardiohrafichne kilkisne otsiniuvannia kamer sertsia u doroslykh. Praktychni rekomendatsii Asotsiatsii sertsivo-sudynnykh khirurhiv Ukrainy ta Ukrainskoho tovarystva kardiolohev [Cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: Recommendations from the Association of cardiovascular surgeons of Ukraine and Ukrainian society of cardiology]. *Ukrainskyi zhurnal sertsivo-sudynnoi khirurgii*, 4(41), 96-117. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.30702/ujcv/20.4112/096-117.16.12.22020>
 27. Faust, O., Hong, W., Loh, H. W., Xu, S., Tan, R. S., Chakraborty, S., Barua, P. D., Molinari, F., & Acharya, U. R. (2022). Heart rate variability for medical decision support systems: A review. *Computers in biology and medicine*, 145, 105407. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2022.105407>
 28. Sassi, R., Cerutti, S., Lombardi, F., Malik, M., Huikuri, H. V., Peng, C. K., Schmidt, G., & Yamamoto, Y. (2015). Advances in heart rate variability signal analysis: joint position statement by the e-Cardiology ESC Working Group and the European Heart Rhythm Association co-endorsed by the Asia Pacific Heart Rhythm Society. *Europace*, 17(9), 1341-1353. <https://doi.org/10.1093/europace/euv015>
 29. Shaffer, F., & Ginsberg, J. P. (2017). An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms. *Frontiers in public health*, 5, 258. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00258>
 30. Konovalova, M. O., & Mykhailovska, N. S. (2023). Vzaiemozviazok ferokinetychnykh pokaznykiv zi stanom kardialnoho remodeliuvannia u khvorykh na ishemichnu khvorobu sertsia iz suputnim zalozodefitsytom [The relationship between ferokinetic parameters and the state of cardiac remodeling in patients with coronary artery disease with concomitant iron deficiency]. *Pathologia*, 20(1), 20-26. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2023.1.275370>
 31. Lichtenauer, M., Wernly, B., Paar, V., Rohm, I., Jung, C., Yilmaz, A., Hoppe, U. C., Schulze, P. C., Kretzschmar, D., & Pistulli, R. (2018). Specifics of fetuin-A levels in distinct types of chronic heart failure. *Journal of clinical laboratory analysis*, 32(1), e22179. <https://doi.org/10.1002/jcla.22179>
 32. Göçer, K., Aykan, A. Ç., Kılınc, M., & Göçer, N. S. (2020). Association of serum FGF-23, klotho, fetuin-A, osteopontin, osteoprotegerin and hs-CRP levels with coronary artery disease. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 80(4), 277-281. <https://doi.org/10.1080/00365513.2020.1728786>
 33. Çakir, H., Kanat, S., Çakir, H., & Tenekecioğlu, E. (2022). Lower Serum Fetuin-A Levels are Associated with a Higher Ten-Year Mortality Risk in Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction. Níveis mais Baixos de Fetuina-A Sérica estão Associados a um Maior Risco de Mortalidade em Dez Anos em Pacientes com Infarto do Miocárdio por Supradesnívelamento do Segmento ST. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 118(1), 14-21. <https://doi.org/10.36660/abc.20201057>
 34. Feistritz, H. J., Klug, G., Reinstadler, S. J., Gröber, M. T., Mair, J., Kirchmair, R., Henninger, B., Franz, W. M., & Metzler, B. (2015). Fetuin-A is related to infarct size, left ventricular function and remodelling after acute STEMI. *Open heart*, 2(1), e000244. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2015-000244>
 35. Albert, C. L., & Tang, W. (2018). Metabolic Biomarkers in Heart Failure. *Heart Failure Clinics*, 14(1), 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2017.08.011>
 36. Gan, Y., Zhao, M., & Feng, J. (2021). Association of fetuin-A levels and left ventricular diastolic dysfunction in patients on haemodialysis. *International urology and nephrology*, 53(8), 1689-1694. <https://doi.org/10.1007/s11255-021-02796-9>
 37. Zheng, J., Huang, M., Huang, Q., Chen, Q., & Chen, Z. (2021). The relationship between fetuin-A and coronary atherosclerotic heart disease (CHD) and CHD-related risk factors: A retrospective study. *Medicine*, 100(43), e27481. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000027481>
 38. Jirak, P., Stechemesser, L., Moré, E., Franzen, M., Topf, A., Mirna, M., Paar, V., Pistulli, R., Kretzschmar, D., Wernly, B., Hoppe, U. C., Lichtenauer, M., & Salmhofer, H. (2019). Clinical implications of fetuin-A. *Advances in clinical chemistry*, 89, 79-130. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.12.003>
 39. Pagan, L. U., Gatto, M., Martinez, P. F., Okoshi, K., & Okoshi, M. P. (2022). Biomarkers in Cardiovascular Disease: The Role of Fetuin-A. Biomarcadores em Doenças Cardiovasculares: O Papel da Fetuina-A. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 118(1), 22-23. <https://doi.org/10.36660/abc.20210980>
 40. Torres-Arellano, J. M., Echeverría, J. C., Ávila-Vanzini, N., Springall, R., Toledo, A., Infante, O., Bojalil, R., Cossío-Aranda, J. E., Fajardo, E., & Lerma, C. (2021). Cardiac Autonomic Response to Active Standing in Calcific Aortic Valve Stenosis. *Journal of clinical medicine*, 10(9), 2004. <https://doi.org/10.3390/jcm10092004>
 41. Kryvenko, V. I., Kachan, I. S., Fedorova, O. P., Kolesnyk, M. Yu., Nepryadkina, I. V., Pachomova, S. P., Borodavko, O. I., & Borota, D. S. (2021). Kaltsynoz klapaniv sertsia: suchasnyi pohliad na problemu ta perspektivy doslidzhen (ohliad literatury) [Heart valve calcinosis: a modern view on the problem and research prospects]. *Praktykuiuchyi likar*, (3), 15-21. [in Ukrainian]. Retrieved from: <https://plr.com.ua/index.php/journal/article/view/651>
 42. Brandon, L., Connolly, N., Hensey, M., O'Connor, S., Kenny, R., Maree, A., & Cruz-Gonzalez, I. (2023). Cardiovascular Autonomic Dysfunction and its association with Aortic Stenosis. *Medical Research Archives*, 11(1). <https://doi.org/10.18103/mra.v11i1.3495>
 43. Ng, H. Y., Hsueh, S. K., Lee, Y. T., Chiou, T. T., Huang, P. C., & Lee, C. T. (2017). Synergic Impact of Vascular Calcification and Low Autonomic Tone in Mortality of Hemodialysis Patients. *Nephron*, 137(2), 91-98. <https://doi.org/10.1159/000477827>

Вміст матричної металопротеїнази-1, -9 та тканинного інгібітора матричних металопротеїназ-1 у хворих на бронхіальну астму й ожиріння

В. В. Качковська¹*, А. В. С. Д. Е., Л. Н. Приступа¹ Е. F

Сумський державний 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

Ключові слова: бронхіальна астма, ожиріння, матричні металопротеїнази-1, -9, тканинний інгібітор матричних металопротеїназ-1, перебіг, контроль.

Патологія. 2023. Т. 20, № 3(59). С. 238-242

*E-mail: vladu_dytko@ukr.net

Відомо, що ремоделювання дихальних шляхів (ДШ) при бронхіальній астмі (БА) спричиняє прогресування дихальної недостатності, а ожиріння є додатковим чинником запалення, а отже й ремоделювання ДШ внаслідок посилення продукції матричних протеїназ (ММП). Недостатньо вивченими залишаються механізми ремоделювання ДШ при різних фенотипах БА, й зокрема в коморбідних хворих.

Мета роботи – дослідити вміст маркерів ремоделювання ММП-1, ММП-9 і тканинного інгібітора матричних протеїназ (ТІМП-1) у хворих на БА й ожиріння залежно від віку дебюту, тяжкості перебігу та рівня контролю БА.

Матеріали та методи. Обстежили 195 хворих на БА, асоційовану з ожирінням. У контрольну групу залучили 95 практично здорових осіб. Пацієнтів поділили на дві групи: у I групу залучили 100 хворих із раннім, а в II – 95 осіб із пізнім дебютом БА. Дослідження схвалене комісією з питань біоетики Сумського державного університету. Статистичний аналіз результатів здійснили за допомогою програми SPSS-17.

Результати. Вміст ММП-1, -9 і ТІМП-1 вищий у хворих на ранню (129,40 ± 7,86 нг/мл; 177,30 ± 9,19 нг/мл; 142,40 ± 12,22 нг/мл відповідно) та пізню (196,60 ± 9,62 нг/мл; 289,80 ± 16,23 нг/мл; 187,50 ± 11,34 нг/мл відповідно) БА й ожиріння порівняно з групою контролю ($p < 0,005$). При пізньому дебюті БА ці показники вірогідно вищі за відповідні у хворих на ранню БА.

Вміст ММП-1, -9 та ТІМП-1 не відрізнявся залежно від тяжкості перебігу у хворих на ранню БА ($p > 0,05$), вищий при тяжкому перебігу пізньої БА порівняно з нетяжким ($p < 0,05$). Рівні ММП-1 і ММП-9 у хворих на ранню, пізню БА й ожиріння вищі при неконтрольованому перебігу захворювання порівняно з відповідними показниками при повному й частковому контролі, але при пізньому дебюті перевищували такі порівняно з раннім.

Висновки. Враховуючи результати дослідження, можна припустити, що концентрації ММП-1, ММП-9 і ТІМП-1 у хворих на БА й ожиріння можуть бути біомаркерами ремоделювання ДШ, зокрема тяжкості перебігу та рівня контролю БА.

Key words: asthma, obesity, matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, course, control.

Pathologia, 2023. 20(3), 238-242

The content of matrix metalloproteinase-1, -9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in patients with bronchial asthma and obesity

V. V. Kachkovska, L. N. Prystupa

Airway remodeling is a significant factor in the progression of respiratory failure in bronchial asthma (BA). Obesity can contribute to inflammation, and consequently – airway remodeling, by increased production of matrix proteinase (MMP). However, the mechanisms of remodeling in different phenotypes of BA, especially in comorbid patients, remain poorly understood.

The aim of the research was to examine the levels of remodeling markers MMP-1, MMP-9 and tissue inhibitor of matrix proteinases (TIMP-1) in obese asthmatic patients, taking into account their age at the onset of BA, the severity of symptoms and the level of control.

Material and methods. 195 patients with BA associated with obesity were examined. The control group consisted of 95 practically healthy people. Patients were divided into two groups: Group I included 100 patients with early onset, and Group II included 95 patients with late onset of BA. The study was approved by the Bioethics Commission of the Medical Institute of Sumy State University. Statistical analysis of the obtained results was carried out using the SPSS-17 program.

Results. The content of MMP-1, -9 and TIMP-1 was higher in patients with early (129.40 ± 7.86; 177.30 ± 9.19; 142.40 ± 12.22 ng/ml, respectively) and late (196.60 ± 9.62; 289.80 ± 16.23; 187.50 ± 11.34 ng/ml, respectively) BA with obesity compared to practically healthy individuals ($p < 0.005$). Patients with late-onset BA associated with obesity likely had higher indicators than those with early BA. In patients with early BA, the levels of MMP-1, -9, and TIMP-1 were not significantly different depending on the severity of the disease ($p > 0.05$). However, in patients with severe late BA, the levels of these markers were higher compared to those with mild BA ($p < 0.05$). Levels of MMP-1 and MMP-9 in patients with early-onset and late-onset BA with obesity were higher in the absence of disease control compared to those in complete and partial control, but in late-onset exceeded those in early-onset.

Conclusions. Considering the obtained results, it can be assumed that the level of MMP-1, MMP-9 and TIMP-1 in obese patients with BA can serve as biomarkers of airway remodeling, namely, the severity and the level of BA control.

У результаті досліджень встановили значущість ремоделювання бронхів для несприятливого перебігу бронхіальної астми (БА). Відомо, що ремоделювання дихальних шляхів (ДШ) прогресує з посиленням тяжкості захворювання, спричиняє прогресування дихальної недостатності. Встановлено, що при БА найважливішими маркерами ремоделювання ДШ є матриксна металопротеїназа (ММП)-1, ММП-9 і тканинний інгібітор матриксних металопротеїназ (ТІМП)-1, а дисбаланс між ММП-9 і ТІМП-1 пояснює його прогресування [1,2].

Наявність ожиріння може зумовлювати підвищення продукції ММП, посилення запалення та ремоделювання бронхів [3,4,5]. Результати клінічних досліджень підтверджують, що ожиріння модулює функції імунних, епітеліальних і гладеньком'язових клітин, фібробластів, а також змінює клітинний склад ДШ. Врешті це призводить до їх ремоделювання [3,6]. Гетерогенність механізмів його виникнення та прогресування зумовлює специфічні ендотипи ремоделювання ДШ при БА [7,8].

Недостатньо вивченими залишаються механізми ремоделювання при різних фенотипах БА, особливо у хворих на БА, що асоційована з ожирінням.

Мета роботи

Дослідити вміст маркерів ремоделювання ММП-1, ММП-9 і ТІМП-1 у хворих на БА й ожиріння залежно від віку дебюту, тяжкості перебігу та рівня контролю БА.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження здійснили протягом 2016–2019 рр. на базі пульмонологічного відділення Комунального некомерційного підприємства Сумської обласної ради «Сумська обласна клінічна лікарня». У дослідження залучили 553 хворих на БА, які проживали у м. Суми та Сумській області, зверталися для консультації в поліклініку закладу чи були госпіталізовані для верифікації діагнозу, виключення чи підтвердження іншої бронхолегеневої патології та корекції терапії. На другому етапі обрали 195 хворих на БА, що асоційована з ожирінням.

Критерії залучення пацієнтів у дослідження – вік 18 років і більше; встановлений діагноз персистоючої бронхіальної астми різних ступенів тяжкості відповідно до чинних нормативних документів, підтверджений даними спірографії (зворотність бронхіальної обструкції – приріст об'єму форсованого видиху за першу секунду $\geq 12\%$ і ≥ 200 мл від вихідного рівня після проби з 400 мкг салібуталамолу); можливість правильного використання базисних препаратів; відсутність загострення протягом мінімум 1 місяця до залучення; відсутність куріння в анамнезі; наявність письмової інформованої згоди на участь.

Критерії виключення – діагностована тяжка супутня патологія (декомпенсовані хвороби серцево-судинної системи, печінки, нирок); туберкульоз легень, синдром набутого імунodefіциту; цукровий діабет 1 і 2 типів; період вагітності чи лактації; виявлені хронічне обструктивне захворювання легень,

бронхоектази, саркоїдоз, фіброз легень, інтерстиціальні захворювання легень; онкологічні хвороби; психічні, неврологічні захворювання; медикаментозна (наркотична) і/чи алкогольна залежність; синдром Іценка–Кушинга; небажані явища, що включають реакції гіперчутливості на медикаменти, несумісні з продовженням дослідження; нездатність виконувати протокол спірометричного дослідження; постійне приймання системних глюкокортикоїдів; крім того, у дослідження не залучали активних курців та осіб, які курили раніше.

У контрольну групу залучили 95 практично здорових осіб без симптомів БА, алергії та atopії в індивідуальному та сімейному анамнезі. Всі обстежені попередньо підписали інформовану згоду на участь у дослідженні.

Пацієнтів поділили на дві групи залежно від віку дебюту: до I групи залучили 100 хворих із раннім, а до II – 95 пацієнтів із пізнім дебютом БА. Діагноз БА, тяжкість перебігу, рівень контролю встановили згідно з рекомендаціями GINA-2016 та її наступними версіями [9]. Діагностику ожиріння здійснили відповідно до наказу МОЗ України від 05.08.2009 № 574 «Про затвердження протоколів надання медичної допомоги пацієнтам з ендокринними захворюваннями» та рекомендацій ВООЗ (1999), Європейської Асоціації з вивчення ожиріння (EASO, 2016).

Серед обстежених хворих – 360 (65,1%) жінок і 193 (34,9%) чоловіки. Середній вік хворих на БА становив $42,39 \pm 0,71$ року, осіб із групи контролю – $44,10 \pm 1,53$ року ($F = 1,029$; $p = 0,311$).

ТІМП-1, ММП-1 і ММП-9 визначили за допомогою наборів для імуноферментного аналізу IBL International GmbH (Hamburg, Germany) на базі Центру колективного користування науковим обладнанням «Центр біомедичних досліджень» Навчально-наукового медичного інституту Сумського державного університету на обладнанні GBG Stat Fax 303 Plus.

Для оцінювання контролю БА використали опитувальник ACQ-5. Загальний бал обраховували як середнє арифметичне для 5 відповідей і оцінювали так: якщо середній бал становить $\leq 0,75$ – хороший контроль БА; $0,75-1,50$ – частковий; $>1,5$ – неконтрольований перебіг.

Дослідження схвалене Комісією з питань про дотримання біоетики під час експериментальних і клінічних досліджень Навчально-наукового медичного інституту Сумського державного університету (витяг з протоколу від 26 лютого 2016 року № 3/2).

Статистичний аналіз результатів здійснили за допомогою програми SPSS-17. Для оцінювання форми розподілу параметрів, що оцінювали, використали тест Колмогорова–Смирнова. У результаті визначили параметричні чи непараметричні методи статистичного опрацювання даних. Критерій Фішера застосували для оцінювання кількісних показників. Для оцінювання відмінностей у незалежних вибірках використали непараметричні критерії Вілкоксона, Манна–Вітні та Краскела–Волліса. Всі тести двосторонні, значення $p < 0,05$ вважали статистично достовірним.

Таблиця 1. Вміст матричної металопротеїнази-1, -9 та тканинного інгібітора матричних металопротеїназ-1

Показник, нг/мл	I група, n = 100	II група, n = 95	Контроль, n = 95	p ₁	p ₂	p ₃
ММП-1	129,40 ± 7,86	196,60 ± 9,62	46,80 ± 1,77	0,001	0,001	0,001
ММП-9	177,30 ± 9,19	289,80 ± 16,23	43,40 ± 1,39	0,001	0,001	0,001
ТІМП-1	142,40 ± 12,22	187,50 ± 11,34	43,30 ± 1,13	0,001	0,001	0,004
ММП-9/ТІМП-1	2,11 ± 0,21	1,93 ± 0,13	1,00 ± 0,001	0,001	0,001	0,001

p₁: вірогідність відмінності між показником I групи та контролем; p₂: достовірність відмінності між показником II групи та контролем; p₃: вірогідність відмінності між показниками I та II групи.

Таблиця 2. Вміст маркерів ремоделювання залежно від тяжкості перебігу

Показник, нг/мл	I група, n = 100			II група, n = 95		
	33,5 мм	Тяжкий, n = 80	p	Нетяжкий, n = 32	Тяжкий, n = 63	p
ММП-1	135,30 ± 19,17	127,90 ± 8,65	0,710	137,50 ± 14,49	226,70 ± 10,73	0,001
ММП-9	135,20 ± 18,72	187,80 ± 10,21	0,020	187,40 ± 18,53	341,80 ± 19,64	0,001
ТІМП-1	126,60 ± 25,59	146,30 ± 13,92	0,520	148,40 ± 16,98	207,30 ± 14,21	0,013
ММП-9/ТІМП-1	1,66 ± 0,37	2,22 ± 0,23	0,270	1,78 ± 0,25	2,01 ± 0,16	0,410

Таблиця 3. Вміст маркерів ремоделювання залежно від рівня контролю БА

Показник, нг/мл	I група, n = 100				II група, n = 95			
	повний контроль, n = 12	частковий контроль, n = 34	неконтрольований перебіг, n = 54	p	повний контроль, n = 5	частковий контроль, n = 35	неконтрольований перебіг, n = 55	p
ММП-1	77,10 (61,56; 92,61)	95,30 (80,11; 110,48)	162,40 (138,32; 186,49)	0,001	162,20 (57,77; 266,63)	148,50 (118,35; 178,74)	230,40 (207,48; 253,21)	0,001
ММП-9	67,50 (46,36; 88,64)	131,20 (108,22; 154,25)	230,70 (209,83; 251,51)	0,001	99,00 (54,22; 143,78)	205,00 (162,73; 247,21)	361,10 (322,16; 400,02)	0,001
ТІМП-1	117,60 (64,22; 170,94)	132,0 (91,49; 172,50)	154,40 (118,09; 190,72)	0,63	112,80 (20,41; 205,19)	165,50 (126,15; 204,93)	208,20 (179,44; 236,96)	0,060
ММП-9/ТІМП-1	0,87 (0,41; 1,33)	1,57 (1,18; 1,96)	2,72 (2,07; 3,38)	0,002	1,31 (0,02; 2,58)	1,65 (1,28; 2,02)	2,17 (1,79; 2,54)	0,090

Результати

Враховуючи гетерогенність патогенетичних механізмів ремоделювання при різних фенотипах БА [7,8], дослідили вміст маркерів ремоделювання у хворих на БА й ожиріння залежно від віку дебюту захворювання. Результати дослідження вмісту ММП-1, ММП-9 і ТІМП-1 сироватки крові у хворих на ранню та пізню БА й ожиріння, а також у практично здорових осіб наведено в таблиці 1.

Встановили, що у хворих I та II груп показники ММП-1, ММП-9, ТІМП-1 і співвідношення ММП-9/ТІМП-1 вірогідно вищі порівняно з контролем (p < 0,05 для всіх випадків). Порівняння вмісту ММП і ТІМП-1 у хворих на БА й ожиріння залежно від віку дебюту показало вищий рівень ММП-1, ММП-9 і ТІМП-1 у хворих на пізню БА порівняно з показниками при ранній БА. Співвідношення ММП-9/ТІМП-1 у пацієнтів з ожирінням відрізнялось залежно від віку дебюту БА (p = 0,001).

Зокрема, у хворих на пізню БА й ожиріння рівні ММП-1, ММП-9 і ТІМП-1 вищі порівняно з показником пацієнтів із ранньою БА й ожирінням.

Надалі проаналізували вміст ММП-1, ММП-9 і ТІМП-1 залежно не лише від віку дебюту БА, але й враховуючи тяжкість перебігу БА. Результати наведено в таблиці 2.

Отже, у хворих I групи рівні ММП-1, ТІМП-1 та співвідношення ММП-9/ТІМП-1 вірогідно не відрізнялися залежно від тяжкості перебігу (p > 0,05 для всіх випадків); тільки вміст ММП-9 був в 1,4 раза вищий у

разі тяжкого перебігу порівняно з нетяжким (p = 0,02). У хворих II групи з тяжким перебігом визначили вірогідно вищий вміст ММП-1, ММП-9 і ТІМП-1 порівняно з нетяжким (p > 0,05 для всіх показників). Зазначимо, що вміст ММП-1, ММП-9 і ТІМП-1 у пацієнтів із нетяжким перебігом вірогідно не відрізнявся залежно від віку дебюту, але при тяжкому перебігу пізньої БА вміст ММП-1 вищий в 1,6 раза, ММП-9 – в 1,8 раза, ТІМП-1 – в 1,4 раза порівняно з таким у хворих на ранню БА з тяжким перебігом. Це свідчить про істотніше зростання протеолітичної активності при тяжкому перебігу пізньої БА порівняно з таким при ранній БА.

Результати дослідження вмісту ММП-1, -9 і ТІМП-1 у сироватці крові у хворих на БА залежно від рівня контролю наведено в таблиці 3.

Встановили, що вміст ММП-1 і ММП-9 вірогідно вищий у хворих I та II груп із неконтрольованим перебігом БА порівняно з показниками хворих із повним чи частковим контролем; концентрація ТІМП-1 не відрізнялася залежно від контролю. Зазначимо, що у хворих на пізню БА, асоційовану з ожирінням, вміст ММП-1 вищий в 1,4 раза, ММП-9 – в 1,6 раза, ТІМП-1 – в 1,3 раза порівняно з відповідними показниками хворих на ранню БА й ожиріння.

Отже, металопротеолітична активність залежала від рівня контролю, вища при неконтрольованому перебігу БА порівняно з частковим і повним контролем. При пізньому дебюті БА, що асоційована з ожирінням, ці рівні були вищими, ніж у хворих на ранню БА й ожиріння.

Обговорення

Зважаючи на суперечливість результатів досліджень щодо рівнів ММП-1, ММП-9 і ТІМП-1 у хворих на БА та супутнє ожиріння [5,10,11], диференційовано дослідили вміст цих маркерів ремоделювання залежно від віку дебюту. Це обґрунтовано тим, що фенотип БА-ожиріння гетерогенний [12], розрізняють ранню атопічну БА та пізню БА без атопії [2,13].

У результаті дослідження встановили збільшення вмісту ММП-1, -9 та ТІМП-1 у хворих на ранню та пізню БА й ожиріння порівняно з практично здоровими особами. Зазначимо, що рівні ММП-1, -9 та ТІМП-1 вірогідно вищі при пізньому дебюті БА порівняно з відповідними показниками при ранньому. Відомо, що ТІМП-1 подовжує виживання нейтрофілів та активує нейтрофільне запалення через секрецію нейтрофільної еластази та мієлопероксидази [14,15]; це може почасти пояснити вищі рівні ММП-1 і ММП-9 при пізній БА.

Є достатньо наукових даних про те, що вміст ММП зростає залежно від тяжкості БА [1,16]. Як правило, ремоделювання ДШ визначають у хворих на БА з легким перебігом, воно має тенденцію до посилення зі зростанням тяжкості захворювання. Втім, ремоделювання ДШ може інтенсивно відбуватися на ранніх стадіях захворювання, й у дорослих пацієнтів із тривалим анамнезом БА бути мінімальним [7,8,17,18]. Під час нашого дослідження таку залежність визначили у хворих на пізню БА й ожиріння, а при ранній БА тільки вміст ММП-9 зростав при тяжкому перебігу, концентрації ММП-1 і ТІМП-1 не залежали від тяжкості захворювання. Імовірно, відмінності за рівнями маркерів ремоделювання при різних фенотипах БА, асоційованої з ожирінням, що виявили під час нашого дослідження, доповнять результати роботи інших вчених, які показали гетерогенність механізмів його виникнення та прогресування, що призводить до специфічних ендотипів ремоделювання ДШ при БА [7,8]. Це стосується і вмісту ТІМП-1, який не залежав від тяжкості у хворих на ранню БА та зростав при тяжкому перебігу пізньої БА порівняно з нетяжким перебігом хвороби. Попередньо встановлено, що вміст ТІМП-1 збільшувався разом із тяжкістю БА [1].

Виявили, що рівні ММП-1, ММП-9 і ТІМП-1 у хворих на ранню, пізню БА й ожиріння вищі при неконтрольованому перебігу захворювання порівняно з відповідними показниками хворих із повним і частковим контролем. При пізньому дебюті БА вміст ММП-1, ММП-9 і ТІМП-1 вірогідно вищий порівняно з таким у хворих на ранню БА й ожиріння. Результати, що одержали, збігаються з даними попередніх досліджень, у яких встановлено сироваткові рівні ММП-9, ТІМП-1 і ММП-9/ТІМП-1 у хворих на неконтрольовану БА порівняно з відповідними показниками при контрольованому перебігу хвороби. На думку авторів, це дає підстави визначити їх як неінвазивні маркери ремоделювання ДШ [1]. Результати нашого дослідження уточнюють дані щодо істотнішого зростання металопротеолітичної активності при неконтрольованому перебігу БА саме у хворих із пізнім дебютом порівняно з такою при ранньому.

Висновки

1. Вміст ММП-1, -9 та ТІМП-1 вищий у хворих на ранню та пізню БА й ожиріння порівняно з практично здоровими особами, а також при пізньому дебюті порівняно з раннім.

2. Вміст ММП-1, -9 та ТІМП-1 не відрізнявся залежно від тяжкості перебігу у хворих на ранню БА, вищий при тяжкому перебігу пізньої БА порівняно з нетяжким; при тяжкому перебігу пізньої БА порівняно з таким у хворих на ранню БА.

3. Рівні ММП-1 і ММП-9 у хворих на ранню та пізню БА й ожиріння вищі при неконтрольованому перебігу захворювання порівняно з відповідними показниками хворих із повним і частковим контролем, а рівень ТІМП-1 вірогідно не відрізнявся. Вміст ММП-1, ММП-9 і ТІМП-1 у хворих на неконтрольовану пізню БА, асоційовану з ожирінням, вірогідно вищий порівняно з таким у пацієнтів із неконтрольованою ранньою БА й ожирінням. Отже, ці біомаркери можна застосовувати для додаткового прогностичного оцінювання тяжкості перебігу та рівня контролю БА в таких пацієнтів.

Перспективи подальших досліджень. Маркери ремоделювання ДШ у хворих на БА й ожиріння можуть бути і прогностичними факторами, й таргетними об'єктами для покращення контролю БА в цих пацієнтів; це робить перспективними наступні дослідження з цього питання.

Фінансування

Дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи Сумського державного університету: «Хвороби внутрішніх органів: предиктори розвитку, оптимізація, діагностика, лікування та профілактика», держреєстрація № 0116U004046 (2016–2020); «Удосконалення діагностики, лікування та профілактики захворювань внутрішніх органів», держреєстрація № 0121U108891 (2021–2026).

Подяка

Колектив авторів висловлює особливу подяку захисникам України за можливість продовжувати наукову та практичну роботу.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 07.11.2023

Після доопрацювання / Revised: 20.11.2023

Схвалено до друку / Accepted: 06.12.2023

Відомості про авторів:

Качковська В. В., канд. мед. наук, доцент каф. внутрішньої медицини з центром респіраторної медицини, Сумський державний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-9563-5425

Пристапа Л. Н., д-р мед. наук, професор, зав. каф. внутрішньої медицини з центром респіраторної медицини, Сумський державний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-6454-9831

Information about authors:

Kachkovska V. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Internal Medicine with the Center of Respiratory Medicine, Sumy State University, Ukraine.

Prystupa L. N., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Internal Medicine with the Center of Respiratory Medicine, Sumy State University, Ukraine.

ican journal of respiratory and critical care medicine, 207(4), 452-460. <https://doi.org/10.1164/rcm.202111-2634OC>

18. Guida, G., & Riccio, A. M. (2019). Immune induction of airway remodeling. *Seminars in immunology*, 46, 101346. <https://doi.org/10.1016/j.smm.2019.101346>

References

- Chung, F. T., Huang, H. Y., Lo, C. Y., Huang, Y. C., Lin, C. W., He, C. C., He, J. R., Sheng, T. F., & Wang, C. H. (2019). Increased Ratio of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9)/Tissue Inhibitor Metalloproteinase-1 from Alveolar Macrophages in Chronic Asthma with a Fast Decline in FEV₁ at 5-Year Follow-up. *Journal of clinical medicine*, 8(9), 1451. <https://doi.org/10.3390/jcm8091451>
- Garcia-Rio, F., Alvarez-Puebla, M. J., Esteban-Gorgojo, I., Barranco, P., & Olaguibel, J. M. (2019). Obesity and Asthma: Key Clinical Questions. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 29(4), 262-271. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0316>
- Shailesh, H., & Janahi, I. A. (2022). Role of Obesity in Inflammation and Remodeling of Asthmatic Airway. *Life*, 12(7), 948. <https://doi.org/10.3390/life12070948>
- Kurokawa, A., Kondo, M., Arimura, K., Ashino, S., & Tagaya, E. (2021). Less airway inflammation and goblet cell metaplasia in an IL-33-induced asthma model of leptin-deficient obese mice. *Respiratory research*, 22(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01763-3>
- Boumiza, S., Chahed, K., Tabka, Z., Jacob, M. P., Norel, X., & Ozen, G. (2021). MMPs and TIMPs levels are correlated with anthropometric parameters, blood pressure, and endothelial function in obesity. *Scientific reports*, 11(1), 20052. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99577-2>
- Dholia, N., Sethi, G. S., Naura, A. S., & Yadav, U. C. S. (2021). Cysteinyl leukotriene D₄ (LTD₄) promotes airway epithelial cell inflammation and remodelling. *Inflammation*, 70(1), 109-126. <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01416-z>
- Hough, K. P., Curtiss, M. L., Blain, T. J., Liu, R. M., Trevor, J., Deshane, J. S., & Thannickal, V. J. (2020). Airway Remodeling in Asthma. *Frontiers in medicine*, 7, 191. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00191>
- Hsieh, A., Assadina, N., & Hackett, T. L. (2023). Airway remodeling heterogeneity in asthma and its relationship to disease outcomes. *Frontiers in physiology*, 14, 1113100. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1113100>
- Global Initiative for Asthma. (2016). *Global strategy for asthma management and prevention*. Retrieved from: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2019/01/2016-GINA.pdf>
- Ozen, G., Boumiza, S., Deschildre, C., Topal, G., Longrois, D., Jakobsson, P. J., Michel, J. B., Jacob, M. P., Chahed, K., & Norel, X. (2019). Inflammation increases MMP levels via PGE₂ in human vascular wall and plasma of obese women. *International journal of obesity (2005)*, 43(9), 1724-1734. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0235-6>
- Grzechocińska, B., Dąbrowski, F. A., Sierdzinski, J., Cyganek, A., & Wielgoś, M. (2019). The association between serum metalloproteinase concentration, obesity, and hormone levels in reproductive-aged women. *Endokrynologia Polska*, 70(1), 49-56. <https://doi.org/10.5603/EP.a2018.0067>
- Dixon, A. E., & Poynter, M. E. (2016). Mechanisms of Asthma in Obesity. Pleiotropic Aspects of Obesity Produce Distinct Asthma Phenotypes. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 54(5), 601-608. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0017PS>
- Farzan, S., Coyle, T., Coscia, G., Rebaza, A., & Santiago, M. (2022). Clinical Characteristics and Management Strategies for Adult Obese Asthma Patients. *Journal of asthma and allergy*, 15, 673-689. <https://doi.org/10.2147/JAA.S285738>
- Schoeps, B., Eckfeld, C., Prokopchuk, O., Böttcher, J., Häußler, D., Steiger, K., Demir, I. E., Knolle, P., Soehnlein, O., Jenne, D. E., Hermann, C. D., & Krüger, A. (2021). TIMP1 Triggers Neutrophil Extracellular Trap Formation in Pancreatic Cancer. *Cancer research*, 81(13), 3568-3579. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-4125>
- Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Piperigkou, Z., Manou, D., Passi, A., Skandalis, S. S., Vynios, D. H., Orian-Rousseau, V., Ricard-Blum, S., Schmelzer, C. E. H., Duca, L., Durbeej, M., Afratis, N. A., Troeberg, L., Franchi, M., Masola, V., & Onisto, M. (2021). A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *The FEBS journal*, 288(24), 6850-6912. <https://doi.org/10.1111/febs.15776>
- Prabha, A., Lokesh, K. S., Chaya, S. K., Jayaraj, B. S., Malamardi, S., Subbarao, M. V. S. S. T., Beck, S. C., Krishna, M. T., & Mahesh, P. A. (2022). Pilot study investigating diagnostic utility of serum MMP-1 and TGF-β1 in asthma in 'real world' clinical practice in India. *Journal of clinical pathology*, 75(4), 222-225. <https://doi.org/10.1136/jclin-path-2020-206821>
- James, A. L., Donovan, G. M., Green, F. H. Y., Mauad, T., Abramson, M. J., Cairncross, A., Noble, P. B., & Elliot, J. G. (2023). Heterogeneity of Airway Smooth Muscle Remodeling in Asthma. *Amer-*

Морфологічні особливості реваскуляризації перифокальних ділянок інфаркту мозку

С. І. Тертишний^{id} *^{A,E,F}, О. О. Волошанська^{id} ^{B,C,D}, А. М. Сергеева^{id} ^{C,D}

Запорізький державний медично-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 – дослідити патоморфологічні прояви реваскуляризації перифокальних ділянок інфаркту мозку в динаміці гострого періоду захворювання.

Матеріали та методи. Вивчали перифокальні ділянки інфаркту мозку в померлих хворих у термінах 1, 3, 7 і 14 діб. Здійснили оглядове світлооптичне дослідження, імпрегнацію препаратів 10 % аміачним сріблом та імуногістохімічне дослідження з використанням моноклональних антитіл *Mo a-Hu CD34*, *Clone QBEnd/10* (Thermo Fisher Scientific Inc., США) і *Mo a-Hu CD105 Endoglin*, *Clone: SN6h¹* (DAKO, Данія). Дослідили щільність судин і сумарну площу поперечного перетину судин. Морфометричне дослідження здійснили за допомогою програми Відеотест – Морфологія 5.2.0.158 (ООО ВідеоТест). Статистичне опрацювання результатів виконали за допомогою програми Statistica® for Windows 13.0.

Результати. За даними експресії CD34 і морфометричного дослідження, з 3 доби в перифокальних ділянках інфаркту мозку посилюються процеси ангиогенезу, збільшується щільність судин на 18,48 %, в 1,93 раза зростає сумарна площа поперечного перетину судин. На 7 добу в цих ділянках зареєстрували максимальні показники щільності судин і сумарної площі поперечного перетину судин, визначили брунькування судин, формування ендотеліальних проліфератів, спостерігали посилення інтенсивності мембранної експресії CD105 в ендотелії судин і перичитах, що свідчить про активну участь останніх в ангиогенезі. На 14 добу щільність судин і показники сумарної площі поперечного перетину судин зменшилися. В цей термін у перифокальних ділянках інфаркту збільшилися щільність розташування астролії з гіпертрофією тіл і відростків астрочитів.

Висновки. У перифокальних ділянках мозкового інфаркту, за даними експресії CD34 і CD105, із 3 доби поступово посилюються процеси ангиогенезу, збільшується щільність судин, сумарна площа поперечного перетину судин, а також спостерігають брунькування судин, формування ендотеліальних проліфератів. Судинне ремоделювання супроводжується збільшенням щільності та гіпертрофією астролії в перифокальних ділянках мозкового інфаркту.

Ключові слова:

перифокальні ділянки інфаркту мозку, реваскуляризація, CD34, CD105, астрочити.

Патологія. 2023. Т. 20, № 3(59). С. 243-249

*E-mail: tertishniypath@gmail.com

Morphological peculiarities of revascularization of perifocal areas of brain infarction

S. I. Tertyshnyi, O. O. Voloshanska, A. M. Serheieva

Aim. To study pathomorphological signs of revascularization of perifocal areas of brain infarction in the dynamics of the acute period of the disease.

Material and methods. Perifocal areas of brain infarction in patients who died at the 1st, 3rd, 7th, and 14th days were studied. General histopathological study was followed by 10 % ammonium silver impregnation and immunohistochemical examination using monoclonal antibodies *Mo a-Hu CD34*, *Clone QBEnd/10* ("Thermo Fisher Scientific Inc." – USA) and *Mo a-Hu CD105 Endoglin were used. clone: SN6h¹* ("DAKO", Denmark). Vascular density and total cross-sectional area of vessels were studied. For the morphometric study, Videotest – Morphology 5.2.0.158 software (VideoTest LLC) was used. Statistical processing of the obtained data was carried out using the Statistica® for Windows 13.0 software.

Results. According to the data of CD34 expression, from the 3rd day in the perifocal areas of brain infarction, the angiogenesis processes were increased: the density of blood vessels increased by 18.48 %, and the total cross-sectional area of vessels increased by 1.93 times. On the 7th day, the maximal vessel density and total cross-sectional area of vessels were registered in these areas; there was a vascular budding, formation of endothelial proliferates, and increased expression of CD105 on the vascular endothelium and pericytes, which indicates the active participation of the latter in angiogenesis. On the 14th day, blood vessel density and indicators of the total cross-sectional area of vessels decreased. During this period, the density of the astrocytes increased in the infarct's perifocal areas with hypertrophy of their bodies and processes.

Conclusions. According to CD34 and CD105 expression data, in the perifocal areas of cerebral infarction, the processes of angiogenesis gradually increase from the 3rd day manifesting by increase in the blood vessel density and total vascular cross-sectional area, as well as in the vascular budding and the formation of endothelial proliferates. Vascular remodeling is accompanied by increased density and hypertrophy of astroglia in the perifocal areas of cerebral infarction.

Key words:

perifocal areas of brain infarction, revascularization, CD34, CD105, astrocytes.

Pathologia, 2023. 20(3), 243-249

Ішемічний інсульт – основна причина смертності та тяжкої інвалідності в усьому світі, й кількість хворих на інсульт у багатьох країнах неухильно зростає [1,2].

Враховуючи соціальну значущість цієї патології, кількість наукових досліджень, що присвячені про-

блемам ішемічного інсульту, за останнє десятиліття також суттєво зросла [3]. Останнім часом дослідники приділяють чимало уваги процесам відновлення функцій мозку після перенесеного ішемічного інсульту. Критичну роль у цьому процесі відіграє стан судинної

системи [4,5]. Все більше доказів свідчать, що покращення кровопостачання ішемічних ділянок відбувається шляхом посиленого ангіо- та васкулогенезу.

Процес постінсультного ангіогенезу досить складний і остаточно не з'ясований. У ньому задіяно багато механізмів, які нині інтенсивно вивчають [6,7]. Нові судини утворюються в мозку кількома способами, включаючи ангіогенез, васкулогенез і ріст колатеральних судин. Головна мета утворення цих нових судин – посилення колатерального кровообігу як першої лінії захисту від ішемії. Ангіогенез відіграє вирішальну роль у відновленні мозку після ішемічного інсульту та тривалому функціональному відновленні.

Чимало дослідників зазначають, що в процесах ангіогенезу важлива роль належить CD34+-клітинам [8,9]. Вони здатні до проліферації та диференціювання, виділяють ангіогенні фактори, що може посилювати процеси регенерації при ішемічному пошкодженні тканин [10,11,12]. Крім того, CD34+-клітини ідентифікують як ендотеліальні клітини-попередники, а також як мультипотентні гемопоетичні стовбурові клітини.

Зауважимо, що експресію CD34 визначають і в нормальних тканинах, тому для ідентифікації активованих ендотеліальних клітин у сучасних дослідженнях часто використовують імуногістохімічний маркер CD105, або ендоглін. Повідомляють, що CD105 сильно експресується в ендотеліальних клітинах тканин, які беруть участь в ангіогенезі. Крім ендотеліальних клітин, що задіяні в відновленні кровопостачання перифокальних відділів інфаркту мозку, важлива роль у цих процесах належить перицитам та астроцитам [13,14] як невід'ємним компонентам судин і гематоенцефалічного бар'єра.

Вираженість процесів ангіогенезу в перифокальних ділянках мозкових інфарктів у різні терміни захворювання має важливе значення для впровадження ефективних лікувальних заходів, що спрямовані на запобігання поширенню ішемічних змін при інфарктах мозку та покращення неврологічного статусу хворих. Однак морфологічні зміни в перифокальних ділянках мозкових інфарктів, і зокрема процеси ангіогенезу, висвітлено в поодиноких дослідженнях останніх років [15].

Мета роботи

Дослідити патоморфологічні прояви реваскуляризації перифокальних ділянок інфаркту мозку в динаміці гострого періоду захворювання.

Матеріали і методи дослідження

Матеріал дослідження – мозок хворих, які померли в різні терміни півкульового ішемічного інфаркту. Вивчали перифокальні зони інфаркту в такі терміни: 1 доба – $n = 17$, 3 – $n = 15$, 7 – $n = 14$, 14 діб – $n = 9$. Як контроль дослідили відповідні ділянки мозку протилежної півкулі.

Для оглядової світлової мікроскопії мозок фіксували 10 % розчином нейтрального формаліну (24–48 годин), надалі обробляли за загальноприйнятою методикою. Парафінові серійні зрізи забарвлювали

гематоксиліном та еозинном. Стан базальних мембран судин визначали на препаратах, забарвлених шифф-йодною кислотою (PAS-реакція).

Ендотелій мікросудин визначали, використовуючи моноклональні антитіла *Mo a-Hu CD34*, *Clone QBEnd/10* (Thermo Fisher Scientific Inc., США) і *Mo a-Hu CD105 Endoglin*, *Clone: SN6h¹* (DAKO, Данія).

Здійснили контрольні дослідження для виключення хибнопозитивного і хибнонегативного результатів імуногістохімічного дослідження (ІГХ). Позитивний контроль – зрізи головного мозку померлих без цереброваскулярної патології; при цьому досліджені антигени були наявні в тканині в достатній мірі, мали відповідний розподіл. Для негативного контролю під час ІГХ-забарвлення виключали інкубацію з первинним антитілом.

Посилення ангіогенезу як адаптивного механізму при ішемічному інфаркті мозку в перифокальних зонах оцінювали шляхом обрахунку щільності мікросудин, яку визначали за допомогою методу «гарячих точок» ангіогенезу за N. Weidner [16]. На зрізах із позитивною експресією CD34 в ендотелії судин визначали три ділянки з найбільшою кількістю мікросудин в умовно стандартизованому полі зору (УСПЗ) мікроскопа при збільшенні $\times 400$. У кожній із цих ділянок обраховували кількість мікросудин; середнє арифметичне значення кількості мікросудин, що отримали в трьох полях зору, вважали показником щільності мікросудин.

Експресію CD105 оцінювали з визначенням оптичної щільності в умовних одиницях оптичної щільності (УООЩ) за допомогою програми ImageJ. Слабка інтенсивність – від 21 до 50 УООЩ, помірна – від 51 до 100 УООЩ, виражена експресія – понад 100 УООЩ. Інтенсивність експресії часто не відповідала площі експресії, залежала від щільності поверхневих рецепторів на клітинах.

На оглядових препаратах у перифокальних ділянках інфаркту мозку обчислювали сумарну площу поперечного перетину судин (СПС) у стандартизованому полі зору мікроскопа при збільшенні $\times 200$. У кожному випадку аналізували від 10 до 15 полів зору. Показники СПС наведено в відсотках до площі поля зору.

Виразність гліальної реакції в перифокальних ділянках інфаркту мозку визначали методом імпрегнації попередньо заморожених зрізів у розчині 10 % аміачного срібла.

Дослідження здійснили, використавши мікроскоп Axio Scope A1 Carl Zeiss (Німеччина) з камерою Jenoptik Progres gryphax® серії SUBRA (Німеччина). У кожному випадку аналіз судинних змін здійснили в 5 полях зору за допомогою програми Відеотест – Морфологія 5.2.0.158 (ООО ВідеоТест).

Одержані дані статистично опрацювали за допомогою програми Statistica® for Windows 13.0 (StatSoft Inc., ліцензія № JPZ8041382130ARCN10-J). Статистичний аналіз морфометричних параметрів здійснили з обчисленням медіани (Me), нижнього і верхнього квантилів (Q1; Q3). Відмінності між двома незалежними вибірками оцінювали за допомогою U-критерію Манна–Вітні. Статистично значущими вважали відмінності на рівні 95 % ($p < 0,05$).

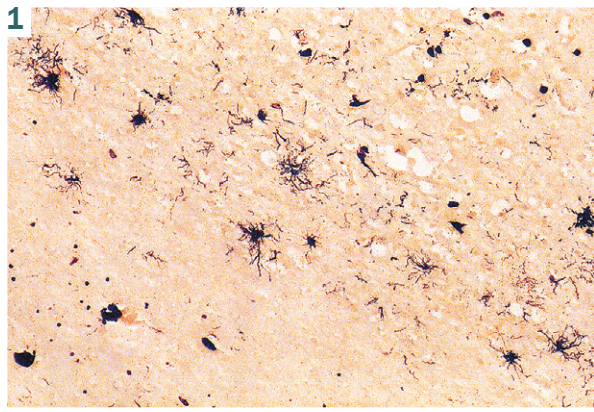


Рис. 1. Руйнування астроцитів у перифокальній ділянці інфаркту. Термін спостереження – 1 доба. Імпрегнація солями срібла. 36. $\times 200$.

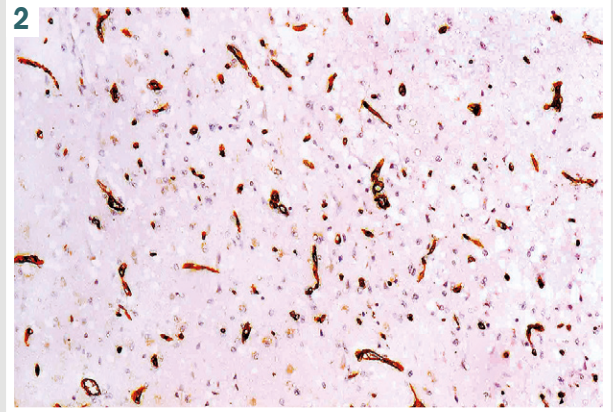


Рис. 2. Експресія CD34 у перифокальній ділянці інфаркту мозку на 3 добу захворювання. ІГХ, Мо *a-Hu CD34*, Clone QBEnd/10. 36. $\times 100$.

Результати

За даними експресії CD34, у контрольних спостереженнях щільність судин у корі та білій речовині становила 21,1 (19,00; 23,75) і 10,5 (9,00; 12,00) в УСПЗ відповідно при збільшенні $\times 200$. У кіркових відділах дрібні артеріоли та капіляри частіше розташовувалися навколо нейронів. У білій речовині визначили рівномірніше розташування дрібних судин. СПС у корі мозку становила 1,43 (1,21; 1,75) %.

На 1 добу захворювання в перифокальних ділянках мозкового інфаркту на фоні циркуляторних, гемокоагуляційних змін у капілярах і дрібних артеріолах реєстрували дистрофічні зміни ендотелію з наявністю в них сплосчених або вакуолізованих ядер із нечіткими межами. Визначили ділянки деендотелізації зі зниженою щільністю розташування ендотелію. Базальна мембрана дрібних артеріол характеризувалася нерівномірною товщиною, почасти внаслідок її руйнування зі зниженням оптичної щільності на окремих ділянках, почасти – внаслідок гіалінозу; це свідчило про наявність ангіопатії в більшості хворих на ішемічний інфаркт мозку. У цей термін визначали також фрагментацію, руйнування відростків і тіл астроцитів, нерівномірність їх розподілу по периметру інфарктного ядра, а також варіабельність їхніх розмірів (рис. 1).

У цей термін підвищувалася експресія CD34 в оболонках і корі мозку, визначали суттєве розгалуження і нерівномірний розподіл капілярної мережі в іпсилатеральній півкулі, але на межі з ішемічним осередком руйнування судин призводило до істотного зниження інтенсивності експресії CD34. Щільність судин у перифокальних ділянках ішемічного осередку на 1 добу становила 16,00 (14,00; 18,50); це на 24,17 % менше, ніж у контрольних спостереженнях ($p \leq 0,01$). СПС у корі мозку перифокальних ділянок інфаркту становила 0,77 (0,62; 1,16) %; це відповідало 58,84 % від показника контрольних спостережень. Отже, СПС істотніше знижується порівняно зі щільністю судин перифокальних ділянок інфаркту мозку. Це відбувається внаслідок спадіння частини дрібних артеріол і капілярів, а також у результаті вакуолізації ендотелію зі зменшенням просвіту судин. Однак в

окремих випадках у цьому терміні виявляли ділянки з розширенням судин зі стазом крові та розширені судини венозної ланки кровообігу, що спричиняло збільшення показників СПС. Такі зміни фіксували на обмежених ділянках перифокальної зони інфаркту, вони свідчили про неефективність кровообігу в цих зонах.

На 3 добу інтенсивність експресії CD34 у перифокальній зоні інфаркту мозку та щільність судин збільшувалися порівняно з контрольними спостереженнями. У зонах із підвищеною проникністю судин визначили інтенсивнішу експресію CD34. Щільність судин у цьому терміні становила 25,00 (22,25; 27,00); це на 18,48 % більше ніж у контролі. На окремих ділянках визначили хаотичне розташування великої кількості судин, щільність яких більш ніж удвічі перевищувала контрольні параметри (рис. 2). Показники СПС суттєво зростали внаслідок розширення колатеральних судин і становили 2,77 (2,07; 3,45) %, що в 1,93 раза більше порівняно з контрольними спостереженнями.

На 7 добу захворювання щільність судин, за даними щодо рівня експресії CD34, становила 27,00 (25,25; 29,00) в УСПЗ; це більше порівняно з показником, що встановили на 1 і 3 доби, на 68,75 % ($p < 0,05$) і 8,00 % ($p > 0,05$) відповідно. На межі з ішемічним осередком посилювалися процеси ангіогенезу – брунькування судин і формування ендотеліальних проліфератів, локалізованих навколо дрібних судин, які містили до 5–7 клітин. Кількість таких проліфератів зменшувалася з віддаленням від осередку некрозу. Показники СПС у цей термін становили 3,42 (3,25; 3,68) %; це більше порівняно з 1 і 3 добами в 4,44 і 1,23 раза відповідно ($p \leq 0,01$).

На 14 добу інтенсивність експресії CD34 по периферії інфаркту нерівномірна. Щільність судин становила 25,50 (22,25; 28,00) в УСПЗ, що менше порівняно з попереднім терміном на 5,55 %; показники СПС становили 3,09 (2,96; 3,71) %. У цей термін спостерігали суттєву редукцію набряку, циркуляторних і гемокоагуляційних розладів на межі з осередком ішемічного інфаркту, по периметру якого зростала щільність макрофагів.

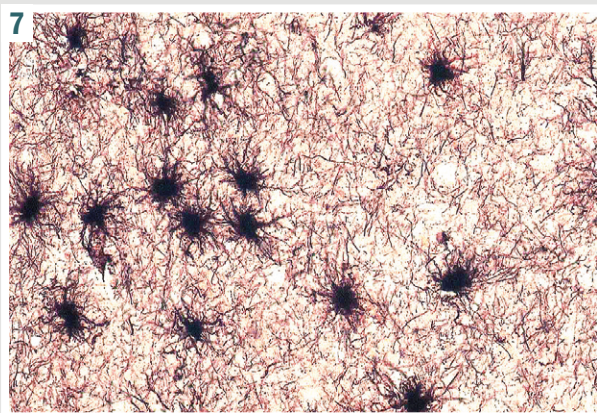
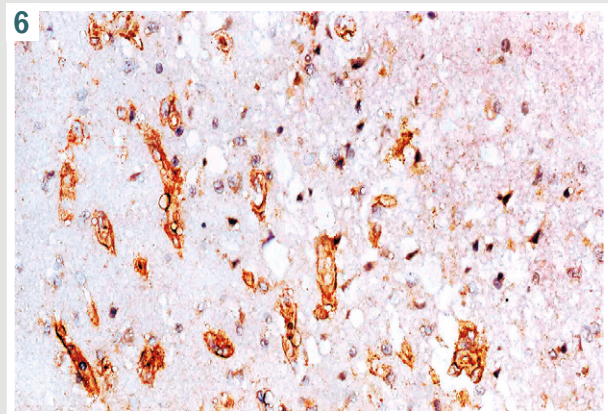
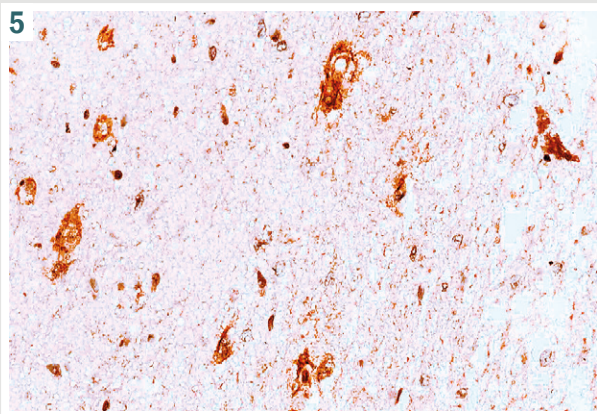
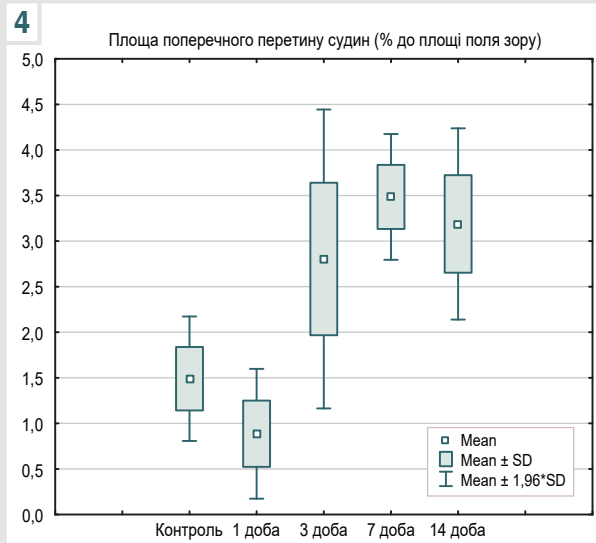
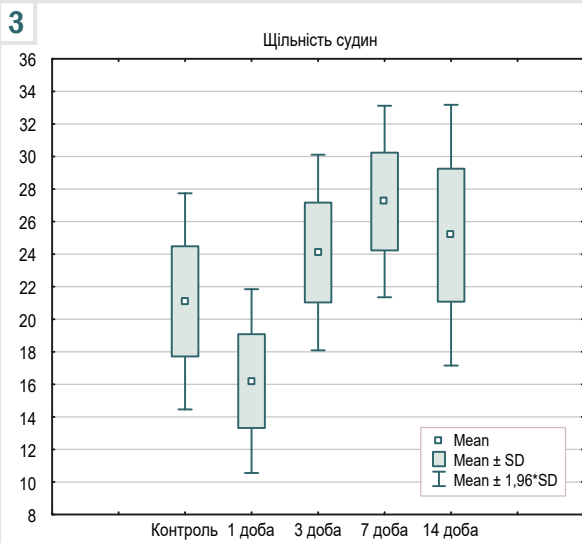


Рис. 3. Щільність судин у перифокальних відділах інфаркту мозку в різні терміни спостереження.

Рис. 4. Показники сумарної площі поперечного перетину судин у перифокальних відділах інфаркту мозку в різні терміни спостереження.

Рис. 5. Експресія CD105 в перифокальній ділянці інфаркту мозку на 3 добу (ділянка некрозу на рисунку справа). Мо *a-Hu CD105 Endoglin*, Clone: SN6h1. 36. ×200.

Рис. 6. Експресія CD105 у перифокальній ділянці інфаркту мозку на 7 добу (ділянка некрозу на рисунку в правому верхньому куті). Мо *a-Hu CD105 Endoglin*, Clone: SN6h1. 36. ×200.

Рис. 7. Формування астрогліозу в перифокальних ділянках інфаркту мозку. Термін спостереження – 14 діб. Імпрегнація солями срібла. 36. ×100.

На 7 і 14 добу, поряд із посиленням експресії CD34 в ендотелії судин, збільшувалася кількість CD34-позитивних клітин, які вільно розташовувалися серед нейронів і гліальних клітин; почасти такі клітини формували осередки підвищеної щільності, що визначили як прояви початкових стадій васкулогенезу. Кількість таких клітин на 7 і 14 добу становила 9,50 (7,00; 13,00) і 20,00 (16,25; 23,75) відповідно.

Зведені діаграми щільності судин і сумарна площа поперечного перетину судин на 1–14 добу наведені на рис. 3 і 4.

Визначили аналогічну спрямованість за термінами спостереження щодо експресії CD105. У перші 3 доби в перифокальних ділянках інфаркту визначили слабку мембранну експресію маркера (рис. 5). На окремих ділянках її визначили тільки в поодиноких ендотеліальних клітинах, що свідчило про відсутність активації ендотелію.

Починаючи з 7 доби, в перифокальних відділах інфаркту мозку визначали виражену інтенсивність експресії CD105 (рис. 6), що зменшувалася з віддаленням від некротичного осередку. Виражену мембранну

експресію CD105 виявляли і в ендотелії судин, і в перичитах; це свідчить про активну участь останніх в ангиогенезі, враховуючи спільність їхньої мембрани з ендотелієм. Зауважимо, що в більшості судин інтенсивність мембранної експресії в перичитах значно перевищувала таку в ендотелії.

Судинне ремоделювання перифокальних ділянок інфаркту супроводжувалося збільшенням щільності та нерівномірністю розташування астроглії з вираженою гіпертрофією тіл і переплетених відростків (рис. 7); це призводило до формування гліозу за анізоморфним типом з утворенням рубця.

Обговорення

Посилення ангиогенезу є однією зі стратегій сприяння функціональному відновленню після ішемічного інсульту [17,18]. Ангиогенез також тісно пов'язаний із процесами нейрогенезу [19], тому дослідження васкуляризації може бути хорошим біомаркером для моніторингу процесів реабілітації, а також ефектів фармакотерапії [20].

Дані наукової літератури свідчать, що ангиогенез стимулюється на межі ішемічного ядра після початку осередкової ішемії. Появу нових капілярів фіксують через 4–14 днів після церебральної ішемії [17]. В інших дослідженнях наводять термін 4–7 днів [21]. Зіставні результати одержали в нашому дослідженні. В ранні терміни (1 доба) спостерігали зменшення щільності судин внаслідок їх руйнування в перифокальних відділах некротичного осередку. Частина судин спадається через незаповнення кров'ю, і це призводить до значного зменшення сумарної площі поперечного перетину судин. Посилення експресії маркера CD34 на судинах перифокальних відділів інфаркту зі збільшенням щільності судин свідчило про посилення васкуляризації вже на 3 добу. Такі зміни пов'язують із посиленням колатерального кровотоку [22]. Максимальні показники щільності судин зареєстровані на 7 добу. В цей самий термін посилення ангиогенезу фіксували за появою брунькування судин.

Аналіз відомостей фахової літератури свідчить, що в дослідженнях різних авторів наведені терміни початку ангиогенезу та максимальних його проявів, що істотно відрізняються. Це зумовлено тим, що значна кількість досліджень, де вивчали ангиогенез, здійснено на експериментальному матеріалі з застосуванням різних моделей ішемічного ураження мозку [23,24]. На терміни васкуляризації перифокальних відділів інфаркту в померлих можуть впливати об'єм інфаркту, вік хворих, стан судинних колатералей і супутня судинна патологія, застосування лікарських засобів [25].

Дослідження у пацієнтів з інсультом показали, що активний ангиогенез відбувається через 3–4 дні після ішемічного ушкодження [26]. Дослідження аутопсійного матеріалу пацієнтів із різним терміном виживання після інсульту показали збільшення щільності мікросудин головного мозку порівняно з контралатеральною півкулею.

Особливістю змін на 7 і 14 добу, що виявили під час наших спостережень, є експресія CD34 в окремих

клітинах, що не пов'язані з судинами. Кількість таких клітин суттєво збільшувалася з 7 до 14 доби. Зважаючи, що CD34+клітини є маркером ендотеліальних клітин-попередників, таке збільшення свідчить про їхню активну участь у процесах ангиогенезу. У фаховій літературі наведено достатню кількість відомостей про роль ендотеліальних клітин-попередників у підтримці васкуляризації після ішемічного інсульту [11,27]. У дослідженнях останніх років показано: CD34-позитивні клітини, що циркулюють, необхідні для активації відновлення ендотелію [28]; вони є також джерелом факторів росту, ангиогенезу [10]. З підвищенням рівнів ендотеліальних клітин-попередників, які циркулюють, зменшується зростання інфаркту, спостерігають поліпшення неврологічного статусу в пацієнтів після гострого ішемічного інсульту [29]. Показано, що CD34+клітини людини виділяють численні ангиогенні фактори, включаючи VEGF, HGF (фактор росту гепатоцитів) та IGF-1 (інсуліноподібний фактор росту) [30]. В експериментальних дослідженнях підтверджено, що після оклюзії середньої мозкової артерії локальне введення CD34+клітин у зону інфаркту посилює процеси неоваскуляризації, збільшуючи у ній кортикальний кровотік. Протягом останніх років клітинна терапія ендотеліальними клітинами-попередниками запропонована як альтернативний підхід для сприяння ангиогенезу та відновлення мозку після інсульту.

Крім CD34, дослідили експресію CD105, або ендогліну, який також відіграє важливу роль у процесах васкуляризації при ішемічних ураженнях. Важливість ендогліну в реперфузії після оклюзії судин підтверджується зокрема тим, що його експресія посилюється в судинах, які виявляють активний ангиогенез та/або ремоделювання [31]. Інтенсивна експресія ендогліну, згідно з результатами, що одержали, також свідчить про активацію ангиогенезу в перифокальних ділянках інфаркту мозку на 7 добу захворювання. За останніми даними, експресія ендогліну значною мірою індукується гіпоксією в ендотеліальних моношарах мозку людини *in vitro*, і наступна реоксигенація індукує його виділення [32]. Доведено, що рівні ендогліну в сироватці крові значно вищі в пацієнтів з ішемічним інсультом [19]. Інтенсивну експресію ендогліну виявили також на перичитах, що свідчило про їхню активну роль в ангиогенезі. Важливе значення перичитів у процесах ангиогенезу детально вивчено в наукових дослідженнях останніх років [4,13,33]. Перичити не тільки мають ключове розташування на межі кров / мозок, вони також виконують численні функції: підтримують цілісність гематоенцефалічного бар'єра, відіграють важливу роль в ангиогенезі та мають значну секреторну здатність [4].

Поряд з активацією ангиогенезу в перифокальних ділянках мозкового інсульту виявили посилену проліферацію астроцитів. Незважаючи на досить суперечливу роль астроцитів у процесах відновлення після мозкового інсульту, в деяких дослідженнях показано важливу роль реактивних астроцитів у захисті вже наявних судин і полегшенні відновлення, ремоделювання судин після інсульту [34]. Автори констатують, що астроцити можуть опосередковувати відновлення після інсульту шляхом посилення ангиогенезу [14].

проте в нашому дослідженні не акцентували на ролі астроцитів у цих процесах.

Висновки

1. У перифокальних ділянках мозкового інфаркту на 1 добу визначають істотне руйнування дрібних артерій і капілярів. Це призводить до зменшення площі експресії CD34 і показників сумарної площі поперечного перетину судин на 24,17 % і 46,15 % відповідно.

2. На 3 і 7 доби в перифокальних ділянках інфаркту поступово збільшується інтенсивність експресії CD34, зростає щільність судин і показники сумарної площі поперечного перетину судин, збільшується кількість вільно розташованих CD34-позитивних клітин.

3. На 7 і 14 доби активується ангиогенез – брунькування судин і формування ендотеліальних проліфератів, зростає інтенсивність експресії CD105 в ендотелії та перичитах. Судинне ремоделювання перифокальних ділянок інфаркту супроводжується збільшенням щільності та гіпертрофією астроглії.

Перспективи подальших досліджень полягають у детальнішому вивченні процесів ангіо- та васкулогенезу, а також аналізі ролі астроглії та ендотеліальних клітин-попередників у динаміці відновлювального періоду при інфарктах мозку, застосовуючи ширші панелі маркерів.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 22.08.2023

Після доопрацювання / Revised: 11.10.2023

Схвалено до друку / Accepted: 16.10.2023

Відомості про авторів:

Тертишний С. І., д-р мед. наук, професор, зав. каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-3856-4234

Волошанська О. О., д-р філософії, асистент каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-4504-2066

Сергеева А. М., PhD-аспірант каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0009-0005-9021-0582

Information about authors:

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

Serheieva A. M., Assistant of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

References

- King, D., Wittenberg, R., Patel, A., Quayyum, Z., Berdunov, V., & Knapp, M. (2020). The future incidence, prevalence and costs of stroke in the UK. *Age and ageing*, 49(2), 277-282. <https://doi.org/10.1093/ageing/afz163>
- Akinyemi, R. O., Ovbiagele, B., Adeniji, O. A., Sarfo, F. S., Abd-Allah, F., Adoukonou, T., Ogah, O. S., Naidoo, P., Damasceno, A., Walker, R. W., Ogunniyi, A., Kalaria, R. N., & Owolabi, M. O. (2021). Stroke in Africa: profile, progress, prospects and priorities. *Nature reviews. Neurology*, 17(10), 634-656. <https://doi.org/10.1038/s41582-021-00542-4>
- Millenaar, D., Ragoschke-Schumm, A., Fehlmann, T., Raible, M., Lochner, P., Böhm, M., Fassbender, K., Keller, A., Mahfoud, F., & Ukena, C. (2022). Ischemic Stroke-A Scientometric Analysis. *Frontiers in neurology*, 13, 893121. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.893121>
- Yang, Y., & Torbey, M. T. (2020). Angiogenesis and Blood-Brain Barrier Permeability in Vascular Remodeling after Stroke. *Current neuropharmacology*, 18(12), 1250-1265. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200720173316>
- Williamson, M. R., Franzen, R. L., Fuentes, C. J. A., Dunn, A. K., Drew, M. R., & Jones, T. A. (2020). A Window of Vascular Plasticity Coupled to Behavioral Recovery after Stroke. *The Journal of neuroscience*, 40(40), 7651-7667. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1464-20.2020>
- Ma, Y., Yang, S., He, Q., Zhang, D., & Chang, J. (2021). The Role of Immune Cells in Post-Stroke Angiogenesis and Neuronal Remodeling: The Known and the Unknown. *Frontiers in immunology*, 12, 784098. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.784098>
- Sun, P., Zhang, K., Hassan, S. H., Zhang, X., Tang, X., Pu, H., Stetler, R. A., Chen, J., & Yin, K. J. (2020). Endothelium-Targeted Deletion of microRNA-15a/16-1 Promotes Poststroke Angiogenesis and Improves Long-Term Neurological Recovery. *Circulation research*, 126(8), 1040-1057. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315886>
- Sargento-Freitas, J., Pereira, A., Gomes, A., Amorim, P., Matos, T., Cardoso, C. M. P., Silva, F., Santo, G. C., Nunes, C., Galego, O., Carda, J., Branco, J., Lourenço, V., Cunha, L., & Ferreira, L. (2018). STROKE34 Study Protocol: A Randomized Controlled Phase IIa Trial of Intra-Arterial CD34+ Cells in Acute Ischemic Stroke. *Frontiers in neurology*, 9, 302. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00302>
- Bachelier, K., Bergholz, C., & Friedrich, E. B. (2020). Differentiation potential and functional properties of a CD34CD133+ subpopulation of endothelial progenitor cells. *Molecular medicine reports*, 21(1), 501-507. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10831>
- Matta, A., Nader, V., Galinier, M., & Roncalli, J. (2021). Transplantation of CD34+ cells for myocardial ischemia. *World journal of transplantation*, 11(5), 138-146. <https://doi.org/10.5500/wjtv11.i5.138>
- Kukumberg, M., Zaw, A. M., Wong, D. H. C., Toh, C. M., Chan, B. P. L., Seet, R. C. S., Wong, P. T. H., & Yim, E. K. F. (2021). Characterization and Functional Assessment of Endothelial Progenitor Cells in Ischemic Stroke Patients. *Stem cell reviews and reports*, 17(3), 952-967. <https://doi.org/10.1007/s12015-020-10064-z>
- Rodríguez-Esparragón, F., Torres-Mata, L. B., López-Fernández, J. C., Cappiello, L., González-Martín, J. M., Clavo, B., Serna-Gómez, J. A., Estupiñán-Quintana, L., Torres-Ascensión, C., & Villar, J. (2022). Clinical relevance of circulating angiogenic cells in patients with ischemic stroke. *BMC cardiovascular disorders*, 22(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s12872-021-02421-8>
- Zhou, S. Y., Guo, Z. N., Zhang, D. H., Qu, Y., & Jin, H. (2022). The Role of Pericytes in Ischemic Stroke: From Cellular Functions to Therapeutic Targets. *Frontiers in molecular neuroscience*, 15, 866700. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.866700>
- He, T., Yang, G. Y., & Zhang, Z. (2022). Crosstalk of Astrocytes and Other Cells during Ischemic Stroke. *Life*, 12(6), 910. <https://doi.org/10.3390/life12060910>
- Voloshanska, O. (2021). Patomorfologichni proiavy sudynnoho remodeliuvannia v perifokalnykh diliankakh ishemichnykh infarktiv mozku [Pathomorphological manifestations of vascular remodeling in the perifocal areas of ischemic cerebral infarction]. *Bukovynskiy medychny visnyk*, 25(2), 22-28. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.24061/2413-0737.XXV.2.98.2021.4>
- Weidner, N. (1999). Tumour vascularity and proliferation: clear evidence of a close relationship. *The Journal of pathology*, 189(3), 297-299. [https://doi.org/10.1002\(SICI\)1096-9896\(199911\)189:3<297::AID-PATH434>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002(SICI)1096-9896(199911)189:3<297::AID-PATH434>3.0.CO;2-O)
- Kanazawa, M., Takahashi, T., Ishikawa, M., Onodera, O., Shimohata, T., & Del Zoppo, G. J. (2019). Angiogenesis in the ischemic core: A potential treatment target?. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 39(5), 753-769. <https://doi.org/10.1177/0271678X19834158>
- Xue, L. X., Shu, L. Y., Wang, H. M., Lu, K. L., Huang, L. G., Xiang, J. Y., Geng, Z., Zhao, Y. W., & Chen, H. (2023). miR-181b promotes angiogenesis and neurological function recovery after ischemic stroke. *Neural regeneration research*, 18(9), 1983-1989. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.367957>
- Alrafiah, A., Alofi, E., Almohaya, Y., Hamami, A., Qadah, T., Almaghrabi, S., Hakami, N., Alrawaili, M. S., & Tayeb, H. O. (2021). Angiogenesis Biomarkers in Ischemic Stroke Patients. *Journal of inflammation research*, 14, 4893-4900. <https://doi.org/10.2147/JIR.S331868>
- Włodarczyk, L., Szelenberger, R., Cichon, N., Saluk-Bijak, J., Bijak, M., & Miller, E. (2021). Biomarkers of Angiogenesis and Neuroplasticity as

- Promising Clinical Tools for Stroke Recovery Evaluation. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 3949. <https://doi.org/10.3390/ijms22083949>
21. Hatakeyama, M., Ninomiya, I., & Kanazawa, M. (2020). Angiogenesis and neuronal remodeling after ischemic stroke. *Neural regeneration research*, 15(1), 16-19. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.264442>
 22. Voloshanska, O. O., & Tertyshnyi, S. I. (2020). Patomorfologichni зміny sudynnoho rusla ta stan kolateralnoho krovotoku pry mozkovykh infarktakh [Pathomorphological changes of the vascular bed and the state of collateral blood flow in cerebral infarction]. *Pathologia*, 17(2), 234-240. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2020.2.212808>
 23. Gregorius, J., Wang, C., Stambouli, O., Hussner, T., Qi, Y., Tertel, T., Börger, V., Mohamud Yusuf, A., Hagemann, N., Yin, D., Diltrich, R., Mouloud, Y., Mairinger, F. D., Magraoui, F. E., Popa-Wagner, A., Kleinschnitz, C., Doepfner, T. R., Gunzer, M., Meyer, H. E., Giebel, B., Hermann, D. M. (2021). Small extracellular vesicles obtained from hypoxic mesenchymal stromal cells have unique characteristics that promote cerebral angiogenesis, brain remodeling and neurological recovery after focal cerebral ischemia in mice. *Basic research in cardiology*, 116(1), 40. <https://doi.org/10.1007/s00395-021-00881-9>
 24. Kishida, N., Maki, T., Takagi, Y., Yasuda, K., Kinoshita, H., Ayaki, T., Noro, T., Kinoshita, Y., Ono, Y., Kataoka, H., Yoshida, K., Lo, E. H., Arai, K., Miyamoto, S., & Takahashi, R. (2019). Role of Perivascular Oligodendrocyte Precursor Cells in Angiogenesis After Brain Ischemia. *Journal of the American Heart Association*, 8(9), e011824. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.011824>
 25. Mangiardi, M., Bonura, A., Iaccarino, G., Alessiani, M., Bravi, M. C., Crupi, D., Pezzella, F. R., Fabiano, S., Pampana, E., Stilo, F., Alfano, G., & Anticoli, S. (2023). The Pathophysiology of Collateral Circulation in Acute Ischemic Stroke. *Diagnostics*, 13(14), 2425. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13142425>
 26. Krupinski, J., Kaluza, J., Kumar, P., Kumar, S., & Wang, J. M. (1994). Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke*, 25(9), 1794-1798. <https://doi.org/10.1161/01.str.25.9.1794>
 27. Li, J., Ma, Y., Miao, X. H., Guo, J. D., & Li, D. W. (2021). Neovascularization and tissue regeneration by endothelial progenitor cells in ischemic stroke. *Neurological sciences*, 42(9), 3585-3593. <https://doi.org/10.1007/s10072-021-05428-3>
 28. Shimizu, Y., Kawashiri, S. Y., Kiyoura, K., Koyamatsu, J., Fukui, S., Tamai, M., Nobusue, K., Yamanashi, H., Nagata, Y., & Maeda, T. (2020). Circulating CD34+ cells and active arterial wall thickening among elderly men: A prospective study. *Scientific reports*, 10(1), 4656. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61475-4>
 29. Rudnicka-Drożak, E., Drożak, P., Mizerski, G., & Drożak, M. (2022). Endothelial Progenitor Cells in Neurovascular Disorders-A Comprehensive Overview of the Current State of Knowledge. *Biomedicines*, 10(10), 2616. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102616>
 30. Hassanpour, M., Salybekov, A. A., Kobayashi, S., & Asahara, T. (2023). CD34 positive cells as endothelial progenitor cells in biology and medicine. *Frontiers in cell and developmental biology*, 11, 1128134. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1128134>
 31. Núñez-Gómez, E., Pericacho, M., Ollauri-Ibáñez, C., Bernabéu, C., & López-Novoa, J. M. (2017). The role of endoglin in post-ischemic revascularization. *Angiogenesis*, 20(1), 1-24. <https://doi.org/10.1007/s10456-016-9535-4>
 32. Haarmann, A., Zimmermann, L., Bieber, M., Silwedel, C., Stoll, G., & Schuhmann, M. K. (2022). Regulation and Release of Vasoactive Endoglin by Brain Endothelium in Response to Hypoxia/Reoxygenation in Stroke. *International journal of molecular sciences*, 23(13), 7085. <https://doi.org/10.3390/ijms23137085>
 33. Cao, L., Zhou, Y., Chen, M., Li, L., & Zhang, W. (2021). Pericytes for Therapeutic Approaches to Ischemic Stroke. *Frontiers in neuroscience*, 15, 629297. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.629297>
 34. Williamson, M. R., Fuertes, C. J. A., Dunn, A. K., Drew, M. R., & Jones, T. A. (2021). Reactive astrocytes facilitate vascular repair and remodeling after stroke. *Cell reports*, 35(4), 109048. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109048>

Analysis of the diagnostic informativity of non-contrast computed tomography markers of intracerebral hemorrhage expansion in assessment of the individual risk of early neurological deterioration in patients with hemorrhagic hemispheric stroke

A. A. Kuznietsov^{ID}*

Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine

Key words:
cerebral
hemorrhage,
x-ray tomography,
prognosis.

Pathologia, 2023.
20(3), 250-256

*E-mail:
titus3.05@gmail.com

The aim of the study was to evaluate the diagnostic informativity of non-contrast computed tomography (NCCT) markers of intracerebral hemorrhage (ICH) expansion in assessment of the individual risk of early neurological deterioration (END) in patients with hemorrhagic hemispheric stroke (HHS).

Materials and methods. A prospective, cohort study was conducted involving 333 patients in the acute period of hypertensive spontaneous supratentorial ICH on the background of conservative therapy. The level of neurological deficit was assessed using the Full Outline of Unresponsiveness (FOUR) coma scale and the National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS). The computed tomography of the brain was used to verify the ICH volume, the midline shift (MS), the secondary intraventricular hemorrhage volume (IVHV) and NCCT markers of intracerebral hemorrhage expansion. As a combined clinical endpoint, END was considered (decrease of the FOUR scale score ≥ 2 or/and increase of the NIHSS score ≥ 4 or/and lethal outcome within 48 hours of hospitalization).

Results. Early neurological deterioration was registered in 112 patients. On the basis of a comparative analysis, it was established that the specific weight of END was significantly higher in subcohorts of patients with individual NCCT markers of intracerebral hemorrhage expansion, than it was in subcohorts of patients without corresponding NCCT signs ($p < 0.0001$). It was established that the following NCCT markers of ICH expansion are the most sensitive predictors of END: hypodensity, swirl sign and irregular shape (sensitivity $>90.0\%$). The most specific NCCT markers were island sign, black hole sign, blend sign, satellite sign and heterogeneous density (specificity $>87.0\%$). In accordance with the multiple logistic regression analysis, hypodensity (OR (95% CI) = 13.56 (4.54–40.49), $p < 0.0001$) and island sign (OR (95% CI) = 5.94 (2.05–17.16), $p = 0.0010$) are independently associated with the risk of END. A highly sensitive multi-prediction logistic regression model was elaborated in order to predict END in patients with HHS which takes into account the most informative NCCT markers of ICH expansion (hypodensity, island sign) and quantitative neuroimaging indicators (MS, IVHV) (AUC \pm SE (95% CI) = 0.92 ± 0.02 (0.89–0.95), $p < 0.0001$).

Conclusions. Non-contrast computed tomography markers of ICH expansion are associated with increased risk of END in patients with HHS. Hypodensity and island sign are independent predictors of END. The integration of NCCT markers of ICH expansion with quantitative neuroimaging indicators (MS, IVHV) in the structure of the multi-prediction logistic regression model allows to assess the individual risk of END with an accuracy of $>85.0\%$.

Ключові слова:
внутрішньо-
мозковий
крововилив,
рентгенівська
томографія,
прогноз.

Патологія, 2023.
Т. 20, № 3(59).
С. 250-256

Аналіз діагностичної інформативності неконтрастних комп'ютерно-томографічних маркерів прогресування внутрішньомозкового крововиливу у визначенні індивідуального ризику раннього клініко-неврологічного погіршення у хворих на геморагічний півкульовий інсульт

A. A. Кузнєцов

Мета роботи – оцінити інформативність неконтрастних комп'ютерно-томографічних (НККТ) маркерів прогресування внутрішньомозкового крововиливу (ВМК) у визначенні індивідуального ризику раннього клініко-неврологічного погіршення (РКНП) у хворих на геморагічний півкульовий інсульт (ГПІ).

Матеріали та методи. Здійснили проспективне, когортне дослідження із залученням 333 пацієнтів у гострому періоді гіпертензивного спонтанного супратенторіального ВМК на тлі консервативної терапії. Рівень неврологічного дефіциту оцінювали за шкалою коми Full Outline of Unresponsiveness (FOUR) та National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS). За даними комп'ютерної томографії головного мозку визначили об'єм ВМК, латеральну дислокацію (ЛД) серединних структур мозку, об'єм вторинного внутрішньошлуночкового крововиливу (ОВВШК) та НККТ-маркери прогресування ВМК. Як комбіновану кінцеву клінічну точку визначили РКНП (зменшення сумарного бала за шкалою коми FOUR ≥ 2 та/або збільшення сумарного бала за NIHSS ≥ 4 , та/або летальний наслідок протягом 48 годин після госпіталізації).

Результати. Раннє клініко-неврологічне погіршення зареєстровано у 112 пацієнтів. У результаті порівняльного аналізу встановили: в субкогортах пацієнтів з окремими НККТ-маркерами прогресування ВМК питома вага РКНП достовірно вища, ніж у субкогортах пацієнтів без таких ($p < 0,0001$). Найчутливіші предиктори РКНП – гіподенсивність, ознака «завихрення» та неправильна форма осередку ураження (чутливість $>90,0\%$), а найбільш специфічні – ознаки «острівця», «чорної діри», «змішування», «супутника» та гетерогенна щільність осередку ураження (специфічність $>87,0\%$). За даними множинного логістичного регресійного аналізу, з ризиком РКНП незалежно асоційовані гіподенсивність (ВШ (95% ДІ) = 13,56 (4,54–40,49), $p < 0,0001$) та ознака «острівця» (ВШ (95% ДІ) = 5,94 (2,05–17,16), $p = 0,0010$). Побудо-

вано високочутливу мультипредикторну логістичну регресійну модель для прогнозування РКНП у хворих на ГПІ, що враховує найінформативніші НККТ-маркери ВМК (гіподенсивність, ознака «острівця») та кількісні нейровізуалізаційні показники (ЛД, ОБВШК) ($AUC \pm SE$ (95 % CI) = $0,92 \pm 0,02$ (0,89–0,95), $p < 0,0001$).

Висновки. Неконтрастні комп'ютерно-томографічні маркери прогресування ВМК асоційовані з підвищеним ризиком РКНП у хворих на ГПІ. Незалежні предиктори РКНП – гіподенсивність та ознака «острівця». Інтеграція НККТ-маркерів прогресування ВМК із кількісними нейровізуалізаційними показниками (ЛД, ВВШК) у структурі мультипредикторної логістичної регресійної моделі дає змогу визначати індивідуальний ризик РКНП із точністю >85,0 %.

Cerebral hemorrhagic stroke and, in particular, its most widespread form – spontaneous supratentorial intracerebral hemorrhage (SSICH) is the most destructive type of acute cerebrovascular disorders in the medical and social aspect [1,2,3]. The modern paradigm of the specialized care provided to the specified contingent of patients includes, first of all, the use of an individual approach to the determination of the optimal treatment strategy [4]. Moreover, the most important basis for the appropriate decisions is the earliest possible verification of the short-term prognosis. This makes it possible to timely identify patients with a high risk of unfavorable course and outcome of the acute period of the disease on the background of conservative therapy, as well as to identify those whose treatment requires more active medical and tactical actions and, in particular, neurosurgical intervention (as a part of "life-saving strategy") [5].

The combined endpoint, which integrates the adverse course types of the acute period of SSICH, is early neurological deterioration (END) [6]. Here are the possible components of END: a decrease of the Full Outline of UnResponsiveness (FOUR) scale score ≥ 2 and/or an increase of the National Institute of Stroke Scale (NIHSS) score ≥ 4 and/or death within 48 hours of the onset of the disease [7]. Depending on the progression speed, the following types of END are distinguished: fulminant (up to 60 minutes from the onset of the disease); acute (1–12 hours); subacute (24–48 hours) [8].

At the same time, it was established that the main link in the pathogenesis of END is the intracerebral hemorrhage expansion. An increase of the volume of intracerebral hemorrhage initiates a progressive combined (midline shift / transtentorial shift) of the brainstem structures in the rostro-caudal direction with the further development of secondary hemorrhages in the pons of the brain and the subsequent wedging of the bulbar structures into the cervical-dural funnel and the onset of death [9].

All of the above justifies the feasibility of further research aimed at the elaboration of informative criteria for the prognosis of END. It was proven that the density heterogeneity and shape irregularity on non-contrast computed tomography of the brain are associated with a high risk of intracerebral hemorrhage expansion [10]. The avalanche model of hematoma expansion is considered to be the most accepted: peripheral vessels are the second to be sheared after the initial vessels rupture, which results in the constant source of bleeding. Fresh blood mixes with a clot, which causes higher hemorrhage heterogeneity. The prevalence of heterogeneity when speaking about hematoma expansion, may be potentially explained by the fact that hyperattenuating regions are making more stable bleed zones and lower attenuating areas. Hemorrhages which grow usually have irregular shape and can change, expanding in various directions after the time passes.

Irregular hemorrhages may occur at an intermediate stage of maturity, when the bleeding continues persisting bleeding or when the intrahemorrhage pressure is high, which is a favorable condition for the hematoma to bulge into brain structures [11,12,13].

Relevant non-contrast computed tomography (NCCT) markers of intracerebral hemorrhage expansion were identified [14,15]. In spite of established association between NCCT signs and intracerebral hemorrhage expansion, informativeness of these markers as potential end-point clinical predictors needs clarification [11]. Thus in some investigations the prognostic value of the intracerebral hemorrhage expansion NCCT markers as lethal outcome and poor functional outcome predictors was validated [16,17,18].

However, there are no studies devoted to the analysis of the diagnostic informativity of NCCT markers of intracerebral hemorrhage expansion in assessment of the individual risk of END.

Aim

The aim of the study is to evaluate the diagnostic informativity of non-contrast computed tomography markers of intracerebral hemorrhage expansion in assessment of the individual risk of early neurological deterioration in patients with hemorrhagic hemispheric stroke.

Materials and methods

The study included 333 patients (194 men and 139 women, age 65 [57–75] years) with first-onset hypertensive SSICH. The patients were hospitalized within the first 24 hours after the onset of the disease to the department of acute cerebrovascular disorders of the Municipal non-profit enterprise "City Hospital No. 6" of the Zaporizhzhia City Council. Signed informed consent for the patient's participation in the study was mandatory.

The diagnosis was established according to the data of a neuroimaging study, which was carried out using Siemens Somatom Spirit (Germany) or Toshiba Asteion (Japan), taking into account the localization, size of the lesion, midline shift, the presence of secondary intraventricular hemorrhage.

The intracerebral hemorrhage volume (ICHV) was calculated using the ellipsoid formula:

$$ICHV (ml) = (a \times b \times c) / 2,$$

where a, b, and c are the linear dimensions of the lesion (cm). Midline shift (MS) was detected as average from septum pellucidum and pineal gland displacement (mm). The intraventricular hemorrhage volume (IVHV) was assessed with the help of the exponential formula, based on the value of the total score on the Intraventricular Hemorrhage scale [19].

The density of the lesion was assessed according to the 5-point Barras density scale, where gradations I and II of the specified scale correspond to the homogeneous density of intracerebral hemorrhage; gradations III, IV and V correspond to heterogeneous density. The shape of the lesion was evaluated according to the 5-point categorical Barras shape scale, where gradations I and II of the specified scale correspond to the correct shape of the lesion; gradations III, IV and V correspond to an irregular shape [20].

Non-contrast computed tomography (NCCT) markers of intracerebral hematoma expansion, which are derivatives of its density (heterogeneous density, swirl sign, hypodensity, black hole sign, blend sign, fluid level) and shape (irregular shape, island sign, satellite sign) were also recorded. The verification of the above-mentioned markers was carried out in accordance with the appropriate neuroimaging standards for their detection, interpretation and registration [11].

The level of neurological deficit was assessed during admission to the hospital and during the course of the acute period of the disease using the NIHSS and the FOUR scale. Early neurological deterioration was a cumulative endpoint, which was considered to be the occurrence of one or more of the following events within 48 hours from admission on the background of conservative therapy: a decrease of the FOUR scale score ≥ 2 ; an increase of the NIHSS score ≥ 4 ; lethal outcome.

Patients who met at least one of the following criteria were excluded from the study: a cerebral stroke in anamnesis; intracerebral hemorrhage caused by cerebral infarction, brain tumor, taking anticoagulants; presence of confirmed aneurysm or arterio-venous malformation of cerebral vessels; somatic pathology in the stage of decompensation; malignant tumors; extracerebral cause of death according to autopsy data.

All patients were examined by a neurosurgeon. In most of the cases conservative therapy was chosen as the most optimal tactic. Patients received therapy in accordance with the Unified protocol for providing medical care to patients with cerebral hemorrhagic stroke, approved by order of the Ministry of Health of Ukraine No. 275 dated 04/17/2014 [21]. 19 patients were transferred to a neurosurgical hospital for surgical treatment. The data regarding the patients was also excluded from the analysis in the event that the duration of observation on the background of conservative therapy was less than 48 hours (as a result of transfer to the neurosurgical department), and in the event that during the time of stay in the neurological hospital, none of the variants of END were recorded.

Statistical data processing was performed using Statistica 13.0 software (StatSoft Inc., USA, serial number JPZ804I382130ARCN10J) and MedCalc (version 18.2.1). The Shapiro–Wilk test was used to assess the normality of the distribution. As most of the studied indicators did not have a normal distribution, descriptive statistics are presented in the form of median and interquartile range. Mann–Whitney U test was used to identify intergroup differences in quantitative indicators. Pearson's Chi-squared test was used to assess the relations between qualitative (discrete) indicators. Logistic regression analysis and ROC-analysis were used for prognostic tools elabora-

tion. Odds ratio (OR), relative risk (RR), sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and forecast accuracy were assessed. A significance level of $p < 0.05$ was considered critical for rejecting null hypotheses.

Results

The clinical and paraclinical characteristics of the studied patients during their admission to hospital were presented as follows: FOUR scale score – 15.0 [12.0–16.0], NIHSS score – 15.0 [9.0–21.0], ICHV – 14.3 [5.9–44.7] ml, the presence of midline shift – in 214 (64.3 %) patients, the severity of midline shift – 2.5 [0.0–5.5] mm, the presence of SIVH – in 194 (58.3 %) patients, IVHV – 6.0 [0.0–30.0] ml.

The density of the lesion was heterogeneous in 122 (36.6 %) patients, the shape of the lesion was irregular in 200 (60.1 %) patients, the swirl sign was visualized in 156 (46.8 %) patients, hypodensity in 188 (56.5 %) people, the black hole sign occurred in 67 (20.1 %) patients, the blend sign – in 30 (9.0 %) patients, the island sign – in 50 (15.0 %) patients, the satellite sign – in 81 (24.3 %) patients. Fluid level was not detected in any of the patients.

Indicators of the specific weight of NCCT markers of the intracerebral hemorrhage expansion in groups of patients with different ICHV are shown in Table 1. As it can be seen, NCCT markers of intracerebral hemorrhage expansion are associated with a bigger ICHV.

Neurological deterioration within 48 hours from admission at hospital was registered in 112 (33.6 %) patients (66 men and 46 women, age 63.0 [55.0–76.0] years), while the indicated endpoint during the first 24 hours was verified in 99 patients, in the period from 24 to 48 hours it was registered in 19 cases (in 6 patients it was preceded by neurological deterioration in the form of consciousness level decreasing during the first 24 hours of hospitalization). Early neurological deterioration was not recorded in 221 patients (128 men and 93 women, age 65 [58–74] years).

Indicators of the specific weight of END in subcohorts of patients with the presence / absence of appropriate NCCT markers of intracerebral hemorrhage expansion were as follows: the presence of heterogeneous density of the lesion – 77.9 %, homogeneous density – 8.1 % (Pearson's Chi-squared = 168.3, $p < 0.0001$); with the swirl sign – 64.7 %, without the swirl sign – 6.2 % (Pearson's Chi-squared = 126.9, $p < 0.0001$); with hypodensity – 57.4 %, without hypodensity – 2.8 % (Pearson's Chi-squared = 109.4, $p < 0.0001$); with the black hole sign – 74.6 %, without black hole sign – 23.3 % (Pearson's Chi-squared = 63.0, $p < 0.0001$); with the blend sign – 53.3 %, without the blend sign – 31.7 % (Pearson's Chi-squared = 5.7, $p = 0.0168$); with an irregular shape – 52.5 %, without irregular shape – 5.3 % (Pearson's Chi-squared = 79.6, $p < 0.0001$); with the island sign – 90.0 %, without the island sign – 23.7 % (Pearson's Chi-squared = 83.5, $p < 0.0001$); with the satellite sign – 70.4 %, without the satellite sign – 21.8 % (Pearson's Chi-squared = 64.5, $p < 0.0001$). Therefore, it can be seen from the above data that all registered NCCT markers of intracerebral hematoma expansion are reliably associated with END.

Table 1. Indicators of the specific weight of NCCT markers of the intracerebral hemorrhage expansion in groups of patients with different ICHV

NCCT markers of intracerebral hemorrhage expansion	ICHV		Pearson's Chi-squared	p
	<30 mL (n = 217)	≥30 mL (n = 116)		
Heterogeneous density	18.9 %	69.8 %	84.2	<0.0001
Swirl sign	21.7 %	94.0 %	158.2	<0.0001
Hypodensity	35.5 %	95.7 %	111.1	<0.0001
Black hole sign	3.7 %	50.9 %	104.4	<0.0001
Blend sign	3.2 %	19.8 %	25.3	<0.0001
Irregular shape	38.7 %	100.0 %	118.0	<0.0001
Island sign	1.8 %	39.7 %	84.4	<0.0001
Satellite sign	7.4 %	56.0 %	96.9	<0.0001

Table 2. Indicators of sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy of NCCT markers of intracerebral hematoma expansion as criteria for predicting END in patients with hemorrhagic hemispheric stroke

Criteria for predicting END in patients with hemorrhagic hemispheric stroke	Se	Sp	PPV	NPV	Accuracy
Heterogeneous density	84.8 %	87.8 %	77.9 %	91.9 %	86.8 %
Swirl sign	90.2 %	75.1 %	64.7 %	93.8 %	80.2 %
Hypodensity	96.4 %	63.8 %	57.4 %	97.2 %	74.8 %
Black hole sign	44.6 %	92.3 %	74.6 %	76.7 %	76.3 %
Blend sign	14.3 %	93.7 %	53.3 %	68.3 %	67.0 %
Irregular shape	93.8 %	57.0 %	52.5 %	94.7 %	69.4 %
Island sign	40.2 %	97.7 %	90.0 %	76.3 %	78.4 %
Satellite sign	50.9 %	89.1 %	70.4 %	78.2 %	76.3 %

Se: sensitivity; Sp: specificity; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.

Thus, the heterogeneous density of the lesion is associated with an increase of the END risk by 9.7 times (RR (95 % CI) = 9.66 (6.07–15.40), $p < 0.0001$), the swirl sign – by 10.4 times (RR (95 % CI) = 10.42 (5.81–18.68), $p < 0.0001$), hypodensity – by 20.8 times (RR (95 % CI) = 20.82 (7.86–55.16), $p < 0.0001$), the black hole sign – by 3.2 times (RR (95 % CI) = 3.20 (2.47–4.15), $p < 0.0001$), the blend sign – by 1.7 times (RR (95 % CI) = 1.68 (1.16–2.45), $p = 0.0063$), the irregular shape of the lesion – by 10.0 times (RR (95 % CI) = 9.98 (4.79–20.76), $p < 0.0001$), the island sign – by 3.8 times (RR (95 % CI) = 3.80 (3.02–4.78), $p < 0.0001$), the satellite sign – by 3.2 times (RR (95 % CI) = 3.22 (2.45–4.24), $p < 0.0001$).

The reliable changes of all mentioned clinical and neurological parameters during hospital admission between patients with and without END were revealed: NIHSS score (22 [15–30] versus 13 [8–17], $p < 0.0001$), FOUR scale score (12 [5–15] versus 16 [14–16], $p < 0.0001$), ICHV (55 [21–85] mL versus 11 [5–24] mL, $p < 0.0001$), midline shift (7 [3–11] mm versus 2 [0–4] mm, $p < 0.0001$), IVHV (30 [14–55] mL versus 0 [0–11] mL, $p < 0.0001$), heterogeneous density of the lesion (84.8 % versus 12.2 %, $p < 0.0001$), swirl sign (90.2 % versus 24.9 %, $p < 0.0001$), hypodensity (96.4 % versus 36.2 %, $p < 0.0001$), black hole sign (44.6 % versus 7.7 %, $p < 0.0001$), blend sign (14.3 % versus 6.3 %, $p = 0.0168$), irregular shape of the lesion (93.7 % versus 43.0 %, $p < 0.0001$), island sign (40.2 % versus 2.3 %, $p < 0.0001$), satellite sign (50.9 % versus 10.9 %, $p < 0.0001$).

In accordance with the logistic regression analysis, the following dependent predictors of END were verified: NIHSS score (OR (95 % CI) = 1.16 (1.12–1.21), $p < 0.0001$), FOUR scale score (OR (95 % CI) = 0.74 (0.69–0.80), $p < 0.0001$), ICHV (OR (95 % CI) = 1.04

(1.03–1.05), $p < 0.0001$), midline shift (OR (95 % CI) = 1.40 (1.29–1.52), $p < 0.0001$), IVHV (OR (95 % CI) = 1.08 (1.06–1.09), $p < 0.0001$), heterogeneous density of the lesion (OR (95 % CI) = 40.15 (20.87–77.27), $p < 0.0001$), swirl sign (OR (95 % CI) = 27.70 (13.90–55.42), $p < 0.0001$), hypodensity (OR (95 % CI) = 47.59 (16.90–133.96), $p < 0.0001$), black hole sign (OR (95 % CI) = 9.68 (5.21–17.98), $p < 0.0001$), blend sign (OR (95 % CI) = 2.46 (1.16–5.25), $p = 0.0195$), irregular shape of the lesion (OR (95 % CI) = 19.89 (8.85–44.73), $p < 0.0001$), island sign (OR (95 % CI) = 29.01 (11.07–76.06), $p < 0.0001$), satellite sign (OR (95 % CI) = 8.51 (4.85–14.94), $p < 0.0001$).

Table 2 shows indicators of sensitivity, specificity, PPV, NPV and the accuracy of NCCT markers of intracerebral hematoma expansion as criteria for predicting END.

As shown in Table 2, the most sensitive predictors of END are hypodensity (Se = 96.4 %, Sp = 63.8 %, predictive accuracy = 74.8 %), swirl sign (Se = 90.2 %, Sp = 75.1 %, predictive accuracy = 80.2 %) and irregular shape (Se = 93.8 %, Sp = 57.0 %, predictive accuracy = 69.4 %), whereas the most specific are island sign (Se = 40.2 %, Sp = 97.7 %, predictive accuracy = 78.4 %), black hole sign (Se = 44.6 %, Sp = 92.3 %, predictive accuracy = 76.3 %), satellite sign (Se = 50.9 %, Sp = 89.1 %, predictive accuracy = 76.3 %), blend sign (Se = 14.3 %, Sp = 93.7 %, predictive accuracy = 67.0 %) and heterogeneous density (Se = 84.8 %, Sp = 87.6 %, predictive accuracy = 86.8 %).

In accordance with the results of multiple logistic regression analysis it was detected, that END risk was independently associated with the following NCCT markers of intracerebral hemorrhage expansion: hypodensity (OR (95 % CI) = 13.56 (4.54–40.49), $p < 0.0001$) and island sign (OR (95 % CI) = 5.94 (2.05–17.16), $p = 0.0010$).

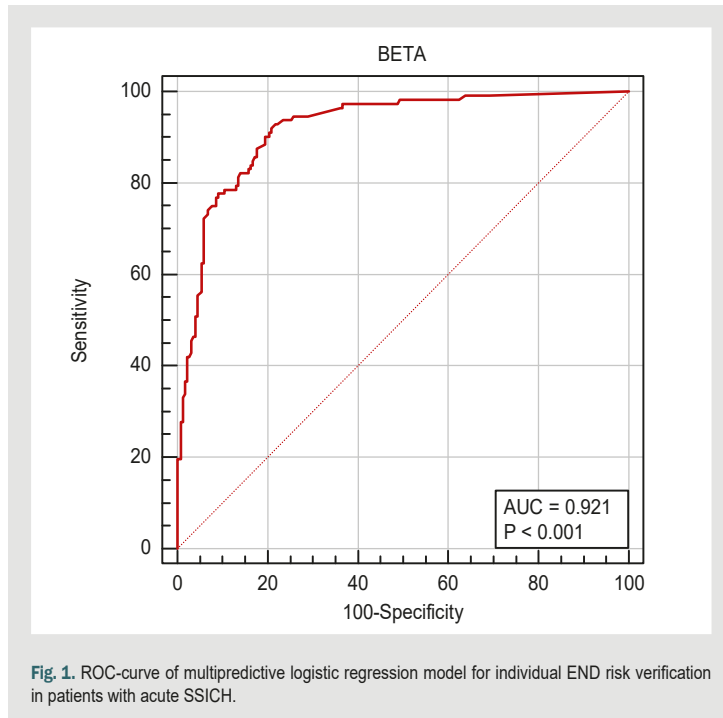


Fig. 1. ROC-curve of multipredictive logistic regression model for individual END risk verification in patients with acute SSICH.

Midline shift severity (OR (95 % CI) = 1.11 (1.01–1.21), $p = 0.0227$) and IVHV (OR (95 % CI) = 1.04 (1.08–1.06), $p = 0.0002$) were also an independent END predictors. The binary logistic regression equation was developed based upon all mentioned parameters that were integrated in this multipredictive model. This equation looks like the following:

$$B = -3.927 + 2.607 \times P1 + 1.781 \times P2 + 0.103 \times P3 + 0.036 \times P4,$$

where -3.927 – intercept (β_0);
 P1 – hypodensity (1 – present, 0 – absent);
 P2 – island sign (1 – present, 0 – absent);
 P3 – midline shift severity, mm;
 P4 – intracerebral hemorrhage volume, mL.

The cut-off value β (> -1.011) was detected by ROC-analysis as an integrated predictor END in patients with SSICH (Se – 92.0 %, Sp – 79.2 %, PPV – 69.1 %, NPV – 95.1 %). The evaluation of informativeness and quality of predicting model was made by using: accuracy – 86.5 %; AUC \pm SE (95 % CI) = 0.92 ± 0.02 (0.89–0.95), $p < 0.0001$ (Fig. 1).

Indicators of endpoints specific weight were the following: in cohort with $\beta > -1.011$ ($n = 149$) – 69.1 %, with $\beta \leq -1.011$ ($n = 184$) – 4.9 %. Thus, $\beta > -1.011$ was associated with END risk increasing by 14.1 times (RR (95 % CI) = 14.13 (7.41–26.97), $p < 0.0001$).

Discussion

According to the neuroimaging study, a wide range of different NCCT markers of intracerebral hemorrhage expansion (hypodensity, swirl sign, heterogeneous density, black hole sign, blend sign, the irregular shape of the lesion, island sign and satellite sign) were registered in

the general cohort of patients. The highest specific weight was registered in the following markers: irregular shape (60.1 %), hypodensity (56.5 %), swirl sign (46.8 %) and heterogeneous density (36.6 %). Satellite sign (24.3 %), black hole sign (20.1 %), island sign (15.0 %) and blend sign (9.0 %) were verified in a smaller number of patients. Fluid level was not detected in any of the patients. In accordance with the available data, fluid level is a specific marker of oral anticoagulant-associated intracerebral hemorrhage [22]. Patients with intracerebral hemorrhage which resulted from taking oral anticoagulants were not included in the study.

On the basis of a comparative analysis, it was established that the specific weight of END was significantly higher in subcohorts of patients with individual NCCT markers of intracerebral hemorrhage expansion (hypodensity, swirl sign, heterogeneous density, black hole sign, blend sign, irregular shape, island sign, satellite sign), than it was in subcohorts of patients without corresponding NCCT signs. So, it has been proven that hypodensity, swirl sign, heterogeneous density, black hole sign, blend sign, irregular shape, island sign and satellite sign are associated with an increased risk of END in patients with hemorrhagic stroke. The presence of the above-mentioned NCCT signs in the spectrum of dependent predictors of END is also confirmed by logistic regression analysis. Taking into account the high informativity of hypodensity, swirl sign, heterogeneous density, black hole sign, blend sign, irregular shape, island sign and satellite sign as NCCT markers of intracerebral hemorrhage expansion [11, 14, 15, 16, 17, 18], the obtained results are consistent with modern ideas about the leading role of hematoma progression in the pathogenesis of END in the specified contingent of patients.

Indicators of sensitivity, specificity and accuracy of NCCT markers of intracerebral hematoma expansion were assessed as criteria for predicting END in patients with hemorrhagic hemispheric stroke. It was established that the following NCCT markers of intracerebral hematoma expansion are the most sensitive predictors of END: hypodensity, swirl sign and irregular shape (Se > 90.0 %, predictive accuracy 69.4–80.2 %). Therefore, the sensitivity indicators of the above-mentioned NCCT signs according to the results of our study were slightly higher than the ones described in other studies, in which their sensitivity to the assessment of the risk of intracerebral hemorrhage progression was evaluated (Se 64.0–83.0 %) [16, 17].

The most specific NCCT markers were island sign, black hole sign, blend sign, satellite sign and heterogeneous density (Sp > 87.0 %, predictive accuracy 67.4–86.8 %). The obtained data are consistent with the results of other studies in which showed a high specificity of the island sign, black hole sign and blend sign in the verification of the individual risk of intracerebral hematoma expansion (Sp 90.0–98.0 %) [15, 17, 23]. At the same time, the specificity indicators of satellite sign and heterogeneous density according to the results of our study were slightly higher than in other studies, where the informativity of the above-mentioned NCCT signs as for the assessment of the risk of progression of intracerebral hemorrhage was evaluated (Sp 69.0–78.0 %) [10, 16].

On the basis of the multiple logistic regression analysis, a multi-predictor model was built for predicting the END in patients with hemorrhagic hemispheric stroke. Independent predictors were as follows: hypodensity, island sign, MS and IVHV. The presence of certain NCCT signs in the spectrum of independent predictors also confirms the leading role of intracerebral hemorrhage expansion in the pathogenesis of END. This model integrates the informativity of individual predictors included in its composition. On the basis of the ROC analysis, the optimal cut-off value β was determined, which acts as a highly sensitive integral neuroimaging predictor of END and allows to assess the short-term prognosis on the background of conservative therapy with an accuracy of 86.5 % (AUC \pm SE (95 % CI) = 0.92 \pm 0.02 (0.89–0.95), $p < 0.0001$).

Thus, in accordance with the results of the NCCT study, markers of intracerebral hematoma expansion are informative predictors of END in patients with hemorrhagic hemispheric stroke. A non-invasive and economically available method is used in order to assess the markers, which is the gold standard of neuroimaging in the specified contingent of patients. That is the reason why a number of researchers consider NCCT as a real and widely available alternative to digital subtraction angiography for the stratification of the risk of intracerebral hematoma expansion at the initial diagnostic stage [11,24]. The above justifies the expediency of the assessment of NCCT markers of intracerebral hematoma expansion for the timely identification of patients with an increased risk of END as a component of the basis for further selection of optimal treatment tactics.

Conclusions

1. The following NCCT markers of intracerebral hemorrhage expansion are associated with an increased risk of END in patients with hemorrhagic stroke: hypodensity (RR (95 % CI) = 20.82 (7.86–55.16), $p < 0.0001$), swirl sign (RR (95 % CI) = 10.42 (5.81–18.68), $p < 0.0001$), heterogeneous density (RR (95 % CI) = 9.66 (6.07–15.40), $p < 0.0001$), black hole sign (RR (95 % CI) = 3.20 (2.47–4.15), $p < 0.0001$), blend sign (RR (95 % CI) = 1.68 (1.16–2.45), $p = 0.0063$), the irregular shape of the lesion (RR (95 % CI) = 9.98 (4.79–20.76), $p < 0.0001$), island sign (RR (95 % CI) = 3.80 (3.02–4.78), $p < 0.0001$) and satellite sign (RR (95 % CI) = 3.22 (2.45–4.24), $p < 0.0001$).

2. Hypodensity is the most informative independent predictor of END among NCCT markers of intracerebral hemorrhage expansion that take into account the density of the lesion in patients with hemorrhagic hemispheric stroke (Se = 96.4 %, Sp = 63.8 %, accuracy = 74.8 %; OR (95% CI) = 13.56 (4.54–40.49), $p < 0.0001$). The island sign is the most informative independent predictor of END among NCCT of intracerebral hemorrhage expansion that take into account the shape of the lesion (Se = 40.2 %, Sp = 97.7 %, accuracy = 78.4 %; OR (95 % CI) = 5.94 (2.05–17.16), $p = 0.0010$).

3. A highly sensitive multi-predictor logistic regression model was developed, which integrates the prognostic value of NCCT markers of intracerebral hemorrhage

expansion (hypodensity, island sign) with the informativity of quantitative neuroimaging indicators (midline shift, secondary intraventricular hemorrhage volume) and allows to verify the individual risk of END with an accuracy of 86.5 % (AUC \pm SE (95 % CI) = 0.92 \pm 0.02 (0.89–0.95), $p < 0.0001$).

Prospect for further research is the development of integral neuroimaging criteria for the prediction of early clinical and neurological deterioration in patients with spontaneous supratentorial intracerebral hemorrhage as a component of the basis for the selection of an individual treatment tactic.

Conflicts of interest: author has no conflict of interest to declare.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Надійшла до редакції / Received: 30.10.2023

Після доопрацювання / Revised: 28.11.2023

Схвалено до друку / Accepted: 08.12.2023

Information about the author:

Kuznietsov A. A., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Neurology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0002-6118-9682

Відомості про автора:

Кузнєцов А. А., канд. мед. наук, доцент каф. неврології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

References

- Magid-Bernstein, J., Girard, R., Polster, S., Srinath, A., Romanos, S., Awad, I. A., & Sansing, L. H. (2022). Cerebral Hemorrhage: Pathophysiology, Treatment, and Future Directions. *Circulation research*, 130(8), 1204–1229. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.319949>
- Pinho, J., Costa, A. S., Araújo, J. M., Amorim, J. M., & Ferreira, C. (2019). Intracerebral hemorrhage outcome: A comprehensive update. *Journal of the neurological sciences*, 398, 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.01.013>
- Puy, L., Parry-Jones, A. R., Sandset, E. C., Dowlatshahi, D., Ziai, W., & Cordonnier, C. (2023). Intracerebral haemorrhage. *Nature reviews. Disease primers*, 9(1), 14. <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00424-7>
- Koziolkin, O. A., & Kuznietsov, A. A. (2021). Prognostic value of serum S100B concentration in patients with acute spontaneous supratentorial intracerebral hemorrhage. *Pathologia*, 18(1), 19–25. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2021.1.228850>
- Akpınar, E., Gürbüz, M. S., & Berkman, M. Z. (2019). Factors Affecting Prognosis in Patients With Spontaneous Supratentorial Intracerebral Hemorrhage Under Medical and Surgical Treatment. *The Journal of craniofacial surgery*, 30(7), e667–e671. <https://doi.org/10.1097/SCS.00000000000005733>
- Law, Z. K., Dineen, R., England, T. J., Cala, L., Mistri, A. K., Appleton, J. P., Ozturk, S., Bereczki, D., Ciccone, A., Bath, P. M., Sprigg, N., & TICH-2 investigators (2021). Predictors and Outcomes of Neurological Deterioration in Intracerebral Hemorrhage: Results from the TICH-2 Randomized Controlled Trial. *Translational stroke research*, 12(2), 275–283. <https://doi.org/10.1007/s12975-020-00845-6>
- Flaherty, K., Bath, P. M., Dineen, R., Law, Z., Scutt, P., Pocock, S., Sprigg, N., & TICH-2 investigators (2017). Statistical analysis plan for the 'Tranexamic acid for hyperacute primary IntraCerebral Haemorrhage' (TICH-2) trial. *Trials*, 18(1), 607. <https://doi.org/10.1186/s13063-017-2341-5>
- Lord, A. S., Gilmore, E., Choi, H. A., Mayer, S. A., & VISTA-ICH Collaboration (2015). Time course and predictors of neurological deterioration after intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 46(3), 647–652. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.007704>
- Wang, G., & Zhang, J. (2017). Hematoma Expansion: Clinical and Molecular Predictors and Corresponding Pharmacological Treatment. *Current drug targets*, 18(12), 1367–1376. <https://doi.org/10.2174/1389450117666160712092224>

10. Yu, Z., Zheng, J., Xu, Z., Li, M., Wang, X., Lin, S., Li, H., & You, C. (2017). Accuracy of Shape Irregularity and Density Heterogeneity on Noncontrast Computed Tomography for Predicting Hematoma Expansion in Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: A Systematic Review and Meta-Analysis. *World neurosurgery*, 108, 347-355. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2017.09.022>
11. Morotti, A., Boulouis, G., Dowlatshahi, D., Li, Q., Barras, C. D., Delcourt, C., Yu, Z., Zheng, J., Zhou, Z., Aviv, R. I., Shoamanesh, A., Sporns, P. B., Rosand, J., Greenberg, S. M., Al-Shahi Salman, R., Qureshi, A. I., Demchuk, A. M., Anderson, C. S., Goldstein, J. N., Charidimou, A., ... International NCCT ICH Study Group (2019). Standards for Detecting, Interpreting, and Reporting Noncontrast Computed Tomographic Markers of Intracerebral Hemorrhage Expansion. *Annals of neurology*, 86(4), 480-492. <https://doi.org/10.1002/ana.25563>
12. Schlunk, F., & Greenberg, S. M. (2015). The Pathophysiology of Intracerebral Hemorrhage Formation and Expansion. *Translational stroke research*, 6(4), 257-263. <https://doi.org/10.1007/s12975-015-0410-1>
13. Boulouis, G., Dumas, A., Betensky, R. A., Brouwers, H. B., Fotiadis, P., Vashkevich, A., Ayres, A., Schwab, K., Romero, J. M., Smith, E. E., Viswanathan, A., Goldstein, J. N., Rosand, J., Gurol, M. E., & Greenberg, S. M. (2014). Anatomic pattern of intracerebral hemorrhage expansion: relation to CT angiography spot sign and hematoma center. *Stroke*, 45(4), 1154-1156. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.004844>
14. Yu, Z., Zheng, J., Ma, L., Guo, R., You, C., & Li, H. (2019). Predictive Validity of Hypodensities on Noncontrast Computed Tomography for Hematoma Growth in Intracerebral Hemorrhage: a Meta-Analysis. *World neurosurgery*, 123, e639-e645. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.11.239>
15. Zhang, D., Chen, J., Xue, Q., Du, B., Li, Y., Chen, T., Jiang, Y., Hou, L., Dong, Y., & Wang, J. (2018). Heterogeneity Signs on Noncontrast Computed Tomography Predict Hematoma Expansion after Intracerebral Hemorrhage: A Meta-Analysis. *BioMed research international*, 2018, 6038193. <https://doi.org/10.1155/2018/6038193>
16. Boulouis, G., Morotti, A., Brouwers, H. B., Charidimou, A., Jessel, M. J., Auriel, E., Pontes-Neto, O., Ayres, A., Vashkevich, A., Schwab, K. M., Rosand, J., Viswanathan, A., Gurol, M. E., Greenberg, S. M., & Goldstein, J. N. (2016). Association Between Hypodensities Detected by Computed Tomography and Hematoma Expansion in Patients With Intracerebral Hemorrhage. *JAMA neurology*, 73(8), 961-968. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.1218>
17. Morotti, A., Boulouis, G., Romero, J. M., Brouwers, H. B., Jessel, M. J., Vashkevich, A., Schwab, K., Afzal, M. R., Cassarly, C., Greenberg, S. M., Martin, R. H., Qureshi, A. I., Rosand, J., Goldstein, J. N., & ATACH-II and NETT investigators (2017). Blood pressure reduction and noncontrast CT markers of intracerebral hemorrhage expansion. *Neurology*, 89(6), 548-554. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000004210>
18. Delcourt, C., Zhang, S., Arima, H., Sato, S., Al-Shahi Salman, R., Wang, X., Davies, L., Stapf, C., Robinson, T., Lavados, P. M., Chalmers, J., Heeley, E., Liu, M., Lindley, R. I., Anderson, C. S., & INTERACT2 investigators (2016). Significance of Hematoma Shape and Density in Intracerebral Hemorrhage: The Intensive Blood Pressure Reduction in Acute Intracerebral Hemorrhage Trial Study. *Stroke*, 47(5), 1227-1232. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.012921>
19. Halleivi, H., Dar, N. S., Barreto, A. D., Morales, M. M., Martin-Schild, S., Abraham, A. T., Walker, K. C., Gonzales, N. R., Illoh, K., Grotta, J. C., & Savitz, S. I. (2009). The IVH score: a novel tool for estimating intraventricular hemorrhage volume: clinical and research implications. *Critical care medicine*, 37(3), 969-e1. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318198683a>
20. Barras, C. D., Tress, B. M., Christensen, S., MacGregor, L., Collins, M., Desmond, P. M., Skolnick, B. E., Mayer, S. A., Broderick, J. P., Diringler, M. N., Steiner, T., Davis, S. M., & Recombinant Activated Factor VII Intracerebral Hemorrhage Trial Investigators (2009). Density and shape as CT predictors of intracerebral hemorrhage growth. *Stroke*, 40(4), 1325-1331. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.536888>
21. Ministry of Health of Ukraine. (2014). *Unifikovanyi klinichniy protokol ekstrenoi, pervynnoi, vtorynnoi (spetsializovanoi), tretynnoi (vysokospetsializovanoi) medychnoi dopomohy ta medychnoi reabilitatsii Hemorahichnyi insult (vnutrishnomozkova hematoma, anevryzmalnyi subarakhnoidalnyi krovovyliv)* [Unified clinical protocol of emergency, primary, secondary (specialized), tertiary (highly specialized) medical care and medical rehabilitation Hemorrhagic stroke (intrahepatic hematoma, aneurysmal subarachnoid hemorrhage) (No. 275)]. Retrieved from: https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2019/11/2014_275_ykpmnd_gi.pdf
22. Almarzouki, A., Wilson, D., Ambler, G., Shakeshaft, C., Cohen, H., Yousry, T., Al-Shahi Salman, R., Lip, G. Y. H., Houlden, H., Brown, M. M., Muir, K. W., Jäger, H. R., & Werring, D. J. (2020). Sensitivity and specificity of blood-fluid levels for oral anticoagulant-associated intracerebral haemorrhage. *Scientific reports*, 10(1), 15529. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72504-7>
23. Chen, Y., Tian, L., Wang, L., Qin, Y., & Cai, J. (2020). Black Hole Sign on Noncontrast Computed Tomography in Predicting Hematoma Expansion in Patients with Intracerebral Hemorrhage: A Meta-analysis. *Current medical imaging*, 16(7), 878-886. <https://doi.org/10.2174/1573405615666190903155738>
24. Dowlatshahi, D., Morotti, A., Al-Ajlan, F. S., Boulouis, G., Warren, A. D., Petrich, W., Aviv, R. I., Demchuk, A. M., & Goldstein, J. N. (2019). Inter-rater and Intra-rater Measurement Reliability of Noncontrast Computed Tomography Predictors of Intracerebral Hemorrhage Expansion. *Stroke*, 50(5), 1260-1262. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.024050>

Laparoscopic intraperitoneal onlay mesh with fascial repair (IPOM plus) for ventral and incisional hernia

H. O. Havrylov^{1,B,F}, O. V. Shulyarenko^{2,A,B,C,D,F}, M. O. Yosypenko^{1B} *^{3,A,F},
V. V. Prepodobnyi^{3,A,C,E,F}, V. F. Vatamaniuk^{3,A,C,E,F}

¹Private Enterprise Clinic Medicom, Kyiv, Ukraine, ²Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine, ³Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv

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

Abdominal wall surgery for ventral hernia is one of the commonest procedures performed by the surgeons.

The aim of the study is to evaluate short- and long-term outcomes in patients who underwent laparoscopic IPOM plus approach.

Materials and methods. This study describes 70 patients who underwent laparoscopic intraperitoneal onlay mesh repair plus (IPOM plus) for ventral and incisional hernia. These were then followed up for a period of a minimum of 12 months and a maximum of 5 years.

Results. Of the 70 patients, 8 (11.43 %) linea alba hernias, 28 (40.00 %) umbilical hernias, 34 (48.57 %) had incisional hernias. The distribution based on ASA score: I – 23 (32.86 %) patients, II – 39 (55.71 %), III – 8 (11.43 %). The mean age was 50.21 ± 0.89 years (M ± m). Male to female ratio was 1.19:1.00. Average defect size was 4.77 ± 0.21 cm (M ± m). Mean operating time was 58.27 ± 0.52 minutes (M ± m). Mean post-op hospital stay was 1.84 ± 0.06 days (M ± m). Intensity of pain by VAS pain score was 5.11 ± 0.92, 4.47 ± 0.31, 2.90 ± 0.72, 0.92 ± 0.81 (M ± m) after 6 hours, 24 hours, 1 week, 6 weeks respectively. No conversion to open laparotomy was required.

Reported complications were port-site seroma 3 (4.29 %), port-site hematoma 1 (1.43 %) over one year of follow-up. 62 (88.57 %) patients were evaluated over 21 months follow-up period, no complications have been reported.

Conclusions. Obtained results showed that the IPOM plus repair is safe and may be used for routine laparoscopic ventral and incisional hernia repair, the closure of fascial defect appears to give chance for good fixation of the mesh and decrease postoperative morbidity.

Key words:

IPOM plus, laparoscopic surgery, surgical mesh, ventral hernia.

Pathologia, 2023.
20(3), 257-260

*E-mail:
surgeryukraine@ukr.net

Лапароскопічна інтраперитонеальна пластика з ушиванням гризових воріт (IPOM plus) у хірургії первинної вентральної та післяопераційної грижі

Г. О. Гаврилов, О. В. Шуляренко, М. О. Йосипенко, В. В. Преподобний, В. Ф. Ватаманюк

Операція на черевній стінці при вентральній грижі є одним із найпоширеніших втручань, які виконують хірурги.

Мета роботи – оцінювання ранніх і віддалених результатів лікування у пацієнтів, яким виконали операцію IPOM plus.

Матеріали та методи. Викладено результати хірургічного лікування 70 пацієнтів, яким виконали операцію IPOM plus при вентральній і післяопераційній грижі. Пацієнти перебували під спостереженням від 12 місяців до 5 років.

Результати. З-поміж 70 пацієнтів, яких залучили в дослідження, у 8 (11,43 %) діагностовано грижі білої лінії, у 28 (40,00 %) – пупкові, у 34 (48,57 %) хворих – післяопераційні грижі. Розподіл за шкалою ASA: I – 23 (32,86 %) пацієнти, II – 39 (55,71 %), III – 8 (11,43 %) випадків. Середній вік становив 50,21 ± 0,89 року (M ± m), співвідношення чоловіків і жінок – 1,19:1,00. Середній розмір дефекту становив 4,77 ± 0,21 см (M ± m). Середня тривалість операції – 58,27 ± 0,52 хвилини (M ± m), середня тривалість перебування в лікарні становила 1,84 ± 0,06 доби (M ± m). Інтенсивність болю за шкалою VAS оцінили як 5,11 ± 0,92, 4,47 ± 0,31, 2,90 ± 0,72, 0,92 ± 0,81 (M ± m) через 6 і 24 години, 1 і 6 тижнів після операції відповідно. Необхідності в конверсії не було в жодному випадку.

Протягом одного року після операції зафіксували такі ускладнення: серома ділянки порту – в 3 (4,29 %) пацієнтів, гематома ділянки порту – 1 (1,43%) випадок. Протягом 21 місяця після операції обстежили 62 (88,57 %) пацієнтів, ускладнення не виявлені.

Висновки. Пластика IPOM plus безпечна, може бути використана в лапароскопічній хірургії первинної вентральної та післяопераційної грижі. Закриття фасціального дефекту дає змогу якісно зафіксувати сітку та сприяє зниженню післяопераційних ускладнень.

Ключові слова:

IPOM plus, лапароскопічна пластика вентральної грижі, сітка, вентральна грижа.

Патологія. 2023.
Т. 20, № 3(59).
С. 257-260

All hernias may lead to discomfort. Symptoms like pain, the increasing size of the protruding hernia due to straining, and others can be alarming to patients, along with impending risk of incarceration.

Many of these patients are no more active in sport, profession or even daily life. Hence there is the need for surgery. This can be achieved either as an open or laparoscopic approach.

Ventral hernia repair is one of the most frequently performed surgical operations in the world [5].

Minimally invasive surgery using laparoscopy is the first treatment option for ventral hernias. Laparoscopic Ventral Hernia Repair (LVHR) was first described by Karl Leblanc in 1992 and has been gaining popularity in this present era of minimal access surgery [10].

Based on the updated international Endohernia Society (IEHS) guidelines, mesh repair is recommended for abdominal hernias with defects larger than 1 cm, and those larger than 4 cm should be considered for laparoscopic mesh repair [3]. Intraperitoneal mesh placement is an option through a laparoscopic approach.

Standard LVHR involves bridging the defect from the peritoneal side followed by placement of a composite mesh, known as the “intraperitoneal onlay mesh (IPOM) repair”, wherein the mesh is placed in an “underlay” position via the laparoscopic intraperitoneal approach. These repairs are associated with a significant incidence of recurrence and seroma formation and also cause incomplete restoration of abdominal muscle function [12,20].

To deal with these problems, sutured closure of the defect in the fascia before intraperitoneal placement of a mesh, termed as the “IPOM plus repair” was recommended in the guideline of the International Endohernia Society [13,18].

Aim

The purpose of the study is to evaluate short- and long-term outcomes in patients who underwent laparoscopic IPOM plus approach.

Materials and methods

This retrospective study describes 70 patients who underwent laparoscopic intraperitoneal onlay mesh repair plus (IPOM plus) for ventral and incisional hernia at the clinic “Medikom” from 2015 to 2021 years. Follow-up information was obtained via the medical record for subsequent hospitalizations or clinic visits, and a questionnaire was administered to every patient. These were then followed up for a period of a minimum of 12 months and a maximum of 5 years.

Patients older than 18 years undergoing IPOM plus surgery for primary or incisional ventral hernia and having defect whose width did not exceed 12 cm were enrolled after informed consent.

Patients with cardiac disorders, also unfit for general anesthesia, patients fit for open repair or a hybrid approach (open reduction and closure of defect followed by laparoscopic IPOM repair), with incarcerated, obstructed or strangulated hernias were excluded from this study.

Information recorded for data analysis: age, gender, body mass index (kg/m^2), hernia type, location, ASA score, size of the defect, operating time, 10-balls postoperative pain score. The size of the defect was measured as the maximum distance between the medial edges of the defect in the fascia when the patient is in a resting supine position. The operating time was calculated from the insertion of the first trocar to exsufflation.

All patients underwent routine laboratory investigations, ultrasound soft tissue for establishing diagnosis (we used Esaote MyLab 6), detection size of defect, and chest radiography. First generation cephalosporin cefazolin 1 gram solution for intravenous injection was given for every patient before operation.

The procedure (laparoscopic IPOM plus) was done according to Patent of Ukraine No. 119299 with Parietene Composite mesh, it's important to reduce intra-abdominal pressure to 6 mm Hg in order to get accurate hernia orifice size, intracorporeal sutures with non-absorbable monofilament were applied on hernia orifice, it involved placement of a mesh with 4–5 cm overlap at the edges of the defect, mesh was anchored with two opposite corner tension free extracorporeal subcutaneous transfascial sutures, the mesh fixation was performed by absorbable tacks.

The patients were mobilized and liquids orally were allowed once they were fully awake and non-sedated, usually 3–4 h after the surgery. Patients were discharged once they were fully mobile and comfortable on oral analgesics.

Statistical analysis was obtained with the statistical software package. Quantitative data were presented as mean and average deviation from the mean ($M \pm m$).

Results

There were 38 males and 32 females (Table 1). The range age was 29–60 years. Obesity is defined as a BMI greater than or equal to $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ and morbid obesity also termed class III obesity as BMI greater than or equal to $40 \text{ kg}/\text{m}^2$. BMI ranged from 28 to $33 \text{ kg}/\text{m}^2$.

Incisional hernia was the most common hernia. Of the 34 incisional hernias which were recurrent, all of them undergone previous open repair using anatomical non-mesh techniques.

The operating time was 58.27 ± 0.52 (range from 48 to 69 minutes). There were no conversions to open.

The literature findings report a seroma rate of up to 12.2 % [2,13]; in our study, the seroma rate was 4.29 % (Table 2). The port-site seromas were punctured under sonography control.

In 1 (1.43 %) patient the port-site hematoma was punctured and successfully coagulated under sonography control. Hematoma prevalence is estimated to be between 0.4 % and 4.0 % in the literature [1,16].

Conversion to open surgery was not required among the 70 patients.

Discussion

In this series, mean operating time was 58.27 minutes (range 48–69 minutes), which is more than the study carried out by Gupta et al (45 minutes) but less than the study carried out by C. Palanivelu et al. which was 95 minutes [9,13].

There was no intraoperative visceral and vascular injury encountered in this study. Palanivelu C. et al. reported 0.3 % bowel injury in his study [13].

No patient needed conversion to open procedure in this study in contrast to other studies carried out by C. Palanivelu et al. (1 %) and Bassem M. Sieda et al. (4.3 %) [13,19].

Table 1. Baseline characteristics, n (%), M ± m

IPOM plus, n = 70		
Gender	Male	38 (54.29 %)
	Female	32 (45.71 %)
Age, years		50.21 ± 0.89
ASA score	ASA-I	23 (32.86 %)
	ASA-II	39 (55.71 %)
	ASA-III	8 (11.43 %)
Type of hernia	Linea alba	8 (11.43 %)
	Umbilical	28 (40.00 %)
	Incisional	34 (48.57 %)
BMI, kg/m ²		30.72 ± 0.18
Defect size, cm		4.77 ± 0.21

Table 2. Post-operative data (n = 70), n (%), M ± m

Features	Data	
Pain (VAS)	6 hours	5.11 ± 0.92
	24 hours	4.47 ± 0.31
	1 week	2.90 ± 0.72
	4 weeks	0.92 ± 0.81
Port-site seroma	3 (4.29 %)	
Port-site hematoma	1 (1.43 %)	
Length of stay, days	1.84 ± 0.06	

There was no incidence of mesh infection in this study compared to other studies [19].

Average hospital stay in this study was 1.8 days. Gupta P. et al. in their study showed mean hospital stay was 1.4 days compatible with our study [9].

No bulging or eversion of mesh was observed in this study comparable to other studies [19]. We agree that fascial closure has been recommended to prevent the bulging of the abdominal wall and seromas after bridging repair in laparoscopic IPOM repair [6,7].

On the other hand, authors concluded that LVHR with or without fascial closure, provided satisfactory results in terms of safety and efficacy, the discordant results in the literature are probably related to independent variables such as the type of mesh, the type of suture and closure technique [15].

Main idea of fixation is to keep the mesh in contact with the anterior abdominal wall in order to achieve fibrosis and to avoid landing of mesh in the peritoneal cavity to prevent complications.

We are in accordance with conclusions that the mesh overlaps of the borders of hernia ring is important as a factor, and depends on the size of the hernia defect, so the larger the gap – hernia ring, more overlapping of the mesh is needed [8].

The concern with laparoscopic IPOM is chronic pain. It has been defined as a pain that lasts more than 3 months. This complication has been reported in 2.0–9.5 % of cases of laparoscopic IPOM repair [20].

It was related to fixation systems, especially non-absorbable ones [11]. In our series, no cases of chronic pain or recurrence have been observed, we used only absorbable fixation tacks.

In the one year follow up time P. Gupta et al. reported 0.4 % and C. Palanivelu et al. 0.55 % recurrence rate respectively [9,13].

62 (88.57 %) patients were evaluated over 21 months

follow-up period, major complications associated with laparoscopic IPOM, such as enteric fistulas or mesh migration, were not reported.

The 36-Item Short Form Health Survey questionnaire (SF-36) is a very popular instrument for evaluating Health-Related Quality of Life (HRQL) [18]. In this study 67 (95.71 %) of the patients were satisfied with the 1 year post operative results, 3 (4.29 %) of the patients were not satisfied with the 1 year post operative results because of co-morbidities only. Mental health showed no alteration. Therefore, it is correct to say that IPOM plus should improve the HRQL. As observed in our and other authors research, the QoL is not entirely influenced by the operation itself, but also by additional health problems [14].

The advantages of IPOM plus over open retro muscular hernia repair like Rives–Stoppa technique: first method does not disturb muscle compartments or the segmental nerve innervations, provides additional benefit as a complete exploration of the abdominal cavity, the possibility to add another procedure if needed, an easier adhesiolysis due to the magnification of the view, and a lower postoperative abdominal pain because no wide dissection is performed [4].

Conclusions

1. IPOM plus repair is safe and may be used for routine laparoscopic ventral and incisional hernia repair.
2. Closure of fascial defect appears to give chance for good fixation of the mesh and decrease postoperative morbidity. However, larger-scale studies are essential.

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

Надійшла до редакції / Received: 05.07.2023
Після доопрацювання / Revised: 30.08.2023
Схвалено до друку / Accepted: 04.09.2023

Information about authors:

Havrylov H. O., MD, Head of the Surgical Department, Private Enterprise Clinic Medicom, Kyiv, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0002-8425-8134

Shulyarenko O. V., MD, PhD, Associate Professor, Assistant of the Department of General Surgery 2, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0002-6780-8587

Yosypenko M. O., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Surgery and Proctology, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv.

ORCID ID: 0000-0002-2659-1238

Prepodobnyi V. V., MD, PhD, Assistant of the Department of Surgery and Proctology, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv.

ORCID ID: 0000-0003-1822-6772

Vatamaniuk V. F., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Surgery and Proctology, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0001-6987-3799

Відомості про авторів:

Гаврилов Г. О., зав. хірургічного відділення, Приватне підприємство «Клініка «Медіком», м. Київ, Україна.

Шуляренко О. В., канд. мед. наук, доцент, асистент каф. загальної хірургії № 2, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

Йосипенко М. О., канд. мед. наук, доцент каф. хірургії і проктології, Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ.

Преподобний В. В., канд. мед. наук, асистент каф. хірургії і проктології, Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ.

Ватаманюк В. Ф., канд. мед. наук, доцент каф. хірургії і проктології, Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ.

References

- Awaiz, A., Rahman, F., Hossain, M. B., Yunus, R. M., Khan, S., Memon, B., & Memon, M. A. (2015). Meta-analysis and systematic review of laparoscopic versus open mesh repair for elective incisional hernia. *Hernia*, 19(3), 449-463. <https://doi.org/10.1007/s10029-015-1351-z>
- Bansal, V. K., Asuri, K., Panaiyadiyan, S., Kumar, S., Subramaniam, R., Ramachandran, R., Sagar, R., & Misra, M. C. (2016). Comparison of Absorbable Versus Nonabsorbable Tackers in Terms of Long-term Outcomes, Chronic Pain, and Quality of Life After Laparoscopic Incisional Hernia Repair: A Randomized Study. *Surgical laparoscopy, endoscopy & percutaneous techniques*, 26(6), 476-483. <https://doi.org/10.1097/SLE.0000000000000347>
- Bittner, R., Bain, K., Bansal, V. K., Berrevoet, F., Bingener-Casey, J., Chen, D., Chen, J., Chowbey, P., Dietz, U. A., de Beaux, A., Ferzli, G., Fortelny, R., Hoffmann, H., Iskander, M., Ji, Z., Jorgensen, L. N., Khullar, R., Kirchoff, P., Köckerling, F., Kukleta, J., ... Yao, Q. (2019). Update of Guidelines for laparoscopic treatment of ventral and incisional abdominal wall hernias (International Endohernia Society (IEHS))-Part A. *Surgical endoscopy*, 33(10), 3069-3139. <https://doi.org/10.1007/s00464-019-06907-7>
- Dietz, U. A., Wiegner, A., & Germer, C. T. (2015). Indikationen zur laparoskopischen Versorgung großer Narbenhernien [Indications for laparoscopic treatment of large incisional hernias]. *Der Chirurg: Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin*, 86(4), 338-345. <https://doi.org/10.1007/s00104-014-2814-y>
- Faylona, J. M. (2017). Evolution of ventral hernia repair. *Asian journal of endoscopic surgery*, 10(3), 252-258. <https://doi.org/10.1111/ases.12392>
- Feleshtynsky, Ya. P., Lerchuk, O. M., Smishchuk, V. V., & Hudyman, Ya. M. (2020). Laparoskopichna preperitonealna aloplastyka pisliaoperatsiynikh ventralnykh hryzh [Laparoscopic preperitoneal alloplasty of postoperative ventral hernias]. *Klinichna khirurgiia*, 87(5-6), 50-54. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.26779/2522-1396.2020.5-6.50>
- Giuffrida, M., Rossini, M., Pagliani, L., Del Rio, P., & Cozzani, F. (2023). Laparoscopic Intraoperative Onlay Mesh (IPOM): Short- and Long-Term Results in a Single Center. *Surgeries (Switzerland)*, 4(1), 98-107. <https://doi.org/10.3390/surgeries4010011>
- Guérin, G., & Turquier, F. (2013). Impact of the defect size, the mesh overlap and the fixation depth on ventral hernia repairs: a combined experimental and numerical approach. *Hernia*, 17(5), 647-655. <https://doi.org/10.1007/s10029-013-1050-6>
- Gupta, P., Kapoor, K., Kundra, D., Khanna, A. P., Arora, C., & Agarwal, A. (2020). Laparoscopic intraperitoneal onlay mesh repair (intraperitoneal onlay mesh plus) in 429 patients – Our experience. *International Journal of Abdominal Wall and Hernia Surgery*, 3(4), 144-147. https://doi.org/10.4103/ijawhs.ijawhs_19_20
- Haque, M. R., Alam, M., Hossain, S. S., Khan, L., & Islam, M. A. (2023). Laparoscopic Intra Peritoneal Onlay Mesh Plus (IPOM Plus) repair of Ventral Hernias – Experience in a Tertiary Hospital. *Journal of Bangladesh College of Physicians and Surgeons*, 41(2), 150-155. <https://doi.org/10.3329/jbcps.v41i2.64567>
- Kapoulas, S., Papalois, A., Papadakis, G., Tsoulfas, G., Christoforidis, E., Papaziogas, B., Schizas, D., & Chatzimavroudis, G. (2022). Safety and efficacy of absorbable and non-absorbable fixation systems for intraperitoneal mesh fixation: an experimental study in swine. *Hernia*, 26(2), 567-579. <https://doi.org/10.1007/s10029-020-02352-x>
- Kurmann, A., Visth, E., Candinas, D., & Beldi, G. (2011). Long-term follow-up of open and laparoscopic repair of large incisional hernias. *World journal of surgery*, 35(2), 297-301. <https://doi.org/10.1007/s00268-010-0874-9>
- Palanivelu, C., Jani, K. V., Senthilnathan, P., Parthasarathi, R., Madhankumar, M. V., & Malladi, V. K. (2007). Laparoscopic sutured closure with mesh reinforcement of incisional hernias. *Hernia*, 11(3), 223-228. <https://doi.org/10.1007/s10029-007-0200-0>
- Pătrașcu, M. I., Ion, D., Bolocan, A., Păduraru, D. N., & Andronic, O. (2023). The Impact of Incisional Hernia Repair on the Quality of Life: A Narrative Review. *Sudan Journal of Medical Sciences*. Knowledge E. <https://doi.org/10.18502/sjms.v18i2.13607>
- Pizza, F., D'Antonio, D., Lucido, F. S., Bruscianno, L., Mongardini, F. M., Dell'Isola, C., Brillantino, A., Docimo, L., & Gambardella, C. (2023). IPOM plus versus IPOM standard in incisional hernia repair: results of a prospective multicenter trial. *Hernia*, 27(3), 695-704. <https://doi.org/10.1007/s10029-023-02802-2>
- Reynvoet, E., Deschepper, E., Rogiers, X., Troisi, R., & Berrevoet, F. (2014). Laparoscopic ventral hernia repair: is there an optimal mesh fixation technique? A systematic review. *Langenbeck's archives of surgery*, 399(1), 55-63. <https://doi.org/10.1007/s00423-013-1126-x>
- Saris-Baglana, R. N., Dewey, C. J., Chisholm, G. B., Plumb, E., King, J., Kosinski, M., Bjorner, J. B., & Ware, J. E., Jr. (2010). QualityMetric health outcomes™ scoring software 4.0: installation guide. Lincoln (RI): QualityMetric Incorporated. https://www.amihealthy.com/download/installationguide_scoringsoftwarev4.pdf
- Schoenmaeckers, E. J., Wassenaar, E. B., Raymakers, J. T., & Rakic, S. (2010). Bulging of the mesh after laparoscopic repair of ventral and incisional hernias. *JSL: Journal of the Society of Laparoscopic Surgeons*, 14(4), 541-546. <https://doi.org/10.4293/108680810X12924466008240>
- Sieda, B. M., & Khail, I. O. H. (2020). Short-term outcomes of laparoscopic intraperitoneal onlay mesh with facial repair (ipom-plus) for ventral hernia: a randomized controlled trial. *The Egyptian Journal of Surgery*, 39(3), 764-773.
- Suwa, K., Okamoto, T., & Yanaga, K. (2018). Is fascial defect closure with intraperitoneal onlay mesh superior to standard intraperitoneal onlay mesh for laparoscopic repair of large incisional hernia?. *Asian journal of endoscopic surgery*, 11(4), 378-384. <https://doi.org/10.1111/ases.12471>

Influence of shortwave laser therapy on morphometric parameters of sciatic nerve regeneration after experimental neurorrhaphy

Z. M. Yashchyshyn¹, O. O. Dyadyk²

¹Vasyl Stefanyk Precarpathian National University, Ivano-Frankivsk, Ukraine, ²Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv

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

The aim of this work was to reveal the effectiveness of delayed laser therapy for the regeneration of the sciatic nerve.

Materials and methods. In 21 rats, transection and epineural microsurgical suture of the right sciatic nerve (SN) were performed. In 16 rats (experimental group) in the period from 1.0 to 2.5 months after surgery, a course of laser therapy (LT-1, n = 8) and a delayed (after 6 months) course of laser therapy (LT-2, n = 8) were used 18 sessions were performed in each subgroup. Laser therapy was not performed in 5 operated animals and they were included in the control group. The terms of withdrawal of rats from the experiment were 2.5 and 12.0 months after the operation. During the morphometry of semi-thin sections distal to the level of the sutures, the volumetric density of the constituent elements of the SN, the number density of myelinated nerve fibers (MNF), their diameters, the thickness of the axons and myelin sheath, the myelination index (index G) distribution of MNF by diameter and dependence of index G on the fiber caliber were measured. For double control, we used muscle morphometry data from intact rats (Intact). Muscle tissue was additionally examined by the method of transmission electron microscopy using a generally accepted technique with a REM-100 electron microscope (Selmi, Sumy, Ukraine).

Results. In the control group, as compared to the intact group, the numerical density of muscle fibers was 21 % higher, but 38 % less than the numerical density of microvessels, therefore, the vascularization index was reduced by 1.7 times. The obtained results indicated laser compensation for denervation atrophy, which was confirmed by morphometric data.

Conclusions. The results of the study indicate a stimulating prolonged effect of delayed laser therapy in regenerative axonogenesis.

Key words:

sciatic nerve, regeneration, morphometry, laser therapy.

Pathologia, 2023, 20(3), 261-265

*E-mail: alena0566@gmail.com

Вплив короткохвильової лазерної терапії на морфометричні показники регенерації сідничного нерва після експериментальної нейрорафії

З. М. Яцишин, О. О. Дядик

Мета роботи – оцінювання ефективності відстроченої лазеротерапії для регенерації сідничного нерва (СН).

Матеріали та методи. У 21 щура здійснили перетин правого сідничного нерва і наклали епіневральний мікрохірургічний шов. У 16 щурів (експериментальна група) у період від 1,0 до 2,5 місяця після операції застосували курс лазеротерапії (ЛТ-1, n = 8) і відстрочений (через 6 місяців) курс лазеротерапії (ЛТ-2, n = 8); у кожній підгрупі здійснили 18 сеансів. У 5 прооперованих тварин лазерну терапію не виконували, і вони залучені в контрольну групу. Терміни виведення щурів з експерименту – 2,5 і 12,0 місяця після операції. Під час морфометрії напівтонких зрізів дистальніше рівня швів встановили об'ємну щільність складових елементів СН, щільність мієлінових нервових волокон (МНВ), їхній діаметр, товщину аксонів і мієлінової оболонки, індекс мієлінізації (індекс G), визначили розподіл МНВ за діаметром і залежність індексу G від калібру волокна. Для подвійного контролю результатів здійснили морфометрію нервів в інтактних щурих. М'язову тканину додатково дослідили методом трансмісійної електронної мікроскопії, застосувавши відому методику, електронний мікроскоп PEM-100 (фірма «Selmi», м. Суми, Україна).

Результати. У контрольній групі порівняно з інтактною кількісна щільність м'язових волокон на 21 % більша, але на 38 % менша від кількісної щільності мікросудин; отже, індекс васкуляризації знижений в 1,7 раза. Результати, що одержали, свідчать про лазерну компенсацію денерваційної атрофії; це підтверджено морфометричними даними.

Висновки. Результати дослідження підтвердили стимулювальний пролонгований ефект відстроченої лазерної терапії при регенеративному аксоногенезі.

Ключові слова:

сідничний нерв, регенерація, морфометрія, лазерна терапія.

Патологія. 2023, Т. 20, № 3(59), С. 261-265

According to A. Eberstein & S. Eberstein [1], the results of studies over the past 25 years have proven that the biochemical and physiological properties of muscle fibers are determined not so much by the influence of neurotrophic substances as by the activity of the muscle; therefore, different types of myostimulation are considered the most effective way to treat denervation atrophy.

Schimrigk K. et al. found that electrical stimulation not only slows down the development of atrophy of the dener-

vated muscle, but also increases the number of necrotic muscle fibers and reduces the number of myotubes [2,3].

Laser therapy (LT) does not change the number of fibers in the denervated muscle, and the ratio of the proportions of muscle tissue, blood vessels and connective tissue is "improved" in comparison with unstimulated control. The effect of LT on reinnervation has also been the subject of research. Nakano S., Bianciardi G. et al., who found that when low-intensity LT was used to

stimulate nerve regeneration after its compression, the cross-sectional area of muscle fibers in the reinnervated muscles increased, and the proportion of connective tissue in them decreased [4,5].

After transection and suture of motor nerves, some authors obtained data on the improvement of the structure and function of reinnervated muscles under the influence of electrical stimulation, others concluded that reinnervation was suppressed [6].

Aim

The aim of this work was to reveal the effectiveness of delayed laser therapy for the regeneration of the sciatic nerve.

Materials and methods

The experiments were carried out on 21 adult outbred rats. In 21 rats under intravenous barbituric anesthesia and aseptic conditions, complete transection and primary microsurgical suture of the sciatic nerve (SN) were performed at the level of the middle third of the thigh. We used the Aesculap company's tools, 8/0 gauge thread on atraumatic needles from Ethicon and 8× magnification of an operating microscope from Opton.

In the postoperative period, in 5 animals, no effects on the regenerative process were applied (unstimulated control – CG). In the experimental group (EG), low-intensity LT courses were conducted on the “Impulse-CT” apparatus with a wavelength of 480 nm of the blue spectrum. Each 10-minute procedure consisted of two parts: the first part (5 minutes) – short-wave laser stimulation of peripheral segments, the second part (20 minutes) – short-wave LT of the nerve trunk proximal to the level of damage. For shortwave LT [8] sciatic nerve, the SN trunk in the middle third of the thigh was irradiated. The procedures were performed every other day (Monday, Wednesday, Friday). The radiation mode is variable, the frequency is 50 Hz, the pulse duration is 0.7 ms, the pulse duration is 2 s; pulse-pause ratio 2:2. The strength of the pulsed irradiation was selected individually. In 16 rats (experimental group) in the period from 1.0 to 2.5 months after surgery, a course of laser therapy (LT-1, n = 8) and a delayed (after 6 months) course of laser therapy (LT-2, n = 8) were used 18 sessions were performed in each subgroup. Laser therapy was not performed in 5 operated animals and they were included in the control group (CG, n = 5). The terms of withdrawal of rats from the experiment are 2.5 and 12.0 months after the operation.

12 months after the operation, the animals EG and CG were withdrawn from the experiment by the administration of a lethal dose of barbiturates. Since the timing of the appearance of the first electro-physiological signs of the reinnervation of the leg muscles in CG and EG rats varied individually from 3 to 8 weeks after the operation, additional 3 experiments were performed using the “prevented regeneration” model (Denerv) [8]: after resection of 3 cm SN, its proximal and distal stumps were isolated with caps made of biologically inert material. Denerv group withdrawn from experience 33 days after the surgery. That made it possible to obtain homogeneous initial data on the

structure of the denervated muscle in the period immediately preceding the reinnervation and the beginning of laser therapy sessions. Maintenance, feeding of animals, operations and LT sessions, as well as withdrawal from the experiment were carried out according to the protocol “On humane behavior with laboratory animals” No. 775.

After euthanasia for morphological studies, fragments of the tibialis anterior muscle were taken from the local region at the level of its upper, middle and lower third. Transverse cryostat sections were made (microtome-cryostat M05050) to detect the activity of myosin-ATPase according to Padycula, Herman in the modification of A. E. Meijer [9] which allows you to identify different types of muscle fibers in muscles with different compositions. The preparations were digitized on the APK “DiaMorph” and morphometric using the Image program. For double control, we used muscle morphometry data from intact rats (Intact).

Muscle tissue was additionally examined by the method of transmission electron microscopy using a generally accepted technique with a REM-100 electron microscope (Selmi, Sumy, Ukraine).

Statistical processing of the primary data was carried out using the software capabilities of MS Excel-2000, the variational series were ranged with a step of 10.0 μm, and histograms of the distribution of muscle fibers by diameter were obtained. The vascularization index (VI) is the ratio of the number of hemocapillaries to the total number of muscle bundles that make up this muscle, i. e. it reflects the “saturation” of the object with vessels.

Results

Visual analysis of preparations of the denervated muscle indicates significant fiber atrophy as early as 1 month after resection of the SN. The distribution curve by fiber diameters is significantly shifted to the left compared to the intact one and has a high peak instead of a plateau (Fig. 1).

In all experiments with a nerve suture one year after the operation, the shapes and sizes of the profiles of muscle fibers in cryostat sections indicate laser compensation for denervation atrophy, which is confirmed by morphometric data. In the control group, the average curve of the distribution of muscle fibers by diameter practically coincides with the intact one (Fig. 1). In the LT-1 subgroup, it is shifted to the right and has a small peak. In the LT-2 subgroup, the shift of the curve to the right is even more pronounced, the height of its peak decreases, and the width of the base increases significantly. The study of individual histograms of animals of this group showed that in one rat out of three, the distribution of muscle fibers in diameter bimodal, which, presumably, can be associated with the unequal effect of electrical stimulation on muscle fibers of different metabolic types.

According to the stereological analysis, in the control, compared to the intact muscle, the volumetric density of microvessels is 1.5 times reduced, the proportion of endomysium is 1.2 times reduced and, accordingly, the volume density of muscle fibers is slightly increased (Fig. 2). In the LT-1 subgroup, the volumetric density of muscle fibers is comparable to that of intact muscle, but

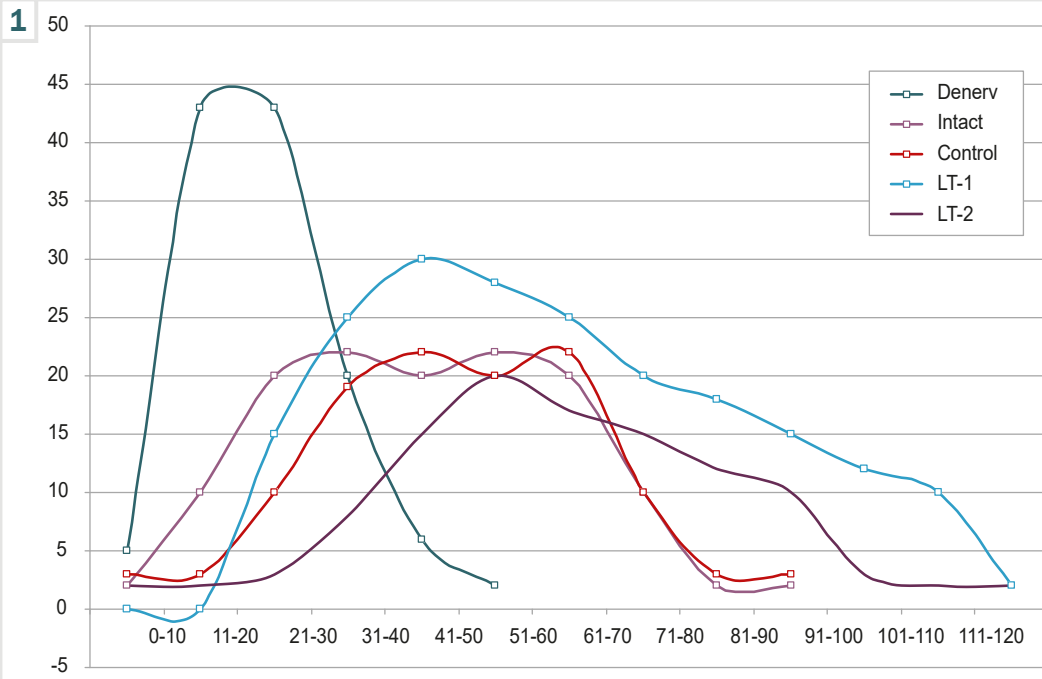


Fig. 1. Curves of distribution of fibers of the tibialis anterior muscle of rats by diameter in an intact state and different experimental conditions. The abscissa axis is the size class of fibers (0–10 microns; 11–20 microns, etc.); Y-axis – percentage of fibers of each class.

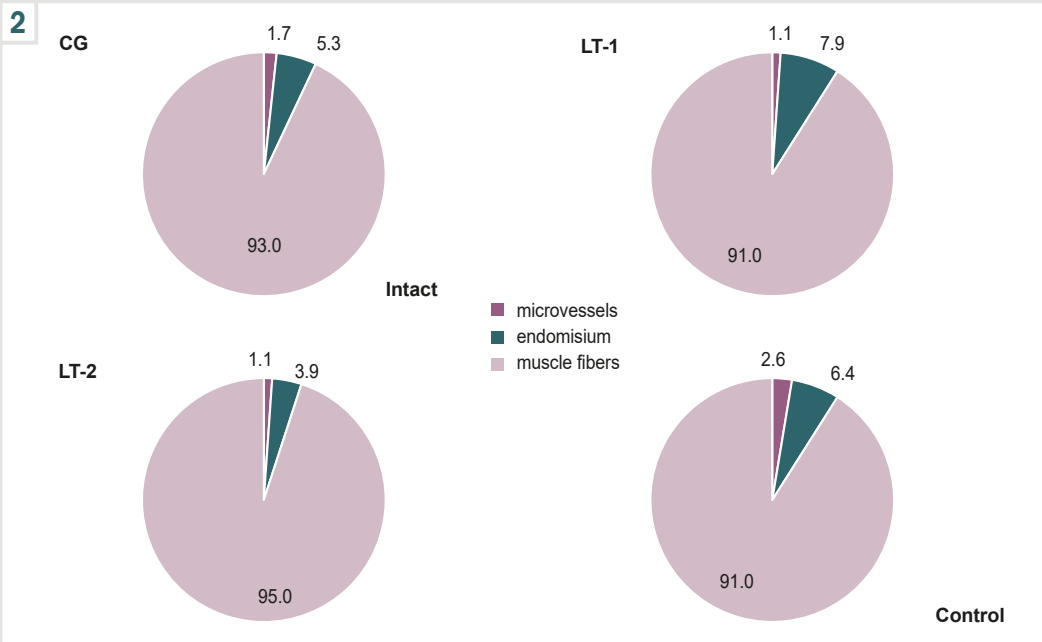


Fig. 2. Volume ratios of muscle fibers, endomysium and microvessels in the tibialis anterior muscle of operated and intact rats.

the volumetric density of microvessels is reduced by 2.4 times, and the proportion of endomysium is increased by 1.2 times. In the LT-2 subgroup, the volumetric density of microvessels is less than in the control, but higher than in the LT-1 subgroup; the volume fraction of endomysium in this group is the smallest; even in comparison with an intact muscle, it is reduced by 1.7 times; the bulk density of muscle fibers slightly exceeds the corresponding parameter of other groups.

In the control group, as compared to the intact group, the numerical density of muscle fibers is 21 % higher, but 38 % less than the numerical density of microvessels, therefore the vascularization index is reduced by 1.7

times (Fig. 3). In the LT-1 subgroup, the numerical density of muscle fibers is practically equal to the corresponding parameter of the intact muscle, but the numerical density of microvessels is reduced by 1.9 times and the vascularization index is reduced by 2 times. In the LT-2 subgroup, the numerical density of muscle fibers is 1.3 times less than in the intact muscle, the numerical density of microvessels is 1.8 times, the vascularization index is reduced 1.4 times.

Despite this, an increase in ATPase activity was observed in the group with LT-1 (Fig. 4), which is closely correlated with the expansion and normalization of the lumen of hemocapillaries (Fig. 5).

3

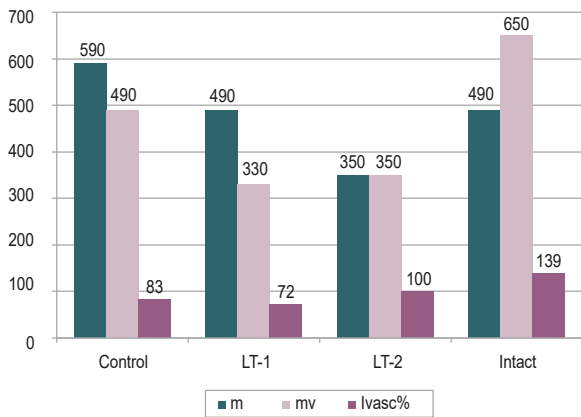
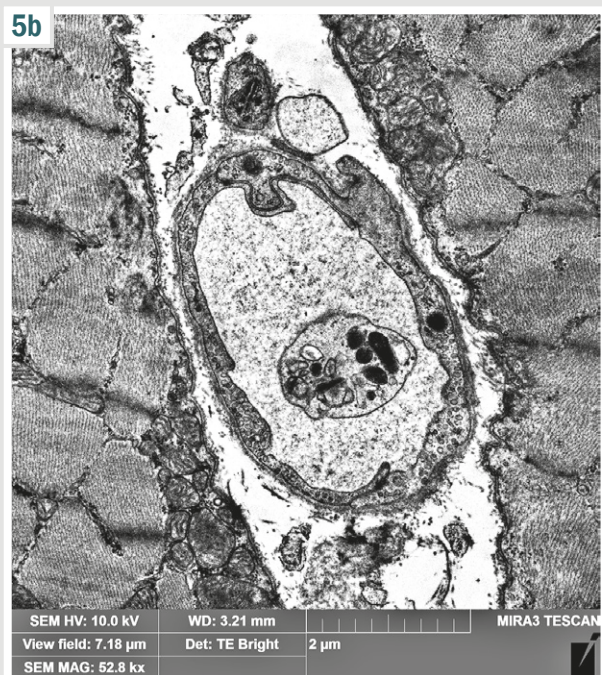
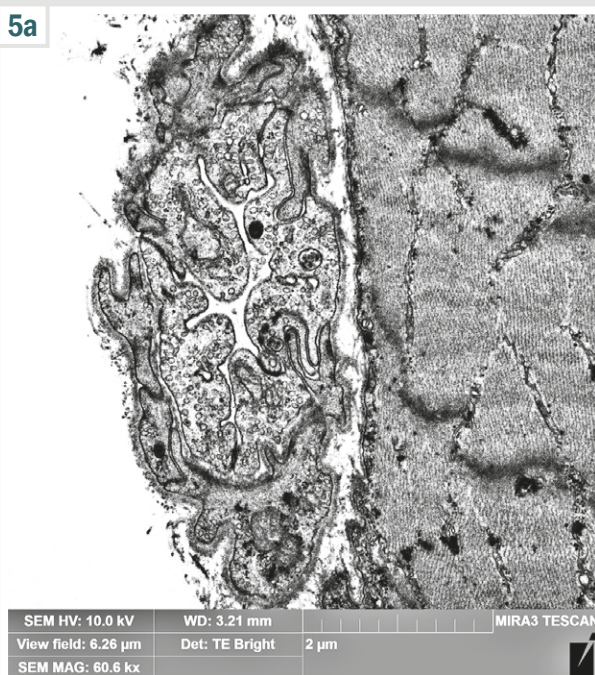
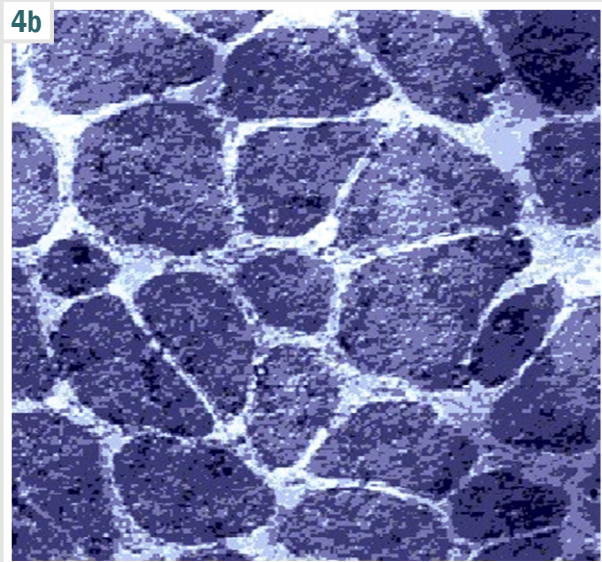
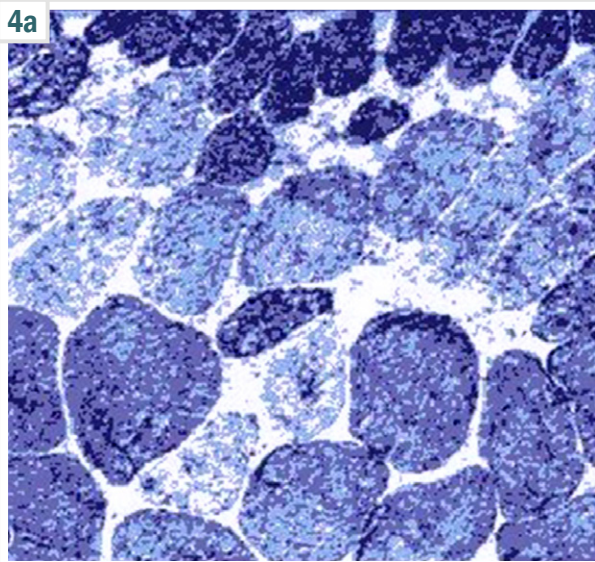


Fig. 3. Numerical density of muscle fibers (mf), microvessels (mv) and vascularization index (lvasc%) in the tibialis anterior muscle of operated and intact rats after laser therapy.

Fig. 4. ATPase activity in muscle fibers m. tibialis anterior before (a) and after (b) laser therapy in conditions of SN neurorrhaphy.

Fig. 5. Structural organization of hemocapillaries SN before (a) and after (b) laser therapy in conditions of SN neurorrhaphy. Method: transmission electron microscopy. Magn.: $\times 10\ 000$.



Discussion

The results of our study indicate that in rats after 1 month of denervation, pronounced atrophy of the anterior tibial muscle occurs. In the process of reinnervation, the size of the muscle fibers is restored even without the use of LT, but the tissue organization of the muscle 12 months after the transection and suture of the nerve is not optimal, which is confirmed by the data of other authors [5,6]. First, compared with intact muscle, the volume fraction of microvessels, their number per unit of muscle cross-sectional area and the average number per muscle fiber remain reduced [7]. Secondly, the increased volume and numerical density of muscle fibers indicate an increase in their number as a result of regenerative myogenesis, which often leads to the formation of abnormally branching muscle fibers or small clusters, which does not contribute to muscle restitution [10].

In the group with one course of LT, its effect on the thickness of muscle fibers was established – judging by the nature of the distribution curve, on average they become larger than in the control and in the intact muscle. The volumetric and numerical density of muscle fibers is comparable to that of an intact muscle, but all vascularization parameters are reduced not only in comparison with the intact muscle, but even in comparison with the control. Apparently, LT, carried out in the period from 1.0 to 2.5 months after the operation, not only maintains normo- and induces hypertrophy of muscle fibers experiencing denervation, but also has an inhibitory effect not only on regenerative myogenesis, but also on angiogenesis.

Conducting the second course of LT within 6.0 to 7.5 months after the nerve suture enhances the hypertrophy of the reinnervated muscle. The vascularization index increases due to a decrease in the number density of muscle fibers, the volume and number of density of microvessels remain reduced compared with the controls and especially with intact muscle.

Conclusions

1. The protocol of laser therapy tested in our experiments has a distinct modulating effect on the tissue organization of the reinnervated muscle, contributing to the development of muscle fiber hypertrophy. This effect is accompanied by an increase in muscle vascularization compared to unstimulated controls.

2. An increase in muscle vascularization is accompanied by an increase in the ATPase activity of muscle fibers and indicates a positive regenerative potential of laser therapy.

3. An increase in the ATPase activity of muscle fibers along with an increase in their vascularization makes it possible to use these indicators in assessing the effectiveness of the means that contribute to the recovery of muscle function after experimental neurotomy of the sciatic nerve under the conditions of laser therapy.

Prospects for further research are to determine correlational relationships between the processes of regeneration of nerve fibers of the sciatic nerve and the degree of vascularization during laser therapy at different times after applying a microsuture.

Funding

The work was carried out within the framework of a comprehensive scientific research topic: “Pathogenetic mechanisms in development of changes in organs of the respiratory, endocrine, nervous systems in the modeled pathological states and their correction”, state registration number 0117U001758 (2017–2022).

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

Надійшла до редакції / Received: 31.05.2023

Після доопрацювання / Revised: 21.08.2023

Схвалено до друку / Accepted: 14.09.2023

Information about authors:

Yashchynshyn Z. M., MD, PhD, Head of the Department of Physical Therapy, Occupational Therapy, Vasyl Stefanyk Precarpathian National University, Ivano-Frankivsk, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0001-8672-1797

Dyadyk O. O., MD, PhD, DSc, Professor, Head of Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv.

ORCID ID: 0000-0002-9912-4286

Відомості про авторів:

Яшишин З. М., канд. мед. наук, доцент, зав. каф. фізичної терапії, ерготерапії, Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, м. Івано-Франківськ, Україна.

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.

References

- Eberstein, A., & Eberstein, S. (1996). Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile?. *Medicine and science in sports and exercise*, 28(12), 1463-1469. <https://doi.org/10.1097/00005768-199612000-00004>
- Schimrigk, K., McLaughlin, J., & Grüniger, W. (1977). The effect of electrical stimulation on the experimentally denervated rat muscle. *Scandinavian journal of rehabilitation medicine*, 9(2), 55-60.
- Schwartz, L. M. (2008). Atrophy and programmed cell death of skeletal muscle. *Cell death and differentiation*, 15(7), 1163-1169. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.68>
- Nakano, S. (2020). Histological investigation of picosecond laser-toning and fractional laser therapy. *Laser therapy*, 29(1), 53-60. <https://doi.org/10.5978/islsm.20-OR-05>
- Bianciardi, G., Pontenani, F., Vassallo, L., Tacchini, D., Buonsanti, M., & Tripodi, S. (2016). Morphometric analysis of cryofixed muscular tissue for intraoperative consultation. *Microscopy research and technique*, 79(3), 155-161. <https://doi.org/10.1002/jemt.22616>
- Ebrahimi-Zadehlou, P., Najafpour, A., & Mohammadi, R. (2021). Assessments of regenerative potential of silymarin nanoparticles loaded into chitosan conduit on peripheral nerve regeneration: a transected sciatic nerve model in rat. *Neurological research*, 43(2), 148-156. <https://doi.org/10.1080/01616412.2020.1831341>
- Smith, J. J. (2017). Laser Therapy and Multimodal Postoperative Rehabilitation. In *Laser Therapy in Veterinary Medicine* (pp. 239-251). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119220190.ch22>
- Bersch, I., & Fridén, J. (2021). Electrical stimulation alters muscle morphological properties in denervated upper limb muscles. *EBioMedicine*, 74. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103737>
- Meijer, A. E. (1979). Semipermeable membrane techniques in quantitative enzyme histochemistry. *Ciba Foundation Symposium*, (73), 103-120. https://doi.org/10.1002/9780470720561.ch7https://search.crossref.org/?q=Enzyme+histochemistry&from_ui=yes
- Durfee, W. K., & MacLean, K. E. (1989). Methods for estimating isometric recruitment curves of electrically stimulated muscle. *IEEE transactions on bio-medical engineering*, 36(7), 654-667. <https://doi.org/10.1109/10.32097>

Кореляція щільності кістки окремих ділянок щелеп за Гаунсфілдом із довжиною ділянки адентії в програмі конусно-променевої комп'ютерної томографії

О. В. Сидор^{IB,D}, Т. В. Строгонова^{IB,D}, С. Д. Варжапетян^{IB} *A,C,D,E,F

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:

комп'ютерна томографія, щільність щелепи, обробка медичних зображень.

Патологія. 2023.
Т. 20, № 3(59).
С. 266-270

*E-mail:
sw050773@gmail.com

Мета роботи – вивчити наявність взаємозв'язку між щільністю кісткової тканини та протяжністю беззубої ділянки зубного ряду.

Матеріали та методи. Здійснили оцінювання щільності губчастої речовини щелеп за максимальним і середнім показниками за шкалою одиниць Гаунсфілда (HU). Щільність губчастої кістки оцінювали тільки в ділянках, доступних для встановлення імплантату. Пацієнтів поділили на групи залежно від локалізації та довжини дефекту зубного ряду. Методи статистики включали визначення середнього арифметичного значення (M), стандартного відхилення (σ), помилки середнього (m), довірчого інтервалу (95 % CI), а також оцінювання медіани (Me) та інквартильного розмаху ([Q1; Q2]); застосували критерій Стьюдента (t критерій).

Результати. Максимальні та середні показники щільності губчастої кістки у дефектах зубного ряду верхньої (562,4 [347,1; 777,8] HU і 301,5 [163,0; 439,9] HU відповідно, $p = 0,84$) та нижньої (1379,0 [1116,2; 1641,9] HU і 848,6 [630,6; 1066,6] HU відповідно, $p = 0,96$) щелеп у ділянках молярів і премолярів при «великих» дефектах достовірно відрізняються від параметрів «малих» дефектів (299,7 [176,9; 422,4] HU і 642,6 [470,4; 814,9] HU, 1061,1 [866,5; 1255,7] HU і 608,3 [440,5; 776,1] HU відповідно). Середня щільність кістки альвеолярного відростка верхньої щелепи майже однакова у дефектах із різною протяжністю. Середня щільність губчастої кістки альвеолярної частини нижньої щелепи у «великих» дефектах мають вірогідні відмінності від «середніх» ($p = 0,02$) і «малих» ($p = 0,005$) дефектів.

Висновки. Середня щільність губчастої кістки альвеолярної частини нижньої щелепи у «великих» дефектах має вірогідні відмінності від «середніх» ($p = 0,02$) і «малих» ($p = 0,0005$) дефектів, відповідає класу D3 (350–850 HU) за класифікацією Misch незалежно від протяжності дефекту зубного ряду. Середня щільність губчастої кістки альвеолярного відростка верхньої щелепи в ділянках молярів і премолярів не має достовірних відмінностей залежно від протяжності дефекту зубного ряду та відповідає класу D4 (150–350 HU) за класифікацією Misch. Клінічна класифікація Misch не дає змоги розглядати окремо всі варіанти середніх показників щільності кістки, що мають статистично вірогідні відмінності, в різних ділянках зубного ряду.

Key words:

computer tomography, bone density, medical image processing.

Pathologia, 2023.
20(3), 266-270

Correlation of bone density of individual jaw sections according to Hounsfield with the length of the edentary section in the cone-beam computer tomography program

O. V. Sydor, T. V. Strohonova, S. D. Varzhapetian

Aim. To study the existence of a relationship between the density of bone tissue and the length of the edentulous part of the tooth row.

Materials and methods. Evaluation of the density of the spongy substance of the jaws by the maximum and average value of HU. The density of cancellous bone was evaluated only in the areas available for implant placement. The groups consisted of the localization and extent of the dentition defect. Statistical methods included the estimation of the arithmetic mean (M), standard deviation (σ), error of the mean (m), confidence interval (95 % CI), estimation of the median (Me) and interquartile range ([Q1; Q2]), Student's test (t criterion).

Results. Maximum and average indicators of cancellous bone density in defects of the upper (562.4 [347.1; 777.8] and 301.5 [163.0; 439.9], respectively ($p = 0.84$) and lower (1379.0 [1116.2; 1641.9] HU and 848.6 [630.6; 1066.6] HU, respectively, $p = 0.96$) jaws in the areas of molars and premolars with "large" defects are significantly different from the indicators "small" defects (299.7 [176.9; 422.4] and 642.6 [470.4; 814.9], 1061.1 [866.5; 1255.7] and 608.3 [440.5; 776.1], respectively). The average bone density of the alveolar process of the upper jaw is almost the same in defects of different lengths. The average density of the cancellous bone of the alveolar part of the lower jaw in "large" defects has significant differences from "average" ones ($p = 0.02$) and "small" ($p = 0.005$) defects.

Conclusions. The average density of cancellous bone of the alveolar part of the lower jaw in "large" defects has significant differences from "medium" ($p = 0.02$) and "small" ($p = 0.005$) defects, and regardless of the extent of the dentition defect corresponds to class D3 (350–850 HU) according to the Misch classification. The average density of cancellous bone of the alveolar process of the upper jaw in the areas of molars and premolars does not have significant differences depending on the extent of the dentition defect and corresponds to class D4 (150–350 HU) according to the Misch classification. Since one class includes a large range of values, the clinical classification of Misch does not allow taking into account individual bone density indicators that have statistically significant differences in different areas of the dentition.

В останні десятиліття метод дентальної імплантації став одним із провідних при заміщенні дефектів зубних рядів в Україні та світі. Частка пацієнтів із повною адентією серед осіб похилого віку, зокрема віком понад 65 років, становить 27,3 % [1]. У Європейському Союзі щороку встановлюють понад 1,8 млн імплантів [2]. Очікують, що цей показник постійно зростатиме через збільшення геріатричної популяції та загальної кількості стоматологів і фахівців, які виконують цю процедуру [1].

Виробники дентальних імплантів повідомляють про успішність імплантації у 98 % випадків, згідно з результатами клінічних досліджень [3]. Важлива умова успішної дентальної імплантації – первинна стабільність імплантату в імплантаційному ложі відразу після встановлення. Первинна стабільність забезпечується механічним зчепленням імплантату з кісткою [4]. Крім конструкції імплантату, структури та методів обробки його поверхні на первинну стабільність впливає щільність кістки в ділянці встановлення імплантату [5,6]. Якість і кількість щелепних кісток – два важливі локальні фактори, що впливають на ухвалення остаточного рішення про розміщення імплантату. Тому передопераційний аналіз і хірургічне планування встановлення імплантату потребують пильної уваги до якості доступної кістки [5].

Передопераційне оцінювання щільності кістки щелепи лікарі здійснюють, використовуючи результати комп'ютерної томографії пацієнта [7]. Оцінювання щільності губчастої кістки щелепи у стоматологічній імплантації за допомогою конусно-променевої комп'ютерної томографії (КПКТ) залишається найпоширенішим на практиці і під час клінічних досліджень [3]. Щільність кістки на місці дентального імплантату можна визначити за шкалою одиниць Гаунсфілда (HU) і як значення відтінків сірого (GVs) [8].

Результати дослідження якості кістки можуть відрізнитися залежно від досвіду дослідника та використаної апаратури [9,10]. У фаховій літературі наведено результати дослідження щодо середнього значення щільності кістки у різних ділянках верхньої та нижньої щелеп, що оцінене з використанням КПКТ [3].

На наш погляд, під час планування реабілітації пацієнтів із частковою адентією, що потребує застосування дентальних імплантів, важливим чинником є протяжність дефекту зубного ряду. Знання про середні показники мінеральної щільності кістки в ділянках адентії залежно від її протяжності можна застосувати як один із стандартів практичної стоматології. Наявність таких стандартів сприятиме зменшенню імовірності помилок, стане орієнтиром для молодих спеціалістів [3].

Таблиця 1. Топографічні характеристики досліджених беззубих ділянок

Тип дефекту зубного ряду	Локалізація дефекту				Загалом
	Щелепи		Ділянка зубного ряду		
	Нижня	Верхня	Моляри і премоляри	Ікла і різці	
«Малий»	20	31	48	3	51 (32,7 %)
«Середній»	20	40	59	1	60 (38,5 %)
«Великий» і повна адентія	25	20	45	–	45 (28,8 %)
Загалом	65 (41,7 %)	91 (58,3 %)	152 (97,3 %)	4 (2,7 %)	156 (100 %)



Рис. 1. Вимірювання щільності губчастої кістки, кількісно визначеної в одиницях Гаунсфілда (HU) на місці, де планується встановлення зубного імплантату.

Мета роботи

Вивчити наявність взаємозв'язку між щільністю кісткової тканини та протяжністю беззубої ділянки зубного ряду.

Матеріали і методи дослідження

Для оцінювання локальної щільності губчастої речовини альвеолярної частини нижньої щелепи та альвеолярного відростка верхньої щелепи використали максимальні та середні значення HU (одиниці Гаунсфілда) [3] – стандартної програми конусно-променевого комп'ютерного томографа NewTom Giaco HR Professional (16 × 18) (Італія). Під час дослідження застосували результати КПКТ нижньої та верхньої щелеп пацієнтів зі вторинною адентією.

Під час стратифікації пацієнтів на групи не враховували наявність супутніх захворювань, стать і вік обстежених. Поділ на групи здійснили за локалізацією та протяжністю дефекту зубного ряду.

Так, за протяжністю дефекту зубного ряду сформували три групи дослідження. До групи «малих» дефектів зубного ряду визначили ділянки адентії, у яких протяжність становила один зуб; до групи «середніх» дефектів зубного ряду – коли видалено два зуби; як «великі» дефекти зубного ряду визначили випадки, коли не було трьох і більше зубів. Кількість випадків з повною адентією невелика, тому дані щодо цих дефектів об'єднали з показниками, які визначили в групі «великих» дефектів.

Топографічні характеристики досліджених беззубих ділянок наведено у *таблиці 1*. Виміряли щільність губчастої кістки в 156 беззубих ділянках щелеп:

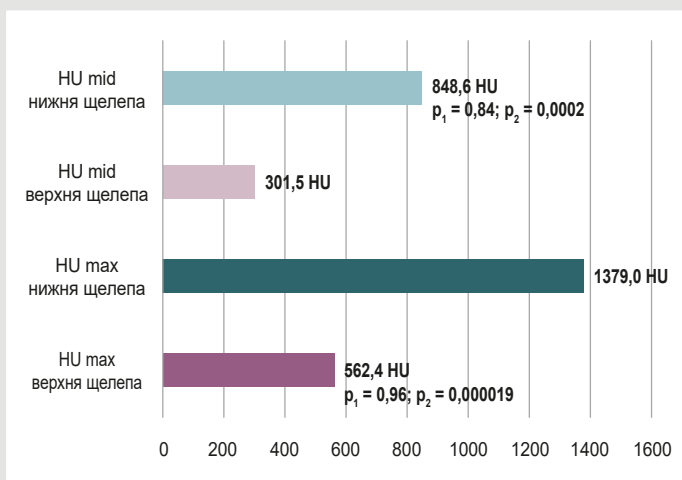


Рис. 2. Порівняння щільності кістки нижньої та верхньої щелеп у «великих» дефектах.

p₁: різниця параметрів максимальної та середньої щільності кісток однієї щелепи, p < 0,05;
p₂: різниця параметрів щільності кісток верхньої та нижньої щелеп, p < 0,05.

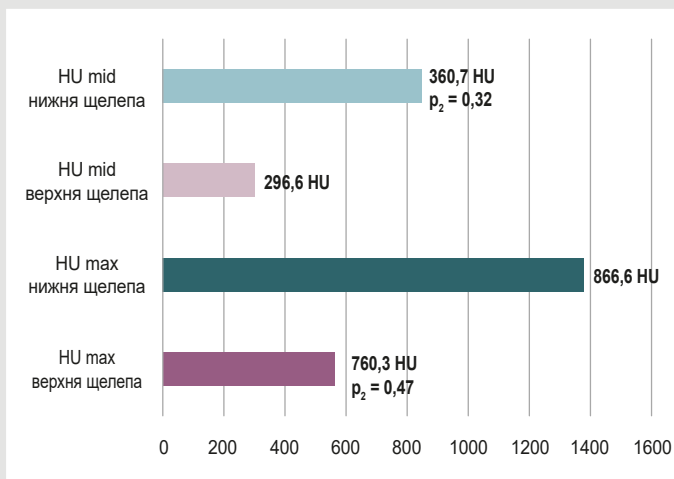


Рис. 3. Порівняння щільності кістки нижньої та верхньої щелеп у «середніх» дефектах.

p₂: різниця параметрів щільності кісток верхньої та нижньої щелеп, p < 0,05.

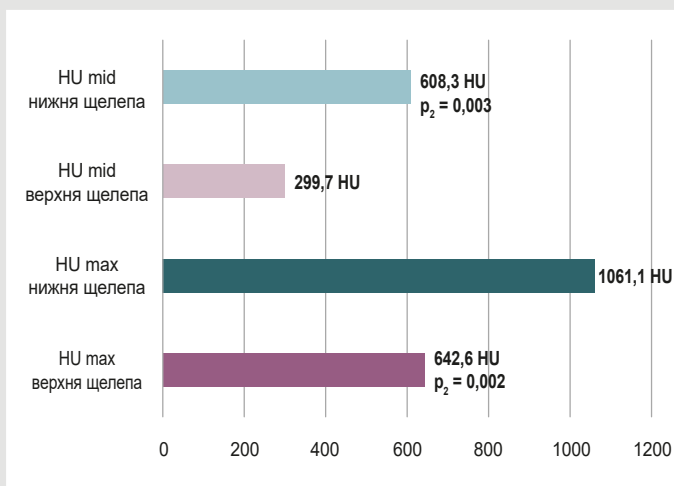


Рис. 4. Порівняння щільності кістки нижньої та верхньої щелеп у «малих» дефектах.

p₂: різниця параметрів щільності кісток верхньої та нижньої щелеп, p < 0,05.

41,7 % розташовані на нижній щелепі, 58,3 % – на верхній. «Великих» дефектів було 45 (28,8 %), «середніх» – 60 (38,5 %), «малих» – 51 (32,7 %). Досліджені ділянки дефекту альвеолярного відростка в області відсутніх молярів і премолярів становили 97,3 %, в області клівів і різців – 2,7 %.

Через малу кількість дефектів зубного ряду, що розташовані в передньому відділі альвеолярних відростків щелеп, ці дані ми не аналізували. Показники, що наведені у цій роботі, визначені в ділянках молярів і премолярів.

Щільність губчастої кістки оцінювали тільки в ділянках, що доступні для встановлення імплантату. Використали стандартну програму опцій конусно-променевого комп'ютерного томографа (рис. 1).

Дослідження виконали з дотриманням основних положень «Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини», що затверджені Гельсінською декларацією (1964–2013 рр.), ICH GCP (1996 р.), відповідно до Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986 р.), наказів МОЗ України від 23.09.2009 № 690, від 14.12.2009 № 944, від 03.08.2012 № 616.

Для опрацювання даних, розподіл яких відповідав закону нормальності, використали параметричні методи статистики. Методи описової статистики включали оцінювання середнього арифметичного значення (M), довірчого інтервалу (95 % CI), а також визначення медіани (Me) й інквартильного розмаху ([Q1; Q2]). Для порівняння даних, що відповідали закону нормального розподілу, застосували критерій Стьюдента (t критерій). Значущими вважали відмінності при 0,05.

Результати

Дослідження мінеральної щільності губчастої кістки в дефектах зубного ряду протяжністю ≥ 3 зуби в сегментах премолярів і молярів показало: середнє значення максимального показника альвеолярної частини нижньої щелепи становить 1379,0 [1116,2; 1641,9] HU, середнє значення – 848,6 [630,6; 1066,6] HU (p = 0,96); верхньої щелепи – 562,4 [347,1; 777,8] і 301,5 [163,0; 439,9] відповідно (p = 0,84) (рис. 2). На нижній щелепі у «великих» дефектах максимальний показник щільності кісткової тканини більший, ніж на верхній у 2,45 раза (понад 200 %), різниця достовірна, p = 0,000019.

У групі середніх дефектів різниця показників незначна. Так, максимальні значення відрізнялися на 100 HU (11,06 %); середні – лише на 64 HU (17,7 %): HU max нижньої щелепи – 866,6 [568,4; 1168,4], HU max верхньої щелепи – 760,3 [611,6; 908,9], p = 0,47; HU mid нижньої щелепи – 360,7 [233,0; 488,4], HU mid верхньої щелепи – 296,6 [229; 364,1], p = 0,31 (рис. 3).

На рис. 4 наведено дані щодо щільності кісткової тканини при «малих» дефектах: на нижній щелепі максимальна щільність кісткової тканини становила 1061,1 [866,5; 1255,7] HU, середнє значення – 608,3 [440,5; 776,1] HU; на верхній щелепі максимальне значення дорівнювало 642,6 [470,4; 814,9] HU, p = 0,002; середній показник щільності – 299,7 [176,9; 422,4] HU, p = 0,003.

Обговорення

Остеоінтеграція, що визначається як прямий структурний і функціональний зв'язок між упорядкованою живою кісткою та поверхнею імплантату, яка несе навантаження, має вирішальне значення для стабільності імплантату. Її вважають необхідною умовою для тривалого клінічного успіху.

Зазвичай у клінічній практиці лікарі-стоматологи використовують поєднання клінічної класифікації щільності кісткової тканини за Misch [11] з класифікацією оптичної щільності кісткової тканини, що запропонована Гаунсфілдом (HU). За цими класифікаціями кістку оцінюють за чотирма типами кісткової тканини:

D1 – щільна компактна кістка без губчастого шару, що відповідає >1250 HU;

D2 – зовні товстий, різної густини (від щільного до пористого) кортикальний шар, всередині – дрібний губчастий шар; відповідає 850–1250 HU;

D3 – зовні тонкий пористий кортикальний шар, всередині – середньомікрковий губчастий шар; відповідає 350–850 HU;

D4 – зовні кортикального шару майже немає (дуже тонкий); всередині – крупномікркова губчаста тканина; відповідає 150–350 HU;

D5 – суцільна крупномікркова губчаста кістка щільністю менше ніж 150 HU.

Середні показники щільності кістки верхньої щелепи, що одержали під час нашого дослідження, відповідно до класифікації Misch наведено на рис. 5.

Дослідження щільності кістки альвеолярного відростка верхньої щелепи не виявило значущих відмінностей за цим показником у ділянках із різною протяжністю. Частіше вона відповідає четвертому типу за Misch – D4 (150–350 HU). За даними фахової літератури, тип кістки D4 найчастіше ідентифікують у задній частині верхньої щелепи [12].

Середні показники щільності кістки альвеолярної частини нижньої щелепи мали істотніші відмінності залежно від протяжності дефекту (рис. 6).

У ділянках, де дефекти зубного ряду нижньої щелепи утворені внаслідок втрати трьох і більше зубів («великі» дефекти), щільність кісток вірогідно вища, ніж у ділянках дефекту зубного ряду нижньої щелепи, де видалено 2 зуби («середні» дефекти), $p = 0,0005$. Значення щільності у «малих» дефектах нижньої щелепи ($608,3 \pm 80,2$ HU) вірогідно відрізнялися від параметрів у «середніх» ($p = 0,02$), але не мали достовірних відмінностей порівняно з «великими» дефектами ($p = 0,08$).

Серед місцевих факторів, що впливають на мінеральну щільність кісток щелеп, передусім треба визначити локацію. Щільність кісток, як правило, вища на нижній щелепі та в передній ділянці, ніж у верхній щелепі та задній відділах [9, 13]. У результаті досліджень виявили позитивну кореляцію між мінеральною щільністю кісткової тканини щелеп і кількістю зубів у зубному ряді [14, 15]. Можна припустити, що залежність щільності кісткової тканини від кількості зубів і протяжності дефекту зубного ряду визначають одні й ті самі фактори.

Втім, у нашому дослідженні визначили, що щільність кістки альвеолярної частини більша в ділянках із

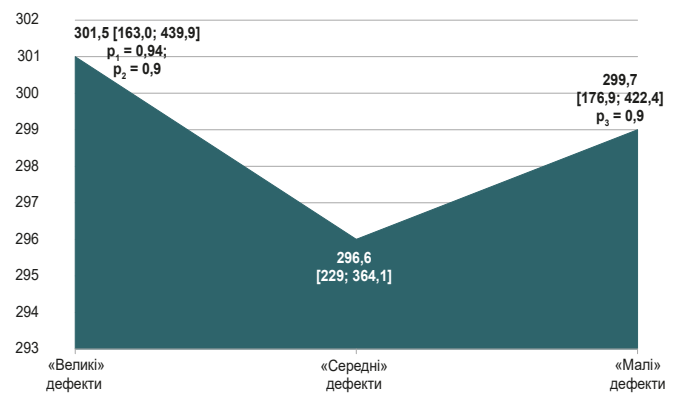


Рис. 5. Середня щільність губчастої кістки альвеолярного відростка верхньої щелепи у дефектах зубного ряду різної протяжності.

Дані наведено як довірчий інтервал (95 % CI);

p_1 : вірогідні відмінності між групами «великих» і «середніх» дефектів;

p_2 : достовірні відмінності між групами «великих» і «малих» дефектів;

p_3 : вірогідні відмінності між групами «малих» і «середніх» дефектів.

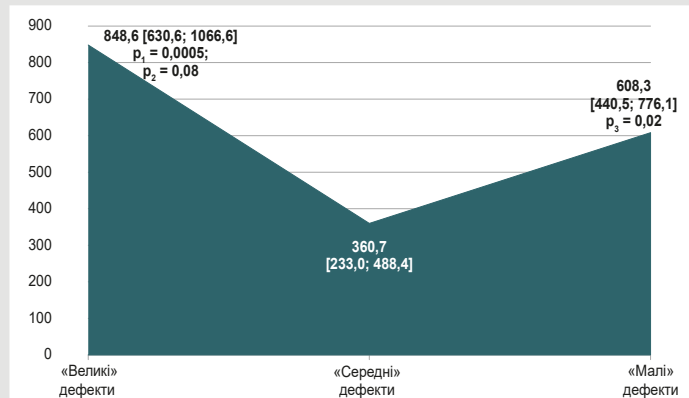


Рис. 6. Середня щільність губчастої кістки альвеолярної частини нижньої щелепи у дефектах зубного ряду різної протяжності.

Дані наведено як довірчий інтервал (95 % CI);

p_1 : вірогідні відмінності між групами «великих» і «середніх» дефектів;

p_2 : достовірні відмінності між групами «великих» і «малих» дефектів;

p_3 : вірогідні відмінності між групами «малих» і «середніх» дефектів.

максимальною кількістю видалених зубів (≥ 3). Різниця середніх значень щільності кістки за Гаунсфілдом між «великими» (немає трьох і більше зубів) та «середніми» дефектами (немає двох зубів) альвеолярної частини нижньої щелепи в ділянці молярів і премолярів вірогідна: 848,6 HU і 360,7 HU відповідно, $p = 0,0005$. При «малих» дефектах зубного ряду (протяжністю в один видалений зуб) губчастий шар кісткової тканини міцніший, ніж при «середніх» дефектах, але поступався «великим» дефектам. Підвищення щільності у «великих» дефектах може бути пов'язано з більшою тривалістю стану адентії. Збільшення терміну спричиняє більшу резорбцію губчастої кістки й ущільнення кортикального шару [8, 14]. На верхній щелепі анатомічні умови є перешкодою для збільшення щільності.

Результати, що одержали, свідчать: показники щільності кістки нижньої щелепи відповідали межах, визначеним для типу D3, незважаючи на достовірність відмінностей показників. Щільність кістки у великих

дефектах мала значення, що майже втричі перевищувало показник при «середніх» дефектах ($p = 0,02$), в 1,5 раза – при «малих» дефектах ($p = 0,0005$).

Через великий діапазон значень, передбачений клінічною класифікацією Misch, параметри міцності кістки, що встановили в цьому дослідженні, відповідали тільки типу D3 (350–850 HU) на нижній щелепі і D4 (150–350 HU) – на верхній.

Висновки

1. Середня щільність губчастої кістки альвеолярної частини нижньої щелепи у «великих» дефектах має вірогідні відмінності від «середніх» ($p = 0,02$) і «малих» ($p = 0,0005$) дефектів, відповідає класу D3 (350–850 HU) за класифікацією Misch незалежно від протяжності дефекту зубного ряду.

2. Середня щільність губчастої кістки альвеолярного відростка верхньої щелепи в ділянках молярів і премолярів не має достовірних відмінностей залежно від протяжності дефекту зубного ряду та відповідає класу D4 (150–350 HU) за класифікацією Misch.

3. Клінічна класифікація Misch не дає змоги розглядати окремо всі варіанти середніх показників щільності кістки, що мають статистично вірогідні відмінності, в різних ділянках зубного ряду.

Перспективи подальших досліджень. У дослідженні, що здійснили, не враховували вік і стать обстежених, а також загальні фактори (хронічні системні або ендокринні захворювання); крім того воно мало географічну обмеженість, можливо, залучено недостатню кількість пацієнтів. Втім, отримані результати актуалізують наступні дослідження, зокрема для підтвердження чи спростування вже відомих відомостей.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 09.10.2023

Після доопрацювання / Revised: 27.11.2023

Схвалено до друку / Accepted: 05.12.2023

Відомості про авторів:

Сидор О. В., аспірант каф. стоматології післядипломної освіти, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-3081-8906

Строгонова Т. В., канд. екон. наук, доцент каф. медичної фізики, біофізики та вищої математики, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-5510-2176

Варжапетян С. Д., д-р мед. наук, доцент каф. терапевтичної, ортопедичної та дитячої стоматології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-5649-1126, 0000-0003-0464-6127

Information about authors:

Sydor O. V., MD, Postgraduate student of the Department of Dentistry of Postgraduate Education, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Strohonova T. V., PhD, Associate Professor of the Department of Department of Medical Physics, Biophysics, and Further Mathematics, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Varzhapetian S. D., MD, PhD, DSc, Associate Professor of the Department of Therapeutic, Orthopedic and Pediatric Dentistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

References

- Dye, B. A., Weatherspoon, D. J., & Lopez Mitnik, G. (2019). Tooth loss among older adults according to poverty status in the United States from 1999 through 2004 and 2009 through 2014. *Journal of the American Dental Association* (1939), 150(1), 9-23.e3. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2018.09.010>
- Saghiri, M. A., Freag, P., Fakhrzadeh, A., Saghiri, A. M., & Eid, J. (2021). Current technology for identifying dental implants: a narrative review. *Bulletin of the National Research Centre*, 45(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00471-0>
- Jargalsaikhan, A., Sengee, N., Telue, B., & Ochirkhvv, S. (2019). Estimation of Lower Jaw Density using CT data. *Journal of Multimedia Information System*, 6(2), 67-74. <https://doi.org/10.33851/jmis.2019.6.2.67>
- Kim, J. M., Kim, S. J., Han, I., Shin, S. W., & Ryu, J. J. (2009). A comparison of the implant stability among various implant systems: clinical study. *The journal of advanced prosthodontics*, 1(1), 31-36. <https://doi.org/10.4047/jap.2009.1.1.31>
- Sundell, G., Dahlin, C., Andersson, M., & Thuvander, M. (2017). The bone-implant interface of dental implants in humans on the atomic scale. *Acta biomaterialia*, 48, 445-450. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.044>
- Mohajerani, H., Roozbayani, R., Taherian, S., & Tabrizi, R. (2017). The Risk Factors in Early Failure of Dental Implants: a Retrospective Study. *Journal of dentistry (Shiraz, Iran)*, 18(4), 298-303.
- Weiss, R., 2nd, & Read-Fuller, A. (2019). Cone Beam Computed Tomography in Oral and Maxillofacial Surgery: An Evidence-Based Review. *Dentistry journal*, 7(2), 52. <https://doi.org/10.3390/dj7020052>
- Wang, S. H., Shen, Y. W., Fuh, L. J., Peng, S. L., Tsai, M. T., Huang, H. L., & Hsu, J. T. (2020). Relationship between Cortical Bone Thickness and Cancellous Bone Density at Dental Implant Sites in the Jawbone. *Diagnostics*, 10(9), 710. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10090710>
- Ganguly, R., Ramesh, A., & Pagni, S. (2016). The accuracy of linear measurements of maxillary and mandibular edentulous sites in cone-beam computed tomography images with different fields of view and voxel sizes under simulated clinical conditions. *Imaging science in dentistry*, 46(2), 93-101. <https://doi.org/10.5624/isd.2016.46.2.93>
- Halperin-Sternfeld, M., Machtei, E. E., & Horwitz, J. (2014). Diagnostic accuracy of cone beam computed tomography for dimensional linear measurements in the mandible. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 29(3), 593-599. <https://doi.org/10.11607/jomi.3409>
- Misch, K. A., Yi, E. S., & Sarment, D. P. (2006). Accuracy of cone beam computed tomography for periodontal defect measurements. *Journal of periodontology*, 77(7), 1261-1266. <https://doi.org/10.1902/jop.2006.050367>
- Tsigarida, A., Toscano, J., de Brito Bezerra, B., Geminiani, A., Barma, A. B., Caton, J., Papaspyridakos, P., & Chochlidakis, K. (2020). Buccal bone thickness of maxillary anterior teeth: A systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical periodontology*, 47(11), 1326-1343. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13347>
- Yasuda, K., Okada, S., Okazaki, Y., Hiasa, K., Tsuga, K., & Abe, Y. (2020). Bone turnover markers to assess jawbone quality prior to dental implant treatment: a case-control study. *International journal of implant dentistry*, 6(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s40729-020-00264-0>
- Takeda, M., Matsuda, Y., Ikebuchi, K., Takeda, M., Abe, T., Tominaga, K., Isomura, M., Nabika, T., & Kanno, T. (2021). Relationship between Oral Health Status and Bone Mineral Density in Community-Dwelling Elderly Individuals: A Cross-Sectional Study. *Healthcare*, 9(4), 432. <https://doi.org/10.3390/healthcare9040432>
- Barbe, A. G., Javadian, S., Rott, T., Scharfenberg, I., Deutscher, H. C. D., Noack, M. J., & Derman, S. H. M. (2020). Objective masticatory efficiency and subjective quality of masticatory function among patients with periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*, 47(11), 1344-1353. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13364>
- Meeta, M., Harinarayan, C. V., Marwah, R., Sahay, R., Kalra, S., & Babhulkar, S. (2020). Clinical practice guidelines on postmenopausal osteoporosis: *an executive summary and recommendations-Update 2019-2020. *Journal of Mid-Life Health*, 11(2), 96-112. https://doi.org/10.4103/jmh.JMH_143_20

Вплив підвищеного споживання білка та дотації L-карнітину на результати виходжування доношених новонароджених в інтенсивній терапії

I. O. Anikin¹ *A,B,C,D,F, L. S. Stryzhak¹ B,C,E

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

Вивчили можливості підвищеної дотації протеїнів і L-карнітину в доношених новонароджених із захворюваннями перинатального періоду для покращення результатів інтенсивної терапії.

Мета роботи – оцінити вплив короткотривалого підвищеного споживання білка доношеними новонародженими та дотації L-карнітину на основні показники ефективності лікування у відділенні інтенсивної терапії.

Матеріали та методи. Для перевірки впливу запропонованого методу харчування новонароджених у дослідження залучили 59 доношених дітей, яких рандомно поділили на дві групи. Діти першої групи (n = 30) отримували стандартне харчування молоком матері або формулою, пацієнти другої групи (n = 29) одержували фортифікований білковою добавкою харчовий продукт і дотацію L-карнітину протягом перебування в лікарні.

Результати. Немовлята обох груп мали статистично зіставні антропометричні характеристики на початку дослідження. Пропорції дітей обох статей відповідали межах 50 % перцентилію. Починаючи з третього тижня, споживання калорій у групі стандартного харчування (СХ) та групі збагачення (ГЗ) становило 111,83 ± 7,19 ккал/кг/добу та 113,44 ± 5,61 ккал/кг/добу відповідно, p = 0,0667. На 1 г білка діти у ГЗ споживали кількість небілкових калорій на рівні 28,68 (27,50; 29,80) ккал/кг/добу, а пацієнти із групи СХ – 42,37 (41,60; 38,00) ккал/кг/добу (U = 28,0000, p = 0,0001). Дотація карнітину в ГЗ сприяла підвищенню рівня вільного карнітину в зразках плазми крові, що одержали безпосередньо перед випискою дітей додому.

Загалом запропонована стратегія харчування сприяла поліпшенню показників фізичного розвитку малюків, статистично вірогідно швидшому відновленню маси тіла в групі фортифікації. Так, узагальнений показник маси тіла дітей із ГЗ становив 3966,90 ± 439,08 г, а в групі СХ – 3554,62 ± 452,28 г (p = 0,0033). Встановили, що діти, які споживали більше білка, були раніше переведені з відділення інтенсивної терапії (10,00 (8,00; 12,00) дня проти 12,00 (11,00; 16,00) дня, U = 235,00, p = 0,0024); раніше виписані зі стаціонара (21,00 (19,00; 27,00) дня проти 26,50 (22,00; 31,00) дня, U = 267,00, p = 0,0109).

Запропонована стратегія безпечна. Це підтверджено нормальними рівнями фенілаланіну та сечовини на всіх етапах обстеження дітей.

Висновки. Короткотривале підвищене споживання білка на тлі дотації карнітину сприяє покращенню результатів фізичного розвитку новонароджених і показників перебування у стаціонарі та відділенні інтенсивної терапії. Актуальними є дослідження з більшою кількістю учасників і катанестичне спостереження за дітьми.

Ключові слова:

діти, харчування, інтенсивна терапія, білок, новонароджений.

Патологія. 2023.

Т. 20, № 3(59),
С. 271-280

*E-mail:

anikin1974@ukr.net

The influence of increased protein intake and L-carnitine supply on the outcomes of term newborns in intensive therapy

I. O. Anikin, L. S. Stryzhak

We studied the possibilities of increased protein and L-carnitine supplementation in full-term newborns with perinatal diseases to improve the results of intensive care.

Aim: to assess the impact of short-term increased protein consumption and L-carnitine supplementation by full-term newborns on the main indicators of treatment effectiveness in the intensive care unit.

Materials and methods. To check the impact of the proposed method of feeding newborns, the life indicators of 59 full-term children, who were randomly divided into two groups, were studied. The first group (n = 30) received standard nutrition with mother's milk or formula, the second group (n = 29) received a food product fortified with a protein supplement and a subsidy of L-carnitine during hospital stay.

Results. Infants of both groups had statistically equivalent anthropometric characteristics at the beginning of the study. The proportions of infants of both sexes were within the 50 % percentile. Starting from the third week, caloric intake for the standard diet group (SG) and the enrichment group (FG), respectively, was 111.83 ± 7.19 kcal/kg/day, against 113.44 ± 5.61 kcal/kg/day, p = 0.0667. Per 1 g of protein, children in the FG group had amount of non-protein calories as 28.68 (27.50; 29.80) kcal/kg/day, compared to the indicator in the SG group of 42.37 (41.60; 38.00) kcal/kg/day, with U = 28.0000; p = 0.0001. Carnitine supplementation in the FG group led to an increase in the level of free carnitine in the last blood plasma samples, before the children were discharged home.

Key words:

children, nutrition assessment, intensive care, protein, newborn.

Pathologia, 2023,
20(3), 271-280

In general, the proposed nutrition strategy was accompanied by better indicators of the physical development of children, and a statistically probable faster recovery of body weight in the fortification group. Thus, the generalized indicator of body weight of children of the SG group was 3966.90 ± 439.08 g, compared to the FG group of 3554.62 ± 452.28 g, with $p = 0.0033$. In general, children who consumed more protein were transferred from the intensive care unit earlier – 12.00 (11.00; 16.00) days, against 10.00 (8.00; 12.00) days, with $U = 235.00$; $p = 0.0024$; previously discharged from the hospital – 26.50 (22.00; 31.00) days, against 21.00 (19.00; 27.00) days, with $U = 267.00$, $p = 0.0109$.

This strategy proved to be safe, as confirmed by normal levels of phenylalanine and urea at all stages of the examination of children.

Conclusions. Short-term increased protein consumption against the background of carnitine supplementation improves the results of physical development of newborns and indicators of hospitalization and intensive care unit stay. Larger studies and catamnestic observation of children are needed.

Протягом останніх двадцяти років учені з багатьох країн світу здійснюють дослідження для пошуку оптимальної програми харчування дітей перших двох років життя. Особливої уваги потребує нутритивна підтримка новонароджених, які знаходяться в періоді пластичного розвитку. Доведено, що затримка фізичного розвитку в цьому віці асоціюється з негативними наслідками неврологічного прогресу дітей. Особливо актуальним це є для передчасно народжених дітей із низькою масою тіла [1,2].

Показовим щодо неврологічних наслідків є відставання приросту об'єму голови щодо перцентильних кривих, які розроблені на підставі фізіологічного розвитку плодів і малюків першого року життя [3]. Вторинним ефектом, що пов'язаний із пошуками оптимального складу макронутрієнтів у харчуванні, є метаболічне програмування тривалого фізичного розвитку та складу тіла малюків. Експериментальні дослідження надали особливо переконливі докази щодо програмування виникнення ожиріння та пов'язаних із ним неінфекційних захворювань у дорослому віці (цукровий діабет, артеріальна гіпертензія тощо) [4,5]. Зауважимо, що в усіх попередніх дослідженнях вивчали надмірне споживання нутрієнтів здоровими новонародженими, які не мали обмежень або харчувалися з перших годин після народження [5].

Чинні рекомендації щодо стратегії нутритивної підтримки новонароджених у загальній популяції дають змогу отримати задовільні результати. Втім, незважаючи на дотримання рекомендацій щодо харчування новонароджених, відставання в розвитку, пов'язане з нутритивною недостатністю, виявляють у малюків, які потребують тривалої інтенсивної терапії через захворювання перинатального періоду. Про це свідчать звіти відділень інтенсивної терапії новонароджених.

Доведено, що у критично хворих дітей першого року життя короткотривале підвищене споживання білка й енергії сприяє швидшому одужанню [6]. Фактори, що перешкоджають повноцінному харчуванню, добре відомі: порушення внутрішньоклітинної передачі сигналів інсуліну, порушення поглинання глюкози та зниження рівня працездатності мітохондрій під час критичного захворювання. Ці механізми притаманні новонародженим та зумовлюють підвищений катаболізм білків і потребу в додатковій енергії для подолання захворювань [7,8,12].

У багатьох обсерваційних дослідженнях та опитуваннях щодо харчування в недоношених і доношених немовлят, які одержують лікування внаслідок критичних захворювань, показано: призначене і фактично

доставлене споживання нутрієнтів зазвичай нижче за рекомендоване, а кумулятивний дефіцит білка й енергії може становити до 40–45 % протягом усієї госпіталізації [7]. Ці особливості корелюють із тривалістю потреби в штучній вентиляції легень.

Відомо, що під час критичної хвороби деградація білка посилюється. Вивільнення цитокінів, кортизол і гормон росту спричиняють протеоліз скелетних м'язів так, що специфічні амінокислоти можуть бути перенаправлені та використані як субстрати для глюконеогенезу в печінці. Це може відігравати важливу роль у затримці росту немовлят з обмеженими запасами білка та енергії [7]. Загально визнаною стратегією, що спрямована на покращення фізичного розвитку малюків, є забезпечення достатньою кількістю протеїнів у грудному молоці або формулі для годування і доношених, і передчасно народжених дітей. Харчові протеїни забезпечують незамінні амінокислоти для синтезу білка, що необхідний для росту.

Норми споживання протеїну та стратегії підвищення вмісту білка щодо протокольних рекомендацій залишаються предметом наукового пошуку [9]. Передусім проблема актуальна для дітей, які народилися з масою тіла менше ніж 1500 г, і лише обмежене коло досліджень присвячене пошуку оптимального споживання протеїну в доношених дітей [4,10].

Доведено, що підвищене споживання білка з достатнім енергетичним забезпеченням сприяє анаболізму в недоношених немовлят, у новонароджених із хірургічними проблемами та дітей з опіками. Еталонну потребу в споживанні протеїнів доношеними у перший місяць життя, згідно з останнім систематичним оглядом, визначають на рівні в 2,5 г/кг ваги на добу. Втім діти, які мають захворювання перинатального періоду, потребують більшої дотації енергії та протеїну, мають проблеми з харчуванням [11,12].

Ще одна стратегія, що протягом останніх років стала предметом досліджень, – покращення результатів виходжування новонароджених шляхом дотації L-карнітину в програмі нутритивної підтримки. Він відіграє важливу роль в окисненні жирних кислот шляхом полегшення транспортування довголанцюгових жирних кислот через мітохондріальну мембрану. Отримана енергія може сприяти покращенню синтезу протеїнів.

Карнітин – умовно незамінна поживна речовина, що міститься в жіночому молоці, її додають до дитячої формули. Більшість досліджень, що здійснені раніше в недоношених новонароджених, не довели поліпшення результатів лікування малюків, крім збільшеного вмісту карнітину в плазмі крові. Однак останнім часом з'яви-

лися дані щодо позитивної кореляції між споживанням карнітину за розміром головного мозку та фізичним розвитком дітей [13]. Досліджень за участю народжених у строк дітей, які потребували інтенсивної терапії, майже не здійснювали.

Отже, оптимізація нутритивної підтримки доношених новонароджених шляхом підвищеної дотації білка з L-карнітином є перспективним напрямом наукового пошуку в галузі неонатальної інтенсивної терапії.

Мета роботи

Оцінити вплив короткотривалого підвищеного споживання білка доношеними новонародженими та дотації L-карнітину на основні показники ефективності лікування у відділенні інтенсивної терапії.

Матеріали і методи дослідження

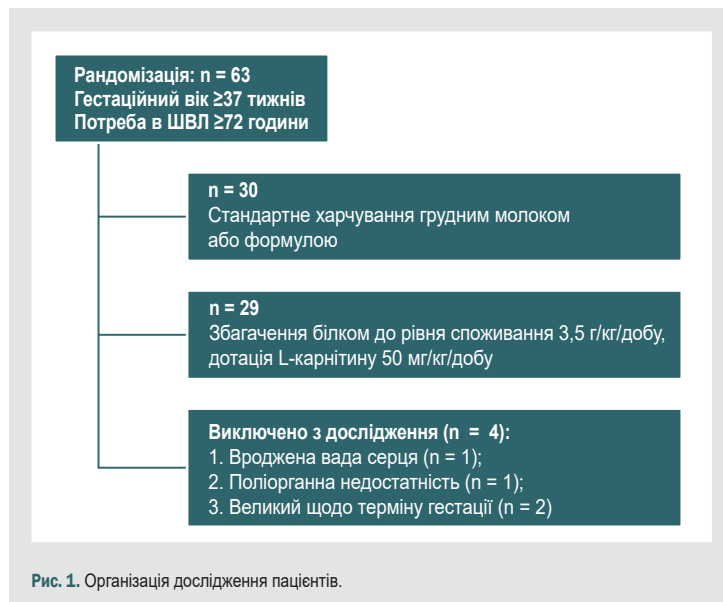
Наша гіпотеза полягала в тому, що раннє призначення підвищеної дотації білка (щодо звичайного споживання) та додавання L-карнітину в програмі харчування доношених новонароджених, які потребують інтенсивної терапії, дасть змогу покращити показники виходжування дітей у стаціонарі.

Дослідження здійснили в відділенні інтенсивної терапії новонароджених третинного рівня КНП «Запорізька обласна дитяча лікарня» ЗОР, що є клінічною базою Запорізького державного медико-фармацевтичного університету. Заплановано проспективне рандомізоване контрольоване дослідження, в яке залучали дітей різних термінів гестації (від 24 до 42 тижнів). Малюків стратифікували на 4 групи за ступенем зрілості. В цій статті проаналізовано дані дітей, народжених у термін від 37 тижнів гестації.

У період із жовтня 2017 року до травня 2020 року обстежили 59 немовлят, які народжені в терміні понад 37 тижнів. Новонароджених транспортували з пологових будинків і госпіталів другого рівня надання допомоги. У першу добу життя надійшли 52 (88 %) малюки, інші – у термін до 36 годин після народження; це не порушувало протокол дослідження. Значуща універсальна вимога для залучення в дослідження – необхідність подовженої штучної вентиляції легень понад 72 години, зумовлена критичними станами, що виникли в перинатальному періоді. Програма інтенсивної терапії призначена відповідно до чинних протоколів і стандартів МОЗ України, а також міжнародних рекомендацій із допомоги новонародженим.

У дослідження не залучали дітей, замалих і завеликих щодо терміну гестації (оцінювали, використовуючи номограми фізичного розвитку плодів Fenton 2013), пацієнтів із вродженими вадами розвитку, які потребували хірургічного лікування, малюків із вродженими порушеннями метаболізму, хромосомними аномаліями, осіб із термінальними стадіями захворювання печінки або нирок, немовлят із гестаційним віком <37 тижнів.

Так, на етапі обстеження залучили 63 дітей, але надалі з дослідження виключили чотирьох малюків: одного – у зв'язку з виявленою вродженою вадою серця з хірургічною корекцією, ще одного – внаслідок



розвитку термінальної поліорганної недостатності; дві дитини після антропометрії визначені як великі щодо терміну гестації (рис. 1).

Зовнішнє дихання у дітей обох груп заміщали штучною вентиляцією легень (ШВЛ) до відновлення рівня свідомості, стабілізації функції серцево-судинної системи та появи ефективного самостійного дихання.

Для вивчення результатів впливу різних стратегій харчування на наслідки лікування в стаціонарі всіх немовлят рандомно поділили на 2 групи за допомогою випадкових чисел, згенерованих у програмі Statistica.

У групу стандартного харчування залучили 30 дітей, які отримували переважно грудне молоко. На початковому етапі надання допомоги дітям призначили зондове харчування, а після відновлення ковтання вони були переведені на годування грудьми або з пляшечки. Об'єм харчування збільшували щодня поступово, користуючись клінічними ознаками толерантності до їжі.

У групі дослідження (29 дітей) призначили дотацію протеїну до рівня споживання 3,5 г/кг/добу. Її здійснили, використавши харчову білкову добавку, що призначена для додавання в грудне молоко або формулу для годування, до індивідуально необхідного рівня. Цей фортифікатор є гідролізатом казеїну, що не містить глютену. Зазвичай її використовують для фортифікації у недоношених дітей.

Фортифікацію починали при ентеральному засвоєнні об'єму 80–90 мл/кг/добу. Необхідну дозу збагачувача розраховували щоденно, додаючи необхідну кількість у грудне молоко або формулу для годування. Для розрахунку використовували усереднені дані щодо вмісту протеїну в грудному молоці жінок, які народили в термін [11], та вмісту білка відповідно до інструкції в разі годування формулою. Зазвичай добову кількість фортифікатора рівномірно розподіляли в усі порції при зондовому годуванні та в 4 порції, якщо діти могли самостійно ковтати. Після виписки зі стаціонара збагачення грудного молока фортифікатором припиняли.

Таблиця 1. Характеристика груп дослідження

Показник, одиниці вимірювання	Стандартне харчування, n = 30	Група збагачення, n = 29	p-рівень
Термін гестації, тижні	38,73 ± 1,26	39,00 ± 1,13	0,3964
Маса тіла при народженні, г	3265,13 ± 366,60	3452,24 ± 413,58	0,0709
Довжина тіла при народженні, см	52,17 ± 2,32	53,16 ± 2,13	0,0938
Обвід голови, см	34,27 ± 1,17	34,69 ± 1,01	0,1427
Хлопчики, n (%)	21 (70,00 %)	18 (62,07 %)	0,5282
Дівчатка, n (%)	9 (30,00 %)	11 (37,93 %)	
Оцінка за шкалою Апгар на першій хвилині, бали	6 (5,00; 7,00)	7 (5,00; 7,00)	0,3641
Оцінка за шкалою Апгар на п'ятій хвилині, бали	6 (7,00; 8,00)	7 (7,00; 8,00)	0,3101
Кесарів розтин, n (%)	5 (16,67 %)	6 (20,69 %)	0,6977
Гіпоксично-ішемічна енцефалопатія, n (%)	26 (86,67 %)	25 (86,21 %)	0,9598
Неонатальний сепсис, n (%)	1 (3,33 %)	2 (6,90 %)	0,5415
Неонатальна аспірація, n (%)	3 (10,00 %)	2 (6,90 %)	0,6752

Додатково використали введення препаратів L-карнітину в добовій дозі 50 мг/кг/добу діючої речовини. Ентеральне введення карнітину починали, коли об'єм харчування становив 90–100 мл/кг/добу. Для цього використовували сироп, який містить L-карнітин. Добову дозу карнітину вводили в три прийоми, додаючи в формулу для харчування або грудне молоко. Парентеральне введення карнітину використали для запобігання накопиченню вторинного дефіциту, оскільки діти протягом майже 10 днів не могли отримувати необхідний для нормального годування ентеральний об'єм. Доки дитина не починала отримувати названий об'єм ентерального харчування, L-карнітин вводили у формі розчину для інфузії, додаючи добову дозу в підготовлену в відділенні суміш рідини й електролітів, яку вводили зазвичай протягом доби з однаковою швидкістю.

Оцінили фізичний розвиток малюків у день народження й на 7, 14, 21, 28 доби життя або в день виписки з лікарні. Для цього виміряли основні антропометричні показники. Процедури вимірювання стандартизовані за рекомендаціями ВООЗ. Два антропометристи виконали вимірювання незалежно один від одного. Вагу визначали з точністю до 5 г на каліброваних електронних вагах. Якщо в результаті вимірювання різниця за вагою перевищувала 50 г, за довжиною – 7 мм, за обводом голови – 5 мм, то обидва співробітники повторювали процедуру.

Результати зіставили з номограмами фізичного розвитку Фентона, номограмами постнатального розвитку новонароджених ВОЗ, здійснили порівняльний аналіз показників за групами. Додатково здійснили комплексне оцінювання соматичного та неврологічного статусу малюків. Біохімічний профіль новонароджених вивчали щотижня. Ефективність дотації L-карнітину оцінювали, вимірюючи плазмову концентрацію вільної речовини на початку дослідження та перед випискою; безпеку навантаження білком досліджували за рівнем фенілаланіну в плазмі крові. Для визначення цих даних застосували метод рідинної хроматографії мас-спектрометрії (LC MS-Agilent 1260 Infinity HPLC System, США).

Статистично результати опрацювали за допомогою комп'ютерних програм Statistica 13.0 (TIBCO Software Inc., ліцензія № JPZ804I382130ARCN10-J) та Microsoft Excel 2013 (ліцензія № 00331-10000-00001-AA404). У тексті й таблицях дані наведено як $M \pm SD$

(середнє арифметичне \pm стандартне відхилення), якщо розподіл даних відповідав закону нормального розподілу, та $Me (Q1; Q3)$ (медіана вибірки з зазначенням інтерквартильного розмаху (верхній (75 %) і нижній (25 %) квантилі)) – при розподілі, що не відповідав закону нормальності. Категоріальні змінні наведені як абсолютна кількість випадків (n) у групі та частота у відсотках (%). Для оцінювання вірогідності різниці абсолютних значень середніх величин між незалежними вибірками використали непараметричні методи статистичного аналізу – критерій Манна–Вітні (U). Рівень $p < 0,05$ визначили як вірогідний у всіх тестах.

Дослідження здійснили відповідно до принципів Гельсінської декларації. Протокол дослідження схвалено локальним етичним комітетом усіх зазначених у роботі установ. Перед залученням дітей у дослідження від усіх батьків одержали письмову інформовану згоду на участь.

Результати

Загалом у дослідження залучили 59 новонароджених: 30 пацієнтів – у групі стандартного харчування (СХ), 29 – у групі збагачення протеїном і карнітином (ГЗ). Характеристика немовлят детально наведені в таблиці 1. Групи дослідження зіставні за гестаційним віком та антропометричними характеристиками дітей при народженні. Виявили значущу різницю розподілу за статтю в кожній групі, оскільки переважали хлопчики (70 % та 62 % відповідно). Діти обох груп мали прояви помірної асфіксії при народженні, яку визначили за шкалою Апгар. Відсоток полог, які проведено шляхом кесаревого розтину, в групах також не відрізнявся: 16,67 % – у групі СХ, 20,69 % – ГЗ. Не виявили відмінностей за діагностованими станами перинатального періоду. Основна проблема – гіпоксично-ішемічна енцефалопатія помірного ступеня (86,67 % і 86,21 %, різниця статистично невірогідна). Немовлят обох груп здебільшого вигодували тільки грудним молоком: 86 % випадків у групі СХ, 90 % – ГЗ ($p = 0,6931$).

Діти обох груп мали статистично зіставні антропометричні характеристики на початку дослідження. Пропорції ваги при народженні та обводу голови немовлят обох статей були в межах 50 % перцентилу. Щодо довжини тіла при народженні обидві когорти мали показники в межах $<90\%$ та $>50\%$ процентилю, статистично зіставні (табл. 1).

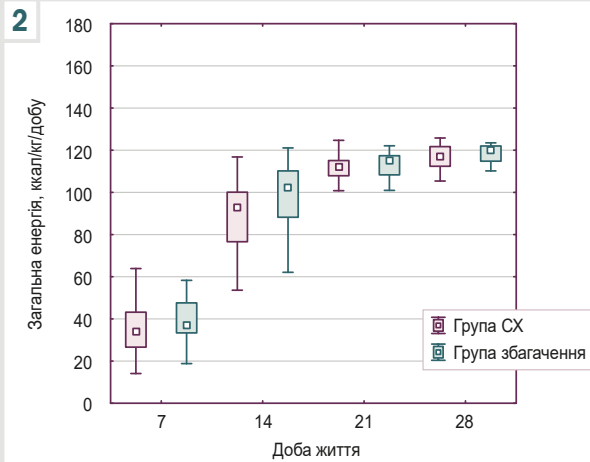


Рис. 2. Загальне споживання енергії в групах протягом лікування.

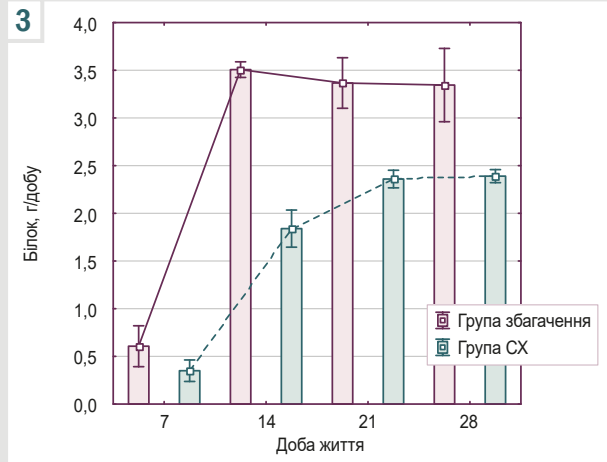


Рис. 3. Загальне споживання протеїнів у групах протягом лікування.

Для забезпечення толерантності до харчового навантаження поступово збільшували щоденний об'єм годування, що в групах наприкінці першого тижня життя становив у ГЗ $141,81 \pm 20,18$ мл/кг/добу, у СХ – $131,87 \pm 30,63$ мл/кг/добу ($p = 0,1256$); на 14 добу – $163,43 \pm 9,46$ мл/кг/добу та $156,12 \pm 13,25$ мл/кг/добу ($p = 0,0748$) відповідно за групами. Ці дані свідчать про хорошу толерантність до засвоєння їжі, а також агресивну стратегію збільшення харчування, що дало змогу здійснювати дотацію білка протягом першого тижня після народження. Збільшення припиняли, коли кількість спожитого харчування за добу становила 150–165 мл/кг. У жодному випадку не здійснювали парентеральне харчування з використанням ліпідних емульсій та амінокислот, відповідно до рекомендацій ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN 2018. Для забезпечення рідиною використовували розчини глюкози, яку вводили парентерально; це забезпечувало метаболічну швидкість споживання 4–6 мг/кг/хв. Загальне споживання білка та калорій, досягнуте в дослідженні, наведено на рис. 2 і 3.

Отже, протягом двох тижнів зафіксували неоднорідність споживання калорій у групах зі значним відхиленням від середніх показників: у групі СХ – $98,00 \pm 16,75$ ккал/кг/добу, ГЗ – $89,9 \pm 16,48$ ккал/кг/добу, $p = 0,0667$. Це зумовлено тим, що деякі діти споживали неповний ентеральний об'єм та отримували дотацію вуглеводних калорій парентерально у формі розчину глюкози. Починаючи з третього тижня життя і надалі, всі малюки споживали рекомендовану кількість калорій, що становила $111,83 \pm 7,19$ ккал/кг/добу та $113,44 \pm 5,61$ ккал/кг/добу ($p = 0,0667$) у групах СХ і ГЗ відповідно. Зауважимо, що однакову кількість калорій діти одержали на тлі різного співвідношення білок / калорії. Так, кількість небілкових калорій, яку діти споживали на 1 г харчового білка, статистично достовірно відрізнялася в групах на 3 тижні виходжування. Кількість спожитих небілкових калорій для ГЗ становила $28,68$ (27,50; 29,80) ккал/кг/добу, а в групі СХ – $42,37$ (41,60; 38,00) ккал/кг/добу ($U = 28,0000$,

$p = 0,000001$). Відповідно, це забезпечувало рівень споживання білка та калорій у групі стандартного харчування на рівні співвідношення 2,0 г білка на 100 ккал, що є стандартною рекомендацією [10]. Запропонована стратегія дала змогу забезпечити співвідношення в ГЗ на рівні 3,0 г / 100 ккал.

Безпосередньо споживання протеїну збільшувалося щотижня в обох групах до часу виписки зі стаціонара (рис. 3).

За даними, що наведені на діаграмах, в групі збагачення, починаючи з 7 доби життя, вдалося забезпечити дотацію білка на рівні майже 3,5 г/кг/добу. Це відповідає фазі «відновлення» для критичних захворювань перинатального періоду, а загальна доза білка сягала максимально рекомендованої для споживання [7]. При цьому зафіксували низький рівень відхилення від середнього; це досягнуто завдяки щоденному комп'ютерному розрахунку програми харчування малюків. Так, на 14 та 21 доби діти ГЗ споживали протеїни у дозі 3,5 (3,4; 3,6) г/кг/добу та 3,5 (3,5; 3,5) г/кг/добу відповідно. Загалом спожитий білок складався з протеїнів грудного молока або формули – 2,3 (2,3; 2,5) г/кг/добу та 2,4 (2,3; 2,6) г/кг/добу відповідно. Інший білок забезпечений фортифікатором. Загалом дотримано дизайн дослідження, а загальна кількість протеїнів виявилася вищою, ніж рекомендовані рівні споживання доношеними дітьми. Споживання білка малюками при стандартному харчуванні на 14 та 21 добу становило в середньому 2,35 (2,30; 2,50) г/кг/добу та 2,40 (2,30; 2,50) г/кг/добу. Статистично харчовий протеїн не відрізнявся в групах дослідження, а за рівнем споживання в групі СХ новонароджені отримували кількість протеїнів, що відповідає чинним рекомендаціям [7, 11]. В обох групах на 7 добу лікування діти не отримували достатньої кількості білків через труднощі з толерантністю до харчування у найбільш нестабільних малюків. Це підкреслює актуальність проблеми мальнутриції навіть у вчасно народжених дітей у відділеннях інтенсивної терапії. Порівнюючи споживання загальної кількості білків у стабільну фазу

4

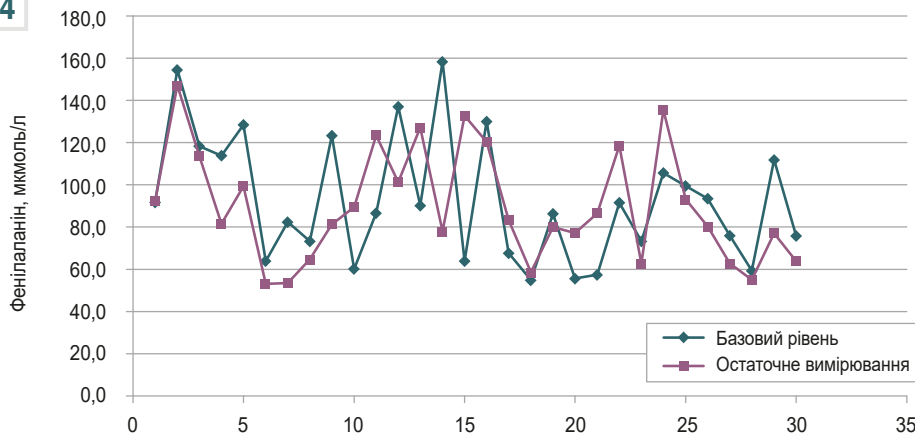


Рис. 4. Динаміка змін рівня фенілаланіну в групі збагачення.

5

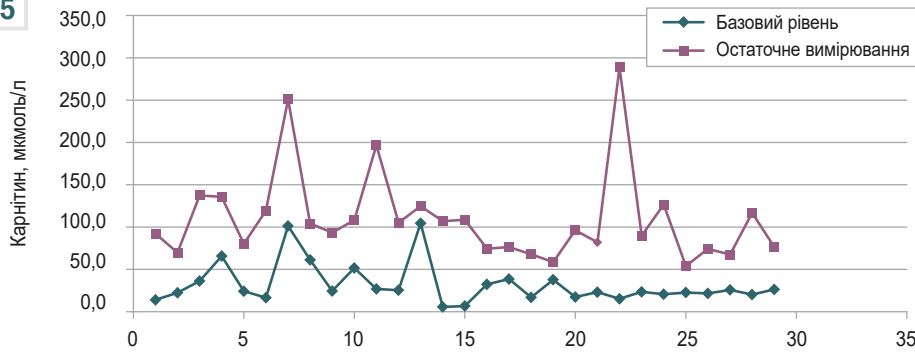


Рис. 5. Рівень вільного карнітину в групі збагачення.

6

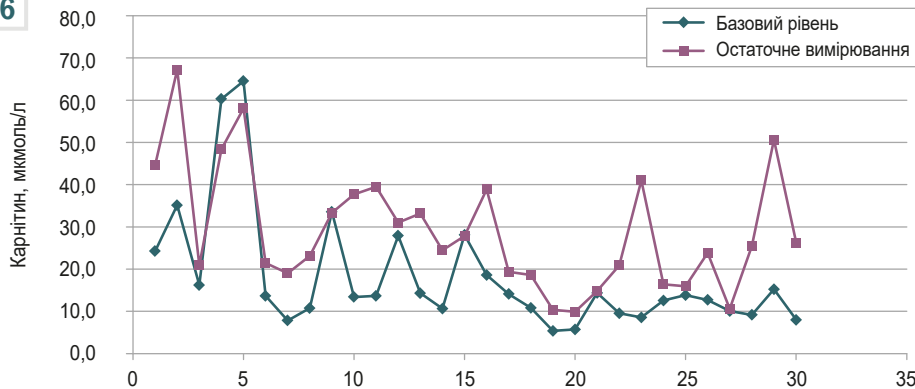


Рис. 6. Рівень вільного карнітину в групі стандартного харчування.

виходжування, зауважимо, що виявили статистично значущу різницю, а саме 3,50 (3,40; 3,60) г/кг/добу проти 2,35 (2,30; 2,50) г/кг/добу ($U = 80,0000$, $p = 0,0001$) на 14 добу життя; 3,5 (3,5; 3,5) г/кг/добу проти 2,4 (2,3; 2,5) г/кг/добу ($U = 50,0000$, $p = 0,0001$) – на 21 день.

Підвищення споживання протеїнів не призводило до негативних наслідків. На це вказує задовільна толерантність до амінокислотного навантаження. Толерантність вивчали за рівнем фенілаланіну плазми крові. Динаміку зміни базового рівня та наприкінці лікування наведено на рис. 4.

Міжнародна база даних, в яку надходять результати зі 133 лабораторій, повідомляє про середній граничний рівень для фенілаланіну 130 мкмоль/л (діапазон значень – 65–234 мкмоль/л); рівні фенілаланіну

в крові необхідно підтримувати в усіх пацієнтів у межах 120–360 мкмоль/л. У нашому дослідженні середній рівень фенілаланіну в плазмі крові перед початком фортифікації становив 91,18 (65,56; 112,61) мкмоль/л, наприкінці обстеження – 88,07 (62,49; 112,40) мкмоль/л ($U = 429,0000$; $p = 0,7618$). У жодного малюка не виявили перевищення порогового рівня цієї амінокислоти, а отже використання запропонованої стратегії безпечне.

Крім того, досліджували рівень сечовини плазми, який протягом усього дослідження не перевищував референтні показники в усіх малюків. Так, наприкінці першого тижня перебування у стаціонарі сечовина плазми у групі СХ становила 6,39 (3,54; 9,73) ммоль/л, у ГЗ – 4,92 (3,65; 7,10) ммоль/л ($U = 372,0000$, $p = 0,4598$). Перед випискою на третьому тижні показники також

Таблиця 2. Показники фізичного розвитку залежно від статі обстежених, М ± m

Показник, одиниці вимірювання	Стандартне харчування, n = 30 ¹	Група збагачення, n = 29 ¹	p-рівень
Хлопці, маса тіла, г			
При народженні	3323,05 ± 363,38	3442,50 ± 397,59	0,3335
7 доба	3320,71 ± 394,86	3517,28 ± 401,07	0,1324
14 доба або виписка	3486,91 ± 417,41	3781,35 ± 393,54	0,0330
21 доба або виписка ²	3654,17 ± 451,05	4009,30 ± 396,12	0,0475
28 доба або виписка ⁴	3936,92 ± 555,66	–	–
Дівчата, маса тіла, г			
При народженні	3130,00 ± 357,39	3468,18 ± 457,98	0,0874
7 доба	2998,33 ± 408,34	3592,55 ± 427,59	0,0055
14 доба або виписка	3220,00 ± 310,56	3738,82 ± 396,10	0,0050
21 доба або виписка ³	3330,63 ± 392,00	3924,50 ± 496,08	0,0139
Хлопці, довжина тіла, см			
При народженні	52,71 ± 1,52	53,14 ± 2,13	0,4733
7 доба	53,00 ± 1,48	53,42 ± 1,91	0,4418
14 доба або виписка	53,55 ± 1,73	55,35 ± 3,32	0,0413
21 доба або виписка ²	54,11 ± 1,57	55,55 ± 1,17	0,0177
28 доба або виписка ⁴	54,57 ± 1,83	–	–
Дівчата, довжина тіла, см			
При народженні	50,89 ± 3,33	53,18 ± 2,23	0,0825
7 доба	51,22 ± 3,77	54,46 ± 1,40	0,0165
14 доба або виписка	51,78 ± 3,11	55,23 ± 1,86	0,0065
21 доба або виписка ³	52,19 ± 2,45	56,10 ± 1,66	0,0010
Хлопці, обвід голови, см			
При народженні	34,55 ± 1,12	34,81 ± 0,86	0,4303
7 доба	35,00 ± 0,95	35,19 ± 0,94	0,5259
14 доба або виписка	35,21 ± 1,06	35,88 ± 0,99	0,0540
21 доба або виписка ²	35,89 ± 1,30	36,89 ± 0,82	0,0464
28 доба або виписка ⁴	36,19 ± 1,33	–	–
Дівчата, обвід голови, см			
При народженні	33,61 ± 1,05	34,50 ± 1,25	0,1065
7 доба	33,56 ± 0,85	34,95 ± 1,21	0,0091
14 доба або виписка	34,17 ± 1,22	35,59 ± 1,04	0,0116
21 доба або виписка ³	34,81 ± 1,44	35,80 ± 0,92	0,0953

¹: кількість дітей з 1 до 14 доби спостереження; ²: кількість спостережень для хлопців на 21 добу становила 18 у групі СХ, 10 – у ГЗ; ³: кількість спостережень для дівчат на 21 добу становила 8 у групі СХ, 10 – у ГЗ; ⁴: кількість спостережень для хлопців на 28 добу становила 14 у групі СХ, 5 – у ГЗ.

не мали статистичної різниці: СХ – 3,17 (2,30; 4,19) ммоль/л, ГЗ – 4,95 (4,10; 5,20) ммоль/л ($U = 326,0000$, $p = 0,2044$).

Рівень креатиніну в обох групах статистично не відрізнявся на всіх етапах, відповідав нормальним референтним значенням відповідно до віку. Діти не мали ознак гострого ураження нирок за класифікацією KDIGO (2012); рівень діурезу достатній на всіх етапах обстеження.

Дотацію карнітину контролювали за рівнем вільної речовини на початку дослідження та в кінці перевірки гіпотези. Рівні вільного карнітину значно підвищені в дітей групи фортифікації. Так, за останніми даними, рівень вільного карнітину в середньому становив 96,18 (76,33; 119,32) мкмоль/л, а в перших зразках у цій групі – 24,17 (20,22; 36,29) мкмоль/л, різниця статистично вірогідна ($U = 35,0000$; $p = 0,0001$) (рис. 5).

У групі стандартного харчування різниця між вихідними даними та результатами, що встановили наприкінці дослідження, щодо рівнів вільного карнітину також статистично достовірна. Це зумовлено надходженням карнітину з молоком матері або з формулою для харчування, що також містить цей компонент (рис. 6). Так, рівень вільного карнітину на

початку дослідження становив 13,67 (10,08; 18,61) мкмоль/л, наприкінці – 24,97 (18,99; 38,85) мкмоль/л ($U = 202,0000$, $p = 0,0002$).

Зауважимо, що зовнішня додаткова дотація карнітину в дозі 50 мг/кг/добу призводить до підвищення рівня плазмового карнітину майже в 3,5 раза.

Зафіксували значущі відмінності за збільшенням маси тіла між групами обстежених (табл. 2). Орієнтуючись на узагальнені дані (не враховуючи стать, табл. 3), встановили: немовлята в групі СХ спочатку втратили більше маси тіла, і її відновлення було повільнішим порівняно з малюками із ГЗ. Так, у середньому відновлення маси тіла при народженні в дітей із групи дотації протеїну зафіксували майже вдвічі раніше порівняно з пацієнтами із групи СХ: 5,0 (1,0; 8,0) дня проти 10,0 (8,0; 16,0) дня відповідно ($U = 173,0000$, $p = 0,0002$). Зазначимо, що це відбулося на тлі однакових об'ємів харчування. Крім того, в дітей із групи збагачення визначили статистично істотніше збільшення маси тіла: 24,76 (14,20; 30,36) г/кг/добу проти 18,62 (12,50; 24,30) г/кг/добу ($U = 263,0000$, $p = 0,0237$) (табл. 4). Відповідно, новонароджені із ГЗ менший час перебували в відділенні інтенсивної терапії та в стаціонарі. Так, у групі підвищеного споживання

Таблиця 3. Узагальнені показники фізичного розвитку, М ± m

Показник, одиниці вимірювання	Стандартне харчування, n = 30 ¹	Група збагачення, n = 29 ¹	p-рівень
Маса тіла, г			
При народженні	3265,13 ± 366,60	3452,24 ± 413,58	0,0709
7 доба	3224,00 ± 419,64	3545,83 ± 405,39	0,0041
14 доба або виписка	3406,83 ± 402,79	3764,64 ± 687,73	0,0011
21 доба або виписка ²	3554,62 ± 452,28	3966,90 ± 439,08	0,0033
28 доба або виписка ³	3814,74 ± 546,99	–	–
Довжина тіла, см			
При народженні	52,17 ± 2,32	53,16 ± 2,13	0,0938
7 доба	52,47 ± 2,47	53,81 ± 1,78	0,0199
14 доба або виписка	53,00 ± 2,35	55,30 ± 2,79	0,0014
21 доба або виписка ²	53,52 ± 2,04	55,83 ± 1,43	0,0001
28 доба або виписка ³	54,10 ± 2,10	57,29 ± 1,25	0,0009
Обвід голови, см			
При народженні	34,27 ± 1,17	34,69 ± 1,01	0,1427
7 доба	34,57 ± 1,13	35,10 ± 1,04	0,0624
14 доба або виписка	34,90 ± 1,19	35,77 ± 1,00	0,0042
21 доба або виписка ²	35,56 ± 1,41	36,32 ± 1,02	0,0526
28 доба або виписка ³	35,47 ± 2,61	–	–

¹: кількість дітей із 1 до 14 доби спостереження; ²: кількість спостережень на 21 добу становила 26 у групі СХ, 20 – у ГЗ; ³: кількість спостережень на 28 добу становила 20 у групі СХ, 7 – у ГЗ n = 7.

Таблиця 4. Результати виходжування у групах дослідження

Показник, одиниці вимірювання	Стандартне харчування, n = 30	Група збагачення, n = 29	p-рівень	U
День відновлення ваги при народженні	10,0 (8,0; 16,0)	5,0 (1,0; 8,0)	0,0002	173,00
Збільшення ваги, г/кг/добу	18,62 (12,50; 24,30)	24,76 (14,20; 30,36)	0,0237	263,00
Тривалість ШВЛ, дні	7,5 (5,0; 10,0)	6,0 (4,0; 7,0)	0,0069	258,00
Тривалість перебування у ВАІТН, ліжко-дні	12,0 (11,0; 16,0)	10,0 (8,0; 12,0)	0,0024	235,50
Тривалість перебування у стаціонарі, ліжко-дні	26,5 (22,0; 31,0)	21,0 (19,0; 27,0)	0,0109	267,00

білка лише 7 (24,14 %) дітей залишилися на лікуванні після 23 доби, а з групи стандартного харчування – 15 (50 %) малюків. Враховуючи це, порівняльний аналіз фізичного розвитку після 21 доби життя не доцільний.

Краще відновлення маси тіла зафіксували в дівчат, у яких уже на сьому добу встановили статистичну значущу різницю за цим показником. У хлопців на сьому добу життя не виявили статистично значущої різниці за масою тіла. Аналогічні тенденції фізичного розвитку встановили за показниками довжини тіла та обводу голови (табл. 2). Починаючи з другого тижня виходжування дітей у стаціонарі, не визначали різницю за фізичним розвитком залежно від статі. У дітей із ГЗ незалежно від статі спостерігали статистично достовірно краще збільшення маси, довжини тіла й обводу голови. Проаналізувавши середні значення показників фізичного розвитку малюків за допомогою діаграм кривих Фентона, що адаптовані до 50 тижня скорегованого віку, виявили паралельний характер збільшення маси тіла й обводу голови в малюків із ГЗ, починаючи від першого тижня життя. Для новонароджених групи стандартного годування спостерігали низхідний характер цих параметрів від народження до сьомого дня життя. Втім, надалі напрямок графіка зростання змінився, набув висхідного характеру, паралельно кривій, що відповідала 50 % перцентилію.

За даними, що наведені в таблиці 3, відмінності фізичного розвитку малюків стосувалися передусім маси та довжини тіла. Збільшення обводу голови не мало статистичної значущої різниці у групах, відпові-

дало кривій, що мала висхідний характер, паралельно 50 % перцентилію.

Крім загальних позитивних результатів застосування запропонованої стратегії харчування дітей у відділенні інтенсивної терапії, зауважимо: коротший період перебування у стаціонарі пов'язаний із меншою тривалістю механічної вентиляції легень. Так, діти з групи збагачення потребували ШВЛ протягом 6,0 (4,0; 7,0) дня. У разі стандартної нутритивної підтримки потреба в протезуванні дихання подовжувалася до 7,5 (5,0; 10,0) дня, різниця статистично вірогідна (U = 258,00, p = 0,0069).

Обговорення

У результаті дослідження виявили, що короткотривале споживання білка в поєднанні з зовнішньою дотацією карнітину сприяє покращенню фізичного розвитку доношених новонароджених, які перебували на лікуванні в відділенні інтенсивної терапії. Проаналізували 790 антропометричних параметрів 59 малюків (маса тіла, довжина тіла й обвід голови), які визначали щотижня від народження до виписки зі стаціонара. Порівнявши одержані дані фізичного розвитку новонароджених із номограмами росту плодів Фентона та ВООЗ, встановили істотні відмінності за довжиною тіла [9]. На відміну від маси тіла й обводу голови, які відповідали межах 50 % перцентилію, довжина тіла в усіх дітей виявилась непропорційно більшою, визначена на межі 90 % перцентилію.

Вважаємо, що антропометричні показники та постнатальний фізичний розвиток мають залежність від географічного регіону, національності дітей та охоплює певну популяцію. Так, Фентон розробляв номограми на підставі даних, що отримані для жителів Канади та Сполучених Штатів Америки.

У 2015 році опубліковано результати роботи INTERGROWTH-21st. Це багаточентрове дослідження, спрямоване на розроблення нового стандарту маси тіла новонароджених, враховуючи відмінності, визначені в різних країнах [15]. Порівняно з діаграмами Фентона, діаграми INTERGROWTH-21st мають тенденцію до значної ідентифікації немовлят, малих щодо терміну гестації при народженні. Отже, ідеального інструменту оцінювання антропометричних показників, на жаль, досі немає. Можливим перспективним науковим напрямом буде вивчення когорти дітей, які народжуються в Україні або в Східній Європі.

Вивченню дотації білків у ранньому дитинстві та в періоді новонародженості присвячено чимало публікацій, що характеризуються різними ступенями доказовості. Зазвичай ці дослідження охоплюють когорту дітей із масою тіла менше ніж 1500 г. Дизайн багатьох досліджень однаковий: підвищену кількість протеїну досягають, додаючи білковий фортифікатор до грудного молока, або використовують формулу з підвищеним вмістом білка на 100 г рідкого продукту.

У дослідженні В. Koletzko et al. вивчали вплив годування дітей формулою з підвищеним вмістом протеїнів порівняно зі стандартними сумішами, вміст протеїнів у яких близький до такого в грудному молоці [10]. Априорі відомо, що грудне молоко, яке містить менше білків, знижує ризик діабету та ожиріння, але спричиняє повільніше збільшення маси тіла. Високий вміст білка становив 2,90 г білка/100 ккал, подібний до грудного молока – 1,77 г білка/100 ккал. Це дослідження починалося в неонатальному періоді та тривало до 8 років. Автори вивчали індекс маси тіла (ІМТ) та склад тіла дітей. Порівняно з дітьми, яких годували грудьми, діти, яких годували сумішшю з більшим вмістом білка, мали значно вищі рівні ІМТ та z-показники ІМТ; діти групи з низьким вмістом білка не відрізнялися від обстежених, які були на грудному вигодовуванні [10].

У нашому дослідженні діти споживали кількість білка, що подібна до дослідженої В. Koletzko et al. [10]. Загалом зафіксовано кращі показники фізичного розвитку дітей і визначені сприятливі кінцеві моделі перебування у стаціонарі. Після виписки діти отримували стандартне, не фортифіковане молоко або звичайну формулу.

Зауважимо, що в дослідженні В. Koletzko et al. залучали здорових доношених дітей. На відміну від цього, ми вивчали споживання протеїнів критично хворими малюками. У результаті роботи визначили співвідношення утилізації енергії на 1 г спожитих протеїнів: у групі збагачення – 28,68 ккал/кг/добу, у групі стандартного харчування – 42,37 ккал/кг/добу. Ці результати, встановлені для ентерального харчування, майже відповідають межах, що рекомендовані ESPGHAN-2021 для критично хворих новонароджених. Втім, зазначимо, що це споживання в межах запасу

енергії 30–40 ккал на 1 г білка не є точно визначеним, може коливатися в окремих випадках. У випадках парентерального харчування для оптимального використання білка рекомендовано споживання на рівні >25 ккал/г амінокислот [7]. Загальна кількість протеїнів, що споживали діти в нашому дослідженні, хоч і вірогідно відрізнялась у групах, але відповідала межах, що рекомендовані ESPGHAN для критично хворих новонароджених.

Вивчення можливих ефектів застосування L-карнітинової дотації в новонароджених почали наприкінці 1990-х років. Вивчали передусім результати у передчасно народжених із низькою вагою. Очікували, що при стандартному годуванні дотація карнітину запобігатиме затримці фізичного розвитку (сприятиме кращому збільшенню маси тіла). Раніше доведено, що позитивно на збільшення маси тіла це не впливає, зумовлюючи тільки підвищення вільного та зв'язаного карнітину в малюків. Однак дослідження останніх років показали позитивний кореляційний зв'язок між рівнями карнітину, фізичним розвитком і масою головного мозку [13, 14]. Визначено позитивний вплив карнітину при тривалому парентеральному харчуванні, зокрема дітей, які народилися в строк.

У нашому дослідженні діти обох груп мали обмежені можливості щодо ентерального харчування протягом перших двох тижнів, отже не отримували дотації карнітину з молоком матері на необхідному рівні. Відповідно, це збільшувало ризики вторинного дефіциту карнітину.

Зауважимо, що референтні значення вмісту вільного карнітину в новонароджених різняться. Є дані (Н. Снасе), що нормальний рівень вільного карнітину в доношених становить $46,41 \pm 20,73$ мкмоль/л. Інші автори визначили граничні показники вільного карнітину в межах 20–26 мкмоль/л; вони можуть змінюватися протягом першого місяця життя. Отже, відомості, що отримані в останні роки, різняться. В одному обсерваційному дослідженні повідомляли, що гіпоксично-ішемічна енцефалопатія (ГІЕ) – доведений фактор ризику вторинної карнітинової недостатності. В групі дітей з ГІЕ встановили статистично нижчий рівень карнітину порівняно зі здоровими ($13,2 \pm 6,8$ мкмоль/л). В цій роботі визначили вірогідно вищі рівні вільного карнітину в доношених малюків на тлі дотації екзогенного продукту, діти мали кращі показники фізичного розвитку, якщо додатково одержували білок.

Використання моделі логістичної регресії дасть змогу вивчити вагомість впливу обох компонентів дизайну.

Результати, що ми одержали, обмежені через відсутність точних даних щодо споживання білка при прямому грудному вигодовуванні. Кращі результати можна отримати шляхом вимірювання вмісту макроелементів грудного молока кожної жінки та здійснення індивідуальної фортифікації. Для отримання вірогідніших результатів використали найкращу наукову літературу, що доступна, для оцінювання середнього складу жіночого молока [11, 15]. Щоденний розрахунок споживання макронутрієнтів і калорій здійснювали за допомогою комп'ютерних програм.

Висновки

1. Збільшене споживання білка та дотація L-карнітину з першого тижня життя доношеними новонародженими, які потребують інтенсивної терапії, супроводжується меншою втратою ваги та її швидким відновленням порівняно з дітьми із групи стандартного годування. Загальне споживання білків відповідало межам, що наведені в сучасних рекомендаціях для годування критично хворих новонароджених.

2. Добове збільшення маси тіла при короткотривалому підвищеному споживанні протеїнів виявилось статистично істотнішим порівняно з таким у малюків, які перебували на стандартному вигодовуванні. Підвищене споживання протеїнів виявилось безпечним.

3. Діти, які отримували збагачення молока або формули для годування в поєднанні з дотацією карнітину, достовірно менше перебували на лікуванні в стаціонарі. Це є перспективним напрямом покращення результатів лікування новонароджених у відділеннях інтенсивної терапії.

Перспективи подальших досліджень полягають в організації дослідження з більшою групою новонароджених, наступним катаместичним оцінюванням фізичного, неврологічного розвитку, а також вивчення впливу дотації протеїну на склад тіла у ранньому дитинстві.

Фінансування

Дослідження здійснене в рамках НДР Запорізького державного медичного університету: «Оптимізація діагностики та інтенсивної терапії поліетіологічних уражень головного мозку, шлунково-кишкового тракту та нирок у новонароджених та дітей старшого віку», держреєстрації № 0118U007142 (2018–2022).

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 14.09.2023

Після доопрацювання / Revised: 07.11.2023

Схвалено до друку / Accepted: 10.11.2023

Відомості про авторів:

Анікін І. О., канд. мед. наук, доцент каф. анестезіології та інтенсивної терапії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-1125-0123

Стрижак Л. С., асистент каф. анестезіології та інтенсивної терапії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-4204-2159

Information about authors:

Anikin I. O., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Anesthesiology and Intensive Care, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Stryzhak L. S., MD, Assistant of the Department of Anesthesiology and Intensive Care, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

References

1. Mabhandi, T., Ramdin, T., Ballot, D. E. (2019). Growth of extremely low birth weight infants at a tertiary hospital in a middle-income country. *BMC pediatrics*, 19(1), 231. <https://doi.org/10.1186/s12887-019-1568-6>

- Hee Chung, E., Chou, J., & Brown, K. A. (2020). Neurodevelopmental outcomes of preterm infants: a recent literature review. *Translational pediatrics*, 9(Suppl 1), S3-S8. <https://doi.org/10.21037/tp.2019.09.10>
- Chen, Z., Xiong, C., Liu, H., Duan, J., Kang, C., Yao, C., Chen, K., Chen, Y., Liu, Y., Liu, M., & Zhou, A. (2022). Impact of early term and late preterm birth on infants' neurodevelopment: evidence from a cohort study in Wuhan, China. *BMC pediatrics*, 22(1), 251. <https://doi.org/10.1186/s12887-022-03312-3>
- Koletzko, B., Godfrey, K. M., Poston, L., Szajewska, H., van Goudoever, J. B., de Waard, M., Brands, B., Grivell, R. M., Deussen, A. R., Dodd, J. M., Patro-Golab, B., Zalewski, B. M., & EarlyNutrition Project Systematic Review Group (2019). Nutrition During Pregnancy, Lactation and Early Childhood and its Implications for Maternal and Long-Term Child Health: The Early Nutrition Project Recommendations. *Annals of nutrition & metabolism*, 74(2), 93-106. <https://doi.org/10.1159/000496471>
- Watchmaker, B., Boyd, B., & Dugas, L. R. (2020). Newborn feeding recommendations and practices increase the risk of development of overweight and obesity. *BMC pediatrics*, 20(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s12887-020-1982-9>
- Misirlioglu, M., Yildizdas, D., Ekinci, F., Horoz, Ö. Ö., Özkale, Y., Özkale, M., Yönten, A., Arslan, İ., & Tümçör, G. (2023). The Effects of Protein Intake on Clinical Outcome in Pediatric Intensive Care Units. *Turkish archives of pediatrics*, 58(1), 68-74. <https://doi.org/10.5152/TurkArchPediatri.2022.22108>
- Moltu, S. J., Bronsky, J., Embleton, N., Gerasimidis, K., Indrio, F., Köglmeier, J., de Koning, B., Lapillonne, A., Norsa, L., Verduci, E., Domellöf, M., & ESPGHAN Committee on Nutrition (2021). Nutritional Management of the Critically Ill Neonate: A Position Paper of the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 73(2), 274-289. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000003076>
- Fu, M., Song, W., Yu, G., Yu, Y., & Yang, Q. (2023). Risk factors for length of NICU stay of newborns: A systematic review. *Frontiers in pediatrics*, 11, 1121406. <https://doi.org/10.3389/fped.2023.1121406>
- Fenton, T. R., Al-Wassia, H., Premji, S. S., & Sauve, R. S. (2020). Higher versus lower protein intake in formula-fed low birth weight infants. *The Cochrane database of systematic reviews*, 6(6), CD003959. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003959.pub4>
- Koletzko, B., Demmelmair, H., Grote, V., & Totzauer, M. (2019). Optimized protein intakes in term infants support physiological growth and promote long-term health. *Seminars in perinatology*, 43(7), 151153. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2019.06.001>
- Richter, M., Baerlocher, K., Bauer, J. M., Elmadfa, I., Heseker, H., Leschik-Bonnet, E., Stangl, G., Volkert, D., Stehle, P., & on behalf of the German Nutrition Society (DGE) (2019). Revised Reference Values for the Intake of Protein. *Annals of nutrition & metabolism*, 74(3), 242-250. <https://doi.org/10.1159/000499374>
- Yalçın, N., Kaşıkçı, M., Çelik, H. T., Demirkan, K., Yiğit, Ş., & Yurdakök, M. (2023). Development and validation of machine learning-based clinical decision support tool for identifying malnutrition in NICU patients. *Scientific reports*, 13(1), 5227. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32570-z>
- Manninen, S., Silvennoinen, S., Bendel, P., Lankinen, M., Schwab, U. S., & Sankilampi, U. (2022). Carnitine Intake and Serum Levels Associate Positively with Postnatal Growth and Brain Size at Term in Very Preterm Infants. *Nutrients*, 14(22), 4725. <https://doi.org/10.3390/nu14224725>
- Crefcoeur, L. L., de Sain-van der Velden, M. G. M., Ferdinandusse, S., Langeveld, M., Maase, R., Vaz, F. M., Visser, G., Wanders, R. J. A., Wijburg, F. A., Verschoof-Puite, R. K., & Schielen, P. C. J. I. (2020). Neonatal carnitine concentrations in relation to gestational age and weight. *JIMD reports*, 56(1), 95-104. <https://doi.org/10.1002/jmd2.12162>
- Tuzun, F., Yucesoy, E., Baysal, B., Kumral, A., Duman, N., & Ozkan, H. (2018). Comparison of INTERGROWTH-21 and Fenton growth standards to assess size at birth and extrauterine growth in very preterm infants. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine*, 31(17), 2252-2257. <https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1339270>

Диференційна діагностика первинних і метастатичних карцином яєчників

Л. М. Захарцева¹*, О. П. Манжура^{1,3,B,D,E}, І. Ю. Ващенко^{1,B,C,D}, Є. В. Майстренко^{1,B,C},
О. М. Кравчук^{1,B,C}, К. М. Шатрова^{1,3,C,E}, О. Г. Рудницька^{1,2,C,E}

¹КНП «Київський міський клінічний онкологічний центр», Україна, ²Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна, ³Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ

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

Пухлини яєчників становлять 3,4 % випадків у структурі онкологічної захворюваності жінок у світі. Яєчник також є частим органом-мішенню для метастазів карциноми з інших органів. Диференційна діагностика між первинною карциномою та метастазом часто доволі складна.

Мета роботи – висвітлити питання щодо морфологічної та імуногістохімічної диференційної діагностики первинних карцином яєчника і метастазів карциноми різних органів у яєчник.

Матеріали та методи. Проаналізували дані клінічного та патологістологічного досліджень 381 хворого. Парафінові зрізи для патологістологічних досліджень забарвлювали гематоксином та еозином за загальноприйнятою методикою. У 161 випадку здійснили імуногістохімічне дослідження з використанням панелі антитіл: до цитокератинів, рецепторів естрогену, прогестерону, CA125, TTF1, Vimentin, CDX2, Villin, Chromogranin A, Synaptophysin, CD56, GATA3, p53, Inhibin A, FOXL-2, PAX-8, Ki-67. Препарати дослідили й проаналізували за допомогою мікроскопа Axioskop 40 (Zeiss) з фотокамерою AxioCam MRc (Zeiss).

Результати. На великому власному клініко-операційному матеріалі вивчали ключові питання щодо диференційної діагностики первинних і метастатичних карцином яєчників, застосування для верифікації адекватної панелі імуногістохімічних антитіл. За результатами власних досліджень за період із 2019 до 2023 року, наведено дані щодо частоти, з якою виявляли різні гістологічні варіанти карцином яєчника та метастазів у яєчник карцином інших органів, а також основні морфологічні, імуногістохімічні показники для практичного застосування в роботі патологоанатома під час верифікації пухлин яєчників. Крім того, наведено приклад формування панелі антитіл, враховуючи клінічні та морфологічні показники, на конкретному клінічному випадку з власної практики.

Висновки. Метастази карциноми інших органів у яєчники становлять половину всіх випадків, що за морфологічною будовою потребують імуногістохімічного дослідження. Найчастіше виявляють метастази раку молочної залози та кишки. Діагностика саме метастатичної карциноми кишки є найскладнішою, оскільки часто рак кишки не має чіткої клінічної картини. Під час диференційної діагностики первинних і метастатичних пухлин яєчників важливу роль відіграє комплексний підхід до аналізу клініки, мікроскопічної будови пухлини та навколишньої тканини, а також, враховуючи ці дані, формування панелі антитіл. Наведено перелік антитіл, які в нашій роботі показали більшу ефективність.

Ключові слова:

карцинома яєчника, метастаз карциноми в яєчник, диференційна діагностика.

Патологія. 2023.

Т. 20, № 3(59).
С. 281-288

*E-mail:

lmzakhartseva@gmail.com

Differential diagnosis of primary and metastatic ovarian carcinomas

L. M. Zakhartseva, O. P. Manzhura, I. Yu. Vashchenko, Ye. V. Maistrenko,
O. M. Kravchuk, K. M. Shatrova, O. H. Rudnytska

Ovarian tumors constitute 3.4 % of the structure of oncological diseases in women worldwide. However, the ovaries are also a common target for metastasis of carcinoma from other organs. Conducting differential diagnosis between primary carcinoma and metastasis is often challenging.

The aim of this study is to highlight the issues of morphological and immunohistochemical differential diagnosis of primary ovarian carcinomas and metastases from carcinomas of various organs to the ovaries.

Materials and methods. Data analysis of clinical and pathohistological studies of 381 patients. Paraffin sections for pathohistological studies were stained with hematoxylin and eosin using standard methodology. Immunohistochemical studies were conducted in 161 cases using a panel of antibodies: cytokeratins, estrogen receptors, progesterone receptors, CA125, TTF1, Vimentin, CDX2, Villin, Chromogranin A, Synaptophysin, CD56, GATA, p53, Inhibin A, FOXL-2, PAX-8, Ki-67. The specimens were examined and analyzed using the Axioskop 40 microscope (Zeiss) with the AxioCam MRc camera (Zeiss).

Results. The article discusses key issues of differential diagnosis of primary and metastatic ovarian carcinomas based on a large clinical and operational material. The application of an adequate panel of immunohistochemical antibodies for verification is considered. The results of the frequency of occurrence of different histological variants of ovarian carcinomas and metastases to the ovaries from carcinomas of other organs are provided based on our own research from 2019 to 2023. The main morphological and immunohistochemical indicators for practical use in the work of a pathologist in the verification of ovarian tumors are presented. An example of forming an antibody panel, taking into account clinical and morphological indicators in a specific clinical case from our own practice, is given.

Key words:

ovarian neoplasms, carcinoma, neoplasm metastasis, differential diagnosis.

Pathologia, 2023.

20(3), 281-288

Conclusions. Metastases of carcinomas from other organs to the ovaries constitute half of all cases requiring immunohistochemical investigation based on morphological structure. The most common are metastases from breast and colorectal cancers. However, the diagnosis of metastatic intestinal carcinoma is particularly challenging, as there is usually no clear clinical picture. In the differential diagnosis of primary and metastatic ovarian tumors, a comprehensive approach to analyzing the clinical presentation, microscopic structure of the tumor, and the surrounding tissue plays a significant role. Additionally, the formation of an antibody panel, taking into account these data, is crucial. The article provides a list of antibodies that have demonstrated greater effectiveness in our work.

Злоякісні новоутворення (ЗН) яєчників за поширеністю посідають восьме місце серед ЗН жінок у всьому світі, в Україні – сьоме, після злоякісних пухлин молочної залози, шкіри (крім меланом), тіла матки, шийки матки, ободової кишки, щитоподібної залози. З-поміж гінекологічних ЗН раку яєчників належить третє місце у світі [1].

За даними Всесвітнього фонду дослідження раку, у 2020 році у світі зареєстровано 313 959 нових випадків раку яєчників, у 2018 році – майже 295 000 випадків (3,4 % від усіх випадків ЗН у жінок); показники захворюваності та смертності у світі становили 6,6 та 3,9 на 100 000 жіночого населення відповідно [2]. В Україні захворюваність і смертність від раку яєчників за останні 5 років істотно не змінювалися, у середньому становили 17,0 на 100 000 та 8,3 на 100 000 жіночого населення відповідно. Частка раку яєчників у структурі злоякісних новоутворень жінок в Україні за 5 років (2018–2022 рр.) становила 4,7 % [3]. У місті Києві в 2020 році вперше виявлено 284 нових випадки раку яєчників, показник захворюваності дорівнює 17,54 на 100 000 жіночого населення; показник занедбаності становить 10,7 % (по Україні – 20,4 %).

Злоякісні новоутворення яєчників найчастіше є епітеліальними, і лише 10 % мають неепітеліальне походження. Серед карцином яєчників 97 % становлять немущинозні, 3 % – муцинозні. Розрізняють такі гістологічні типи немущинозних пухлин: серозні (70 %), ендометріодні (10 %), світлоклітинні (10 %) та неуточнені (5 %) [4]. Найпоширеніший гістологічний тип – високозлоякісна серозна карцинома (HGSC) [5].

Метастатичні карциноми яєчника, за даними різних досліджень, становлять майже 15 % від усіх злоякісних новоутворень яєчників (показники варіюють від 3 % до 30 %). Найпоширеніше первинне джерело – колоректальна карцинома (32,0 %), карцинома молочної залози (15,4 %), карцинома ендометрія (12,9 %), карцинома шлунка (9,2 %), карцинома апендикса (6,7 %), рак шийки матки (2,4 %), рак підшлункової залози (2,2 %), рак тонкої кишки (1,6 %), рак жовчного міхура та жовчних шляхів (1,5 %) [6,7,8,9]. Інші пухлини, як-от карцинома легенів, пухлини шкіри, рак нирки та карцинома стравоходу, становлять менше ніж 1 % кожна [10,11].

Метастатичні пухлини яєчників з наявністю перснєподібних клітин виявляють рідко; вони становлять 3–5 % злоякісних пухлин яєчників і є найскладнішими в діагностиці. Враховуючи, що є первинні раки яєчника з перснєподібною будовою, то без застосування імуногістохімічного дослідження диференційна діагностика не можлива.

Зазвичай первинна пухлина знаходиться в шлунково-кишковому тракті, але можливі й інші

локалізації. У низці досліджень встановили, що найчастіше метастатичні пухлини яєчників з наявністю перснєподібних клітин виникають при новоутвореннях шлунка [12]. Менш поширені первинні локалізації, описані в науковій літературі, – молочна залоза, апендикс, тонка кишка, жовчний міхур, сечовий міхур і сечовивідні шляхи, жовчні шляхи, підшлункова залоза, ампула Фатера та шийка матки. Діагностика пухлин із перснєподібними клітинами дуже складна, потребує не тільки повної клінічної інформації, патологістологічного дослідження, але й обов'язкового імуногістохімічного дослідження, оскільки розрізняють первинну перснєподібноклітинну карциному яєчника, що може мати макро- та мікроскопічні риси метастазу.

У доступній фаховій літературі виявили обмаль досліджень, що присвячені метастатичному ураженню яєчників при аденокарциномі тонкої кишки. Більшість робіт у цьому напрямі зосереджені на метастазах колоректального походження.

Аденокарциноми тонкої кишки рідкісні, становлять <5 % від усіх злоякісних пухлин шлунково-кишкового тракту [13]. Втім, за даними окремих досліджень, аденокарциноми цієї локалізації мають високу схильність до метастазування в яєчники [14].

Локалізацію первинних пухлин у порожній і клубовій кишці рідко встановлюють інтраопераційно. Це пов'язано з тим, що вони здебільшого мають невеликий розмір і неспецифічну клінічну картину.

Враховуючи, що метастаз карциноми шлунково-кишкового тракту в яєчник може бути великим за розміром, давати атипичну клініку, стискаючи навколишні органи, як правило, такі хворі перед операцією мають клінічний діагноз рак яєчників. Точна верифікація метастазування відбувається в процесі патологістологічного та імуногістохімічного досліджень. Цей процес потребує аналізу особливостей морфологічної будови пухлини, застосування раціональної панелі моноклональних антитіл і наступного клінічного дообстеження хворих для підтвердження діагнозу патологоанатома.

Мета роботи

Висвітлити питання морфологічної та імуногістохімічної диференційної діагностики первинних карцином яєчника і метастазів карциноми різних органів у яєчник.

Матеріали і методи дослідження

Здійснили аналіз історій хвороб 381 пацієнта з клінічним діагнозом рак яєчників та патологістологічне дослідження операційного матеріалу цих хворих.

Парафінові зрізи для патологістологічних досліджень забарвлювали гематоксиліном та еозином за загальноприйнятою методикою. У 161 випадку здійснили імуногістохімічне дослідження з використанням системи візуалізації EnVision FLEX та антитіл: Cytokeratin 7 (OV-TL 12/30), Cytokeratin 20 (K 20.8), Ovarian Cancer Antigen (CA125) (OV 185:1), Estrogen receptor (1 D5), Villin (CWW B1), CDX2 (DAK-CDX2), Chromogranin A (DAK-A3), Synaptophysin (SP11), Thrioid Transcription Factor (TTF1) (8G7G3/1), CD56 (123C3.D5), GATA3 (L50-823), p53 (DO7), Inhibin a (R1), FOXL-2 (RPab), PAX-8 (RM436), Ki-67 (MIB-1).

Препарати дослідили та проаналізували за допомогою мікроскопа AxioScop 40 (Zeiss) з фотокамерою AxioCam MRc (Zeiss).

Результати

У гінекологічному відділенні КНП «Київський міський клінічний онкологічний центр» у 2019–2023 рр. прооперували 381 пацієнтку з клінічним діагнозом рак яєчників (31 % від усіх прооперованих у відділенні хворих).

У 161 випадку для верифікації застосували імуногістохімічний (ІГХ) метод дослідження (42,25 % прооперованих із цим клінічним діагнозом), що дало змогу виявити метастатичні карциноми яєчників (21,26 % прооперованих пацієнтів, 50,30 % від усіх випадків ІГХ-дослідження).

Пацієнти з метастазом карциноми в яєчники мали скарги на біль внизу живота, схуднення, іноді нудоту, блювання. Під час інструментального обстеження в усіх хворих на УЗД і КТ визначили пухлину: в 43 % – у межах яєчника, в 57 % випадків пухлина виходила за межі придатка матки, із них у 15 % пацієнтів заповнювала весь малий таз і частину черевної порожнини, в 11 % хворих у пухлинний конгломерат входила кишка. В 73 % пацієнтів на час операції визначили канцероматоз очеревини та чепця. Отже, хворі з метастатичним раком яєчника не мали специфічної клінічної картини, часто процес був поширеним. Це не давало змоги встановити метастатичну природу пухлини, і до гістологічного дослідження хворі мали діагноз карцинома яєчника.

У 220 (57,74 %) випадках морфологічна будова карциноми яєчника дала змогу встановити діагноз без ІГХ-дослідження. Серед первинних пухлин яєчника найчастіше діагностували серозну карциному, що мала типові гістологічні ознаки: папілярні та солідні структури, сформовані стовпчастими або кубоподібними клітинами з еозинофільною цитоплазмою, зі значною ядерною атипією, атипівими мітозами, некрозами та псамомними тільцями. В окремих випадках виявили ознаки ендометріодної карциноми яєчників, зокрема експансивну інвазію строми, щільно розташовані ворсинчасто-залозисті, місцями крибриформні структури. Наявність осередків плоскоклітинної метепітелії, атипівого епітелію, що схожий на ендометрій проліферативного типу з різним ступенем атипії, дали змогу встановити діагноз ендометріодна карцинома яєчника. У деяких пацієнтів діагностували світлоклітинну карциному яєчників, оскільки виявили

кубоподібні, полігональні або сплюснені клітини з прозорою або зернистою еозинофільною цитоплазмою, гіперхромними атипівими ядрами (ядра «цвяхи»), що виступають у просвіті тубулокістозних структур, із помітними ядерцями та варіабельною мітотичною активністю.

У 161 випадку морфологічна будова пухлини викликала сумніви щодо гістологічного варіанта карциноми яєчників або щодо того, чи карцинома є первинною або метастатичною. Для уточнення діагнозу здійснили ІГХ-дослідження з формуванням панелей антитіл залежно від морфологічної будови пухлини.

Для верифікації серозної карциноми (передусім це рак низького ступеня диференціації) застосували панель антитіл, що складалася з СК7 (якщо не було експресії, додавали СКран), ER, CA125, p53, GATA3 (якщо в анамнезі була пухлина молочної залози); якщо було припущення про виникнення злоякісної гранульозоклітинної пухлини низького ступеня диференціювання, також додавали FOXL-2 та Inhibin A.

Для диференційної діагностики первинних і метастатичних пухлин яєчників на першому етапі імуногістохімічного дослідження використали панель антитіл, що включає антитіла до СК7, СК20, СКран (якщо негативні СК7 і СК20), рецепторів естрогену та прогестерону, CA125, p53, Vimentin.

Якщо визначали залозистоподібну морфологію з ознаками продукції муцину, наявністю залоз, заповнених муциноподібною речовиною, а також озер слизу, диференційну діагностику починали з визначення експресії СК20, СК7, CDX2 і Villin. Діагноз метастаз аденокарциноми кишки встановлювали у разі позитивної реакції на СК20, CDX2, Villin, коли не спостерігали експресію СК7 (якщо пухлина в кишці).

Отже, враховуючи морфологічну будову пухлини та результати імуногістохімічного дослідження, у 49,7 % випадків встановлено діагноз первинна пухлина яєчників. Розрізняли такі гістологічні варіанти карциноми яєчника: серозна (64 %), ендометріодна (24 %), муцинозна (12 %) (табл. 1).

Якщо виключено первинну карциному яєчника, панель антитіл розширено залежно від клінічної інформації та морфологічної будови пухлини (CDX2, Chromogranin A, Synaptophysin, CD56, GATA3, PAX-8). Найчастіше метастатичну природу пухлини доведено в разі муцинозної, недиференційованої, персподібною карциноми, а також у випадках, коли в пухлині визначили фіброзовану строми з формуванням шкірозного патерну.

У наших дослідженнях антитіло до PAX-8 (кроляче моноклональне антитіло) показало високу ефективність. PAX-8 зазвичай має експресію в первинних пухлинах яєчника – серозних карциномах (експресія в 90 % випадків), часто – в ендометріодних і світлоклітинних. Разом із тим, у злоякісних мезотеліомах, метастазах карцином молочної залози, товстої кишки та легенів здебільшого спостерігають негативну реакцію.

Для виключення метастазу карциноми молочної залози в яєчник використовували також антитіла до GATA3. Метастази раку молочної залози мають такий

Таблиця 1. Кількість випадків первинної карциноми яєчників, що підтверджені ІГХ-дослідженням

Тип пухлини	2019 рік	2020 рік	2021 рік	2022 рік	2023 рік	Загалом
Серозна карцинома яєчника	8	15	12	8	8	51
Ендометріодна карцинома яєчника	2	3	5	5	4	19
Муциозна карцинома яєчника	3	2	–	4	1	10
Усі типи пухлини	13	20	17	17	13	80

Таблиця 2. Кількість випадків метастатичних карцином яєчників, що підтверджені ІГХ-дослідженням

Первинна пухлина	2019 рік	2020 рік	2021 рік	2022 рік	2023 рік	Загалом
Карцинома молочної залози	4	8	3	6	1	22
Ендометріодна карцинома ендометрія	4	–	–	–	–	4
Серозна папілярна карцинома ендометрія	1	1	1	–	–	3
Аденокарцинома шлунка	1	10	5	1	–	17
Аденокарцинома кишки	7	7	6	8	3	31
– муциозна	1	–	–	–	–	1
Муциозна аденокарцинома апендикса	–	–	1	–	–	1
Нейроендокринна карцинома кишки	–	1	–	–	1	2
Холангіокарцинома	–	–	1	–	–	1
Усі локалізації	17	27	17	15	5	81

імунофенотип: GATA3-позитивна реакція, PAX-8-негативна реакція.

Найчастіше метастазування в яєчник діагностували при аденокарциномах кишки (38 %), що зазвичай мали залозисту будову, з продукцією слизу різних ступенів вираженості, у деяких випадках виявляли перснеподібні клітини. Типовий імунофенотип для метастазу аденокарциноми кишки в яєчник: CK20 «+», CK7 «–», CDX2 «+», Villin «+». На другому місці за частотою в нашому дослідженні – метастаз карциноми молочної залози (28 %), морфологічна будова якої часто солідно-залозиста, з фіброзованою строю навколо метастазу. Найчастіше метастази раку молочної залози мали експресію рецепторів естрогену (98 %), рідше – прогестерону (55 %), а також HER2/neu (9 %). Втім враховуючи, що пухлини яєчника здебільшого також мають експресію рецепторів естрогену та прогестерону, важливіше значення мало застосування GATA3 і PAX-8.

Щодо діагностики метастазу раку шлунка, то більше значення мала морфологічна будова пухлини, наявність пухлини у двох яєчниках, а також клінічна інформація. Типовий імунофенотип метастазу карциноми шлунка в яєчник: CK7 «+» CK20 «+/-», рецептори естрогену «–», CA125 «–». Зазвичай це низькодиференційовані пухлини.

Зі 161 випадку, де здійснили ІГХ-дослідження, у 81 (50,3 %) встановлено діагноз метастазу карциноми в яєчник (табл. 2). Усі наведені в таблиці 2 діагнози клінічно підтверджені під час додаткового обстеження після імуногістохімічного дослідження.

Перснеподібноклітинні карциноми є одним із найскладніших діагностичних питань. Перснеподібну морфологію визначають при первинній перснеподібноклітинній карциномі яєчника, перснеподібній стромальній пухлині та склерозуючій стромальній пухлині яєчника, первинному муциозному карциноїді, а також при метастатичних муциозних і нейроендокринних карциномах із різних первинних локалізацій.

Клінічний випадок

Наводимо діагностично складний клінічний випадок пацієнтки нашої клініки.

Пацієнтка віком 62 роки надійшла в гінекологічне відділення у стані середньої тяжкості зі скаргами на загальну слабкість, значне збільшення живота, нудоту, затримку випорожнень, помірний біль в епігастральній ділянці.

За даними фізикального обстеження, живіт істотно збільшений за розмірами внаслідок наявності утворення до 30 см і роздутих петель кишки, що контурувались по передній черевній стінці в епігастрії, перкуторно – тимпаніт. Симптоми подразнення очеревини негативні. Аускультативно: перистальтика посилена в епігастрії, в нижніх відділах не вислуховувалась.

Дані комп'ютерної томографії (КТ): у результаті КТ трьох зон виявили ознаки гострої тонкокишкової непрохідності. В черевній порожнині від епігастрію до малого таза – багатокамерне кістозно-солідне утворення розмірами 25 × 20 × 30 см, що слабо накопичує контрастну речовину. В черевній порожнині та порожнині малого таза візуалізується невелика кількість вільної рідини. В клітковині черевної порожнини, між кишковими петлями (переважно справа) та в порожнині малого таза – тяжисті гіповаскулярні ділянки канцероматозу завтовшки до 28 мм.

Оцінювали рівні CA125 – 310 Од/мл, HE-4 – 60,97 пмоль/л. Індекс ROMA – 59,4 %.

Клінічний діагноз: Susp. Ca ovarii. Мінімальний асцит. Гостра кишкова непрохідність.

Ургентно виконали нижньо-серединну лапаротомію з обходом пупка зліва. Під час ревізії зафіксували: всю черевну порожнину та малий таз виповнювало кістозно-солідне, бугристе утворення, що походило з лівого яєчника, розміром до 30 см. Тіло матки не збільшене, правий яєчник – солідний, до 4 см у діаметрі; маткові труби – з метастатичними відсівами. Дугласів простір – ділянки канцероматозу розмірами від 0,5 см до 1,5 см. Печінка не змінена, великий чепець тотально метастично уражений, у вигляді «коржа». У ділянці

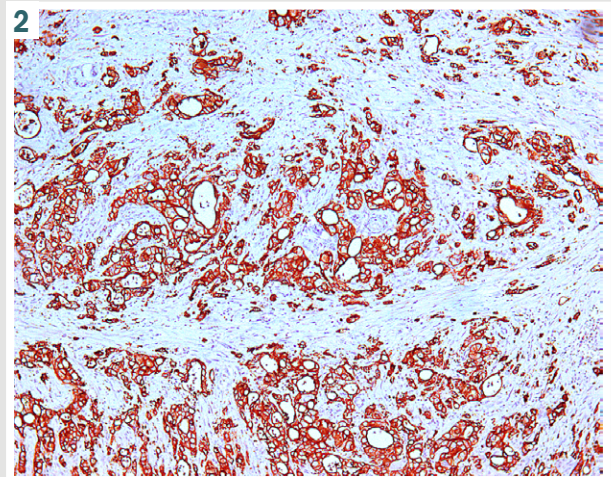
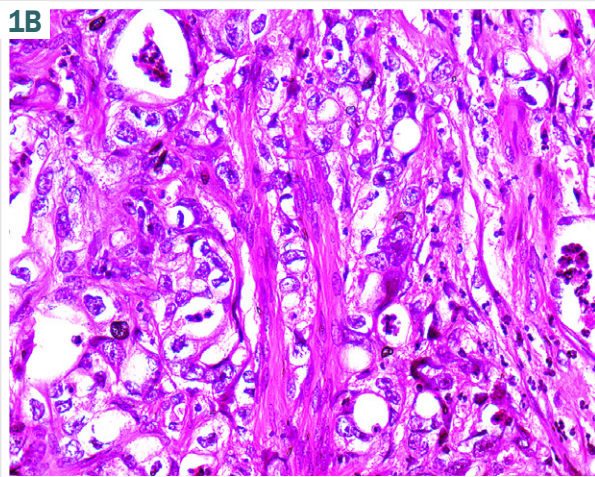
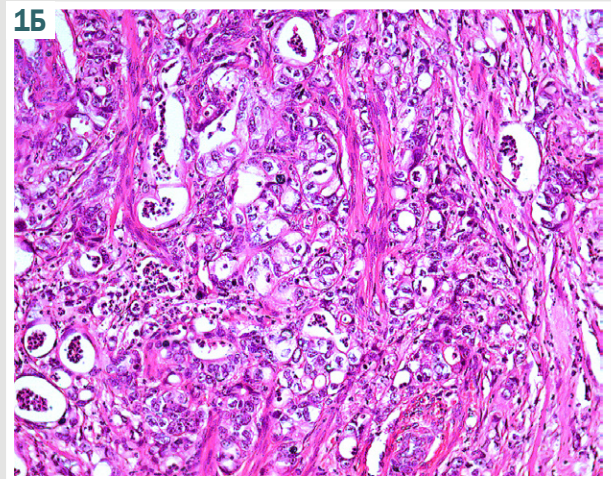
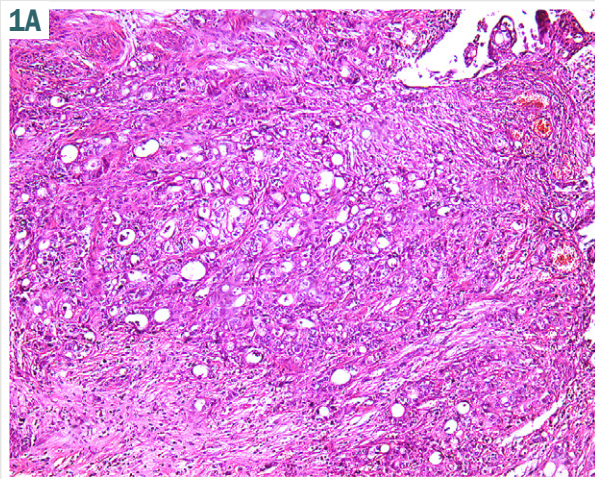


Рис. 1А. Карцинома дифузного типу росту, без формування залоз і папілярних структур. Визначено клітинний поліморфізм і формування слизу, скупчення перснеподібних клітин. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: $\times 100$.

Рис. 1Б. Велика кількість перснеподібних клітин. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: $\times 200$.

Рис. 1В. Виражена атипія ядер, більшість із них має дрібнодисперсний хроматин. Цитоплазма клітин світла, широка, з везикулами муцину. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: $\times 400$.

Рис. 2. Імуногістохімічне забарвлення на СК7. Позитивна реакція: мембранне забарвлення усіх клітин пухлини. Зб.: $\times 100$.

ілеоцекального кута – пухлина ендofітного типу росту з проростанням кишки розміром до 4 см. Апендикс не змінений. Петлі кишечника проксимальніше пухлини значно роздуті, переповнені вмістом. Множинні зливні метастатичні відсіви по очеревині черевної порожнини та брижі тонкої, товстої кишок розміром від 0,5 см до 2,0 см.

Враховуючи тяжкий стан хворої, здійснили оперативне втручання в максимально допустимому обсязі. Виконали двобічну аднексектомію, оментектомію та накладення ілеотрансверзоанастомозу «бік у бік».

Пацієнтка виписана на 10 післяопераційну добу в задовільному стані, отримує курси поліхімієтерапії.

Для гістологічного дослідження надіслано праві та ліві придатки матки та великий чепець. Результати макроскопічного дослідження: лівий яєчник представлений багатокамерним кістозним утворенням діаметром 22 см із жовтим рідким вмістом; правий яєчник

і маткова труба макроскопічно не змінені; чепець – із множинними ділянками канцероматозу.

Гістологічно: в правому яєчнику та чепці визначено ділянки росту низькодиференційованої карциноми альвеолярно-тубулярної будови з наявністю перснеподібних клітин (рис. 1А, В); у лівому яєчнику виявлено пограничну муцинозну пухлину.

Здійснили імуногістохімічне дослідження, одержали такі результати: цитокератин 7 (СК7) (рис. 2) і цитокератин 20 (СК20) (рис. 3) – дифузна виражена позитивна реакція в пухлинних клітинах, включаючи перснеподібні клітини; Villin (рис. 4) і CDX2 – позитивна реакція в клітинах пухлини; CA125, рецептори естрогену (рис. 5), Chromogranin A та Synaptophysin – негативна реакція.

Беручи до уваги наведені дані, діагностовано метастази перснеподібноклітинної карциноми тонкої (клубової) кишки в правому яєчнику та великому чепці.

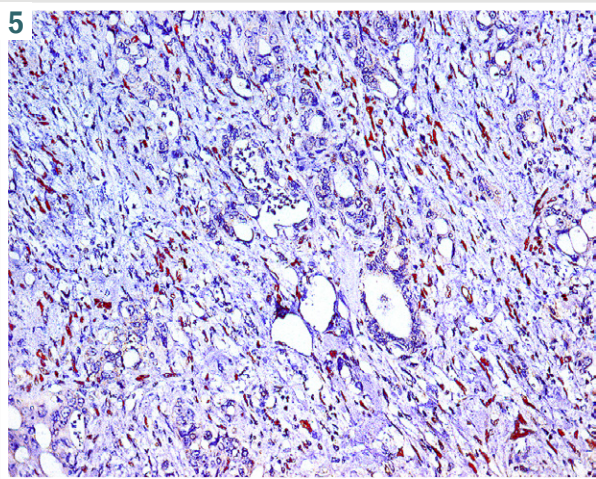
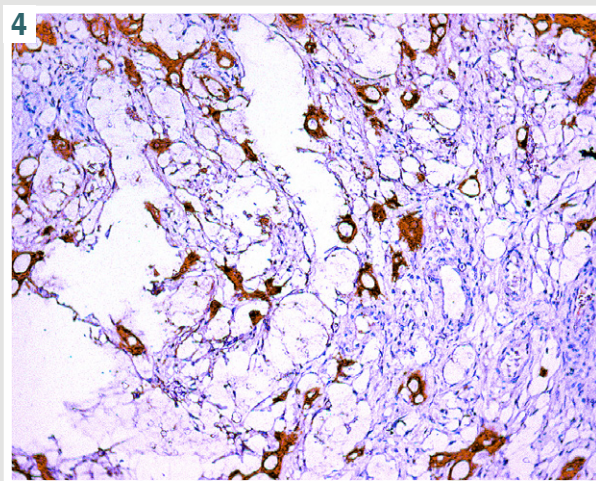
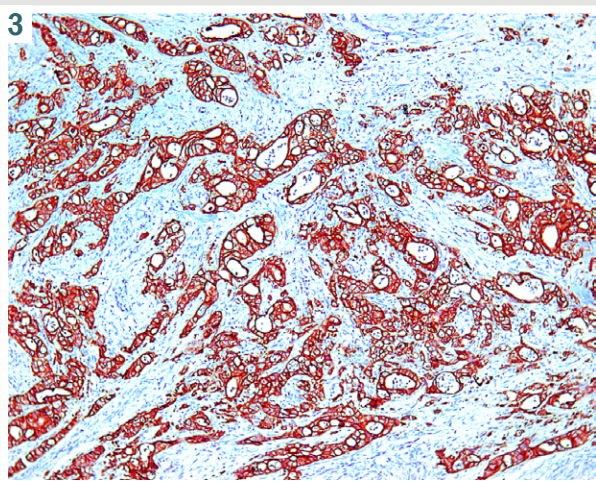


Рис. 3. Імуногістохімічне забарвлення на CK20. Позитивна реакція: мембранне забарвлення усіх клітин пухлини. Зб.: $\times 100$.

Рис. 4. Імуногістохімічне забарвлення на Villin. Позитивна реакція: забарвлення мембран і цитоплазми клітин пухлини. Зб.: $\times 200$.

Рис. 5. Імуногістохімічне забарвлення на рецептори естрогену. Негативна реакція – немає експресії в ядрах клітин карциноми; позитивна реакція в клітинах стромы яєчника. Зб.: $\times 200$.

Обговорення

Для диференційної діагностики первинних і вторинних злоякісних пухлин яєчника використали такі морфологічні критерії: розміри пухлини, чи є пухлина дво- або однобічною, стан капсули та поверхні яєчника, патерн росту та тип інвазії пухлини, асоційовані, фонові ураження яєчника, наявність васкулярної інвазії, перснеподібних клітин.

Дані, що свідчили про первинну злоякісну пухлину: великі розміри (понад 10 см), однобічне ураження, гладенька капсула, ділянки межової або доброякісної пухлини, асоціація з тератомою або пухлиною Бреннера, рівномірно розміщені кістозні та солідні ділянки, складний папілярний гістологічний патерн росту, експансивний тип інвазії, відсутність васкулярної інвазії та перснеподібних клітин. Характерні імуногістохімічні ознаки: дифузна, виражено позитивна реакція на CK7, мінлива реакція на PAX-8 (майже 40 % позитивна), варіабельна реакція на CK20 та CDX2 (негативна або слабка, неоднорідна); позитивні реакції на CA125 та рецептори естрогену частіше свідчили про первинні новоутворення яєчників.

На виникнення метастатичної пухлини вказували такі ознаки: невеликі розміри, двобічне ураження, залучення капсули або воріт яєчника, псевдомісома

очеревини, відсутність асоціації з тератомою або пухлиною Бреннера, багатовузловий патерн росту, деструктивний тип інвазії, наявність васкулярної інвазії та перснеподібних клітин. Імунофенотип метастатичних пухлин, що походять з нижніх відділів шлунково-кишкового тракту, здебільшого характеризувався сильною позитивною реакцією на CDX2 і CK20, варіабельною реакцією на CK7, негативною – на PAX8. Про панкреатобілярне походження метастатичної карциноми свідчили позитивна реакція на CK7, мінлива – на CK20 і CDX2, негативна реакція на PAX-8. Метастатичні карциноми грудних залоз мали позитивну реакцію на GATA3, варіабельні (відповідно до первинної пухлини) реакції на рецептори естрогену, прогестерону та HER2/neu, негативну – на PAX8, слабку або негативну – на CA125.

У наведеному клінічному випадку про метастатичне ураження правого яєчника свідчили такі ознаки: значна кількість перснеподібних клітин, екстраоваріальне, множинне ураження черевної порожнини з наявністю пухлини у ділянці ілеоцекального кута, відсутність в ураженому яєчнику ділянок доброякісних і межових новоутворень, типових для яєчника [11,15,16]. На первинному етапі ІГХ-дослідження визначили дифузну експресію CK7 у всіх клітинах раку, не зафіксували експресію

CA125, ER, Chromogranin A та Synaptophysin. Однак експресія CK7, що типова для багатьох первинних раків яєчника, не є підставою для відхилення діагнозу метастаз карциноми кишки. Наступне розширення панелі антитіл дало змогу визначити експресію CK20, Villin, CDX2 і встановити діагноз метастаз карциноми тонкої кишки в яєчник.

Експресію CK7, CK20 і CDX2 визначають при аденокарциномах шлунка, панкреатобіліарної системи, тонкої, прямої кишок та апендикса [18,19,20].

Деяким первинним муцинозним карциномам яєчників властива кишкова диференціація, вони експресують антитіла, типові для карцином кишки: CK20, Villin та CDX2, – при цьому дифузна експресія CK7 також зберігається [15,17]. Втім у первинних карциномах яєчників забарвлення CK20 і CDX2 зазвичай слабше та більш вогнищеве, ніж те, що спостерігають при метастатичній карциномі кишкового походження [18].

Метастатичні колоректальні карциноми зазвичай повністю негативні щодо CK7 або мають лише мінімальне забарвлення [20,21].

Сильне та дифузне ядерне забарвлення CDX2 підтверджує первинну колоректальну або апендикулярну муцинозну аденокарциному [19,20,21].

Аденокарциноми тонкої кишки мають тенденцію до розвитку експресії CK7 (що спостерігали в нашому випадку) і втрати CK20. Здебільшого спостерігають коекспресію цих маркерів [22]. Карциноми тонкої кишки експресують CK7 (у 35–100 %), CK20 (майже 45 %), CDX2 (44–60 %) і Villin (60 %) [7,23].

Висновки

1. Метастази карциноми інших органів в яєчники становлять 21,26 % від усіх пухлин із клінічним діагнозом припущення або рак яєчників (50,3 % від усіх, що потребують ІГХ-дослідження). У наших дослідженнях найчастіше в яєчниках визначали метастази раку молочної залози та кишки.

2. У диференційній діагностиці первинних і метастатичних пухлин яєчників важливу роль відіграє комплексний підхід аналізу клініки, мікроскопічної будови самої пухлини та навколишньої тканини, а також обов'язкове використання широкої панелі антитіл.

3. Для диференційної діагностики первинних і метастатичних пухлин яєчників на першому етапі необхідно використовувати панель антитіл, що включає CK7, CK20 (СКрап, якщо негативні CK7 та CK20), рецептори естрогену, прогестерону, CA125, p53, Vimentin. Якщо виявлено морфологічні структури, що схожі на гранульозоклітинну пухлину, до панелі антитіл додають Inhibin A, FOXL-2. Виключивши первинну пухлину яєчника, панель антитіл розширюють CDX2, Villin, GATA, PAX-8, коли визначено дрібноклітинний патерн – Chromogranin A, Synaptophysin, CD56.

Перспективи подальших досліджень. Наведені спостереження можуть допомогти лікарям-патологоанатомам і лікарям-онкологам під час диференціювання первинних і метастатичних пухлин яєчників, а також під час встановлення первинної локалізації новоутворення при анонімних метастазах у яєчник.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 09.11.2023

Після доопрацювання / Revised: 27.11.2023

Схвалено до друку / Accepted: 05.12.2023

Відомості про авторів:

Захарцева Л. М., д-р мед. наук, професор каф. патологічної анатомії, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ; зав. відділення патологічної анатомії (з патологістологічною лабораторією), КНП «Київський міський клінічний онкологічний центр», Україна.

ORCID ID: 0000-0001-6838-9970

Манжура О. П., канд. мед. наук, доцент каф. онкології, Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ; зав. гінекологічного відділення, КНП «Київський міський клінічний онкологічний центр», Україна.

ORCID ID: 0000-0003-1070-8515

Вашченко І. Ю., лікар-патологоанатом відділення патологічної анатомії (з патологістологічною лабораторією), КНП «Київський міський клінічний онкологічний центр», Україна.

ORCID ID: 0009-0002-2491-8679

Майстренко Є. В., лікар гінеколог-онколог гінекологічного відділення, КНП «Київський міський клінічний онкологічний центр», Україна.

ORCID ID: 0009-0000-7037-7637

Кравчук О. М., лікар гінеколог-онколог гінекологічного відділення, КНП «Київський міський клінічний онкологічний центр», Україна.

ORCID ID: 0009-0007-2093-3974

Шатрова К. М., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної анатомії, Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ; лікар-патологоанатом відділення патологічної анатомії (з патологістологічною лабораторією), КНП «Київський міський клінічний онкологічний центр», Україна.

ORCID ID: 0000-0003-2916-5098

Рудницька О. Г., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної анатомії, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ; лікар-патологоанатом відділення патологічної анатомії (з патологістологічною лабораторією), КНП «Київський міський клінічний онкологічний центр», Україна.

ORCID ID: 0000-0002-4203-5231

Information about authors:

Zakhartseva L. M., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathological Anatomy, Bogomolets National Medical University, Kyiv; Head of the Department of Pathological Anatomy with Pathohistological laboratory, Kyiv City Clinical Oncology Center, Ukraine.

Manzhura O. P., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Oncology, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv; Head of the Department of Gynecology, Kyiv City Clinical Oncology Center, Ukraine.

Vashchenko I. Yu., MD, Pathologist of the Department of Pathological Anatomy with Pathohistological laboratory, Kyiv City Clinical Oncology Center, Ukraine.

Maistrenko Ye. V., MD, Gynecologist-Oncologist of the Department of Gynecology, Kyiv City Clinical Oncology Center, Ukraine.

Kravchuk O. M., MD, Gynecologist-Oncologist of the Department of Gynecology, Kyiv City Clinical Oncology Center, Ukraine.

Shatrova K. M., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Anatomy, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv; Pathologist of the Department of Pathological Anatomy with Pathohistological laboratory, Kyiv City Clinical Oncology Center, Ukraine.

Rudnytska O. H., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Anatomy, Bogomolets National Medical University, Kyiv; Pathologist of the Department of Pathological Anatomy with Pathohistological laboratory, Kyiv City Clinical Oncology Center, 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>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Fedorenko, Z. P., Sumkina, O. V., Zuba, V. O., Horokh, Ye. L., Hulak, L. O., & Ryzhov, A. Yu. (2023). Rak v Ukraini, 2021-2022. Zakhvoriuvanist, smertnist, pokaznyky diialnosti onkologichnoi sluzhby [Cancer in Ukraine, 2021-2022. Morbidity, mortality, performance indicators of the oncology service]. *Bulletin of the National Chancery Register of Ukraine*, 24. [in Ukrainian]. http://ncru.inf.ua/publications/BULL_24/index.htm
- Gaona-Luviano, P., Adriana, L., Medina-Gaona, & Magaña-Pérez, K. (2020). Epidemiology of ovarian cancer. *Chinese clinical oncology*, 9(4). <https://doi.org/10.21037/cco-20-34>
- Cabasag, C. J., Arnold, M., Butler, J., Inoue, M., Trabert, B., Webb, P. M., Bray, F., & Soerjomataram, I. (2020). The influence of birth cohort and calendar period on global trends in ovarian cancer incidence. *International journal of cancer*, 146(3), 749-758. <https://doi.org/10.1002/ijc.32322>
- Kubeček, O., Laco, J., Špaček, J., Petera, J., Kopecký, J., Kubečková, A., & Filip, S. (2017). The pathogenesis, diagnosis, and management of metastatic tumors to the ovary: a comprehensive review. *Clinical & experimental metastasis*, 34(5), 295-307. <https://doi.org/10.1007/s10585-017-9856-8>
- Kaur, A., Dwivedi, B., Singh, A., Dwivedi, T., Sharma, R., & White, S. (2023). Ileal Adenocarcinoma Presenting with Krukenberg Metastasis to Ovaries- Description of a Rare Case with Review of Literature. *American journal of medical case reports*, 11(8), 142-145. <https://doi.org/10.12691/ajmcr-11-8-3>
- Romeo, M., Quer, A., Tarrats, A., Molina, C., Radua, J., & Manzano, J. L. (2015). Appendiceal mixed adenoneuroendocrine carcinomas, a rare entity that can present as a Krukenberg tumor: case report and review of the literature. *World journal of surgical oncology*, 13, 325. <https://doi.org/10.1186/s12957-015-0740-1>
- Pesce, A., Li Destri, G., Amore, F. F., Magro, G., La Greca, G., & Puleo, S. (2019). A rare case of Krukenberg tumor by gallbladder cancer. *Annals of medicine and surgery* (2012), 47, 50-52. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2019.09.014>
- Bruls, J., Simons, M., Overbeek, L. I., Bulten, J., Massuger, L. F., & Nagtegaal, I. D. (2015). A national population-based study provides insight in the origin of malignancies metastatic to the ovary. *Virchows Archiv*, 467(1), 79-86. <https://doi.org/10.1007/s00428-015-1771-2>
- Dundr, P., Singh, N., Nožičková, B., Němejcová, K., Bártů, M., & Stružinská, I. (2021). Primary mucinous ovarian tumors vs. ovarian metastases from gastrointestinal tract, pancreas and biliary tree: a review of current problematics. *Diagnostic pathology*, 16(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13000-021-01079-2>
- Seow-En, I., Hwang, G., Tan, G. H. C., Ho, L. M. L., & Teo, M. C. C. (2018). Palliative surgery for Krukenberg tumors – 12-year experience and review of the literature. *World journal of clinical oncology*, 9(1), 13-19. <https://doi.org/10.5306/wjco.v9.i1.13>
- Chow, J. S., Chen, C. C., Ahsan, H., & Neugut, A. I. (1996). A population-based study of the incidence of malignant small bowel tumours: SEER, 1973-1990. *International journal of epidemiology*, 25(4), 722-728. <https://doi.org/10.1093/ije/25.4.722>
- Mitsushita, J., Netsu, S., Suzuki, K., Nokubi, M., & Tanaka, A. (2017). Metastatic Ovarian Tumors Originating From a Small Bowel Adenocarcinoma – A Case Report and Brief Literature Review. *International journal of gynecological pathology*, 36(3), 253-260. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000314>
- Simons, M., Bolhuis, T., De Haan, A. F., Bruggink, A. H., Bulten, J., Massuger, L. F., & Nagtegaal, I. D. (2019). A novel algorithm for better distinction of primary mucinous ovarian carcinomas and mucinous carcinomas metastatic to the ovary. *Virchows Archiv*, 474(3), 289-296. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2504-0>
- Ramesan, C. K., Vinotha, T., Dhanya, S. T., Ajit, S., Anitha, T., Rachel, G. C., & Peedicayil, A. (2021). Metastatic Tumors to the Ovary-a Surgeon's Dilemma. *Indian journal of surgical oncology*, 12(1), 152-157. <https://doi.org/10.1007/s13193-020-01267-4>
- Talia, K. L., Parra-Herran, C., & McCluggage, W. G. (2022). Ovarian mucinous and seromucinous neoplasms: problematic aspects and modern diagnostic approach. *Histopathology*, 80(2), 255-278. <https://doi.org/10.1111/his.14399>
- da Silveira Santos, J. P. L., Machado, C. J., Junior, E. P., Rodrigues, J. B. S. R., Vidigal, P. T., & Resende, V. (2018). Immunohistochemical Predictors for Intestinal and Pancreatobiliary Types of Adenocarcinoma of The Ampulla of Vater. *Journal of gastrointestinal surgery*, 22(7), 1171-1178. <https://doi.org/10.1007/s11605-018-3797-7>
- Zhang, W., Tan, C., Xu, M., & Wu, X. (2020). Primary appendiceal mucinous neoplasm: Gynecological manifestations, management, and prognosis. *Gynecologic oncology*, 156(2), 357-362. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.11.030>
- Park, C. K., & Kim, H. S. (2018). Clinicopathological Characteristics of Ovarian Metastasis from Colorectal and Pancreatobiliary Carcinomas Mimicking Primary Ovarian Mucinous Tumor. *Anticancer research*, 38(9), 5465-5473. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12879>
- Bellizzi A. M. (2020). An Algorithmic Immunohistochemical Approach to Define Tumor Type and Assign Site of Origin. *Advances in anatomic pathology*, 27(3), 114-163. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000256>
- Neri, G., Arpa, G., Guerini, C., Grillo, F., Lenti, M. V., Giuffrida, P., Furlan, D., Sessa, F., Quaquarini, E., Viglio, A., Ubezio, C., Pasini, A., Ferrero, S., Sampietro, C., Ardizzone, S., Latella, G., Mescoli, C., Rugge, M., Zingone, F., Barresi, V., ... Vanoli, A. (2020). Small Bowel Adenocarcinomas Featuring Special AT-Rich Sequence-Binding Protein 2 (SATB2) Expression and a Colorectal Cancer-Like Immunophenotype: A Potential Diagnostic Pitfall. *Cancers*, 12(11), 3441. <https://doi.org/10.3390/cancers12113441>
- An-Chieh Liu, A., Chen, C. H., Liu, W. M., & Chang, C. W. (2018). A rare Krukenberg tumor arising from a primary adenocarcinoma of the small intestine. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 57(2), 319-322. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2018.02.025>

Мультисистемний педіатричний запальний синдром, асоційований із COVID-2019, у Запорізькій області

О. В. Усачова^{id} *A,D,E,F, Д. В. Алексиук^{id} B,C,D

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 – ознайомити лікарів із клінічними ознаками мультисистемного запального синдрому, асоційованого з COVID-19, ґрунтуючись на аналізі його перебігу в дітей Запорізької області України.

Матеріали та методи. Здійснили ретроспективний аналіз історій хвороб 16 дітей віком від 1 до 16 років, які мали в анамнезі COVID-19 та/або контактували з хворими на це захворювання. COVID-19 в усіх пацієнтів підтверджений лабораторно. Перебіг хвороби супроводжувався лихоманкою, розладами з боку інших органів і систем.

Для статистичного опрацювання результатів використали непараметричні методи: описову статистику і статистичний висновок. Усі розрахунки здійснили за допомогою програми Microsoft Excel.

Результати. Симптоми, виявлені в обстежених, відповідали діагностичним критеріям ВООЗ для мультисистемного педіатричного запального синдрому, асоційованого з COVID-2019: вік від 1 до 16 років, лихоманка тривалістю не менше ніж 3 доби (100 % випадків); докази мультисистемного захворювання, зафіксовані в усіх хворих (8 осіб мали дрібно-точкову екзантему, 12 – фарингіт; у 12 дітей діагностовано ураження серцево-судинної системи, а саме кардіопатію, в 15 – порушення серцевого ритму, в 9 – дисметаболическі зміни в міокарді; лабораторні ознаки коагулопатії (підвищений рівень D-димера) зафіксували у 8 випадках, зниження тромбінового часу – в 4; абдомінальний синдром визначили у 8 дітей); підвищені рівні маркерів запалення мали всі пацієнти; під час обстеження не виявили переконливих доказів наявності іншого захворювання, яке могло б викликати такі симптоми; всі діти мали докази інфікування вірусом SARS-CoV-2, зокрема COVID-19 мали в анамнезі 9 осіб, ПЛР-тест позитивний у 2, у 12 хворих виявили IgG до COVID-19, у 5 – IgM до COVID-19.

Висновки. Показано поліморфність клінічних і лабораторних проявів мультисистемного педіатричного запального синдрому, асоційованого з COVID-19. Підтверджено легкість використання критеріїв ВООЗ щодо діагностики цього синдрому. Кожному лікарю, який контактує з дитиною, котра лихоманить три і більше днів, рекомендовано оцінювати наявність цього синдрому в період епідемічного неблагополуччя за коронавірусною хворобою (COVID-19).

Ключові слова: вірусна інфекція, COVID-19, мультисистемний педіатричний запальний синдром, діти, ускладнення, діагностика.

Патологія. 2023. Т. 20, № 3(59). С. 289-294

*E-mail: kdibzdmu@gmail.com

Multisystem pediatric inflammatory syndrome associated with COVID-2019 in the Zaporizhzhia region

O. V. Usachova, D. V. Aleksiiuk

The aim is to familiarize with the clinical signs of the multisystem inflammatory syndrome associated with COVID-19, based on the analysis of its course in children of the Zaporizhzhia region of Ukraine.

Materials and methods. A retrospective analysis of the medical histories of 16 children, aged from 1 to 16 years, who had a history of COVID-19 and/or who were in contact with patients with this disease and had a confirmed disease accompanied by fever, disorders of other organs and systems, was conducted.

The methods of non-parametric statistics – descriptive statistics and statistical inference – were used for statistical processing of the results. All calculations were carried out using Microsoft Excel.

Results. Symptoms found in the examined children met the following WHO diagnostic criteria for multisystem pediatric inflammatory syndrome associated with COVID-2019: the age ranged from 1 to 16 years. Fever lasting at least 3 days was observed in 100 % of the subjects. Evidence of multisystem disease occurred in all patients in particular: 8 children had tiny-dotted exanthema, 12 – pharyngitis; damage to the cardiovascular system in the form of cardiopathy was detected in 12 children, rhythm disorders in 15, dysmetabolic changes in the myocardium in 9; laboratory signs of coagulopathy in the form of an increased level of D-dimer were observed in 8 children, a decrease in thrombin time in 4; abdominal syndrome was found in 8 children. All patients had elevated levels of inflammatory markers. During the examinations, no convincing evidence of the presence of another disease that could cause these symptoms was found.

All children had evidence of infection with the SARS-CoV-2 virus, namely, 9 had a history of COVID-19, 2 had a positive PCR test, 12 had IgG to COVID-19, and 5 had IgM to COVID-19.

Conclusions. The article demonstrates the polymorphism of the clinical and laboratory manifestations of the multisystem pediatric inflammatory syndrome associated with COVID-2019; easy to use WHO criteria WHO criteria for diagnosing this syndrome; the need for every physician to be alert to this syndrome when in contact with a child who has fever for three or more days during the period of epidemic disorder due to coronavirus disease (COVID-19).

Key words: viral infection, COVID-19, multisystem inflammatory syndrome in children, children, complications, diagnostics.

Pathologia, 2023. 20(3), 289-294

Тривалий час вважали, що діти та підлітки, які не мають супутньої патології, не хворіють на COVID-19 або переносять його у легкій формі без ускладнень [4,11]. Проте 07 травня 2020 року в британському медичному журналі «The Lancet» вийшла стаття «Hyperinflammatory shock in children during COVID-19 pandemic» за авторством Shelley Riphagen, в якій йшлося про спалах захворювання з ознаками атипичної хвороби Кавасаки, виявлений у Південній Темзі в Лондоні, Велика Британія. Оскільки в обстежених дітей був обтяжений щодо COVID-19 анамнез, науковці припустили існування зв'язку між цими захворюваннями. Проте через нестачу даних довести цю гіпотезу вдалося значно пізніше [8,9,10].

Відомо, що зв'язок мультисистемного педіатричного запального синдрому (MIS-C) із COVID-19 виявляють у більшості випадків захворювання. Симптоми, наявні в пацієнтів, повністю або частково відповідають критеріям діагностики хвороби Кавасаки. В останніх американських дослідженнях показано: MIS-C діагностують переважно в дітей африканського або латиноамериканського походження [6,18,16].

Досі остаточно не встановлено, які генетичні, біологічні чи соціально-економічні фактори відіграють роль у виникненні синдрому [13,15,17]. Складним залишається також питання щодо патогенезу MIS-C. Доведено, що він має усі загальні ознаки механізму розвитку аутоімунних хвороб, а також специфічні імунотоксичні механізми, притаманні васкуліту Кавасаки [15,17].

Серед основних клінічних проявів MIS-C визначають висип, шлунково-кишкові порушення, зміни кінцівок, зміни слизової оболонки порожнини рота, кон'юнктивіт, лімфаденопатію, неврологічні симптоми, епідеміологічний зв'язок із COVID-19 [1,2].

Нині немає специфічних тестів, що дали б змогу точно встановити діагноз. Тому ВООЗ розроблено та запропоновано до використання у медичних закладах низки діагностичних критеріїв, на які варто спиратися під час обстеження:

- 1) вік 0–19 років;
- 2) лихоманка тривалістю не менше ніж 3 доби;
- 3) докази мультисистемності захворювання (наявність двох із п'яти ознак):

- висип, кон'юнктивіт або слизово-шкірні ознаки запалення рук, ніг, слизової оболонки ротової порожнини;
- гіпотензія або шок;
- ураження серцево-судинної системи, як-от перикардит, вальвуліт, коронарні аномалії;
- коагулопатія;
- шлунково-кишкові симптоми;

- 4) підвищені рівні лабораторних маркерів запалення;

- 5) відсутність іншої інфекції, що пояснювала б запалення;

- 6) докази інфікування вірусом SARS-CoV-2 [3,14].

Про випадки MIS-C в Україні нині доволі мало відомостей [2,5]. Тому вважаємо доцільним описати спостереження за групою дітей з ознаками MIS-C, які перенесли коронавірусну хворобу (COVID-19). Спостереження здійснили в Запорізькій області України.

Мета роботи

Ознайомити лікарів із клінічними ознаками мультисистемного запального синдрому, асоційованого з COVID-19, ґрунтуючись на аналізі його перебігу в дітей Запорізької області України.

Матеріали і методи дослідження

Здійснили ретроспективний аналіз історій хвороб 16 дітей віком від 1 до 16 років, які мали в анамнезі COVID-19 та/або контактували з хворими на це захворювання. COVID-19 в усіх пацієнтів підтверджений лабораторно. Перебіг хвороби супроводжувався лихоманкою, розладами з боку інших органів і систем. Жодна дитина групи спостереження не була вакцинована проти SARS-CoV-2.

Хворі перебували на лікуванні в багатопрофільній дитячій лікарні (м. Запоріжжя) у період з квітня 2020 року до вересня 2021 року. В усіх обстежених діагностовано MIS-C за діагностичними критеріями ВООЗ.

Для підтвердження зв'язку з COVID-19 в усіх дітей матеріал із носоглотки вивчили методом ПЛР на наявність РНК вірусу, а також крові методом ІФА з визначенням наявності IgG, IgM до вірусу SARS-CoV-2.

Під час дослідження проаналізували клінічний перебіг захворювання в кожного пацієнта, виявили зміни загального аналізу крові, біохімічного аналізу, показників, що характеризують функціональний стан печінки (АЛТ, АСТ), нирок (креатинін), показників запального процесу (лейкоцитарна формула, ШОЕ, прокальцитонін, С-реактивний білок) у динаміці хвороби, а також параметри, що визначають стан системи згортання крові (рівень тромбоцитів, D-димера). Проаналізували також результати функціональних обстежень (ЕКГ, УЗД, рентгенографія органів грудної порожнини тощо). Для виключення бактеріальних чинників як причини запального синдрому в усіх пацієнтів на висоті лихоманки брали кров і, за потреби, інші біологічні матеріали (кал, сеча, харкотиння) для бактеріологічного дослідження.

Згідно з протоколом [4], дітям призначили «імуносупресивну терапію» глюкокортикоїдними препаратами тривалістю в середньому 7 днів. У 4 дітей виникла потреба в імунотерапії, що здійснена шляхом внутрішньовенного введення імуноглобуліну в супресивній дозі; в середньому виконали 2 введення. У результаті лікування 14 із 16 дітей повністю одужали, у 2 зафіксували залишкові явища (залишкові ознаки міокардиту, тромб передсердя).

Для статистичного опрацювання результатів використали непараметричні методи: описову статистику і статистичний висновок. Усі розрахунки здійснили за допомогою програми Microsoft Excel. У роботі проаналізовано кількісні показники, що наведені як n (%), і якісні – як середнє відхилення (SD), медіана (Me) та мода (Mo).

Результати

Встановлено, що 13 із 16 дітей під час госпіталізації мали діагноз, не пов'язаний із COVID-19. Зокрема,

Таблиця 1. Клінічна характеристика MIS-C кожного пацієнта (n = 16)

Показник	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Вік, роки	9	3	13	11	8	11	7	1	12	2	5	11	6	16	9	5
Лихоманка	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Висип	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+
Кардіопатія	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Порушення ритму	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+
Дисметаболічні зміни в міокарді	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
Абдомінальний синдром	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Гепатомегалія	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Спленомегалія	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Лімфаденопатія	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Міотонічний синдром	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Фарингіт, стоматит	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Нефропатія	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
Артралгія	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Загальна кількість симптомів у пацієнта	10	5	5	7	4	6	6	6	5	5	10	9	6	9	6	9

2 хворих направлені в стаціонар із припущенням про гострий апендицит, 4 – з діагнозом дерматит; діагнози скарлатина, енцефаліт, флебіт ворітної вени, кавернозна трансформація ворітної вени, токсико-гіпоксичне ураження ЦНС і розлад поведінки, ДВЗ синдром, реактивний коксит – по одному випадку. Термін госпіталізації варіював від 1 до 20 дня хвороби (у середньому дітей госпіталізували на 5 день, SD – 5,1). У тяжкому стані надійшли 5 із 16 дітей. На лікуванні в відділенні інтенсивної терапії за клінічними показаннями перебували 11 дітей протягом у середньому 8 днів (SD – 4,1).

Підтверджену коронавірусну хворобу (COVID-19) мали в анамнезі 9 дітей. У них до появи перших симптомів захворювання, з приводу якого відбувалася госпіталізація, минало 8–60 днів. У всіх пацієнтів лабораторно підтверджений зв'язок із COVID-19. Так, ПЛР-тест виявився позитивним у 2 осіб; у 12 обстежених виявили IgG до COVID-19; у 5 – IgM до COVID-19; у 3 дітей виявлено обидва класи антитіл.

Аналіз віку обстежених показав, що середній вік становив 8 років (SD – 4,2). Зауважимо, що лише 2 (12,5 %) дитини були раннього віку, а переважна більшість (n = 14, 87,5 %) – віком 11–16 років. У структурі за статтю переважали хлопці – 11 (68,75 %) проти 5 (31,25 %) дівчат.

За даними, що наведені на рис. 1, всі діти мали лихоманку, що виникала в середньому на 2 день (SD – 1,5) захворювання і тривала 4 дні (SD – 0,5) до часу надходження. Максимальна температура у групі коливалась в межах 38,2–40,4 °C (середнє значення становило 39,0 °C, SD – 0,3). Скарги на виражену слабкість мали 9 дітей, на сильний головний біль – троє. Висипку, а саме екзантему, виявили у 8 дітей, вона мала переважно дрібноточковий характер. Екзантема виникала в середньому на 4 день (SD – 1,8) і тривала 7 днів (SD – 2,6). Абдомінальний синдром виявлено у 50 % дітей. Його основні прояви: блювання (у 5 дітей), яке з'являлася в середньому на 3 день (SD – 1,0) і тривало 1 день; біль у животі (8 осіб) тривалістю 2 дні (SD – 1,4), що виникав у середньому на 2 день (SD – 0,4); діарея (3 випадки), що тривала в середньому 3 дні (SD – 1,6). Гепатомегалію діагностували у 10 дітей, у 8 осіб вона супроводжувалася лабораторними ознаками гепатиту; спленомегалія виявлена у 3 випадках.

Поширене явище – ураження слизової оболонки рота та глотки. Так, фарингіт діагностований у 12 із 16 дітей, у 2 випадках він супроводжувався глоситом, в одному – афтозним стоматитом, ще в одному – хейлітом. Пневмонія діагностована в 3 дітей, кардіопатія – у 12. Серед порушень серцевого ритму виявляли синусову аритмію (n = 5), тахікардію (n = 6), брадикардію (n = 4). У 9 обстежених на ЕКГ виявили дисметаболічні зміни в міокарді. Нефропатія виникла у 8 хворих, у 2 – цитопенічний синдром.

Для підтвердження мультисистемності ураження в пацієнтів, які перебували під спостереженням, у таблиці 1 наведено перелік симптомів, що виявлені в кожного із них. Отже, в однієї дитини зафіксували ураження 6 систем одночасно, у двох осіб у патологічний процес залучені 5 систем, ще у чотирьох хворих – 4, шестеро обстежених мали скарги з боку 3 систем, троє дітей – із боку 2 систем.

Зміни, що виявлені в загальному аналізі крові та лейкоцитарній формулі, наведено на рис. 2. Встановили, що у 8 дітей зафіксовано зниження рівня еритроцитів та/або гемоглобіну (еритроцити: Me – 4, Mo – 4, SD – 0,6; гемоглобін: Me – 106, Mo – 106, SD – 15,0), у 9 осіб прояви анемії посилювалися з часом. У 93,75 % (n = 15) дітей виявили зміни в лейкоцитарній формулі: нейтрофільний лейкоцитоз (SD – 3,1, Me – 17,3, Mo – дані варіабельні) із зсувом лейкоцитарної формули вліво у 87,5 % (n = 14), прискорення ШОЕ – у 81,25 % (n = 13) (SD – 3,9, Me – 30, Mo – 24), лімфоцитопенію – у 93,75 % (n = 15) (SD – 3, Me – 17, Mo – 6). Встановили, що кількість лейкоцитів становила від $1,7 \times 10^9/\text{л}$ до $55,8 \times 10^9/\text{л}$, лімфоцитів – від 2 % до 12 %, ШОЕ – від 3 мм/год до 65 мм/год, у 10 хворих із 13 був вищим за 20 мм/год. Рівень тромбоцитів знижений у 25 % (n = 4) дітей (SD – 37,1, Me – 190, Mo – 190).

Проаналізувавши показники печінкових проб (рис. 3), з'ясували: у 87,5 % (n = 14) дітей виявлено підвищення рівня АЛТ (SD – 5,3, Me – 1,4, Mo – 1,08), що у 5 хворих супроводжувалося зниженням рівня білка (31,25 %, SD – 2,9, Me – 54, Mo – дані варіабельні). Про погіршення функціонального стану нирок свідчило підвищення рівню креатиніну крові в 50,0 % (n = 8) пацієнтів (SD – 30, Me – 126, Mo – 148).

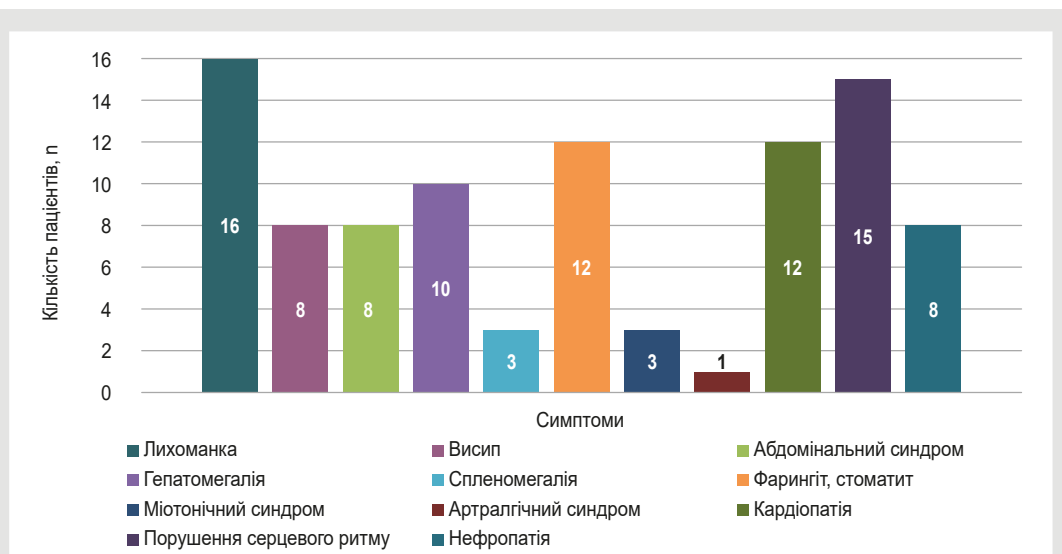


Рис. 1. Частота реєстрації окремих симптомів у дітей із MIS-C (n = 16).

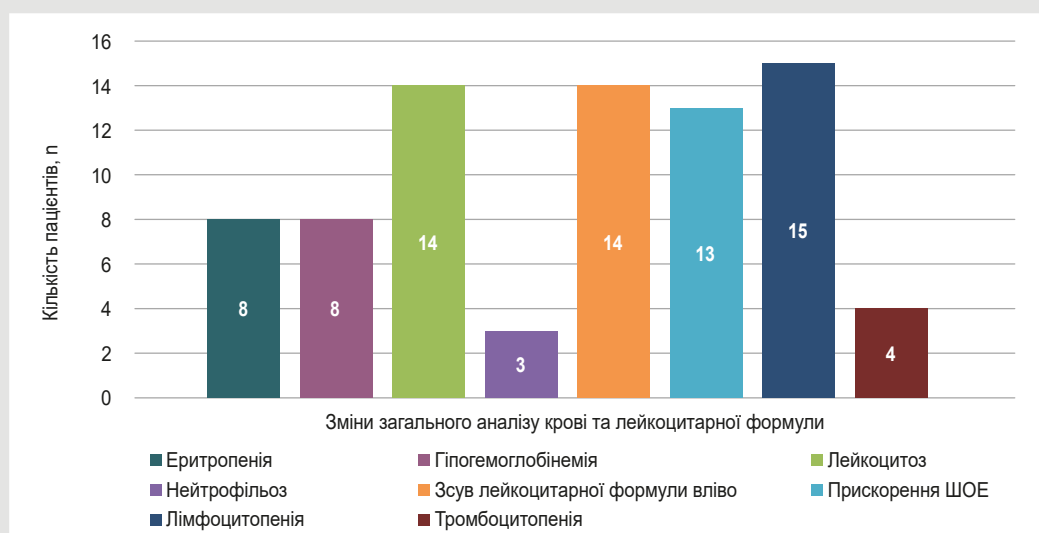


Рис. 2. Частота відхилень показників загального аналізу крові щодо референтних значень у дітей із MIS-C (n = 16).

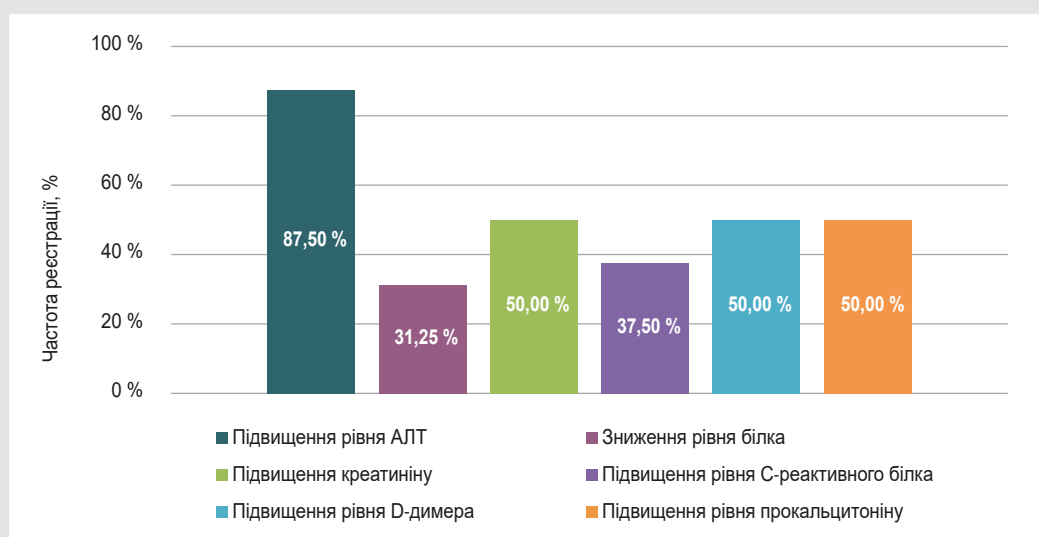


Рис. 3. Частота відхилень біохімічних показників крові у дітей із MIS-C (%) (n = 16) щодо референтних значень.

Підвищення показників запалення в сироватці крові встановили в усіх обстежених. Зокрема, у 37,5 % (n = 6) випадків зафіксовано високі рівні С-реактивного білка (SD – 33, Me – 16,75, Mo – 1), що досягав максимального значення 343,9 мг/л (при референтних показниках 0–5 мг/л). У 50,0 % (n = 8) пацієнтів визначили підвищення концентрації D-димера (SD – 1185, Me – 2765, Mo – 4400), цей показник становив від 1,5 мг/л до 15 000 мг/л (референтні значення – до 0,5 мг/л). Прокальцитонін підвищений у 50,0 % (n = 8) обстежених (SD – 3, Me – 1,06, Mo – дані варіабельні).

Обговорення

Діагностика MIS-C залишається непростою проблемою для лікарів у всьому світі, що підтверджують численні публікації [12, 13, 15, 16, 17, 18]. Згідно з документом «Клінічне ведення пацієнтів з COVID-19. «Жива» клінічна настанова», що схвалений МОЗ України та містить основні рекомендації щодо тактики лікування хворих на COVID-19 у нашій країні, імовірно треба вважати діагноз MIS-C у будь-якої дитини зі стійкою лихоманкою без клінічного фокусу та будь-якою лихоманкою, пов'язаною з погіршенням загального стану, що збігається з недавнім впливом SARS-CoV-2 [4].

Спостерігаючи за дітьми, виявили у них симптоми, що неодноразово наведені в публікаціях дослідників, які вивчали цей синдром. Зокрема йдеться про праці Lucio Verdoni et al. («An outbreak of severe Kawasaki-like disease at the Italian epicentre of the SARS-CoV-2 epidemic: an observational cohort study») та Shelley Riphagen («Hyperinflammatory shock in children during COVID-19 pandemic»), які одними з перших надали розгорнуті дані про клінічну картину, перебіг і лікування цього синдрому [7, 8].

Нині цю симптоматику вважають типовою для MIS-C, вона покладена в основу діагностичних критеріїв ВООЗ, що запропоновані світовій медичній спільноті для використання у практичній діяльності [3]. Під час нашого дослідження також спиралися на ці критерії. Встановили, що вік обстежених дітей – від 1 до 16 років (середній у групі – 8 років (SD – 4,2)), як і за критеріями встановлення діагнозу. Крім того, симптоми, зафіксовані в пацієнтів, відповідали наведеним діагностичним критеріям ВООЗ для MIS-C, їх виявляли з такою частотою: лихоманка тривалістю не менше ніж 3 доби та докази мультисистемного захворювання – у 100 % випадків; порушення ритму – у 93,75 % (n = 15); фарингіт – у 75,00 % (n = 12), що у 2 (12,50 %) випадках супроводжувався глоситом, в 1 (6,25 %) дитини – афтозним стоматитом, ще в 1 (6,25 %) – хейлітом; ураження серцево-судинної системи, зокрема кардіопатія, – в 12 (75,0 %) випадках; дрібноточкова екзантема – 50,0 % дітей (n = 8); абдомінальний синдром – у 50,00 % (n = 8) дітей, що в кожній дитини виявляли за болем у животі, блюванням – у 5 (31,25 %), діареєю – у 3 (18,75 %) випадках; лабораторні ознаки коагулопатії – 50,0 % (n = 8) дітей, зокрема підвищений рівень D-димера, а також у 4 випадках (25,0 %) – зниження тромбінового часу. Підвищені рівні маркерів запалення зареєстрували в кожного пацієнта: 81,25 % (n = 13) –

підвищення ШОЕ, 50,00 % (n = 8) – прокальцитоніну, 37,50 % (n = 6) – С-реактивного білка. Крім того, під час обстеження в дітей не зафіксували переконливих доказів наявності іншого захворювання, що могло б мати такі симптоми (як-от бактеріальні інфекційні хвороби), але в усіх пацієнтів виявили інфікування вірусом SARS-CoV-2. Так, COVID-19 в анамнезі мали 9 (56,25 %) хворих, ПЛР-тест позитивний у 2 (33,30 %) випадках, IgG до COVID-19 виявили у 12 (75,00 %), а IgM до COVID-19 – у 5 (31,25 %) обстежених.

У статті Li Jiang et al. [19], здійснено метааналіз 123 досліджень клініко-лабораторних особливостей MIS-C. Встановлено, що узагальнена частота реєстрації симптомів MIS-C у світі така: лихоманка – 90,85 % (95 %; довірчий інтервал (ДІ) 89,86–91,84 %), неуточнені шлунково-кишкові симптоми – 51,98 % (95 %; ДІ 50,13–53,83 %), біль у животі (48,97 %, 95 %; ДІ 47,09–50,85 %), блювання – 43,79 % (95 %; ДІ 41,90–45,68 %), діарея – 40,10 % (95 %; ДІ 38,23–41,97 %), висип – 49,63 % (95 %; ДІ 47,80–51,47 %), кон'юнктивіт – 46,93 % (95 %; ДІ 45,17–48,69 %). Фарингіт, за результатами міжнародних досліджень, виявили у 31,91 % випадків (95 %; ДІ 30,20–33,61 %), зміни в серці – 29,34 % (95 %; ДІ 27,66–31,02 %), шийна лімфаденопатія – 19,11 % (95 %; ДІ 17,68–20,53 %). У лабораторних аналізах найчастіша ознака – підвищення рівня маркерів запалення, зокрема С-реактивного білка (93,22 %, 95 %; ДІ 93,26–94,17 %), D-димера (68,68 %, 95 %; ДІ 66,81–70,56 %), ШОЕ (56,18 %, 95 %; ДІ 54,03–58,33 %) та прокальцитоніну (41,55 %, 95 %; ДІ 39,42–43,68 %). Підвищення рівня креатиніну (15,8 %; ДІ 14,36–17,24 %), зниження рівня білка (11,6 %; ДІ 10,15–13,04 %) й анемію (7,78 %; ДІ 6,54–9,02) вважають менш поширеними лабораторними змінами. Ці дані підтвержені в інших наукових працях [7, 12, 14].

Порівнявши дані, що наведені закордонними дослідниками, з тими, що одержали в нашому дослідженні, зробили висновок, що частота виникнення симптомів в обстежених дітей здебільшого не відрізнялася.

Висновки

Наведений клініко-лабораторний аналіз 16 випадків мультисистемного педіатричного запального синдрому, асоційованого з COVID-19, демонструє:

1. поліморфність його клінічних і лабораторних проявів, що суттєво утруднює діагностику;
2. легкість використання критеріїв ВООЗ щодо діагностики цього стану;
3. кожному лікарю, який контактує з дитиною, котра лихоманить три і більше днів, рекомендовано оцінювати наявність цього синдрому в період епідемічного неблагополуччя за коронавірусною хворобою (COVID-19).

Подяка

Висловлюємо подяку Раїсі Леонідівні Шевченко, медичному директору КНП «Міська дитяча лікарня № 5» ЗМР, на базі якого здійснено дослідження.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 22.08.2023

Після доопрацювання / Revised: 03.10.2023

Схвалено до друку / Accepted: 06.10.2023

Відомості про авторів:

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

ORCID ID: 0000-0003-0250-1223

Алексюк Д. В., студентка VI курсу, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0009-0006-5688-3705

Information about authors:

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

Aleksiuik D. V., sixth year student, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

References

- Oshlyanska, O. A., Okhotnikova, O. M., Zakharchuk, O. V., & Rusak, S. O. (2021). Multysystemny zapalny syndrom, asotsiovanyi z infektsiieu SARS-CoV-2, u ditei: nova khvoroba chy syndrom? Na pryklad klinichnoho vypadku [Multisystem inflammatory syndrome associated with SARS-CoV-2 infection in children: new disease or syndrome? On the example of a clinical case]. *Ukrainian Journal of Rheumatology*, (2), 1-10. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.32471/rheumatology.2707-6970.84.16258>
- Potehina, T. (2020). Kawasaki-podobni symptomy v ditei z COVID-19: pediatrichny multysystemny zapalny syndrom [Kawasaki-like symptoms in children with COVID-19: pediatric multisystem inflammatory syndrome]. *Dytiachyi likar*, (2), 21-24. [in Ukrainian].
- Tuikkala, H. (2021). Multysystemny zapalny syndrom u ditei (MIS-C), poviazanyi z infektsiieu COVID-19 [Multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) associated with COVID-19 infection]. [in Ukrainian]. <https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2022/01/multysystemnyj-zapalnyj-syndrom-u-ditej-mis-c-covid-19.pdf>
- Ministry of Health of Ukraine. (2021). *Klinichne vedennia patsientiv z COVID-19 «zhYVA» klinichna nastanova* (KN 2021-762) [Clinical management of patients with COVID-19 "ZHYVA" clinical guidelines (KN 2021-762)]. Retrieved from https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2021/04/2021_04_kn_covid-19.pdf
- Usachova, O. V., Konakova, O. V., Silina, Y. A., & Vorobiova, N. V. (2022). Multysystemny zapalny syndrom, imovirno, asotsiovanyi iz SARS-CoV-2, uskladneni utvorenniam trombu v pravomu peredsedi, u dytyny (klinichny vypadok) [Multisystem inflammatory syndrome, probably associated with SARS-CoV-2, complicated by thrombus in the right atrium, in a child]. *Pathologia*, 19(2), 146-153. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2022.2.255603>
- Henderson, L. A., Canna, S. W., Friedman, K. G., Gorelik, M., Lapidus, S. K., Bassiri, H., Behrens, E. M., Ferris, A., Kernan, K. F., Schuler, G. S., Seo, P., Son, M. B. F., Tremoulet, A. H., Yeung, R. S. M., Mudano, A. S., Turner, A. S., Karp, D. R., & Mehta, J. J. (2021). American College of Rheumatology Clinical Guidance for Multisystem Inflammatory Syndrome in Children Associated With SARS-CoV-2 and Hyperinflammation in Pediatric COVID-19: Version 2. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N. J.)*, 73(4), e13-e29. <https://doi.org/10.1002/art.41616>
- Verdoni, L., Mazza, A., Gervasoni, A., Martelli, L., Ruggeri, M., Ciuffreda, M., Bonanomi, E., & D'Antiga, L. (2020). An outbreak of severe Kawasaki-like disease at the Italian epicentre of the SARS-CoV-2 epidemic: an observational cohort study. *Lancet (London, England)*, 395(10239), 1771-1778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31103-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31103-X)
- Riphagen, S., Gomez, X., Gonzalez-Martinez, C., Wilkinson, N., & Theocharis, P. (2020). Hyperinflammatory shock in children during COVID-19 pandemic. *Lancet (London, England)*, 395(10237), 1607-1608. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31094-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31094-1)
- Health Policy team. (2020). Paediatric multisystem inflammatory syndrome temporally associated with covid-19 (PIMS) – guidance for clinicians. *RCPC*. Retrieved from <https://www.rcpch.ac.uk/resources/paediatric-multisystem-inflammatory-syndrome-temporally-associated-covid-19-pims-guidance>
- Media & Public Affairs team. (2020, May 1). Leading paediatricians publish case definition for illness affecting children during COVID-19. *RCPC*. Retrieved from <https://www.rcpch.ac.uk/news-events/news/leading-paediatricians-publish-case-definition-illness-affecting-children-during>
- World Health Organization. (2020, May 15). *Multisystem inflammatory syndrome in children and adolescents temporally related to COVID-19*. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/multisystem-inflammatory-syndrome-in-children-and-adolescents-with-covid-19>
- Belot, A., Antona, D., Renolleau, S., Javouhey, E., Hentgen, V., Angoulvant, F., Delacourt, C., Iriart, X., Ovaert, C., Bader-Meunier, B., Kone-Paut, I., & Levy-Bruhl, D. (2020). SARS-CoV-2-related paediatric inflammatory multisystem syndrome, an epidemiological study, France, 1 March to 17 May 2020. *European communicable disease bulletin*, 25(22), 2001010. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.22.2001010>
- Stasiak, A., Perdas, E., & Smolewska, E. (2022). Risk factors of a severe course of pediatric multi-system inflammatory syndrome temporally associated with COVID-19. *European journal of pediatrics*, 181(10), 3733-3738. <https://doi.org/10.1007/s00431-022-04584-8>
- Flood, J., Shingleton, J., Bennett, E., Walker, B., Amin-Chowdhury, Z., Oligbu, G., Avis, J., Lynn, R. M., Davis, P., Bharucha, T., Pain, C. E., Jyothish, D., Whittaker, E., Dwarakanathan, B., Wood, R., Williams, C., Swann, O., Semple, M. G., Ramsay, M. E., Jones, C. E., ... Ladhani, S. N. (2021). Paediatric multisystem inflammatory syndrome temporally associated with SARS-CoV-2 (PIMS-TS): Prospective, national surveillance, United Kingdom and Ireland, 2020. *The Lancet regional health. Europe*, 3, 100075. <https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2021.100075>
- Chen, M. R., Kuo, H. C., Lee, Y. J., Chi, H., Li, S. C., Lee, H. C., & Yang, K. D. (2021). Phenotype, Susceptibility, Autoimmunity, and Immunotherapy Between Kawasaki Disease and Coronavirus Disease-19 Associated Multisystem Inflammatory Syndrome in Children. *Frontiers in immunology*, 12, 632890. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.632890>
- Stierman, B., Abrams, J. Y., Godfred-Cato, S. E., Oster, M. E., Meng, L., Yip, L., Patel, P., Balachandran, N., Prezzato, E., Pierce, T., Hsu, K. K., Burns, M., Peterson Pompa, X., Lauro, P., Hartley, A., Jones, C., Gretsck, S., Reid, H., Lim, S., Campbell, A. P., ... Belay, E. D. (2021). Racial and Ethnic Disparities in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children in the United States, March 2020 to February 2021. *The Pediatric infectious disease journal*, 40(11), e400-e406. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000003294>
- Zhang, Q. Y., Xu, B. W., & Du, J. B. (2021). Similarities and differences between multiple inflammatory syndrome in children associated with COVID-19 and Kawasaki disease: clinical presentations, diagnosis, and treatment. *World journal of pediatrics* : WJP, 17(4), 335-340. <https://doi.org/10.1007/s12519-021-00435-y>
- Raab, C. P. (2023). Kawasaki disease. *MSD Manual Professional Version*. Retrieved from <https://www.msdmanuals.com/professional/pediatrics/miscellaneous-disorders-in-infants-and-children/kawasaki-disease>
- Jiang, L., Tang, K., Irfan, O., Li, X., Zhang, E., & Bhutta, Z. (2022). Epidemiology, Clinical Features, and Outcomes of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) and Adolescents—a Live Systematic Review and Meta-analysis. *Current pediatric reports*, 10(2), 19-30. <https://doi.org/10.1007/s40124-022-00264-1>