

Патологія



Том 20, № 1(57), січень – квітень 2023 р.

ISSN (print): 2306-8027. ISSN (online): 2310-1237

<http://pat.zsmu.edu.ua>

Науково-практичний журнал
Запорізького державного медичного університету

Заснований у жовтні 2004 р. Виходить один раз на 4 місяці.
Свідоцтво про реєстрацію КВ № 20604-10404 від 27.02.2014 р.
Передплатний індекс – 95911

Атестований як наукове фахове видання України категорії «А»,
в якому можуть публікуватися результати дисертаційних робіт
доктора філософії, доктора та кандидата наук

Галузь знань – охорона здоров'я (22);
спеціальності: медицина – 222,
педіатрія – 228, стоматологія – 221,
технології медичної діагностики та лікування – 224
(наказ МОН України № 1301 від 15.10.2019 р.)

Журнал включений до **WEB OF SCIENCE**[®], Ulrich's Periodicals
Directory (США), WorldCat (США), The National Center
for Biotechnology Information (США), National Library of Medicine
(США), WORLDWIDE ELIBRARY(США), DOAJ, ROAD (Франція), Google
Scholar (Академія) та інших міжнародних наукометричних баз даних

Статті, що надходять до журналу, рецензуються за процедурою
Double-blind. Ліцензія Creative Commons

Рекомендовано до друку Вченою радою ЗДМУ,
протокол № 6 від 21.03.2023 р. Підписано до друку 30.03.2023 р.

Редакція:

Літературний редактор О. С. Савеленко
Технічний редактор Ю. В. Полупан

Адреса редакції та видавця:



ЗДМУ, пр. Маяковського, 26,
м. Запоріжжя, Україна, 69035



med.jur@zsmu.zp.ua



<http://pat.zsmu.edu.ua>

Головний редактор

професор В.О. Туманський (Запоріжжя)

Заступник головного редактора

професор М.Ю. Колесник (Запоріжжя)

Відповідальний секретар

професор С.В. Павлов (Запоріжжя)

Редакційна колегія

проф. А.В. Абрамов (Запоріжжя)
проф. С.І. Воротинцев (Запоріжжя)
проф. О.В. Ганчева (Запоріжжя)
проф. С.Г. Гичка (Київ)
проф. А.І. Гоженко (Одеса)
проф. О.А. Григор'єва (Запоріжжя)
проф. І.С. Давиденко (Чернівці)
проф. О.О. Дядик (Київ)
проф. М. Єлень (Вроцлав, Польща)
проф. С.М. Завгородній (Запоріжжя)
чл.-кор. НАМН України, проф. Т.Д. Задорожна (Київ)
проф. К.Д. Захаровські (Франкфурт, ФРН)
академік НАМН, чл.-кор. НАН України, проф. Д.Д. Зербіно (Львів)
проф. Д.А. Лашкул (Запоріжжя)
проф. А.В. Клименко (Запоріжжя)
проф. С.М. Коваль (Харків)
проф. Д. Контогеоргос (Афіни, Греція)
проф. Г.О. Леженко (Запоріжжя)
д.м.н. О.М. Міщенко (Запоріжжя)
проф. Н.С. Михайловська (Запоріжжя)
проф. Ю.О. Поспішіль (Львів)
академік НАМН, чл.-кор. НАН України, проф. О.Г. Резніков (Київ)
академік НАМН, чл.-кор. НАН України, проф. А.М. Романенко (Київ)
проф. А.М. Романюк (Суми)
чл.-кор. НАН України, проф. Г.Г. Скібо (Київ)
проф. І.В. Сорокіна (Харків)
проф. С.І. Тертишний (Запоріжжя)
д.м.н. М.А. Шишкін (Запоріжжя)
проф. І.С. Шпонька (Дніпро)

В умовах війни надруковано в Центрі видавничого забезпечення ЗДМУ (пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, Україна, 69035)
обмеженим накладом. Свідоцтво про внесення до Державного реєстру ДК № 2298 від 22.09.2005 р.
Формат 60x841/8. Папір офсетний. Умовн. друк. арк. 6. Замовлення № 9614

Scientific Medical Journal. Publisher Zaporizhzhia State Medical University.
ISSN (print): 2306-8027. ISSN (online): 2310-1237

Pathologia (established in October 2004) is the official journal of Zaporizhzhia State Medical University and is published 3 times a year. The Journal publishes peer-reviewed, original articles related and reviews to the science of pathology. The Journal welcomes investigative studies on anatomical pathology, cytopathology, experimental pathology, forensic pathology and morbid anatomy, genetics, haematology, immunology and immunopathology, microbiology and molecular pathology. In determining content, the primary considerations are excellence, relevance and novelty.

Experimental studies must include a statement that the experimental protocol and informed consent procedure were in compliance with the Helsinki Convention and were approved by the relevant local ethics committee. Specific subject of publication: Medical science, Pathology, Diagnostics, Cytology. Submit papers are peer-reviewed. License Creative Commons

Indexing: Web of Science Core Collection, Emerging Sources Citation Index, Ulrich's Periodicals Directory (USA), WorldCat (USA), ISSN (France), Index Copernicus (Poland), BASE - Bielefeld Academic Search Engine (Germany), getCITED (USA), UIF (Universal Impact Factor), DRJI (Sweden), JournalTOCs, CiteFactor (USA/Canada), PILA – Publishers International Linking Association, Inc, CROSSREF (USA), The National Library of Medicine (USA), The National Center for Biotechnology Information, Research Bible (Japan), SIS (Scientific Indexing Services) (USA), Hinari, DOAJ (Directory of Open Access Journals), Worldwide Science Education Library (USA), ROAD, Google Scholar

Editorial office: Maiakovskiy Avenue, 26, Zaporizhzhia, 69035, UKRAINE. **E-mail:** med.jur@zsmu.zp.ua

Editor-in-Chief

V. O. Tumanskiy
(Zaporizhzhia, Ukraine)

Deputy Editor-in-Chief

M.Yu. Kolesnyk
(Zaporizhzhia, Ukraine)

Executive secretary

S.V. Pavlov
(Zaporizhzhia, Ukraine)

Editorial Board

A.V. Abramov (Zaporizhzhia, Ukraine)
I.S. Davydenko (Chernivtsi, Ukraine)
O.O. Dyadyk (Kyiv, Ukraine)
A.I. Gozhenko (Odesa, Ukraine)
S.H. Gychka (Kyiv, Ukraine)
O.V. Hancheva (Zaporizhzhia, Ukraine)
O.A. Hryhorieva (Zaporizhzhia, Ukraine)
M. Jeleń (Wroclaw, Poland)
A.V. Klymenko (Zaporizhzhia, Ukraine)
S.M. Koval (Kharkiv, Ukraine)
G. Kontogeorgos (Athens, Greece)
D.A. Lashkul (Zaporizhzhia, Ukraine)
H.O. Lezhenko (Zaporizhzhia, Ukraine)
O.M. Mishchenko (Zaporizhzhia, Ukraine)

N.S. Mykhailovska (Zaporizhzhia, Ukraine)
Yu.O. Pospishil (Lviv, Ukraine)
O.H. Reznikov (Kyiv, Ukraine)
A.M. Romanenko (Kyiv, Ukraine)
A.M. Romaniuk (Sumy, Ukraine)
I.S. Shponka (Dnipro, Ukraine)
M.A. Shyshkin (Zaporizhzhia, Ukraine)
H.H. Skibo (Kyiv, Ukraine)
I.V. Sorokina (Kharkiv, Ukraine)
S.I. Tertyshnyi (Zaporizhzhia, Ukraine)
S.I. Vorotyntsev (Zaporizhzhia, Ukraine)
K.D. Zacharowski (Frankfurt, Germany)
T.D. Zadorozhna (Kyiv, Ukraine)
S.M. Zavhorodnii (Zaporizhzhia, Ukraine)
D.D. Zerbino (Lviv, Ukraine)

Оригінальні дослідження

- 5** Ремоделювання лівого шлуночка в нормотензивних щурів лінії Вістар, які зазнали інтермітуючої гіпоксії різної тривалості
Колесник Ю. М., Колесник М. Ю., Ганчева О. В., Ісаченко М. І.
- 14** Зниження ризику недосягнення контролю артеріального тиску в пацієнтів з артеріальною гіпертензією та ішемічною хворобою серця: роль кверцетину
Соломенчук Т. М., Прокоса М. І., Климкович О. Ю.
- 20** Взаємозв'язок ферокінетичних показників зі станом кардіального ремоделювання у хворих на ішемічну хворобу серця із супутнім залізодефіцитом
Коновалова М. О., Михайловська Н. С.
- 27** Клініко-прогностична роль змін параметрів системи гемостазу та С-реактивного протеїну в розвитку тромботичних ускладнень у кисневозалежних хворих на коронавірусну хворобу (COVID-19)
Черкаський В. В., Рябоконт О. В., Рябоконт Ю. Ю.
- 36** Рівень аміаку й астроцитів Альцгеймера 2 типу в головному мозку померлих хворих на цироз печінки різних ступенів тяжкості
Шулятнікова Т. В., Туманський В. О.
- 45** Проблеми стадіювання ускладнених форм карциноми ободової кишки у пацієнтів, оперованих в ургентному порядку в умовах загальнохірургічного стаціонара
Кубрак М. А., Завгородній С. М., Данилюк М. Б.
- 50** Використання стромально-васкулярної фракції жирової тканини при відновленні розривів дистального сухожилка двоголового м'яза плеча
Лісунов М. С., Головаха М. А., Кожем'яка М. О.
- 58** Динаміка простагландину E₂ при хірургічному лікуванні гастроєзофагеальної рефлюксної хвороби
Гайдаржі Є. І.
- 63** Вплив метаболічної активності кишкової мікрофлори на тяжкість і тривалість ротавірусної діареї в дітей раннього віку
Воробйова Н. В., Усачова О. В., Сіліна Є. А., Фурик О. О.
- 69** Дослідження капілярного кровотоку слизової оболонки періімплантатної ділянки методом лазерної доплерівської флоуметрії
Максимов Д. Я., Варжапетян С. Д., Пархоменко Д. П., Сальников В. І., Міщенко О. М.

Огляди

- 76** Мезенхімальні стовбурові клітини: різноманітність
Грабовий О. М., Невмержицька Н. М., Яременко Л. М., Костинський Г. Б., Демидчук А. С., Кондаурова Г. Ю.
- 85** Сучасні підходи до скринінгу раку шийки матки (огляд літератури)
Павлюченко М. І., Круть Ю. Я., Сюсюка В. Г., Дейніченко О. В.

Клінічний випадок

- 94** Розлад постійного генітального збудження: клініка, диференційна діагностика та особливості допомоги (клінічний випадок)
Огоренко В. В., Кириченко А. Г., Шустерман Т. Й., Кокашинський В. О., Томах Н. В.

Original research

- 5** Left ventricular remodeling in normotensive Wistar rats exposed to intermittent hypoxia of different duration
Kolesnyk Yu. M., Kolesnyk M. Yu., Hancheva O. V., Isachenko M. I.
- 14** Reduction of the risk of failure to achieve blood pressure control in patients with arterial hypertension and coronary heart disease: the role of quercetin
Solomenchuk T. M., Prokosa M. I., Klymkovych O. Yu.
- 20** The relationship between ferrokinetic parameters and the state of cardiac remodeling in patients with coronary artery disease with concomitant iron deficiency
Konovalova M. O., Mykhailovska N. S.
- 27** The clinical and prognostic role of changes in parameters of the hemostasis system and C-reactive protein in the development of thrombotic complications in oxygen-dependent patients with coronavirus disease (COVID-19)
Cherkaskyi V. V., Riabokon O. V., Riabokon Yu. Yu.
- 36** Ammonia level and Alzheimer type 2 astrocytes in the brain of deceased patients with liver cirrhosis of the varying degree
Shulyatnikova T. V., Tumanskyi V. O.
- 45** Problems of staging complicated forms of colon carcinoma in patients who were urgently operated in a general surgical hospital
Kubrak M. A., Zavhorodnii S. M., Danyliuk M. B.
- 50** Stromal-vascular fraction of adipose tissue using in the repair of distal biceps tendon tears
Lisunov M. S., Holovakha M. L., Kozhemiaka M. O.
- 58** Dynamics of prostaglandin E₂ in the surgical treatment of gastroesophageal reflux disease
Haidarzhi Ye. I.
- 63** The influence of the metabolic activity of the intestinal microflora on the severity and duration of rotavirus diarrhea in early-aged children
Vorobiova N. V., Usachova O. V., Silina Ye. A., Furyk O. O.
- 69** Study of the capillary blood flow of the mucous membrane of the peri-implant area by laser Doppler flowmetry
Maksymov D. Ya., Varzhapetian S. D., Parkhomenko D. P., Salnikov V. I., Mishchenko O. M.

Review

- 76** Mesenchymal stem cells: diversity
Grabovyi O. M., Nevmerzhytska N. M., Yaremenko L. M., Kostynskyi H. B., Demydchuk A. S., Kondaurova H. Yu.
- 85** Modern approaches to cervical cancer screening (a review)
Pavliuchenko M. I., Krut Yu. Ya., Siusiuka V. H., Deinichenko O. V.

Case report

- 94** Persistent genital arousal disorder: clinical, differential diagnostic and care aspects (clinical report)
Ogorenko V. V., Kyrychenko A. H., Shusterman T. Y., Kokashynskiy V. O., Tomakh N. V.

Left ventricular remodeling in normotensive Wistar rats exposed to intermittent hypoxia of different duration

Yu. M. Kolesnyk^{ID A,F}, M. Yu. Kolesnyk^{ID B,C}, O. V. Hancheva^{ID E}, M. I. Isachenko^{ID *B,C,D}

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

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

Intermittent hypoxia has been studied for many years as a promising non-pharmacological method of cardiovascular disease prevention. Hypoxic effects are accompanied by structural and functional changes in the myocardium. There is a direct link between the duration of hypoxic exposures and the severity of left ventricular myocardial remodeling. A range of histochemical markers of myocardial remodeling (cardiotrophin-1, titin, collagen type 1, annexin V) characterizing parenchymal-stromal relationships in the myocardium has shown high informativeness and prognostic value.

The aim of the study was to examine cardiotrophin-1, titin, collagen type 1, annexin V and the morphofunctional state of the left ventricle of the heart in experimental rats exposed to intermittent 15-day (IH15) and 60-day hypoxia (IH60).

Materials and methods. Intermittent hypoxia was modeled using 30 normotensive male Wistar rats, 7–8 months old, which were randomly assigned to 3 experimental groups of 10 animals each: 1) INT – a control group – intact animals (196.3 ± 6.8 g); 2) IH15 – 15-day hypoxia (205.6 ± 4.1 g); 3) IH60 – 60-day hypoxia (201.1 ± 5.5 g). The study compared the effects of intermittent hypoxia of varying duration: 15-day and 60-day hypoxia. Experimental modeling of intermittent hypoxia of 2 terms revealed a number of differences between the effects dependent on this factor duration through functional (blood pressure measurement, echocardiography) and immunofluorescent studies.

Results. Blood pressure in rats of both groups was in the normotensive range, but an increase in systolic by 10 % and diastolic by 19 % was found in IH60 group compared to IH15 group ($p < 0.05$). In IH15 group, there was a significant decrease in end-diastolic dimension by 20 %, end-systolic dimension by 22 %, an increase in the thickness of left ventricular posterior wall by 44 % and interventricular septum by 33 % as well as left ventricular mass by 12 %, indicating concentric remodeling of the left ventricle, the development of which was confirmed by a 76 % increase in relative wall thickness compared to that in the control group ($p < 0.05$). Along with these changes, a decrease in end-diastolic volume by 47 %, end-systolic volume by 48 %, stroke volume by 49 % and cardiac output by 50 % with preserved ejection fraction was revealed ($p < 0.05$). While the parameters of IH60 rats were characterized by an increase in the thickness of interventricular septum by 33 % and left ventricular posterior wall by 17 %, as well as left ventricle mass by 23 %, relative left ventricular wall thickness was 15 % higher than the control value ($p < 0.05$). At the same time, diastolic volume was 9 % decreased and systolic volume was 24 % increased ($p < 0.05$). Also, cardiac output was increased by 58 % compared to that in 15-day hypoxic rats with an 8 % decrease in ejection fraction ($p < 0.05$). The concentrations of markers in IH60 group exceeded those in IH15, namely: cardiotrophin-1 by 39 %, titin by 70 %, collagen type 1 by 60 % and annexin V by 130 % ($p < 0.05$).

Conclusions. 15-day hypoxia forms concentric left ventricular hypertrophy according to echocardiography findings; the study of marker profile of myocardial remodeling has revealed the development of moderate hypertrophy with increased resilient-elastic properties and decreased intensity of cardiomyocyte death. Remodeling caused by 60-day hypoxia is characterized by the eccentric pattern of changes with severe hypertrophy, significant fibrosis associated with apoptosis of cardiomyocytes. Such morphofunctional state of the myocardium may indicate the initial stages of maladaptation, increasing the risk of heart failure development.

Key words: myocardial remodeling, left ventricular, markers of myocardial remodeling, cardiotrophin-1, intermittent hypoxic hypoxia, rats.

Pathologia
2023; 20 (1), 5-13

*E-mail:
fedotova@zsmu.pp.ua

Ремоделювання лівого шлуночка в нормотензивних щурів лінії Вістар, які зазнали інтермітуючої гіпоксії різної тривалості

Ю. М. Колесник, М. Ю. Колесник, О. В. Ганчева, М. І. Ісаченко

Переривчасту гіпоксію вже багато років вивчають як перспективний метод немедикаментозної профілактики серцево-судинних захворювань. Гіпоксичні впливи супроводжуються структурно-функціональними змінами в міокарді. Виявили прямий зв'язок між тривалістю гіпоксичних експозицій і вираженістю ремоделювання міокарда лівого шлуночка. Високу інформативність і прогностичну цінність показав комплекс гістохімічних маркерів ремоделювання міокарда (кардіотрофіну-1, тайтину, колагену 1 типу, анексину V), що характеризує паренхіматозно-стромальні зв'язки в міокарді.

Мета роботи – вивчення маркерів кардіотрофіну-1, тайтину, колагену 1 типу, анексину V та морфофункціонального стану лівого шлуночка серця в експериментальних щурів при впливі переривчастої 15- (IH15) та 60-денної гіпоксії (IH60).

Матеріали та методи. Для моделювання інтермітуючої гіпоксії використовували 30 нормотензивних щурів-самців лінії Вістар віком 7–8 місяців, яких випадковим чином поділили на 3 експериментальні групи по 10 тварин у кожній: INT – контрольна група – інтактні тварини (196,3 ± 6,8 г); IH15 – 15-добова гіпоксія (205,6 ± 4,1 г); IH60 – 60-денна гіпоксія (201,1 ± 5,5 г). Порівняли наслідки періодичної гіпоксії різної тривалості (15- та 60-денної). Експериментальне моделювання переривчастої гіпоксії 2 термінів виявило низку відмінностей між ефектами, що залежать від

Ключові слова: ремоделювання міокарда, лівий шлуночок, маркери ремоделювання міокарда, кардіотрофін-1, переривчаста гіпоксія, щури.

Патологія. 2023.
Т. 20, № 1(57).
С. 5-13

тривалості цього фактора, за допомогою функціональних (вимірювання артеріального тиску (АТ), ехокардіографія) та імунофлуоресцентних досліджень.

Результати. АТ у щурів обох дослідних груп відповідав нормотензивному діапазону, виявили збільшення систолічного (на 10 %) і діастолічного (на 19 %) тиску в групі ІН60 порівняно з ІН15 ($p < 0,05$). У групі ІН15 зареєстрували достовірне зменшення кінцевого діастолічного розміру (на 20 %), кінцевого систолічного розміру (на 22 %), збільшення товщини задньої стінки лівого шлуночка (на 44 %), міжшлуночкової перетинки (на 33 %) та збільшення маси лівого шлуночка (на 12 %). Це свідчить про концентричне ремоделювання лівого шлуночка, виникнення якого підтверджене збільшенням індексу відносної товщини стінки на 76 % порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$). На тлі цих змін виявили зменшення кінцевого діастолічного об'єму (на 47 %), кінцевого систолічного об'єму (на 48 %), ударного об'єму (на 49 %) та серцевого викиду (на 50 %) зі збереженою фракцією викиду ($p < 0,05$). Показники щурів ІН60 характеризувалися збільшенням міжшлуночкової перетинки (на 33 %), задньої стінки лівого шлуночка (на 17 %) і збільшенням маси лівого шлуночка серця (на 23 %), а індекс відносної товщини стінки лівого шлуночка був більшим, ніж у контролі (на 15 %, $p < 0,05$). Встановили зниження кінцевого діастолічного об'єму на 9 %, що супроводжувалось збільшенням систолічного об'єму на 24 % ($p < 0,05$). Серцевий викид також збільшений порівняно з щурами з 15-денною гіпоксією на 58 % зі зниженням фракції викиду на 8 % ($p < 0,05$). Показники концентрації маркерів групи ІН60 перевищували ІН15: кардіотрофін-1 – на 39 %, тайтин – 70 %, колаген 1 типу – на 60 %, анексин V – на 130 % ($p < 0,05$).

Висновки. За даними ехокардіографії, 15-денна гіпоксія формує концентричну гіпертрофію лівого шлуночка серця, маркерна характеристика ремоделювання міокарда виявила розвиток помірної гіпертрофії з підвищенням пружно-еластичних властивостей і зниження інтенсивності загибелі кардіоміоцитів. Ремоделювання, спричинене 60-денною гіпоксією, характеризується ексцентричною спрямованістю змін із вираженою гіпертрофією, значним фіброзом, що асоційований з апоптозом кардіоміоцитів. Такий морфофункціональний стан міокарда свідчить про початкові етапи дезадаптації, що підвищують ризик серцевої недостатності.

Intermittent hypoxia is studied as a promising method of non-pharmacological prevention of cardiovascular diseases. Its cardioprotective effect, that increases myocardial resistance to acute and chronic ischemic damage, ischemia-reperfusion, toxic effects and many other influences is considered [1,2]. Hypoxic influences are accompanied by structural and functional changes in myocardium – its remodeling. The nature and severity of this process depends on many parameters: exposure time, oxygen concentration, gas-transport systems and substrate-enzyme interactions [3].

The efficiency of hypoxic training is determined by the pattern of myocardial remodeling, the degree of its expression and the direction of cardiac geometry transformations [4]. The complex of histochemical markers of myocardial remodeling (cardiotrophin-1, titin, collagen type 1, annexin V), quantitatively characterizing parenchymatous-stromal interrelations in myocardium, has demonstrated high informative and prognostic value. Cardiotrophin-1 provides the first line of myocardium defense by promoting cell survival and proliferation, it also possesses hemodynamic and endocrine properties. At the same time, overexpression of this cytokine leads to pathological hypertrophy, therefore it is considered as a marker of cardiovascular diseases [5].

Fibrosis is an important component of remodeling; it can develop because of extracellular space expansion (reactive) and/or replacement of cells that died by apoptosis (replacement fibrosis). The ratio of titin to type 1 collagen can be considered a prospective approach to assessing the severity of fibrosis. Titin is a protein maintaining sarcomere integrity by modeling passive tension, changing its conformation, isoform balance, as well as interacting with other myofilament components [6]. Physiological role of collagen is to provide mechanical power of myocardial matrix as well as the ability to transmit force generated by cardiomyocytes. In pathological conditions, its accumulation promotes differentiation and proliferation of myofibroblasts, forming a “vicious circle” – increasing collagen synthesis [7].

The marker of molecular imaging of cardiomyocyte apoptosis is annexin V due to its high affinity for phosphatidylserine [8]. High invasiveness of endomyocardial biopsy limits wide use of this technique in patients. The distinctive feature of the above-named markers is the possibility to detect them in blood plasma, that makes this method available for wide use in clinical practice. Previous studies have shown a high correlation between the plasma concentrations of the presented markers and their expression in the myocardium.

For example, in a study by Asparuh Nikolov and Nikola Popovski, collagen type 1 is considered as an indicator of myocardial fibrosis and prognostic marker for heart failure [9]. At the same time, experimental study on hypoxia effect of different duration will allow to ascertain the nature of morpho-structural and hemodynamic changes directly in myocardium. Thus, the aim of the study was to examine cardiotrophin-1, titin, collagen type 1, annexin V and morphofunctional state of the left heart ventricle in experimental rats exposed to intermittent 15-day and 60-day hypoxia.

Materials and methods

The study was conducted at the Laboratory of Experimental Pathophysiology (license 2CK2 YMK2 T6PB SG5N SJLS4) in the Training Scientific Medical and Laboratory Center with a vivarium at Zaporizhzhia State Medical University (certificate of technical competence of the Ministry of Health of Ukraine No. 033/18 dated December 25, 2018, valid until December 25, 2023).

Intermittent hypoxia was modeled using 30 normotensive male Wistar rats, 7–8 months old, which were randomly assigned to 3 experimental groups of 10 animals each: 1) INT – a control group – intact animals (196.3 ± 6.8 g); 2) IH15 – 15-day hypoxia (205.6 ± 4.1 g); 3) IH60 – 60-day hypoxia (201.1 ± 5.5 g).

An experimental part of the study was carried out in strict accordance with the national “General Ethical

Principles of Animal Experiments" (Ukraine, 2001) aligned with the provisions of the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1985), "Provisions on the Use of Animals in Biomedical Research" and the Directive of the European Parliament and the Council of the European Union 2010/63/EU of September 22, 2010 on the protection of animals used for scientific purposes [10].

The study compared the effects of intermittent hypoxia of varying duration: 15-day and 60-day hypoxia [11–12].

Hypoxic training was carried out in a 1.0 m³ ventilated pressure chamber at an "altitude" of 6000 m measured using an altimeter (pO₂ = 9.8 %). The animals were placed in a pressure chamber daily from 10 am to 4 pm. Hypoxic exposures were conducted in the following mode (Table 1) [13,14].

To obtain correct blood pressure (BP) measurement data using Blood Pressure Analysis System TM BP-2000 Series II (Visitech Systems, USA), the rats underwent a two-week adaptation to immobilizing protected tunnels. The measurement was done using a tail-cuff technique in total silence. The first measurement of BP was carried out at the stage of group formation and then according to the needs of the experiment, namely, in rats exposed to intermittent hypoxia of IH15 group – on the 1st and 15th day, and of group IH60 – on the 1st and 60th day. After a series of BP measurements (at least 7–10 BP readings with an interval of 1.5–2.0 minutes), mean BP was calculated automatically by the device according to the formula:

$$MBP = \text{diastolic BP} + 1/3 [\text{systolic BP} - \text{diastolic BP}].$$

The chest of the rats was shaved prior to cardiac ultrasound examination. Telazol was chosen as an anesthetic agent (composition of 1 bottle: tiletamine hydrochloride – 250 mg, zolazepam hydrochloride – 250 mg), which has no cardiodepressant effect. The study was conducted in the position of the animal on its back with the forelimbs fixed, as well as on the left side. A Vivid E9 scanner (GE Healthcare, USA) with a high-frequency linear matrix transducer ML6-15-D (scanning frequency of 15 MHz) was used after applying an ultrasound gel. Cardiohemodynamic parameters were calculated using the "Rodent" package (GE Healthcare, USA), recommended for small objects with a high heart rate. The correctness of the ultrasound beam positioning perpendicularly to the examined structures was verified using "anatomical" M-mode. The short axis view of the left ventricle (LV) at the level of papillary muscles enabled standard measurements of the interventricular septum (IVS) and LV posterior wall (LVPW) thickness, end-systolic (ESD) and end-diastolic dimensions (EDD) and calculation of LV ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS). The study was performed in the B-mode grey-scale imaging in the parasternal and apical views.

The following parameters were calculated:

1. Left ventricular mass (g) = $[0.8 \times (1.04 \times (\text{IVSd} + \text{LVIDd} + \text{LVPWd}) \times 3 - (\text{LVIDd}) \times 3) + 0.14] / 1000$;
2. Diastolic volume (mL) = $1.047 \times (\text{LVIDd}) \times 3$;
3. Systolic volume (mL) = $1.047 \times (\text{LVIDs}) \times 3$;
4. Stroke volume (mL) = diastolic volume – systolic volume;

Table 1. Hypoxic exposure mode

Day of experiment		Altitude, m
IH15	IH60	
	1	1000
	2	2000
	3	3000
	4	4000
	5	5000
	6	6000
7–15	7–60	6000

5. Cardiac output (mL/min) = stroke volume × heart rate, where IVS, LVID and LVPW are all in mm;

6. Relative wall thickness = $2 \times \text{LVPWd} / \text{LVIDd}$ [15].

The parameters were averaged over three consecutive measurements.

The animals were anesthetized before euthanasia using thiopental (45 mg/kg body weight). The objects of study were LV myocardium fragments of the experimental animals. Serial sections were prepared from standardly histologically fixed, paraplast-embedded material. The immunoreactive material (IRM) concentrations (fluorescence units / micrometer² (Uif/μM²)) to the markers of remodeling were analyzed using immunofluorescent detection following the manufacturer's instructions.

To detect cardiotrophin-1 (CT), polyclonal goat anti-CT antibodies (N-20): sc-20867 were used, type I collagen (CL) – primary polyclonal goat anti-COL1A1 antibodies (C-18): sc-8784, annexin V (AN) – goat polyclonal anti-Annexin V antibodies (R-20): sc-1929. FITC-conjugated anti-goat mouse IgG secondary antibodies (sc-2356) were used to the above-described markers. To study titin (TT), primary mouse monoclonal anti-Titin (E-2): sc-271946 antibodies and FITC-conjugated anti-rabbit mouse IgG secondary antibodies (sc-2359) were used. All antibodies manufactured by Santa Cruz Biotechnology, Inc. were used at a 1:200 dilution.

To assess the severity of fibrosis degree in rats of the experimental groups, the titin / collagen ratio was calculated.

IRM in myocardial sections was quantified in the ultraviolet excitation spectrum of 390 nm with a high-emission 38HE light filter (Carl Zeiss, Germany) using an Axio-Imager-M2 microscope (Carl Zeiss, Germany) with the AxioVision 40 V 4.8 software 2.0 (license No. 3005339). When analyzing images in an interactive mode, zones with statistically significant fluorescence were captured. At least 100 visual fields in each series were subjected to study. The files were then analyzed using ImageJ software (National Institutes of Health, USA).

Statistical processing was performed using single-factor analysis of variance (ANOVA) in the program Statistica (License No. JPZ8041382130ARCN10-J). All continuous variables were tested for a normal distribution using the Shapiro–Wilk's W test. Continuous variables are presented as mean ± standard error mean or median (interquartile range) if non-normally distributed. All normally distributed parameters were compared using a one-way ANOVA, followed, in case of significance, by a two-side Tukey test for multiple comparisons. Differences in non-normally distributed variables between groups were assessed by

Table 2. Blood pressure in rats of experimental groups, M ± m

	Day	Systolic BP, mmHg	Diastolic BP, mmHg	Mean BP, mmHg
Intact	1-day, 15-day and 60-day averages	115.0 ± 1.8	68.1 ± 1.2	83.8 ± 0.9
IH15	1	114.6 ± 1.2	67.5 ± 2.0	83.2 ± 1.3
	15	123.4 ± 2.1*	69.3 ± 1.9	87.3 ± 1.4*
IH60	1	113.2 ± 1.1	65.8 ± 1.5	81.6 ± 0.9
	60	135.1 ± 1.7**	82.6 ± 3.2**	92.4 ± 3.5*

*: significant difference in the parameters of the experimental groups ($p < 0.05$) compared to the corresponding parameters of the control group; #: significant difference in IH60 parameters ($p < 0.05$) compared to the corresponding IH15 parameters.

Table 3. Echocardiographic assessment of rats

Parameter, units of measurement	INT	IH15	IH60
EDD (LVlDd, mm)	6.1 (6.0; 6.1)	4.90 (4.6; 5.1)*	5.9 (5.6; 6.0)*
ESD (LVlDs, mm)	3.2 (3.0; 3.3)	2.5 (2.2; 2.8)*	3.4 (3.3; 3.4)*
IVS (IVSd, mm)	1.5 (1.5; 1.6)	2.0 (1.8; 2.2)*	2.0 (1.9; 2.1)*
LVPW (LVPWd, mm)	1.8 (1.7; 1.9)	2.6 (2.3; 2.7)*	2.1 (1.9; 2.1)**
EF, %	84.0 (84.0; 84.0)	84.5 (80.5; 89.0)	77.5 (75.3; 80.8)**
FS, %	47.0 (46.3; 47.8)	50.0 (46.5; 53.5)*	39.5 (38.0; 41.8)**
HR, bpm	478 (471; 483)	464 (437; 475)*	456 (435; 464)**
Relative wall thickness	0.59 (0.57; 0.62)	1.04 (0.93; 1.11)*	0.68 (0.64; 0.74)**
Left ventricular mass, g	0.514 (0.497; 0.526)	0.575 (0.509; 0.674)*	0.631 (0.603; 0.657)*
Diastolic volume, mL	0.232 (0.226; 0.238)	0.123 (0.104; 0.137)*	0.210 (0.186; 0.226)**
Systolic volume, mL	0.033 (0.029; 0.038)	0.017 (0.011; 0.023)*	0.041 (0.038; 0.041)**
Stroke volume, mL	0.199 (0.195; 0.203)	0.101 (0.091; 0.112)*	0.172 (0.144; 0.188)**
Cardiac output, mL/min	95.6 (93.8; 97.2)	47.5 (43.0; 51.2)*	75.1 (67.1; 83.8)**

*: significant difference in the parameters of the experimental groups ($p < 0.05$) compared to the corresponding parameters of the control group; #: significant difference in IH60 parameters ($p < 0.05$) compared to corresponding IH15 parameters.

Table 4. Concentration of markers, Uif/μm²

Parameter	Intact	Hypoxia 15	Hypoxia 60
Cardiotrophin-1	0.09 (0.08; 0.10)	0.10 (0.09; 0.13)*	0.15 (0.14; 0.17)**
Titin	0.08 (0.07; 0.09)	0.09 (0.08; 0.11)*	0.15 (0.13; 0.18)**
Collagen type I	0.09 (0.07; 0.11)	0.10 (0.08; 0.11)	0.15 (0.13; 0.18)**
Annexin V	0.09 (0.08; 0.11)	0.08 (0.07; 0.09)*	0.18 (0.14; 0.23)**
Titin/collagen ratio	0.85	0.91	1.03

*: significant difference in the values of the experimental groups ($p < 0.05$) compared to the corresponding values of the control group; #: significant difference in IH60 values ($p < 0.05$) compared to corresponding IH15 values.

Kruskal–Wallis test with post hoc Mann–Whitney test. A two-sided p -value < 0.05 was considered statistically significant for all the tests.

Results

BP in rats of the experimental groups was in the normotensive range for all measurements and no statistically significant changes were found between intermediate measurements (a concept of normotension was taken from normal BP in rats [16]). But on days 15 and 60, significant differences were revealed between the parameters, namely, an increase in systolic BP by 9.5 % and diastolic BP by 19.2 %, respectively, in IH60 group compared to those in IH15 group (Table 2).

There were no baseline differences in the cardiac morphofunctional parameters between the groups. In IH15 group animals exposed to a 15-day course of intermittent hypoxia, a significant decrease in EDD by 20% and ESD by 22 % was detected ($p < 0.05$). At the same time, an increase in the thickness of IVS by 33 % and LVPW by 44 %, as well as LV mass by 12 % ($p < 0.05$) was recorded. Such changes were accompanied by a

decrease in diastolic and systolic volumes by 47 %, as well as in stroke volume by 49 % and cardiac output by 50 % ($p < 0.05$). These data suggest the formation of concentric LV remodeling, which was confirmed by an increase in the LV relative wall thickness by 76 % compared to that of the control group ($p < 0.05$).

In IH60 group rats after a 60-day course of intermittent hypoxia, there was a relative increase in the size of the LV cavities compared to those in IH15 group animals. Meanwhile, the thickness of IVS was comparable, and of LVPW was 19 % less ($p < 0.05$). Such changes also affected LV relative wall thickness, which was only 15 % greater and LV mass by 23 % than those in the control, that taken together can demonstrate an eccentric direction of changes ($p < 0.05$). There was a decrease in LV EF by 8 % and LV FS by 16 % ($p < 0.05$) (Table 3, Fig. 1–3).

A visual analysis of the myocardium images of the control rats has shown that IRM to CT-1, TT, and AN was diffusely located solely in the cytoplasm of cardiomyocytes, while CL was seen in the intercellular interstitium (Fig. 4).

An analysis of the CT concentration has revealed its significant increase in both hypoxic groups by 11 % and 68 %, respectively, compared to that in the control (Table 4).

1

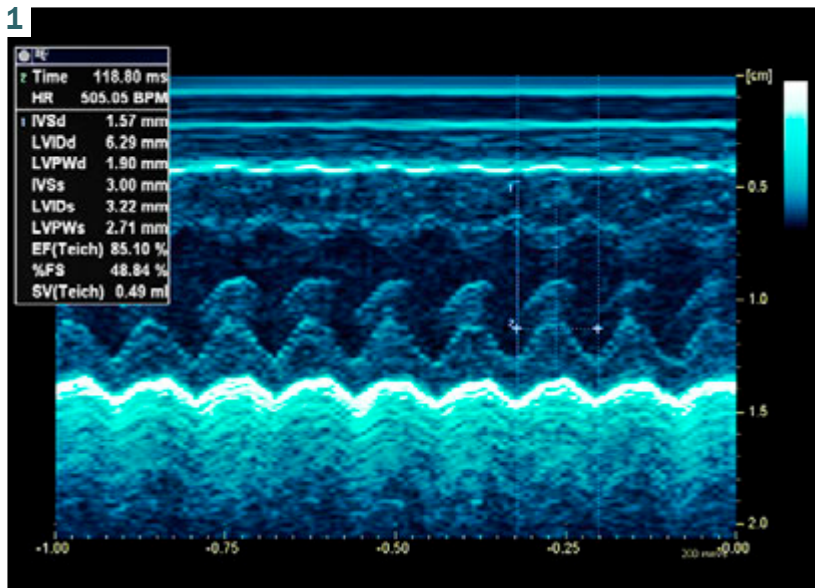
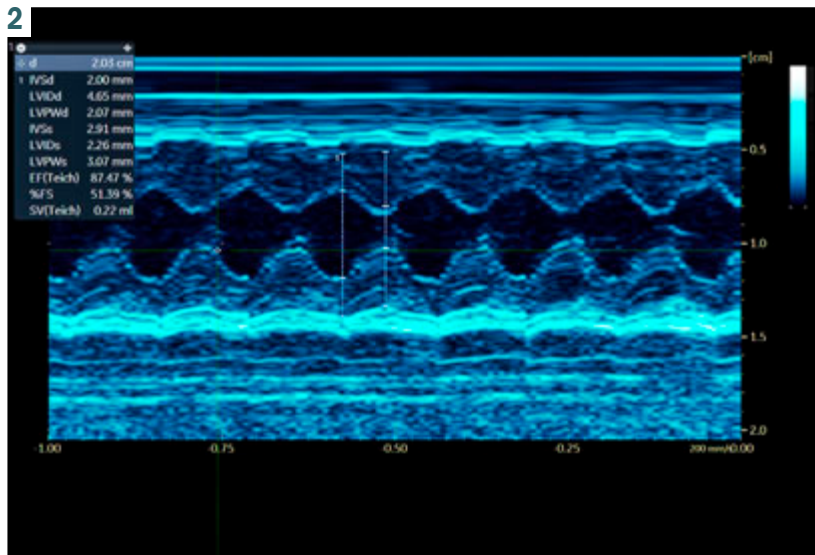


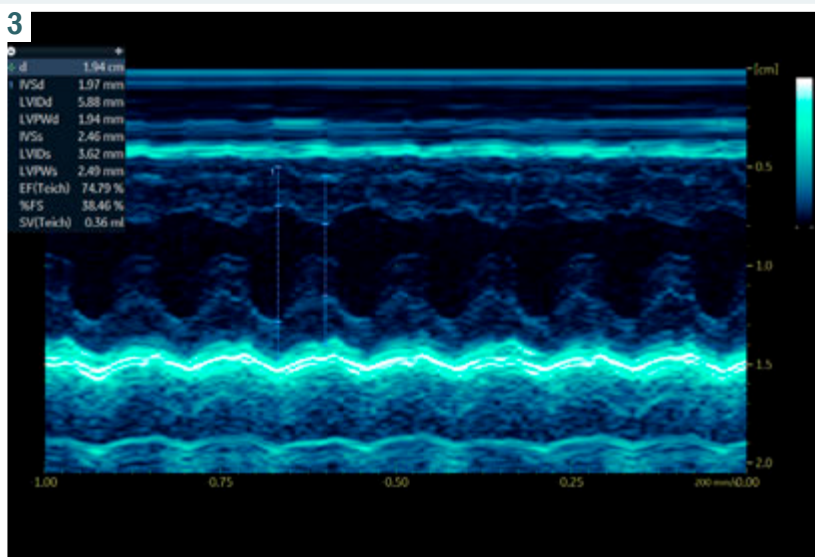
Fig. 1–3. Echocardiograms of experimental group rats (1-INT, 2-IH15, 3-IH60). M-mode scan. Parasternal position. Short axis view of the LV at the level of the papillary muscles.

IVSd: LV end-diastolic interventricular septal thickness;
 LVIDd: LV end-diastolic internal dimension;
 LVPWd: LV end-diastolic posterior wall thickness;
 IVSs: LV end-systolic interventricular septal thickness;
 LVIDs: LV internal diameter at end-systole;
 LVPWs: LV systolic posterior wall thickness;
 EF (Teich): ejection fraction calculated by Teichholz formula;
 % FS: percentage of the fractional shortening calculated by Teichholz formula;
 SV (Teich): stroke volume calculated by Teichholz formula.

2



3



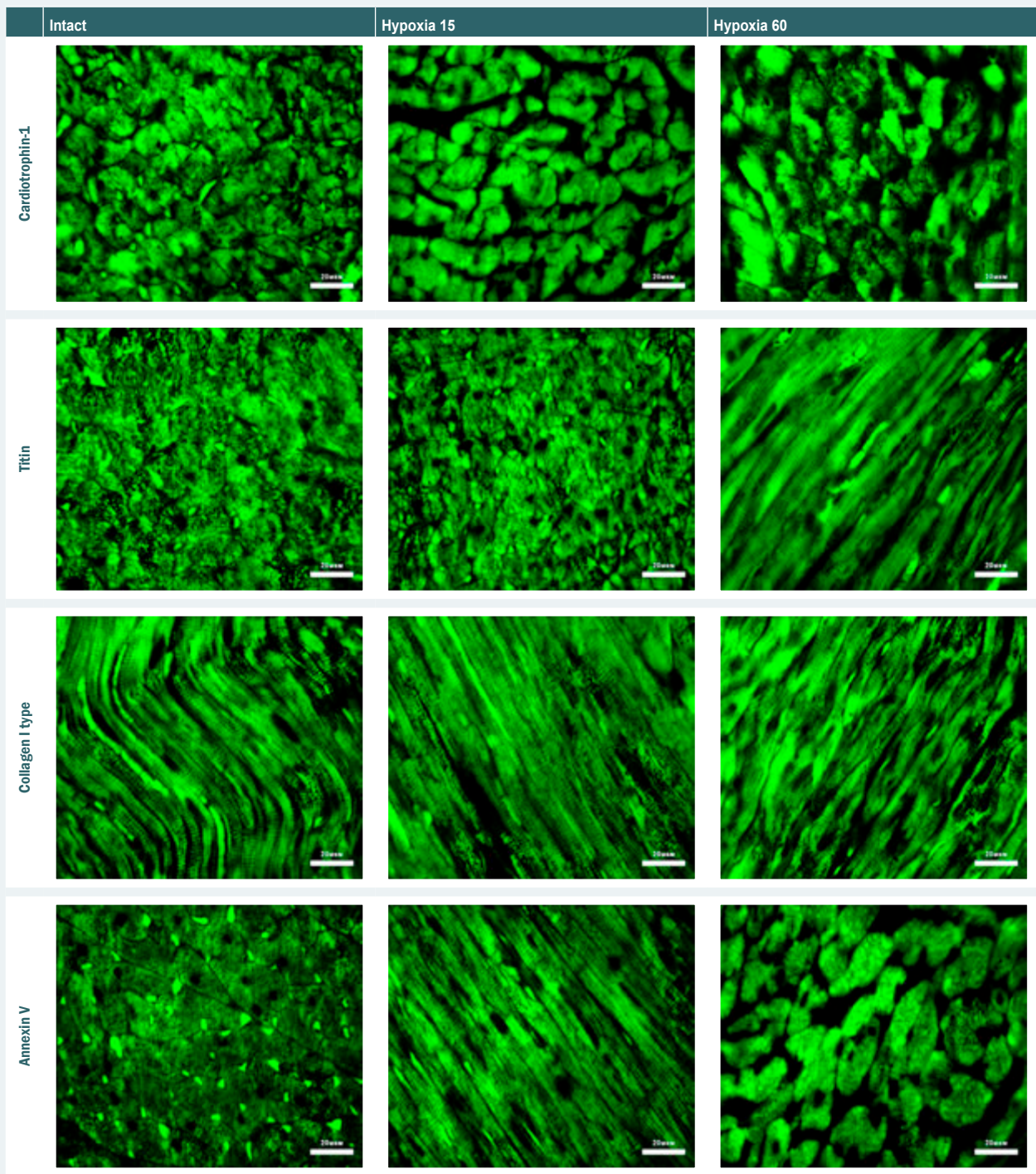


Fig. 4. Expression of remodeling markers in left ventricular myocardium. Indirect immunofluorescence reaction, magnification $\times 630$.

A study of titin has found a statistically significant increase of its concentration in myocardium in both groups of rats, by 15 % in IH15 rats, and by 101 % in IH60 group ($p < 0.05$). CL concentration was significantly increased by 53 % in IH60 group compared to that in IH15 rats ($p < 0.05$). It is interesting to note that the AN concentration was significantly decreased by 11 % in rats exposed to short-term hypoxia compared to the control group, while the increase in this value reached 102 % ($p < 0.05$) in animals after long-term exposure.

Discussion

Analysis of Echo results in animals of both groups gives an insight into LV hypertrophy development. Meanwhile, the increase in LV mass was accompanied by decreased end-diastolic volume with increased end-systolic volume in rats subjected to prolonged hypoxia. Cardiac output improved in IH-60 rats compared to rats after short hypoxic exposure. Interesting results similar to ours were shared by František Papoušek et al., who found no changes in

LV cavity diastolic diameter, but significant thickening of the LV wall especially at 8000 m altitude [17].

The type of LV myocardial remodeling depends on the ratio of its components: hypertrophy, fibrosis and apoptosis. The analysis of marker profile indices revealed differences between the types of remodeling in the experimental rats, which was directly dependent on the duration of hypoxic exposure.

The starting process developing in response to any impact on the myocardium is hypertrophy, which can be assessed by CT. According to the literature, CT should be considered not only as a marker of hypertrophy, but also as a complete gp130-mediated cardioprotector under many influences, including reoxygenation [18], that would explain the increase in its myocardial concentration in rats of both experimental groups in our study.

A clinical study by M. O. Matokhniuk et al. has revealed a correlation between plasma CT and LV myocardial mass index in the patients with heart failure [19]. The same result presented study by U. Polat et al. can be used as a new biomarker and correlated with standard markers of myocardial ischemia [20]. This may have led to the decrease in ejection fraction in rats after prolonged hypoxia.

Researchers E. Martínez-Martínez et al. suggest that CT activates Gal-3, which in turn mediates proinflammatory and profibrotic myocardial effects, and their mutual increase determines a subgroup of higher cardiovascular mortality risk among the patients with heart failure [21]. Thus, the increase in CT concentration in IH60 group of rats should be considered not only as a degree of hypertrophy severity but also as a probable stimulator of fibrosis. While the team of A. Raso believes that increased CT does not induce fibrosis but exhibits anti-apoptotic properties via gp130/LIFR and intracellular PI3K/Akt and p42/44-MAPK cascades [22]. The same effect was also proved with the decrease of annexin V concentration in IH15 rats, however the significant increase in apoptosis in IH60 rats could refute this conclusion.

The next component of myocardial remodeling is fibrosis, the severity of which is characterized by the level CL. It has been proved that progression of fibrotic changes aggravates cardiac dysfunction, impeding both systolic and diastolic function, potentiating arrhythmogenesis and increasing the probability of heart failure [23]. The problem of excessive fibrotic changes is not only in collagen overproduction, but also in apoptosis defect, inability to reverse transformation of myofibroblasts into fibroblasts or both mechanisms [24,25].

A “vicious circle” can form – large amounts of fibrillar collagens enhance differentiation and proliferation of myofibroblasts, which is especially clearly seen in the progression of remodeling [26]. Thus, the actual absence of reliable changes of CL concentration in myocardium of IH15 rats, in comparison with the control, and its significant increase in IH60 fits in well with the “vicious circle” described above, which is due to the duration of exposure. CL also serves as a marker of activity of some substances, correlating with their concentration.

An example is the revealed dependence of sodium-glucose co-transporter 1 gene expression level increase on collagen, atrial natriuretic peptide, brain

natriuretic peptide, interleukin-18, connective tissue growth factor expression in response to chronic pressure overload and ischemia, which led to hypertrophy, fibrosis and impaired myocardial contractility in mice [27], that increases the risks of heart failure development in rats with prolonged hypoxia in our study, and the mechanism of its concentration increase is variable in IH60 rats.

In response to various hemodynamic demands, myocardial remodeling can develop through modulation of its stiffness by posttranslational modification of the TT protein and changes in the ratio of its isoforms. Such modulation of total myocardial stiffness affects cardiac chamber walls, diastolic filling, and systolic pump function due to autoregulation – Frank-Starling law [28].

The obtained results about the significant increase in TT concentration in the experimental groups with the maximum concentration in IH60 are fully consistent with these patterns. Modification of myocardial stiffness occurs in two ways. The first is through oxidation and phosphorylation of the TT protein itself. This is a fast, situational pathway of passive elasticity control [29]. The second pathway is realized by switching of two protein isoforms and is based on lower stiffness of N2BA isoform compared to N2B and their co-expression in the same sarcomere [30].

However, the concentrations of TT and CL should not be evaluated in isolation, but it is worth to analyze the coefficient of their correlation. Probably, the 15-day hypoxic influence contributes to the increase in the elasticity of the matrix scaffold as an element of adaptation to new conditions of functioning. Along with this, the increase in TT concentration during prolonged exposure to IH60 is a compensatory response to a significant increase in CL in rats to improve the resilient-elastic properties of the cardiac muscle.

Determination of AN content, a marker of cardiomyocyte apoptosis, demonstrated a significant decrease in its concentration at 15-day duration of hypoxic exposure, which may be due to suppression of apoptosis by CT or the effect of erythropoietin, a key transducer promoted by hypoxia [31]. It is possible that such changes are the result of anti-apoptotic activity of GRP78 recently revealed in an ischemia-reperfusion model [32]. In case of long-term hypoxia, there was found a 2-fold increase in AN concentration compared to control, which is a sign of death of a substantial number of cells and, possibly, the onset of cardiac myogenic dilatation development [33].

Conclusions

Thus, 15-day and 60-day hypoxia simulate different types of myocardial remodeling:

1. The model of 15-day hypoxia in normotensive rats forms concentric left ventricular hypertrophy. This is confirmed by the increase in left ventricle wall thickness while its cavity size decreases, with no changes of ejection fraction. These changes are accompanied with increased levels of the hypertrophy marker cardiotrophin-1 and titin, as well as decreased levels of the apoptosis marker annexin V.

2. Remodeling induced by 60-day hypoxia is characterized by eccentric orientation – progressive increase in cavity volumes with thickened left ventricle walls and sig-

nificantly decreased ejection fraction. The effect of long-term hypoxia is accompanied with marked hypertrophy, significant fibrosis, and apoptosis of cardiomyocytes. Such morphofunctional state of the myocardium may indicate the initial stages of maladaptation, increasing the risk of heart failure development.

Funding

The study was a part of the research work of Zaporizhzhia State Medical University on topic "The role of peptidergic structures of hypothalamus and brainstem in the pathogenesis of arterial hypertension" (state registration number O117U002579), term 2017–2019 years, which was funded by the Ministry of Health of Ukraine.

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

Надійшла до редакції / Received: 07.02.2023
Після доопрацювання / Revised: 28.02.2023
Прийнято до друку / Accepted: 13.03.2023

Information about authors:

Kolesnyk Yu. M., MD, PhD, DSc, Professor, Rector of Zaporizhzhia State Medical University, Honorary Scientist and Engineering Worker of Ukraine.

ORCID ID: 0000-0002-1556-5085

Kolesnyk M. Yu., MD, PhD DSc, Professor of the Department of Family Medicine, Therapy, Cardiology and Neurology, Faculty of Postgraduate Education, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine, EACVI HIT Ambassador.

ORCID ID: 0000-0001-7566-1899

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

ORCID ID: 0000-0001-7339-7078

Isachenko M. I., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Physiology with the Course of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine, ESC Member.

ORCID ID: 0000-0002-3026-1012

Відомості про авторів:

Колесник Ю. М., д-р мед. наук, професор, ректор Запорізького державного медичного університету, заслужений діяч науки і техніки України.

Колесник М. Ю., д-р мед. наук, професор каф. сімейної медицини, терапії, кардіології та неврології ФПО, Запорізький державний медичний університет.

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

Ісаченко М. І., PhD, доцент каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

References

- Luo, B., Li, Y., Zhu, M., Cui, J., Liu, Y., & Liu, Y. (2022). Intermittent Hypoxia and Atherosclerosis: From Molecular Mechanisms to the Therapeutic Treatment. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022, 1438470. <https://doi.org/10.1155/2022/1438470>
- Mallet, R. T., Burtcher, J., Pialoux, V., Pasha, Q., Ahmad, Y., Millet, G. P., & Burtcher, M. (2023). Molecular Mechanisms of High-Altitude Acclimatization. *International journal of molecular sciences*, 24(2), 1698. <https://doi.org/10.3390/ijms24021698>
- Bourdier, G., Détrait, M., Bouyon, S., Lemarié, E., Brasseur, S., Doutreleau, S., Pépin, J. L., Godin-Ribuot, D., Belaidi, E., & Arnaud, C. (2020). Intermittent Hypoxia Triggers Early Cardiac Remodeling and Contractile Dysfunction in the Time-Course of Ischemic Cardiomyopathy in Rats. *Journal of the American Heart Association*, 9(16), e016369. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.016369>
- Schüttler, D., Clausus, S., Weckbach, L. T., & Brunner, S. (2019). Molecular Mechanisms of Cardiac Remodeling and Regeneration in Physical Exercise. *Cells*, 8(10), 1128. <https://doi.org/10.3390/cells8101128>
- Ping, Y., Wang, X., Dai, Y., Wang, D., Liu, W., Yu, P., & Tao, Z. (2021). A quantitative detection of Cardiotrophin-1 in chronic heart failure by chemiluminescence immunoassay. *Journal of clinical laboratory analysis*, 35(4), e23570. <https://doi.org/10.1002/jcla.23570>
- Kellermayer, D., Smith, J. E., 3rd, & Granzier, H. (2019). Titin mutations and muscle disease. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 471(5), 673-682. <https://doi.org/10.1007/s00424-019-02272-5>
- Yin, X., Yin, X., Pan, X., Zhang, J., Fan, X., Li, J., Zhai, X., Jiang, L., Hao, P., Wang, J., & Chen, Y. (2023). Post-myocardial infarction fibrosis: Pathophysiology, examination, and intervention. *Frontiers in pharmacology*, 14, 1070973. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1070973>
- Zhang, J. (2022). Biomarkers of endothelial activation and dysfunction in cardiovascular diseases. *Reviews in cardiovascular medicine*, 23(2), 73. <https://doi.org/10.31083/j.rcm2302073>
- Nikolov, A., & Popovski, N. (2022). Extracellular Matrix in Heart Disease: Focus on Circulating Collagen Type I and III Derived Peptides as Biomarkers of Myocardial Fibrosis and Their Potential in the Prognosis of Heart Failure: A Concise Review. *Metabolites*, 12(4), 297. <https://doi.org/10.3390/metabo12040297>
- European Commission. (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*. <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>
- Kolesnyk, Yu. M., & Isachenko, M. I. (2020). Pathogenetic features of morphodensitometric characteristics of cardiomyocytes and marker profile of the left ventricular remodeling in rats with experimental intermittent hypoxia of different duration. *Journal of Education, Health and Sport*, 10(9), 752-762. <https://doi.org/10.12775/JEHS.2020.10.09.091>
- Meerson, F. Z., & Pshennikova, M. G. (1988). *Adaptatsiya k stressomym situatsiyam i fizicheskim nagruzkam* [Adaptatsiya k stressomym situatsiyam i fizicheskim nagruzkam]. Meditsina. [In Russian].
- Kolesnyk, Yu. M., Hancheva, O. V., Abramov, A. V., Ivanenko, T. V., Fedotova, M. I., & Danukalo, M. V. (2016). *Sposib modeliuвання fiziolochnoho remodeliuvannya miokarda u drubnykh hryzuniv* [Method for modeling physiological myocardial remodeling in small rodents]. Ukraine Patent UA 112290. <https://sis.ukrpatent.org/uk/search/detail/824086/>
- Kolesnyk, Yu. M., Isachenko, M. I., & Melnikova, O. V. (2019). The features of the nitric oxide system in the left ventricle myocardium in the rats with experimental intermittent hypoxia of different duration. *Pathologia*, 16(3), 308-314. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2019.3.188783>
- Ribeiro, S., Pereira, A. R. S., Pinto, A. T., Rocha, F., Ministro, A., Fiuza, M., Pinto, F., & Santos, S. C. R. (2019). Echocardiographic Assessment of Cardiac Anatomy and Function in Adult Rats. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (154), 10.3791/60404. <https://doi.org/10.3791/60404>
- Saeed, A., Bashir, K., Shah, A. J., Qayyum, R., & Khan, T. (2022). Antihypertensive Activity in High Salt-Induced Hypertensive Rats and LC-MS/MS-Based Phytochemical Profiling of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) Leaves. *BioMed research international*, 2022, 2791874. <https://doi.org/10.1155/2022/2791874>
- Papoušek, F., Sedmera, D., Neckář, J., Ošťádal, B., & Kolář, F. (2020). Left ventricular function and remodelling in rats exposed stepwise up to extreme chronic intermittent hypoxia. *Respiratory physiology & neurobiology*, 282, 103526. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2020.103526>
- Rodríguez, A., Beceril, S., Hernández-Pardos, A. W., & Frühbeck, G. (2020). Adipose tissue depot differences in adipokines and effects on skeletal and cardiac muscle. *Current opinion in pharmacology*, 52, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2020.04.003>
- Matokhniuk, M. O., Limanskiy, O. V., Maiko, O. V., Zhebel, V., Shevchuk, O. K., & Paliy, I. K. (2021). Prognostic significance of blood marker of hypertrophy- cardiotrophin-1 when carrying different variants of its gene in men with essential hypertension. *Wiadomosci lekarskie*, 74(2), 273-277.
- Polat, U., Aydinlar, A., Caliskan, S., Boyuk, F., & Unal, O. (2021). The correlation between cardiac enzymes and cardiotrophin-1 levels in patients with acute coronary syndrome. *International Journal of Cardiovascular Sciences*, 34, 12-21.
- Martinez-Martinez, E., Brugnolaro, C., Ibarrola, J., Ravassa, S., Buonafina, M., López, B., Fernández-Celis, A., Querejeta, R., Santamaria, E., Fernández-Irigoyen, J., Rábago, G., Moreno, M. U., Jaisser, F., Diez, J., González, A., & López-Andrés, N. (2019). CT-1 (Cardiotrophin-1)-Gal-3 (Galectin-3) Axis in Cardiac Fibrosis and Inflammation. *Hypertension*, 73(3), 602-611. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11874>
- Raso, A., Dirkx, E., Philippen, L. E., Fernandez-Celis, A., De Majo, F., Sampaio-Pinto, V., Sansonetti, M., Juni, R., El Azzouzi, H., Calore, M.,

- Bitsch, N., Olieslagers, S., Oerlemans, M. I. F. J., Huibers, M. M., de Weger, R. A., Reckman, Y. J., Pinto, Y. M., Zentilin, L., Zacchigna, S., Giacca, M., ... De Windt, L. J. (2019). Therapeutic Delivery of miR-148a Suppresses Ventricular Dilation in Heart Failure. *Molecular therapy*, 27(3), 584-599. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.11.011>
- [23] Venugopal, H., Hanna, A., Humeres, C., & Frangogiannis, N. G. (2022). Properties and Functions of Fibroblasts and Myofibroblasts in Myocardial Infarction. *Cells*, 11(9), 1386. <https://doi.org/10.3390/cells11091386>
- [24] Cziraki, A., Nemeth, Z., Szabados, S., Nagy, T., Szántó, M., Nyakas, C., & Koller, A. (2023). Morphological and Functional Remodeling of the Ischemic Heart Correlates with Homocysteine Levels. *Journal of cardiovascular development and disease*, 10(3), 122. <https://doi.org/10.3390/jcdd10030122>
- [25] Czubryt, M. P. (2019). Cardiac Fibroblast to Myofibroblast Phenotype Conversion-An Unexploited Therapeutic Target. *Journal of cardiovascular development and disease*, 6(3), 28. <https://doi.org/10.3390/jcdd6030028>
- [26] Pach, E., Kümper, M., Fromme, J. E., Zamek, J., Metzén, F., Koch, M., Mauch, C., & Zigrino, P. (2021). Extracellular Matrix Remodeling by Fibroblast-MMP14 Regulates Melanoma Growth. *International journal of molecular sciences*, 22(22), 12276. <https://doi.org/10.3390/ijms222212276>
- [27] Shi, X., Dorsey, A., & Qiu, H. (2022). New Progress in the Molecular Regulations and Therapeutic Applications in Cardiac Oxidative Damage Caused by Pressure Overload. *Antioxidants*, 11(5), 877. <https://doi.org/10.3390/antiox11050877>
- [28] Horowitz, M., & Hasin, Y. (2023). Vascular compliance and left ventricular compliance cross talk: Implications for using long-term heat acclimation in cardiac care. *Frontiers in physiology*, 14, 1074391. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1074391>
- [29] Koser, F., Loescher, C., & Linke, W. A. (2019). Posttranslational modifications of titin from cardiac muscle: how, where, and what for?. *The FEBS journal*, 286(12), 2240-2260. <https://doi.org/10.1111/febs.14854>
- [30] Kötter, S., & Krüger, M. (2022). Protein Quality Control at the Sarcomere: Titin Protection and Turnover and Implications for Disease Development. *Frontiers in physiology*, 13, 914296. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.914296>
- [31] Sharma, S., Sharma, P., Subedi, U., Bhattarai, S., Miller, C., Manikandan, S., Batinic-Haberle, I., Spasojevic, I., Sun, H., Panchatcharam, M., & Miriyala, S. (2023). Mn(III) Porphyrin, MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺, Commonly Known as a Mimic of Superoxide Dismutase Enzyme, Protects Cardiomyocytes from Hypoxia/Reoxygenation Induced Injury via Reducing Oxidative Stress. *International journal of molecular sciences*, 24(7), 6159. <https://doi.org/10.3390/ijms24076159>
- [32] Ji, H., Xiao, F., Li, S., Wei, R., Yu, F., & Xu, J. (2021). GRP78 effectively protect hypoxia/reperfusion-induced myocardial apoptosis via promotion of the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Journal of cellular physiology*, 236(2), 1228-1236. <https://doi.org/10.1002/jcp.29929>
- [33] Méndez-Barbero, N., San Sebastian-Jaraba, I., Blázquez-Serra, R., Martín-Ventura, J. L., & Blanco-Colio, L. M. (2022). Annexins and cardiovascular diseases: Beyond membrane trafficking and repair. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 1000760. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1000760>

Зниження ризику недосягнення контролю артеріального тиску в пацієнтів з артеріальною гіпертензією та ішемічною хворобою серця: роль кверцетину

Т. М. Соломенчук ^{A,E,F}, М. І. Прокоша ^{*A,B,C,D}, О. Ю. Климкович ^{B,C}

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, 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:

артеріальна гіпертензія, s-ICAM-1, sVCAM, ендотелін-1, ендотеліальна дисфункція, кверцетин.

Патологія. 2023.

T. 20, № 1(57).

C. 14-19

*E-mail:

m.prokosa18@gmail.com

Мета роботи – визначити вплив кверцетину на предиктори недосягнення цільових рівнів артеріального тиску (АТ) у хворих на артеріальну гіпертензію (АГ) та ішемічну хворобу серця (ІХС).

Матеріали та методи. Обстежили 120 хворих на АГ II стадії 2–3 ступенів у поєднанні зі стабільною ІХС (66 жінок і 54 чоловіки). Хворих поділили на 2 групи: I – 58 пацієнтів, які, крім базисної терапії (раміпріл / амлодипін), отримували кверцетин (Корвітин®); II – 62 обстежених, котрим призначили тільки антигіпертензивне лікування. Визначали показники добового моніторингу АТ, ліпідного спектра крові, С-реактивного протеїну, концентрацію молекул адгезії (s-VCAM, s-ICAM-1), рівні ендотеліну-1 (ЕТ-1), ІЛ-1, ІЛ-6, ТНФ-α. Статистичне опрацювання результатів здійснили, застосувавши програми Minitab 21.0, StatPlus Pro 7.6.5, Wizard Pro, Jamovi, MedCalc.

Результати. Встановили, що ризик недосягнення цільового рівня САТдоб у групі базисного лікування АГ (II група) достовірно зростає з перевищенням рівня ХС ЛПНЩ >4,0 ммоль/л (у 3,6 раза), збільшенням рівнів ІЛ-6 >7 нг/мл (у 10 разів), ТНФ-α >9 пг/мл (у 7 разів), VCAM >1100 нг/мл (у 2,4 раза). У групі осіб, які додатково отримували кверцетин (I група), в разі підвищення рівня ЕТ-1 >1,1 пг/мл збільшується ризик недосягнення цільового САТдоб у 2,6 раза, в II групі – у 3,5 раза щодо САТдоб, у II групі – у 8,6 раза щодо ДАТдоб. У II групі підвищення концентрації ІЛ-6 >7 нг/мл вірогідно підвищувало ризик виникнення аритмій (у 6 разів).

Висновки. У разі застосування кверцетину вдається досягти цільових значень САТ (добового, денного, нічного) і ДАТ (добового, денного, нічного) у вірогідно більшої частки хворих порівняно з тими, кому призначено лише стандартну антигіпертензивну терапію. Кверцетин має ендотеліопротективну дію, про що свідчить достовірне зниження рівнів молекул адгезії судинного ендотелію (s-VCAM), молекул міжклітинної адгезії I типу (s-ICAM-1), ЕТ-1, ІЛ-1, ІЛ-6, ТНФ-α. Додаткове використання кверцетину разом зі стандартною антигіпертензивною терапією вірогідно зменшує ризик недосягнення цільових рівнів САТдоб, ДАТдоб і ризик виникнення порушень серцевого ритму навіть на фоні підвищення концентрації прозапальних цитокінів та інших маркерів ендотеліальної дисфункції.

Key words:

hypertension, s-ICAM-1, sVCAM, endothelin-1, endothelial dysfunction, quercetin.

Pathologia

2023; 20 (1), 14-19

Reduction of the risk of failure to achieve blood pressure control in patients with arterial hypertension and coronary heart disease: the role of quercetin

T. M. Solomenchuk, M. I. Prokosa, O. Yu. Klymkovych

Aim. Determine the effect of quercetin on predictors of not reaching target blood pressure (BP) levels in patients with arterial hypertension (AH) and coronary heart disease (CHD).

Materials and methods. 120 patients with stable coronary heart disease and hypertension of the II stage 2–3 degrees (66 women and 54 men) were examined. The patients were divided into 2 groups: Group I – 58 patients who, in addition to basic therapy (ramipril/amlopidine), received quercetin (Corvitin®), Group II – 62 patients who received only basic antihypertensive therapy. The parameters of daily blood pressure monitoring, blood lipid spectrum, C-reactive protein, the concentration of adhesion molecules (s-VCAM, s-ICAM-1), levels of endothelin-1 (ET-1), IL-1, IL-6, TNF-α were determined. Statistical processing of materials was carried out using the following programs: Minitab 21.0, StatPlus Pro 7.6.5, Wizard Pro, Jamovi, MedCalc.

Results. We have established that the risk of not reaching the target level of daily SBP in the group of basic treatment of hypertension (group II) significantly increases with exceeding the level of LDL >4.0 mmol/l (by 3.6 times), an increase in the level of IL-6 >7 ng/ml (by 10 times), an increase in the level of TNF-α >9 pg/ml (by 7 times), an increase in the level of VCAM >1100 ng/ml (by 2.4 times). In the group of people who additionally took quercetin (group I), with an increase in the level of ET-1 >1.1 pg/ml, the risk of failure to reach the target SBP increases by 2.6 times, in the II group – by 3.5 times toward to daily SBP and 8.6 times – toward to daily DBP. We found out that an increase in the concentration of IL-6 >7 ng/mg significantly increases the risk of arrhythmias by 6 times in group II.

Conclusions. When quercetin is used, it is possible to achieve the target values of SBP (daily, daytime, nighttime) and DBP (daily, daytime, nighttime) in a significantly higher proportion of patients compared with those who are prescribed only standard antihypertensive therapy. Quercetin has an endothelial protective effect, as evidenced by a significant decrease in the levels of vascular endothelial adhesion molecules (s-VCAM), type I intercellular adhesion molecules (s-ICAM-1), ET-1, IL-1, IL-6, TNF-α. The additional use of quercetin against the background of standard antihypertensive therapy significantly reduces the risk of failure to achieve the target levels of SBP, DBP and the risk of heart rhythm disturbances even against the background of increased levels of proinflammatory cytokines and markers of endothelial dysfunction.

Незважаючи на те, що здійснено сотні досліджень і регулярно оновлюються клінічні рекомендації з лікування артеріальної гіпертензії (АГ) [1,3,12,14,16], відкрито залишається проблема максимально можливого досягнення та контролю цільових рівнів артеріального тиску (АТ) під впливом антигіпертензивної терапії. Саме це є основним завданням її призначення для зниження ризику серцево-судинних ускладнень і смертності [1,2,7], особливо в осіб із надвисоким ризиком, у яких діагностовано ішемічну хворобу серця (ІХС). Навіть помірне зниження систолічного АТ (САТ) на 10 мм рт. ст. і/або діастолічного АТ (ДАТ) на 5 мм рт. ст. сприяє зниженню ризику смертності від ІХС та інсульту на 22 % і 41 % відповідно [3,4,10,12].

За даними міжнародного дослідження, у світі майже 46,5 % осіб хворіють на АГ, і лише 33 % із них контролюють рівень АТ у межах цільових значень [1]. Особливої уваги заслуговують дослідження щодо недосягнення не тільки офісного АТ, але й показників добового моніторингу АТ, зокрема добового АТ (<130/80 мм рт. ст.), згідно з рекомендаціями Європейського товариства кардіологів (ESC) 2018 року [17,20].

Активність системного запалення, окисний стрес та ендотеліальна дисфункція, критеріями яких є підвищення рівнів С-реактивного протеїну (СРП), ФНП- α , ІЛ-1 і ІЛ-6, – незалежний потужний предиктор ризику ускладнень ІХС, зокрема внаслідок погіршення контролю АТ [5,6,8–10,18]. Один зі шляхів зменшення проявів ендотеліальної дисфункції – використання кверцетину в комплексному лікуванні хворих на АГ. За результатами низки клінічних досліджень, він пригнічує окиснення ліпопротеїнів низької щільності, виявляє ендотелій-незалежний вазодилататорний ефект, призводить до зменшення накопичення молекул адгезії та інших маркерів запалення, характеризується захисною дією щодо конститутивної NO-синтази та ендотеліє загальною в умовах оксидативного стресу, запобігає оксидативному пошкодженню та запаленню ендотеліоцитів, знижує агрегацію тромбоцитів тощо. Це обґрунтовує перспективність застосування кверцетину в терапевтичних цілях у хворих на АГ та ІХС [10,11,14,15,21].

Мета роботи

Визначити вплив кверцетину на предиктори недосягнення цільових рівнів артеріального тиску у хворих на артеріальну гіпертензію та ішемічну хворобу серця.

Матеріали і методи дослідження

Обстежили 120 хворих на АГ II стадії 2–3 ступеня та стабільну ІХС віком 35–79 років (середній вік – 58,49 \pm 2,3 року), які перебували на стаціонарному лікуванні в кардіологічному відділенні лікарні Святого Пантелеймона Першого територіального медоб'єднання міста Львова та/або перебували під спостереженням у лікувально-діагностичному центрі «Сімейний» (м. Львів). Критерії залучення в дослідження: діагностована АГ II стадії 2–3 ступеня, стабільна ІХС (стабільна стенокардія напруження I–III функціонального класу (ФК) за класифікацією Канадської

асоціації кардіологів, дифузний кардіосклероз) [13,14], вік <80 років. Рандомізацію пацієнтів здійснили під час госпіталізації. У дослідження не залучали хворих із гострим коронарним синдромом, тяжкою стенокардією IV ФК, перенесеними інфарктом міокарда й інсультом, симптоматичною АГ, тяжкою серцевою недостатністю IIб–III стадії та/або III–IV ФК за NYHA, запальними та дегенеративними захворюваннями, печінковою та нирковою недостатністю, онкологічними, ендокринними, аутоімунними й інфекційними захворюваннями, а також осіб, які відмовились брати участь у дослідженні.

Пацієнтів поділили на дві групи. У I групу залучили 58 хворих, які, крім стандартної терапії, отримували кверцетин (Корвітин®), середній вік – 58,37 \pm 12,36 року; у II – 62 особи, котрим призначили тільки антигіпертензивну (стандартну) терапію: комбінацію раміприл / амлодипін в індивідуально визначених дозах (5/5 мг/мг; 5/10 мг/мг; 10/5 мг/мг; 10/10 мг/мг), середній вік – 58,08 \pm 12,21 року. Кверцетин (Корвітин®) призначали за схемою: 0,5 г розчиненого лікарського засобу в 50 мл ізотонічного розчину натрію хлориду в/в двічі на добу через 12 годин протягом 5 днів. Надалі пацієнтам призначали кверцетин per os по 40 мг тричі на добу (Квертин) впродовж 12 тижнів.

Клінічне дослідження здійснили після роз'яснення пацієнтам основних етапів лікування та підписання ними інформованої згоди. Воно передбачало опитування та загальноклінічне обстеження, добуве моніторування АТ (ДМАТ) за допомогою приладу ВАТ 41-2 («ІКС-Техно», Україна) з визначенням основних показників (середньодобового, середньоденного, середньонічного систолічного АТ (САТдоб, САТд, САТн), діастолічного АТ (ДАТдоб, ДАТд, ДАТн), добового індексу (ДІ – ступінь нічного зниження АТ)), добуве моніторування електрокардіограми (ЕКГ) за допомогою портативного динамічного холтеровського 3-канального ЕКГ приладу CONTEC TLC 9803, визначення основних показників ліпідного спектра крові, запалення та ендотеліальної функції. Лабораторні дослідження здійснили в акредитованій клініко-біохімічній лабораторії лікарні Святого Пантелеймона Першого територіального медоб'єднання міста Львова, кафедрах клінічної лабораторної діагностики факультету післядипломної освіти, токсикологічної і аналітичної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Ліпідний спектр крові визначили ферментним методом на аналізаторі ФП-900 (Фінляндія) з використанням реактивів Human; рівень СРП – латекс-турбодиметричним методом на аналізаторі Gobas 6000 з використанням тест-системи Roche Diagnostics (Швейцарія). Імуноферментним методом визначили концентрацію розчинних форм адгезивних молекул ендотелію судинної стінки s-ICAM-1, sVCAM (набір реактивів Human s-ICAM-1 ELISA BMS201 та Human sVCAM-1 ELISA BMS232, MedSystems GmbH, Австрія), ET-1 (набір реактивів BI-20082H, Biomedica Medizinprodukte GmbH, Австрія), ІЛ-1, ІЛ-6, TNF- α , (набір реактивів BMS810F, MedSystems GmbH, Австрія).

Обстеження здійснили двічі: під час звернення або госпіталізації хворого та через 12 тижнів лікування.

Статистичне опрацювання результатів виконали за допомогою програм Minitab 21.0, StatPlus Pro 7.6.5,

Таблиця 1. Динаміка лабораторних показників у хворих на АГ

Показник, одиниця вимірювання	I група (n = 58)			II група (n = 62)		
	1 день	12 тижнів	Δ %	1 день	12 тижнів	Δ %
ІЛ 1, нг/мл	5,34 ± 0,25	3,16 ± 0,20*	40,8 %	4,40 ± 0,24	4,03 ± 0,20	8,4 %**
ІЛ 6, нг/мл	7,29 ± 0,40	3,82 ± 0,29*	47,5 %	5,38 ± 0,34	4,67 ± 0,30	13,2 %**
TNF-α, пг/мл	7,71 ± 0,27	6,16 ± 0,27*	20,1 %	6,28 ± 0,31	5,93 ± 0,29	5,5 % [#]
СРП, мг/мл	6,54 ± 0,28	5,33 ± 0,29*	18,5 %	6,31 ± 0,27	5,31 ± 0,28	15,8 %*
ЕТ-1, пг/мл	2,54 ± 0,20	2,09 ± 0,14*	17,7 %	2,92 ± 0,19	2,67 ± 0,16	8,5 % [#]
VCAM, нг/мл	1117,50 ± 47,92	712,95 ± 36,16*	36,2 %	977,83 ± 44,67	851,51 ± 38,17	12,9 % [#]
ICAM-1, нг/мл	354,09 ± 18,17	283,76 ± 12,13*	19,8 %	335,6 ± 19,36	281,59 ± 14,61	16,0 %*
ХС ЛПНЦ, ммоль/л	3,66 ± 0,12	2,63 ± 0,24*	28,1 %	3,44 ± 0,22	2,98 ± 0,90	13,3 % [#]

*: різниця динаміки показників на початку і наприкінці дослідження у I та II групах $p < 0,05$; #: різниця між показниками I та II груп $p < 0,05$.

Wizard Pro, Jamovi, MedCalc. Нормальність розподілу кількісних ознак аналізували за допомогою тесту Шапіро–Вілка. Дані описової статистики наведено як середнє арифметичне та стандартне відхилення ($M \pm SD$) для показників, що мали нормальний розподіл. Показники у групах порівнювали, використовуючи критерій Стюдента та Манна–Вітні. Для виявлення зв'язків між факторами здійснили кореляційний аналіз, застосували коефіцієнт Пірсона (r). Для оцінювання сили кореляційного зв'язку використали шкалу Чеддока: зв'язок слабкий – $r = 0,10–0,29$; помірний – $r = 0,30–0,49$; помітний – $r = 0,50–0,69$; високий – $r = 0,70–0,89$; сильний – $r = 0,9–1,0$.

Для визначення предикторів недосягнення цільового САТ добового застосували метод бінарного логістичного регресійного аналізу. Для визначення незалежних предикторів чинники, що мали вірогідне прогнозове значення при уніваріантному аналізі, покроково включали в мультиваріантну модель. Результати наведено як відношення шансів OR («odds ratio») та їхні довірчі інтервали CI («confidence interval»). Критичні значення (cut-off value) кількісних показників, що включали до логістичного регресійного аналізу, визначали за допомогою ROC-аналізу. Статистичні тести двобічні, значущим вважали рівень $p < 0,05$.

Дослідження здійснили, дотримуючись основних біоетичних положень, протокол схвалений комісією з біоетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 2 від 25.02.2019 року).

Результати

Серед пацієнтів, які додатково отримували кверцетин (I група), цільових значень САТ (доб., д., н.) і ДАТ (доб., д., н.) через 12 тижнів лікування досягнуто в більшій кількості хворих: САТдоб – 83,3 ± 3,8 % (I група) проти 70,9 ± 4,2 % (II група), $p < 0,05$; ДАТдоб – 83,8 ± 3,9 % (I група) проти 72,1 ± 3,6 % (II група), $p < 0,05$. Цільового САТд у I групі досягли 86,6 ± 3,7 % хворих, у II – 73,1 ± 5,2 % ($p < 0,05$), цільового ДАТд – 71,4 ± 5,3 % (I група) та 70,2 ± 5,5 % (II група), $p < 0,05$. Цільового значення САТн у I групі досягли 76,6 ± 4,1 % осіб, у II – 74,6 ± 4,1 %, $p > 0,05$; ДАТн відповідно – у 85,7 ± 3,9 % (I) проти 72,3 ± 4,8 % (II), $p < 0,05$.

Перебіг АГ на тлі ІХС, як свідчать результати низки досліджень, може супроводжуватись істотною активацією системного запалення, що характеризується підвищенням СРП, ІЛ-1, ІЛ-6, TNF-α, молекул адгезії

судинного ендотелію (s-VCAM), молекул міжклітинної адгезії I типу (s-ICAM) тощо [12]. Тому проаналізували 12-тижневу динаміку рівня цитокінів – маркерів ендотеліальної дисфункції та системного запалення (табл. 1). Встановили, що у хворих, які додатково отримували кверцетин (I група), рівень ICAM-1 достовірно знизився на 19,8 % ($p < 0,05$) – з 354,09 ± 18,17 нг/мл до 283,76 ± 12,13 нг/мл, а в групі стандартної терапії (II група) спостерігали менш значуще зниження рівня ICAM-1 – на 16,0 % (з 335,6 ± 19,36 нг/мл до 281,59 ± 14,61, $p < 0,05$). Динаміка рівня sVCAM у I групі хворих подібна: зареєстрували зниження показника на 17,9 % (з 1117,50 ± 47,92 до 916,95 ± 36,16, $p < 0,001$) у I групі та на 12,9 % (з 977,83 ± 44,67 до 851,51 ± 38,17, $p < 0,001$) у II групі. Рівень ІЛ-1 знизився в обох групах хворих, але в I групі на 13,4 % (з 5,34 ± 0,25 до 4,62 ± 0,20, $p < 0,005$), у II – на 8,4 % (з 4,40 ± 0,24 до 4,03 ± 0,20, $p < 0,05$). Рівні TNF-α та ЕТ-1 достовірно знизилися в групі кверцетину (I) на 20,1 % (з 7,71 ± 0,27 до 6,16 ± 0,27, $p < 0,005$) та 17,7 % (з 2,54 ± 0,20 до 2,09 ± 0,14, $p < 0,005$) відповідно. У II групі динаміка цих показників виявилась менш значущою та недостовірною: рівень TNF-α зменшився на 5,5 % (з 6,28 ± 0,31 до 5,93 ± 0,29, $p > 0,05$), ЕТ-1 – на 8,5 % (з 2,92 ± 0,19 до 2,67 ± 0,16, $p > 0,05$). Динаміка рівнів СРП та ІЛ-6 в групах дослідження подібна.

Аналіз показників ліпідного обміну виявив найбільшу позитивну динаміку рівня ХС ЛПНЦ, який у I групі достовірно знизився на 28,1 % ($p < 0,001$), у II групі мав тільки тенденцію до зменшення – на 13,3 % ($p > 0,05$).

Здійснили кореляційний аналіз показників ендотеліальної дисфункції та системного запалення у зв'язку з недосягненням цільових значень САТдоб і ДАТдоб. Виявили прямий вірогідний кореляційний зв'язок між показниками недосягнення САТдоб та ІЛ-1 ($r = +0,130$; $p < 0,05$), TNF-α ($r = +0,190$; $p < 0,05$), СРП ($r = +0,198$; $p < 0,05$), ІЛ-6 ($r = +0,315$; $p < 0,05$) та ЕТ-1 ($r = +0,389$; $p < 0,05$). Між показниками недосягнення ДАТдоб встановлено прямий, середньої сили кореляційний зв'язок із рівнем TNF-α ($r = +0,348$; $p < 0,05$) та концентрацією ЕТ-1 ($r = +0,389$; $p < 0,05$).

Для визначення незалежних факторів, що асоціюються з недосягненням цільових середньодобових рівнів САТ і ДАТ, побудовано мультиваріантну модель логістичної регресії з покроковим включенням лабораторних показників і даних ДМАТ. В обох групах проаналізували співвідношення ризиків недосягнення цільових значень САТдоб і ДАТдоб залежно від окремих незалежних чинників. У групі базисного лікування

АГ (II група) перевищення ХС ЛПНЩ >4,0 ммоль/л достовірно ($p < 0,05$) збільшує ризик недосягнення цільового рівня САТдоб у 3,6 раза (OR = 3,62, CI = 0,13–3,93), що істотно вище, ніж у групі лікування кверцетином (I група), де така залежність не виявлена (OR = 0,10, CI = 0,01–1,61); рівня ІЛ-6 >7 нг/мл – у 10 разів (OR = 9,88, CI = 0,39–12,10 (II) проти OR = 0,06, CI = 0,03–1,32 (I)), зростання рівня ТНФ- α >9 пг/мл – у 7 разів (OR = 7,03, CI = 0,58–8,95 (II) проти OR = 1,12, CI = 0,22–3,71 (I)), рівня VCAM >1100 нг/мл – у 2,4 раза (OR = 2,36, CI = 1,21–2,90) (II) проти OR = 0,34, CI = 0,07–1,57 (I)) (табл. 2).

У групі осіб, які додатково отримували кверцетин (I група), з підвищенням рівня ET-1 >1,1 пг/мл хоч і реєстрували збільшення ризику недосягнення цільового САТдоб у 2,6 раза (OR = 2,63, CI = 0,16–2,98), але воно виявилось достовірно нижчим, ніж у II групі, де ризик недосягнення цільового САТдоб зростає у 3,5 раза (OR = 3,49, CI = 0,37–3,86). Щодо недосягнення цільового ДАТдоб, таку залежність виявили лише у II групі – у 8,6 раза (OR = 8,56, CI = 1,51–9,34) (табл. 2). Крім того, в II групі при підвищенні концентрації ІЛ-6 >7 нг/мл шестеро зростає ризик виникнення аритмій (OR = 5,95, CI = 1,01–6,39) на відміну від пацієнтів, які отримували кверцетин (I група – OR = 0,76, CI = 0,22–2,58, $p < 0,05$) (рис. 1).

Здійснили мультифакторний регресійний аналіз чинників ризику виникнення аритмій у хворих на АГ і супутню ІХС. В обох групах виявили значущий вплив підвищених рівнів ІЛ-6 та ET-1 на ризик виникнення аритмій, але в групі кверцетину встановили достовірно меншу прогностичну ймовірність виникнення порушень серцевого ритму (рис. 1).

Встановлено, що навіть при майже однакових середніх рівнях цих цитокінів в групах порівняння, у II групі зареєстрували у 6–8 разів більшу кількість випадків аритмій, ніж в групі осіб, які додатково отримували кверцетин (I група).

Обговорення

За результатами дослідження, в групі хворих, які додатково отримували кверцетин (I група), цільових значень САТ і ДАТ на 14 добу вдалось досягти в більшій кількості хворих порівняно з групою стандартної терапії (II). Це можна пояснити здатністю цього цитопротекторного лікарського засобу покращувати ендотеліальну функцію шляхом зниження рівнів більшості з досліджених маркерів системного запалення й ендотеліальної дисфункції та їхнім впливом на ендотелій судин.

Щодо маркерів дисфункції ендотелію, використаних у дослідженні, то, за даними деяких авторів, у кровоносних судинах гіпертензивних тварин (аорті та мезентеріальній артерії), особливо в їхньому ендотелії, виявлено істотно підвищені рівні білка VCAM-1 та ІЛ-6 [16,19,23,24]. У роботі DeSouza et al. показано підвищення рівня sVCAM-1 у людей похилого віку з неускладненою есенціальною гіпертензією [19]. Зменшення рівня sVCAM-1, навпаки, спостерігали після зниження АТ і досягнення його цільового рівня на тлі антигіпертензивної терапії. Пропонують застосовувати

Таблиця 2. Предиктори недосягнення цільового середньодобового АТ у групах хворих

Показник, одиниця вимірювання	I група (n = 58)		II група (n = 62)	
	OR	95 % CI	OR	95 % CI
Ризик недосягнення цільового рівня САТдоб (<130 мм рт. ст.)				
ХС ЛПНЩ >4, ммоль/л	0,10	0,01–1,61	3,6	0,131–3,931*#
ІЛ-1 >0,8, нг/мл	0,05	0,01–0,94	0,99	0,24–4,11
ІЛ-6 >7, нг/мл	0,66	0,14–3,0	9,88	0,39–12,10*#
ТНФ- α >9, пг/мл	1,12	0,21–5,89	7,03	0,58–8,95*#
СРП >5, мг/мл	0,37	0,03–3,95	1,01	0,17–6,03
ET-1 >1,1, пг/мл	2,63	0,16–2,98	3,49	0,37–3,86#
VCAM >1100, нг/мл	0,34	0,07–1,57	2,36	1,21–2,90*#
ICAM >400, нг/мл	0,10	0,01–1,61	0,94	0,18–4,93
Ризик недосягнення цільового рівня ДАТдоб (<80 мм рт. ст.)				
ХС ЛПНЩ >4, ммоль/л	0,40	0,06–2,45	2,38	0,18–6,43*#
ІЛ-1 >0,8, нг/мл	0,29	0,03–2,75	1,54	0,10–23,49
ІЛ-6 >7, нг/мл	0,20	0,03–1,32	1,33	0,13–13,34
ТНФ- α >9, пг/мл	1,76	0,22–3,71	0,25	0,02–2,49
СРП >5, мг/мл	0,58	0,03–8,76	1,17	0,12–10,93
ET-1, пг/мл	0,71	0,05–9,67	8,56	1,51–9,34*#
VCAM >1100, нг/мл	1,19	0,23–6,09	0,67	0,08–5,54
ICAM >400, нг/мл	0,40	0,06–2,45	0,65	0,06–6,64

*: різниця динаміки показників у I та II групах $p < 0,05$; #: різниця між показниками I та II груп $p < 0,05$.

sVCAM-1 як можливий біомаркер ендотеліальної дисфункції в пацієнтів з АГ [22,24] поряд з іншими цитокінами (ET-1, СРП, ІЛ-1, ІЛ-6, ТНФ- α тощо) [6].

Проаналізували чинники ендотеліальної дисфункції, що можуть спричиняти недосягнення цільових значень САТ і ДАТ навіть на фоні сучасного антигіпертензивного лікування, а також оцінили вплив кверцетину на ці фактори в процесі 12-тижневого лікування. Встановили, що найбільший вплив на недосягнення цільового САТдоб у хворих на АГ, які отримували стандартну антигіпертензивну терапію (II група), чинять ІЛ-6 >7 нг/мл (збільшує ризик недосягнення цільового САТдоб у 10 разів), ТНФ- α >9 пг/мл (у 7 разів), ХС ЛПНЩ >4,0 ммоль/л (у 3,6 раза), VCAM >1100 нг/мл (у 2,4 раза). У пацієнтів I групи не виявили вірогідну залежність недосягнення цільових показників АТ від названих факторів; це може свідчити про здатність кверцетину чинити ендотеліопротективний вплив навіть при підвищенні рівнів цитокінів, що дослідили, – маркерів системного запалення й ендотеліальної дисфункції.

Результати дослідження відповідають даним експериментальних і клінічних досліджень, у яких виявили здатність кверцетину чинити протизапальну та ендотеліопротективну активність, а отже здатність знижувати АТ. Так, у дослідженні S. Egert et al. вивчали вплив кверцетину на рівень АТ, стан ліпідного обміну, маркери запалення й оксидативного стресу. Учасники дослідження – 93 особи віком 25–65 років з ознаками метаболічного синдрому. Виявили, що приймання кверцетину впродовж 6 тижнів супроводжувалося зниженням АТ у середньому на 2,6 мм рт. ст. порівняно з плацебо, а також зменшенням концентрації проатерогенних ліпопротеїнів низької щільності. Такий вплив спостерігали і під час нашого дослідження. У дослідженні K. H. Lee et al. оцінювали вплив кверцетину на кардіометаболічні фактори ризику. Виявили, що приймання кверцетину значно знижує концентрацію

загального холестерину, ліпопротеїнів низької щільності та сприяє зниженню САТ і ДАТ [25].

Експериментальні дослідження останніх років показали: під впливом водорозчинної форми кверцетину зменшується утворення лейкотриєнів внаслідок пригнічення синтезу прозапальних цитокинів ІЛ-1 β і ІЛ-8. Це свідчить про його протизапальні властивості [8,9]. Як і в нашому дослідженні, встановили, що кверцетин сприяє статистично значущому зниженню рівня САТ і зумовлює тенденцію до зниження ДАТ шляхом покращення ендотеліальної функції, посилення активності ендотеліальної NO-синтази (eNOS). Вплив кверцетину на показники хронічного системного запалення при стабільній ІХС вивчали в дослідженні Н. І. Чекаліної та співавт., у яке залучили 85 пацієнтів зі стабільною стенокардією (функціональний клас I-II) і серцевою недостатністю (0-I стадії). Кожному пацієнтові дослідної групи, крім бета-блокаторів, статинів та аспірину, призначили кверцетин у добовій дозі 120 мг протягом 2 місяців. Встановили зниження рівня прозапальних медіаторів, як-от ТНФ- α , ІЛ-1 та ІЛ-10 [15]. Автори зробили висновок про значущий протизапальний ефект кверцетину. Подібну позитивну динаміку цих та інших цитокинів у хворих, які отримували кверцетин, спостерігали і в нашому дослідженні.

Результати, що одержали, свідчать про перспективність вдосконалення способів прогнозування ризику недосягнення цільового АТ у лікованих за чинними рекомендаціями хворих на АГ та пошуку причин цього явища шляхом вивчення динаміки цитокинів, маркерів ендотеліальної дисфункції. Це забезпечить персоналізований підхід до використання ендотеліопротективних препаратів, зокрема кверцетину, для поліпшення контролю АТ і зменшення частоти серцево-судинних ускладнень.

Висновки

1. Внаслідок застосування кверцетину вдається досягати цільових значень САТ (добового, денного, нічного) і ДАТ (добового, денного, нічного) у вірогідно більшої частки хворих порівняно з тими, кому призначено лише стандартну антигіпертензивну терапію.

2. Кверцетин чинить ендотеліопротективну дію, що підтверджена вірогідним зниженням рівнів молекул адгезії судинного ендотелію (s-VCAM), молекул міжклітинної адгезії I типу (s-ICAM-1), ET-1, ІЛ-1, ІЛ-6, ТНФ- α .

3. Додаткове використання кверцетину на тлі стандартної антигіпертензивної терапії вірогідно зменшує ризик недосягнення цільових рівнів САТдоб, ДАТдоб і ризик виникнення порушень серцевого ритму навіть на фоні підвищення рівнів прозапальних цитокинів і маркерів ендотеліальної дисфункції, як-от ET-1, ІЛ-6, ТНФ- α , sVCAM, ХС ЛПНЩ.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 07.12.2022

Після доопрацювання / Revised: 30.01.2023

Прийнято до друку / Accepted: 07.02.2023

Відомості про авторів:

Соломенчук Т. М., д-р мед. наук, професор, зав. каф. сімейної медицини ФПДО, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-6153-0457

Прокоша М. І., асистент каф. сімейної медицини ФПДО, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-2710-338X

Климкович О. Ю., асистент каф. сімейної медицини ФПДО, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-7788-5722

Information about the authors:

Solomenchuk T. M., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Family Medicine FPGE, Danylo Haltsky Lviv National Medical University, Ukraine.

Prokosa M. I., Assistant of the Department of Family Medicine FPGE, Danylo Haltsky Lviv National Medical University, Ukraine.



Klymkovych O. Yu., Assistant of the Department of Family Medicine FPGE, Danylo Haltsky Lviv National Medical University, Ukraine.

References

- Boichuk, H. R., Myronets, O. I., & Plesh, I. A. (2019). Osnovni faktory ryzyku prohesuvannia hipertoničnoi khvoroby [The main risk factors for the progression of hypertension]. *Bimco Journal*. Abstract book of the congress BIMCO (pp. 187-187). [in Ukrainian].
- Vantiukh, N. V., Lemko, O. I., & Reshetar, D. V. (2020). Khronichna bronkhialna obstruktsiia ta endotelialna dysfunksiia: deaki imunolohichni aspekty vzaiemodii [Chronic bronchial obstruction and endothelial dysfunction: some immunological aspects of the interaction]. *Astma ta alerhiia*, (3), 14-21. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.31655/2307-3373-2022-3-14-21>
- Vatseba, M. O., Haliuk, N. M., & Havrysh, I. M. (2021, December 28). Endotelialna dysfunksiia u cholovikiv z arterialnoi hipertenzieiu ta komorbidnoi patolohieiu [Endothelial dysfunction in men with arterial hypertension and comorbid pathology]. *Modern medicine: the use of creative industries in the healthcare system*. International scientific conference (pp. 24-26). Medical University of Lublin. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-182-4-5>
- Vynnychenko, L. B., & Pryvalova, A. O. (2017). Endotelialna dysfunksiia ta arterialna ryhidnist u khvorykh na khronichne obstruktyvne zakhvoriuvannia [Endothelial dysfunction and arterial stiffness in patients with chronic obstructive disease]. *Aktualni pytannia teoretychnoi ta klinichnoi medytsyny*. Abstracts of reports of the 5th international scientific and practical conference (pp. 225-225). Sumy: Sumy State University. [in Ukrainian].
- Zaremba, Ye. Kh., Zaremba-Fedchyshyn, O. V., & Prokosa, M. I. (2021). Otsinka efektyvnosti metabolichnoi terapii v rozvytku adhezyvnoi dysfunksii endoteliiu u khvorykh na arterialnu hipertenziiu [Evaluation of effectiveness of metabolic therapy in the development of adhesive dysfunction of endothelia in patients with arterial hypertension]. *Zdobutky klinichnoi i eksperymentalnoi medytsyny*, (2), 77-82. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.11603/1811-2471.2021.vi2.11822>
- Zaremba, Ye. Kh., Zaremba-Fedchyshyn, O. V., Prokosa, M. I. (2020). Vplyv metabolichnoi terapii na dynamiku dobovoho monitorynhu arterialnogo tysku u khvorykh na arterialnu hipertenziiu. [The influence of metabolic therapy on daily blood pressure monitoring dynamics in hypertensive patients]. *Simeina medytsyna*, (4), 63-66. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.30841/2307-5112.4.2020.217673>
- Nemish, I. L. (2022). Endotelialna dysfunksiia u khvorykh na khronichnyi koronarnyi syndrom, khronichne obstruktyvne zakhvoriuvannia lehen ta ozhyrinnia [Endothelial dysfunction in patients with chronic coronary syndrome, chronic obstructive pulmonary disease and obesity]. *103rd final scientific and practical conference with the international participation of professors and teaching staff of Bukovinian State Medical University* (pp. 160-161). [in Ukrainian].
- Moibenko, O. O. (2015). *Bioflavonoidy yak orhanoprotektory (kvertsetyn, korvityn, kvertyn)* [Bioflavonoids as organoprotectors (quercetin, corvutin, quertin)]. Naukova dumka. [in Ukrainian].
- Korkushko, O. V., Antoniuk-Shcheglova, I. A., Naskalova, S. S., Bondarenko, O. V., Hryb, O. M., Shatylo, V. B., & Koshel, N. M. (2021). Endoteliprotekorni ta antyhipoksychni vlastyvyosti kvertsetynu u patsientiv pokhlyoho viku z metabolichnym syndromom. [Endotheliumprotective and antihypoxic properties of quercetin in elderly patients with metabolic syndrome]. *Zaporozhye medical Journal*, 23(2), 195-201. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2021.2.228707>

- [10] Parkhomenko, A. N. (2008). Metabolicheskaia terapiya, ili kardioprotektsiia pri ishemiicheskoi bolezni serdtsa: itogi i perspektivy [Metabolic therapy, or cardioprotection in ischemic heart disease: results and prospects]. *Ukrainskyi medychnyi chasopys*, (4), 15-19. [in Russian].
- [11] Polianska, O. S., & Amelina, T. M. (2011). Endotelialna dysfunktsiia pry ishemiichnii khvorobi sertsia v poiednanni z suputnoiu patolohieiu [Endothelial dysfunction in coronary heart disease in combination with concomitant pathology]. *Aktualni pytannia vnutrishnoi medytsyny. Proceedings of the scientific and practical conference* (pp. 136-137). [in Ukrainian].
- [12] Ryzhkova, N. O., Gavrilenko, T. I., & Parkhomenko, O. M. (2016). Korvityn znyzhuie vysokyi vmist mieloperoksydazy v plazmi krovi khvorykh na hostryi infarkt miokarda. [Korvitin reduces the high maintenance of myeloperoxidase in plasma of blood of patients with the acute infarct of myocardium]. *Fiziolohichni zhurnal*, 62(2), 87-93. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/fz62.02.087>
- [13] Ministry of Health of Ukraine. (2016, September 23). *Unifikovanyi klinichni protokoli pervynnoi, vtorynnoi (spetsializovanoi) ta tretynnoi (vysokospetsializovanoi) medychnoi dopomohy "Stabilna ishemiichna khvoroba sertsia"*. Nakaz vid 23.09.2016 No. 994 [Unified clinical protocol of primary, secondary (specialized) and tertiary (highly specialized) medical care "Stable ischemic heart disease" (No. 994)]. [in Ukrainian].
- [14] Ministry of Health of Ukraine. (2021, December 23). *Unifikovanyi klinichni protokoli pervynnoi, vtorynnoi (spetsializovanoi) ta tretynnoi (vysokospetsializovanoi) medychnoi dopomohy "Stabilna ishemiichna khvoroba sertsia"*. Nakaz vid 23.12.2021 No. 2857 [Unified clinical protocol of primary, secondary (specialized) and tertiary (highly specialized) medical care "Stable ischemic heart disease" (No. 2857)]. <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v2857282-21#Text>
- [15] Kazakov, Yu. M., Chekalina, N. I., Burmak, Yu. H., Petrov, Ye. Ie., Borysova, Z. O., & Manusha, Yu. I. (2017). Porivnialna otsinka vplyvu resveratrolu ta kvertsetynu na pokaznyky systemnoho zapalennia u khvorykh na ishemiichnu khvorobu sertsia [Comparative assessment of the effect of resveratrol and quercetin on indicators of systemic inflammation in patients with coronary heart disease]. *Profilaktyka neinfektsiinykh zakhvoriuvan: fokus na komorbidnist*. Materials of Scientific and Practical Conference (pp. 65-65). Kharkiv. [in Ukrainian].
- [16] Shalimova, A. S. (2014). Endotelialna dysfunktsiia ta yii korektsiia u patsientiv z hipertoniichnoiu khvoroboiu i tsukrovym diabetom 2-ho typu [Endothelial dysfunction and its correction in patients with essential hypertension and type 2 diabetes mellitus]. *Mizhnarodnyi endokrynolohichni zhurnal*, (2), 33-39. [in Ukrainian].
- [17] Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., Agabiti Rosei, E., Azizi, M., Burnier, M., Clement, D. L., Coca, A., de Simone, G., Dominiczak, A., Kahan, T., Mahfoud, F., Redon, J., Ruilope, L., Zanchetti, A., Kerins, M., Kjeldsen, S. E., Kreuz, R., Laurent, S., Lip, G. Y. H., ... ESC Scientific Document Group (2018). 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *European heart journal*, 39(33), 3021-3104. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy339>
- [18] Aksenov, E. V. (2019). Endotelialna dysfunktsiia ta shliakhy yii profilaktyky pry provedenni renthenendovaskuliarnykh protsedur po rekanalizatsii koronarnykh arterii [Endothelial Dysfunction and Ways of its Prevention during Percutaneous Coronary Interventions by Recanalization of Coronary Arteries]. *Ukrainskyi zhurnal medytsyny, biolohii ta sportu*, 4(5), 102-108. [in Ukrainian].
- [19] DeSouza, C. A., Dengel, D. R., Macko, R. F., Cox, K., & Seals, D. R. (1997). Elevated levels of circulating cell adhesion molecules in uncomplicated essential hypertension. *American journal of hypertension*, 10(12 Pt 1), 1335-1341. [https://doi.org/10.1016/s0895-7061\(97\)00268-9](https://doi.org/10.1016/s0895-7061(97)00268-9)
- [20] Elliott, W. J. (2012). Relative effectiveness of clinic and home blood pressure monitoring compared with ambulatory blood pressure monitoring in diagnosis of hypertension: systematic review. *Yearbook of Medicine*, 2012, 338-340. [https://doi.org/10.1016/s0084-3873\(12\)00261-1](https://doi.org/10.1016/s0084-3873(12)00261-1)
- [21] Guragac Dereli, F. T., & Belwal, T. (2020). Quercetin. In *Naturally Occurring Chemicals against Alzheimer's Disease* (pp. 109-115). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819212-2.00008-6>
- [22] Hedayat, M., Mahmoudi, M. J., Rose, N. R., & Rezaei, N. (2010). Proinflammatory cytokines in heart failure: double-edged swords. *Heart failure reviews*, 15(6), 543-562. <https://doi.org/10.1007/s10741-010-9168-4>
- [23] Troncoso, M. F., Ortiz-Quintero, J., Garrido-Moreno, V., Sanhueza-Olivares, F., Guerrero-Moncayo, A., Chiong, M., Castro, P. F., Garcia, L., Gabrielli, L., Corbalán, R., Garrido-Olivares, L., & Lavandero, S. (2021). VCAM-1 as a predictor biomarker in cardiovascular disease. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1867(9), 166170. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166170>
- [24] Ferreira, I., Hovind, P., Schalkwijk, C. G., Parving, H. H., Stehouwer, C. D. A., & Rossing, P. (2018). Biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction as predictors of pulse pressure and incident hypertension in type 1 diabetes: a 20 year life-course study in an inception cohort. *Diabetologia*, 61(1), 231-241. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4470-5>
- [25] Lee, K. M., Kang, H. S., Yun, C. H., & Kwak, H. S. (2012). Potential in vitro Protective Effect of Quercetin, Catechin, Caffeic Acid and Phytic Acid against Ethanol-Induced Oxidative Stress in SK-Hep-1 Cells. *Biomolecules & therapeutics*, 20(5), 492-498. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.5.492>

Взаємозв'язок ферокінетичних показників зі станом кардіального ремоделювання у хворих на ішемічну хворобу серця із супутнім залізодефіцитом

М. О. Коновалова *A,B,C,D,E, Н. С. Михайловська A,B,C,E,F

Запорізький державний медичний університет, Україна

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

Ключові слова:

ішемічна хвороба серця, залізодефіцит, ферокінетика, кардіальне ремоделювання.

Патологія. 2023. Т. 20, № 1(57). С. 20-26

*E-mail: mkonovalova94@gmail.com

Мета роботи – оцінити взаємозв'язок ферокінетичних показників зі станом кардіального ремоделювання у хворих на ішемічну хворобу серця (ІХС) залежно від ступеня залізодефіциту.

Матеріали та методи. У дослідження залучили 90 хворих на ІХС: стабільну стенокардію напруження II–III ФК (35 чоловіків, 55 жінок, вік – 69 (61; 72) років). Усіх пацієнтів залежно від показників обміну заліза та гемограми поділили на чотири клінічні групи: I (n = 16) – хворі з залізодефіцитною анемією (ЗДА) легкого та середнього ступеня тяжкості; II (n = 15) – з абсолютним латентним залізодефіцитом (ЗД), III (n = 14) – із функціональним латентним ЗД; у IV (групу порівняння, n = 45) залучили хворих на ІХС без порушень обміну заліза. Оцінили показники кардіального ремоделювання, обміну заліза та їхній взаємозв'язок.

Результати. Під час аналізу стану ферокінетики у хворих на ІХС встановили зниження показників транспортного (сироваткове залізо, насичення трансферину залізом) і тканинного резерву (феритин) заліза на тлі зростання загальної та латентної залізов'язувальної здатності сироватки залежно від ступеня сидеропенії. У хворих з абсолютним ЗД порівняно з хворими без порушень обміну заліза зафіксували достовірно більший на 14,18 % розмір ППд (U = 2,0; p < 0,05), більше в 1,7 раза значення КДІ ЛШ (U = 4,0; p < 0,05), більший на 16 % ІММ ЛШ (U = 17,0; p < 0,05). Також у хворих із порушеннями ферокінетики спостерігали тенденцію до збільшення КДР ЛШ, КДО ЛШ, КСО ЛШ, КСІ ЛШ, ММ ЛШ, розміру Ао, ЛПд, ПШ, ТМШПд порівняно з пацієнтами без супутнього ЗД. У хворих з абсолютним ЗД встановили взаємозв'язки між рівнем феритину і ТМШПд (r = +0,84; p < 0,05); СЗ і ЛПд (r = -0,73; p < 0,05); ЗЗС та Ао (r = -0,78; p < 0,05); латентною ЗЗС і КСР ЛШ (r = +0,71; p < 0,05). У хворих із латентним ЗД виявили зв'язки лише між рівнем НТЗ та ІММ ЛШ (r = +0,60; p < 0,05). При функціональному залізодефіциті кореляції між показниками обміну заліза та кардіального ремоделювання не визначили.

Висновки. Інтенсивність процесів кардіального ремоделювання у хворих на ІХС і залізодефіцит зростає прямо пропорційно ступеню прогресування сидеропенії; це підтверджено відповідними кореляційними взаємозв'язками.

Key words:

coronary artery disease, iron deficiency, ferrokinetic parameters, cardiac remodeling.

Pathologia 2023; 20 (1), 20-26

The relationship between ferrokinetic parameters and the state of cardiac remodeling in patients with coronary artery disease with concomitant iron deficiency

М. О. Konovalova, N. S. Mykhailovska

The aim of the study: to assess the relationship between ferrokinetic parameters and the state of cardiac remodeling in patients with coronary artery disease (CAD) depending on the stage 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) years). 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 with CAD without iron metabolism disorders. The parameters of cardiac remodeling, iron metabolism and their relationship were analyzed.

Results. During the analysis of ferrokinetic parameters, a decrease in transport (serum iron, transferrin saturation) and tissue (ferritin) reserve of iron on the background of an increase in the total and latent iron-binding capacity depending on the stage of sideropenia was established. At the same time, latent iron-binding capacity in patients with absolute ID was less by 43 % than in patients with latent ID. Patients with latent ID demonstrated a significantly higher level of transferrin saturation by 59.9 % than in the group of patients with CAD without concomitant ID. Patients with absolute ID, compared to patients without iron metabolism disorders, demonstrated significantly higher size of RAd by 14.18 % (U = 2.0; p < 0.05); increase EDVI of LV in 1.7 times (U = 4.0; p < 0.05); higher value of LV MI by 16 % (U = 17.0; p < 0.05). Also, patients with ferrokinetics disorders demonstrated a tendency to increase LVIDd, EDV LV, ESV LV, ESVI, LV mass, Ao, RAd, RVd, IVSd compared to patients without concomitant ID. For patients with absolute ID, it was established that there a relationship between the level of ferritin and IVSd (r = +0.84; p < 0.05); serum iron and LAd (r = -0.73; p < 0.05); total iron-binding capacity and Ao (r = -0.78; p < 0.05); latent iron-binding capacity and LVIDs (r = +0.71; p < 0.05). Patients with latent ID demonstrated relationships only between the transferrin saturation and LV MI (r = +0.60; p < 0.05). There were no statistically significant correlation relationships between indicators of iron metabolism and cardiac remodeling in patients with CAD and functional ID.

Conclusions. The intensity of the processes of cardiac remodeling in patients with CAD and iron deficiency increases in direct proportion to the degree of progression of sideropenia, what is confirmed by the relevant correlation relationships.

Ішемічна хвороба серця (ІХС) – найпоширеніша форма серцево-судинних захворювань, що є провідною причиною смертності в Україні та світі [1]. За розрахунками Світового банку, в 2019 році Україна посідала перше місце за показником років життя, втрачених через передчасну смерть від серцево-судинних захворювань [2].

Анемію та дефіцит заліза часто виявляють у пацієнтів з ІХС і хронічною серцевою недостатністю (ХСН). У розвинених країнах поширеність дефіциту заліза в населення коливається від 10 % до 16 % залежно від статі, віку та раси [3]. Поширеність залізодефіцитної анемії становить від 2,6 % до 5,0 % [3]. Прихований дефіцит заліза в дорослого населення у країнах Європи становить 30–40 %. Дефіцит заліза виявили у 43 % пацієнтів із гострим коронарним синдромом і майже у 60 % хворих на ІХС [4].

Залізо відіграє провідну роль у транспортуванні та використанні кисню, росту та проліферації клітин, а також у функції мітохондрій [5,6]. Зниження рівня сироваткового заліза (СЗ) при ІХС пов'язане з підвищеним ризиком серцево-судинної смертності та виникнення інфаркту міокарда. Супутній залізодефіцит (ЗД) істотно знижує якість життя, фізичну активність таких пацієнтів і за наявності анемії, і без неї [7].

Відповідно до рекомендацій British Society of Gastroenterology (BSG) з ведення хворих на залізодефіцитну анемію 2021 р., наказу МОЗ України № 709 від 02.11.2015 року, оптимальним маркером залізодефіцитної анемії є феритин [8,9]. Але підвищення феритину як гострофазового білка під час запального процесу в організмі може маскувати дефіцит заліза [4,8]. Так, у хворих на ІХС при виникненні ХСН рівень цього маркера підвищується в умовах хронічного запалення, що персистує [10]. Отже, визначення феритину може бути недостатнім для точного та надійного оцінювання стану заліза для пацієнтів з ІХС, оскільки він відбиває тільки його запаси в організмі. Для врахування утилізованого заліза рекомендовано додатково вимірювати рівень насичення трансферину залізом (НТЗ) [5,8]. Дослідження обох маркерів дає змогу детальніше проаналізувати стан заліза в організмі й ідентифікувати пацієнтів з абсолютним латентним або функціональним дефіцитом заліза на тлі ІХС [7].

Відомо, що абсолютний дефіцит заліза визначають як істотне зниження або відсутність його запасів у кістковому мозку, печінці та селезінці [7,11]. Відповідно, функціональний дефіцит заліза виникає і при нормальному, й при підвищеному загальному запасі заліза в організмі, але яке недоступне для процесів еритропоезу [7,11].

Сучасні дослідження показали зв'язок захворюваності, смертності від ІХС та її гострих ускладнень у пацієнтів з абсолютним і функціональним ЗД [12,13]. Тяжкість розладів метаболізму заліза, що прогресує, пов'язана з вищими показниками смертності [14]. Наявність ЗД визнано однією з патогенетичних ланок ХСН та її прогресування [15]. У сучасних фундаментальних документах щодо діагностики й лікування серцевої недостатності залізодефіцит та анемія набули статусу окремої коморбідності [4,15]. У пацієнтів із ХСН навіть легка форма анемії асоційована з

погіршенням симптомів, зниженням якості життя та виживаності, обмеженням функціональних можливостей і підвищенням функціонального класу за NYHA [4,7]. У результаті наукових досліджень встановлено, що навіть функціональний ЗД асоційований зі збільшенням ризику захворюваності та смертності в пацієнтів старших вікових груп із СН [16–18].

За даними фахової літератури, у разі виникнення ЗД спостерігають порушення глобальної систолічної функції лівого шлуночка та зниження скоротливого резерву міокарда [17–21]. Дослідження із залученням лабораторних тварин показали, що латентний ЗД асоціюється зі структурними змінами в серці, які включають дилатацію лівого шлуночка з гіпертрофією міокарда, застійні явища в легенях і кардіальний фіброз [19,22,23]. Крім того, експериментальні моделі з ізольованим ЗД виявили кардіомегалію та порушення скорочувальної функції міокарда [19,24].

Уточнення потребують відомості щодо особливостей змін структурно-функціонального стану серця у хворих на ІХС залежно від ступеня залізодефіциту для вироблення індивідуалізованого підходу до ведення таких пацієнтів.

Мета роботи

Оцінити взаємозв'язок ферокінетичних показників зі станом кардіального ремоделювання у хворих на ішемічну хворобу серця залежно від ступеня залізодефіциту.

Матеріали і методи дослідження

У подвійне відкрите дослідження в паралельних групах залучили 90 хворих на ІХС: стабільну стенокардію напруження II–III ФК (35 чоловіків, 55 жінок, вік – 69 (61; 72) років), які перебували на стаціонарному лікуванні в терапевтичному та кардіологічному відділеннях КНП «Міська лікарня № 4» ЗМП (м. Запоріжжя). Усіх пацієнтів залежно від показників обміну заліза та гемограми поділили на чотири клінічні групи: I (n = 16) – хворі з залізодефіцитною анемією (ЗДА) легкого та середнього ступеня тяжкості; II (n = 15) – з абсолютним латентним ЗД; III (n = 14) – з функціональним латентним ЗД; у IV (групу порівняння, n = 45) залучили хворих на ІХС без порушень обміну заліза. Групи хворих зіставні за статтю, віком, характером супутніх захворювань.

ЗДА діагностували при зниженні рівня гемоглобіну (Hb у венозній крові <130 г/л у чоловіків і <120 г/л у жінок), зниженні рівня СЗ <8,8 нмоль/л, при рівні феритину <100 мкг/л, НТЗ <20 %. У цій групі 8 пацієнтів мали ЗДА легкого ступеня тяжкості (рівень гемоглобіну становив 110,5 (106,0; 114,5) г/л), 8 осіб – помірного (рівень гемоглобіну – 87,0 (83,5; 92,5) г/л).

Латентний залізодефіцит верифікували за такими критеріями: Hb у венозній крові >130 г/л у чоловіків, >120 г/л у жінок; рівень СЗ <8,8 нмоль/л; рівень феритину <100 мкг/л, НТЗ <20 % [10,25]. Функціональний ЗД діагностували, якщо Hb у венозній крові >130 г/л у чоловіків, >120 г/л у жінок, рівень СЗ <8,8 нмоль/л, вміст феритину – в межах 100–299 мкг/л, НТЗ <20 % [8].

ІХС верифікували за рекомендаціями European Society of Cardiology (ESC) з діагностики та лікування хронічного коронарного синдрому 2019 р. та чинним уніфікованим клінічним протоколом первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Стабільна ішемічна хвороба серця» (наказ МОЗ № 2857 від 23.12.2021 року). Наявність та етіологію супутнього анемічного синдрому встановили відповідно до рекомендацій British Society of Gastroenterology (BSG) з ведення хворих на залізодефіцитну анемію 2021 р., наказів МОЗ України № 709 від 02.11.2015 року та № 647 від 30.07.2010 року за редакцією від 29.07.2016 року. Для діагностики та верифікації ЗД використали критерії, що адаптовані для пацієнтів із захворюваннями серцево-судинної системи [8, 10, 25].

Критерії залучення в дослідження – наявність письмової інформованої згоди; вік понад 18 років; діагностована залізодефіцитна анемія або латентний залізодефіцит; верифікована ІХС. Критерії виключення – відмова від участі в дослідженні; діагностовані в стаціонарі гострі кровотечі; документовані крововтрати в анамнезі впродовж пів року; тяжка анемія, що потребує гемотрансфузії; гемолітичні анемії; гіпо-, апластичні анемії; злоякісні пухлини, в тому числі кровотворних органів; В12-фолієводефіцитна анемія; парентеральне введення препаратів заліза терміном до 3 місяців; ХСН із ФВ ≤ 40 % або ІV ФК за NYHA; ХХН III–V ст.; гострий коронарний синдром; термін менше ніж 3 місяці після перенесеного гострого інфаркту міокарда та інсульту; імплантований або потреба в імплантації електрокардіостимулятора; тяжкі супутні захворювання, що супроводжувались органною недостатністю; тяжкі психоневрологічні розлади.

Під час роботи дотримувались морально-етичних норм біоетики згідно з правилами ІСН/GCP, Гельсінської декларації прав людини (1964 р.), Конвенції Ради Європи з прав людини і біомедицини (1997 р.), а також чинним законодавством України.

Показники обміну заліза (феритин, СЗ, загальна залізов'язувальна здатність сироватки (ЗЗЗС)) визначили в клініко-біохімічній лабораторії ННМЦ «Університетська клініка» ЗДМУ. Як значення латентної залізов'язувальної здатності сироватки (латентна ЗЗС) встановили різницю рівнів ЗЗЗС і СЗ. Насичення трансферину залізом визначили за формулою:

$$\text{НТЗ (\%)} = (\text{СЗ} \times 100) / \text{ЗЗЗС}.$$

Як референтні визначили такі значення: феритин 28–365 нг/мл, СЗ 8,8–29,9 нмоль/л, ЗЗЗС 45–76 ммоль/л, латентна ЗЗС 32,0–46,0 ммоль/л, НТЗ 16,0–50,0 %.

Для оцінювання особливостей кардіального ремоделювання використали ультразвуковий діагностичний сканер MyLab 50X («eSaote», Італія). Показники оцінювали відповідно до рекомендацій з виконання трансторакальної ехокардіографії Американського товариства з ехокардіографії (2019 р.).

Статистичне опрацювання даних здійснили за допомогою пакету програм Statistica 13.0 (StatSoft Inc., США, № ліцензії JPZ8041382130ARCN10-J). Гіпотезу щодо розподілу кількісних показників перевірили за допомогою критерію Шапіро–Вілка. Оскільки всі

параметри не відповідали нормальному розподілу, то кількісні ознаки наведено як медіана та міжквартильний інтервал (Me; Q25–Q75), якісні – у відсотках. Для визначення відмінностей між групами застосували ранговий аналіз Краскела–Воліса з наступним попарним зіставленням за допомогою U-критерію Манна–Вітні з поправкою Бонфероні. Для оцінювання залежності між показниками клінічної гемограми, обміну заліза та ремоделювання міокарда виконали кореляційний аналіз із розрахунком коефіцієнта кореляції Спірмена. Результати вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати

Оцінили гематологічні та ферокінетичні показники у хворих на ІХС, визначили їхні особливості залежно від ступеня залізодефіциту (табл. 1).

У хворих на ІХС із супутньою ЗДА рівень гемоглобіну, кількість еритроцитів і колірний показник достовірно менше на 28,0 % ($U = 1,5$; $p < 0,05$), на 38,5 % ($U = 1,0$; $p < 0,05$) та на 19,0 % ($U = 1,0$; $p < 0,05$) відповідно, ніж у хворих на ІХС без ознак ЗД. У хворих цієї групи виявили також вірогідно нижчий на 41 % рівень СЗ ($U = 15,5$; $p < 0,05$) і нижчий у 4,5 раза рівень феритину ($U = 7,0$; $p < 0,05$), ніж у пацієнтів без порушення обміну заліза. Зазначимо, що рівень феритину у хворих із ЗДА достовірно нижчий на 60 %, ніж у групі з функціональним латентним ЗД ($U = 9,0$; $p < 0,05$) та на 31,4 % менше, ніж у групі з абсолютним латентним ЗД ($U = 15,0$; $p < 0,05$). Виявили тенденцію до вищого рівня ЗЗЗС, що визначає загальну доступну кількість локусів зв'язування заліза в трансферині, у хворих із ЗДА, ніж у хворих без порушень обміну заліза ($U = 1,0$; $p \approx 0,05$). Латентна ЗЗЗС, що характеризує потенційну здатність сироватки крові зв'язувати залізо, у хворих із ЗДА в 2,06 раза більша, ніж у хворих без порушень обміну заліза ($U = 3,0$; $p < 0,05$). Також у хворих із супутньою ЗДА порівняно з хворими без порушень обміну заліза зафіксували вірогідно нижчий у 2,3 раза рівень НТЗ ($U = 4,0$; $p < 0,05$), що відбиває співвідношення концентрації заліза в сироватці крові до загальної можливості трансферину переносити залізо.

У хворих з абсолютним латентним ЗД рівень СЗ достовірно нижчий на 34 % порівняно з хворими без порушення обміну заліза ($U = 1,5$; $p < 0,05$). Поряд із цим, у цій групі зафіксували вірогідно нижчий на 62,1 % рівень НТЗ ($U = 4,0$; $p < 0,05$) і вищий на 35,0 % рівень латентної ЗЗС ($U = 11,0$; $p < 0,05$), ніж у групі хворих на ІХС без супутнього ЗД. Крім того, у пацієнтів з абсолютним латентним ЗД виявили тенденцію до зниженого рівня феритину порівняно з хворими без порушень обміну заліза ($U = 11,0$; $p \approx 0,05$). Аналогічну особливість встановили в обстежених із функціональним латентним ЗД: достовірно нижчий на 52 % рівень СЗ ($U = 3,5$; $p < 0,05$) і менший в 2,18 раза рівень НТЗ ($U = 2,0$; $p < 0,05$), ніж у хворих без порушень обміну заліза.

Надалі для оцінювання впливу стану обміну заліза на показники кардіального ремоделювання у хворих на ІХС здійснили їхній аналіз залежно від ступеня залізодефіциту (табл. 2).

Таблиця 1. Гематологічні та ферокінетичні показники у хворих на ІХС

Показник, одиниці вимірювання	Хворі на ІХС із супутнім ЗД (n = 45)			Хворі на ІХС без супутнього ЗД (n = 45)
	ЗДА (n = 16)	Абсолютний латентний ЗД (n = 15)	Функціональний латентний ЗД (n = 14)	
Кількість еритроцитів, $\times 10^{12}/л$	2,65 (2,44; 3,70)*	4,16 (4,11; 4,30)	3,10 (2,97; 3,18)	4,31 (4,07; 4,60)
Нв, г/л	108,0 (86,0; 113,0) *	137,0 (128,0; 155,0)	134,0 (127,0; 139,0)	150,0 (143,0; 158,0)
КП, од.	0,77 (0,72; 0,81)*	0,95 (0,89; 1,01)	0,81 (0,79; 0,81)	0,95 (0,91; 1,00)
СЗ, нмоль/л	6,70 (3,35; 8,90)*	7,50 (3,30; 7,80)*	5,50 (2,75; 8,20)*	11,40 (11,05; 15,85)
Феритин, нг/мл	60,5 (33,4; 70,3)*#^	88,2 (47,1; 100,0)	151,4 (124,5; 275,2)	273,3 (71,5; 325,3)
ЗЗЗС, ммоль/л	88,00 (79,35; 95,70)	62,10 (51,40; 68,20)	54,04 (46,80; 64,25)	49,70 (46,65; 68,8)
Латентна ЗЗС, ммоль/л	77,60 (70,40; 89,10)*	57,70 (49,40; 64,90)*	44,65 (36,50; 59,50)	37,55 (32,05; 52,95)
НТЗ, %	10,82 (4,60; 17,46)*	9,51 (7,14; 13,90)*	11,52 (6,32; 13,50)*	25,11 (20,88; 34,13)

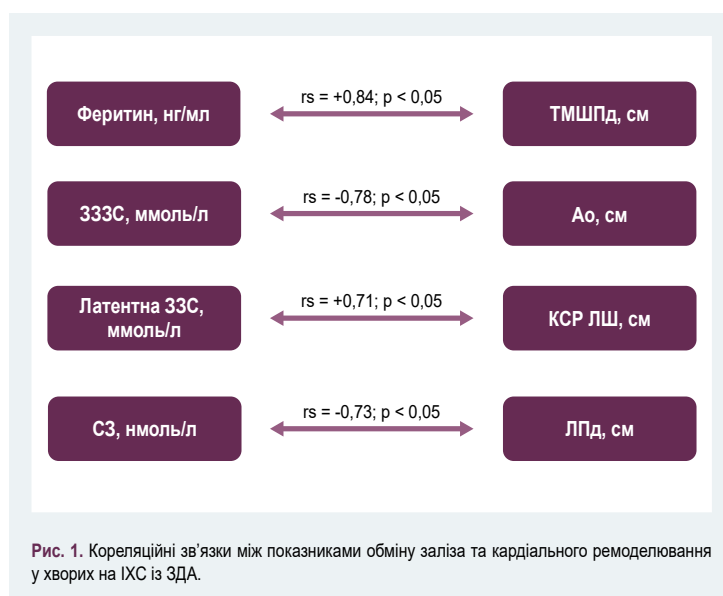
*: вірогідність розбіжностей порівняно з хворими без порушень обміну заліза ($p < 0,05$); #: вірогідність розбіжностей між хворими з абсолютним і функціональним ЗД ($p < 0,05$); ^: вірогідність розбіжностей між хворими з абсолютним і латентним ЗД ($p < 0,05$).

Таблиця 2. Показники кардіального ремоделювання у хворих на ІХС залежно від ступеня залізодефіциту

Показник, одиниці вимірювання	Хворі на ІХС із супутнім ЗД (n = 45)			Хворі на ІХС без супутнього ЗД (n = 45)
	ЗДА (n = 16)	Абсолютний латентний ЗД (n = 15)	Функціональний латентний ЗД (n = 14)	
Ао, см	2,85 (2,56; 3,03)	2,61 (2,31; 2,88)	2,82 (2,52; 3,30)	2,75 (2,47; 3,06)
ЛПд, см	3,86 (3,69; 4,18)	3,69 (3,49; 4,26)	3,84 (3,69; 4,07)	3,46 (3,45; 4,18)
КДР ЛШ, см	5,23 (4,70; 5,61)	4,98 (4,79; 5,11)	4,78 (4,21; 5,30)	4,98 (4,59; 5,02)
КДО ЛШ, мл	145,1 (57,4; 182,0)	126,8 (114,6; 181,4)	133,3 (73,2; 160,4)	126,1 (102,1; 160,7)
КДІ, мл/м ²	83,5 (63,4; 92,8)*	69,7 (49,8; 88,4)	73,9 (44,1; 90,6)	49,2 (38,7; 72,1)
КСР ЛШ, см	3,46 (3,15; 3,84)	3,38 (2,88; 3,72)	3,23 (3,12; 3,30)	3,25 (2,73; 3,58)
КСО ЛШ, мл	65,1 (42,5; 84,1)	50,6 (36,3; 56,6)	53,0 (32,8; 81,0)	42,1 (30,5; 49,8)
КСІ, мл/м ²	33,70 (18,50; 44,30)	31,95 (23,90; 52,90)	33,30 (19,80; 55,90)	23,80 (14,60; 26,90)
ТМШПд, см	1,20 (1,03; 1,25)	1,11 (1,03; 1,16)	1,12 (1,07; 1,20)	1,11 (1,03; 1,18)
ТЗСЛШд, см	1,1 (1,03; 1,15)	1,03 (1,03; 1,12)	1,10 (1,07; 1,20)	1,03 (1,00; 1,05)
ВТС ЛШ, у. о.	0,45 (0,44; 0,48)	0,43 (0,38; 0,45)	0,45 (0,45; 0,50)	0,43 (0,39; 0,46)
ММ ЛШ, г	244,0 (198,0; 320,0)	238,0 (188,0; 269,5)	236,0 (166,0; 270,0)	229,0 (181,0; 271,5)
ІММ ЛШ, г/м ²	136,5 (127,0; 159,0)*	134,0 (108,0; 140,0)	134,0 (109,0; 139,0)	117,5 (94,5; 133,3)
ФВ%, за Сімпсоном	55,0 (52,0; 61,0)	55,0 (51,0; 58,0)	52,0 (46,0; 60,0)	55,0 (49,0; 60,0)
СТЛА, мм рт. ст.	21,0 (14,5; 23,5)	19,5 (17,0; 21,0)	17,0 (17,0; 18,0)	18,5 (17,0; 21,0)
ПШд, см	3,23 (3,12; 3,34)	2,73 (2,65; 2,88)	2,78 (2,59; 3,28)	2,65 (2,59; 3,25)
ППд, см	4,02 (3,70; 4,31)*	3,43 (3,23; 3,54)	3,74 (3,56; 3,87)	3,45 (3,27; 3,82)

*: вірогідність розбіжностей порівняно з хворими без порушень обміну заліза ($p < 0,05$); Ао: розмір аорти на рівні клапанного кільця; ЛПд: передньо-задній розмір лівого передсердя в діастолу; КДР: кінцево-діастолічний розмір; КДО: кінцево-діастолічний об'єм; КДІ: кінцево-діастолічний індекс; КСР: кінцево-систолічний розмір; КСО: кінцево-систолічний об'єм; КСІ: кінцево-систолічний індекс; ТМШПд: товщина міжшлуночкової перетинки в діастолу; ТЗСЛШд: товщина задньої стінки ЛШ в діастолу; ВТС: відносна товщина стінки; ММ ЛШ: маса міокарда лівого шлуночка; ІММ ЛШ: індекс маси міокарда; ФВ: фракція викиду; СТЛА: середній тиск у легеневій артерії; ПШд: розмір правого шлуночка у діастолу; ППд: передньо-задній розмір правого передсердя в діастолу.

У хворих із ЗДА порівняно з хворими без порушень обміну заліза зафіксували вірогідно більший на 14,18 % розмір правого передсердя ($U = 2,0$; $p < 0,05$); більше в 1,7 раза значення КДІ ЛШ ($U = 4,0$; $p < 0,05$); більший на 14 % ІММ ЛШ ($U = 17,0$; $p < 0,05$). У хворих цієї групи виявили також тенденцію до збільшення КДР ЛШ, КДО ЛШ, КСО ЛШ, КСІ ЛШ, ММ ЛШ, розміру Ао, ЛПд, ПШ, ТМШПд порівняно з пацієнтами без супутнього ЗД. У хворих із латентним і функціональним залізодефіцитом спостерігали аналогічну спрямованість цих показників, що не досягла рівня статистичної значущості. Не виявили достовірні відмінності між групами хворих на ІХС із різним ступенем залізодефіциту за показниками, що характеризують структурно-функціональний стан серця. Фракція викиду вірогідно не відрізнялася в усіх групах, свідчила про переважне збереження систолічної функції ЛШ; у хворих груп дослідження переважав перший тип діастолічної дисфункції ЛШ (порушення релаксації).



Шляхом кореляційного аналізу встановили низку зв'язків між показниками обміну заліза та кардіального ремоделювання у хворих на ІХС і супутній дефіцит заліза. Так, у хворих із ЗДА (рис. 1) визначили кореляційні зв'язки між рівнем феритину та товщиною міжшлуночкової перетинки ($r = +0,84$; $p < 0,05$); СЗ і поперечним розміром лівого передсердя ($r = -0,73$; $p < 0,05$); ЗЗС і поперечним розміром аорти ($r = -0,78$; $p < 0,05$), латентною ЗЗС і кінцевим систолічним розміром лівого шлуночка ($r = +0,71$; $p < 0,05$). Це свідчить про асоціацію показників ферокінетики зі структурно-функціональними параметрами серця у хворих на ІХС з абсолютним залізодефіцитом.

У хворих із латентним ЗД виявили зв'язки лише між рівнем НТЗ та ІММ ЛШ ($r = +0,60$; $p < 0,05$); це підтверджує клінічне значення НТЗ як маркера латентного залізодефіциту в процесах кардіального ремоделювання. Зауважимо, що в групі хворих із функціональним ЗД не встановили достовірні кореляційні зв'язки між показниками кардіального ремоделювання й обміну заліза.

Обговорення

Під час аналізу показників ферокінетики встановили поступове зниження показників транспортного та тканинного резерву заліза на тлі зростання загальної та латентної залізозв'язувальної здатності сироватки залежно від ступеня сидеропенії. Так, у хворих на ІХС із супутньою ЗДА виявили вірогідно менші значення рівня феритину, сироваткового заліза та гемоглобінового фонду порівняно і з групами з функціональним, латентним ЗД, і без нього. Латентна ЗЗС у хворих із ЗДА в 2,06 раза більша, ніж у пацієнтів без порушень обміну заліза ($U = 3,0$; $p < 0,05$). У хворих із супутньою ЗДА порівняно з пацієнтами без порушень обміну заліза зафіксували також вірогідно менший у 2,3 раза рівень НТЗ ($U = 4,0$; $p < 0,05$).

У хворих з абсолютним латентним ЗД рівень СЗ достовірно нижчий на 34 % порівняно з пацієнтами без порушення обміну заліза ($U = 1,5$; $p < 0,05$). У цій групі зафіксували також вірогідно менший на 62,1 % рівень НТЗ ($U = 4,0$; $p < 0,05$) і більший на 35 % рівень латентної ЗЗС ($U = 11,0$; $p < 0,05$), ніж у групі хворих на ІХС без супутнього ЗД. Аналогічну особливість виявили у хворих із функціональним латентним ЗД: достовірно нижчий на 52 % рівень СЗ ($U = 3,5$; $p < 0,05$) і менший у 2,18 раза рівень НТЗ ($U = 2,0$; $p < 0,05$), ніж у хворих без порушень обміну заліза. Ці результати збігаються з сучасними науковими даними щодо особливостей змін показників ферокінетики залежно від ступеня залізодефіциту [25–27].

Відомо, що системний залізодефіцит має негативний вплив на стан міокарда, що пов'язаний із погіршенням скорочувального резерву, прогресуванням систолічної дисфункції [17], дилатацією та гіпертрофією шлуночків [16,27,28]. Одержали відомості щодо асоціації порушень обміну заліза та ремоделювання передсердь навіть при збереженні фракції викиду лівого шлуночка [28,29]. Результати нашого дослідження доповнюють міжнародні дані щодо особливостей ремоделювання серця на тлі супутнього залізодефіциту. Так,

у хворих з абсолютним залізодефіцитом спостерігали достовірне збільшення об'ємних і лінійних показників серця та вираженості гіпертрофії ЛШ порівняно з хворими без супутнього ЗД. Подібні тенденції спостерігали у хворих із функціональним і латентним ЗД, але вони не досягли рівня статистичної значущості.

Результати, що отримали, можна пояснити прогресуванням патологічних процесів у міокарді на клітинному рівні при збільшенні ступеня залізодефіциту. За даними фахової літератури, наявність залізодефіциту асоційована з безпосереднім порушенням функції кардіоміоцитів у хворих на серцево-судинну патологію. У дослідженні V. Melenovsky [30] встановили знижений вміст заліза у тканинах лівого шлуночка при серцевій недостатності незалежно від наявності анемії, що супроводжувався зменшенням експресії АФК-захисних ферментів (каталази, глутатіонпероксидази та супероксиддисмутизи) і спричиняло загострення мітохондріальної дисфункції. Дефіцит заліза пов'язують із морфологічними змінами в мітохондріях, як-от збільшенням розміру та зменшенням крист [31], а також із функціональними порушеннями: зниженням продукування АТФ, пошкодженням мітохондріальної ДНК, посиленням глюконеогенезу [32], збільшенням виробництва молочної кислоти [33], зниженням мітохондріального біогенезу [34]. Крім мітохондріальної дисфункції, експериментальні моделі міокарда з залізодефіцитом показали змінений обмін іонів Ca^{2+} зі зрушенням у бік гліколітичного метаболізму, що продукує молочну кислоту [24].

У нашому дослідженні виявили зв'язок показників обміну заліза зі структурно-функціональним станом серця у хворих на ІХС, що цілком узгоджується з відомими науковими даними. Chen Y. et al. [35] під час дослідження хворих із супутнім ЗД та ознаками кардіального ремоделювання на тлі ІХС встановили кореляційні зв'язки між ІММ ЛШ і значеннями ЗЗС ($r = +0,34$; $p = 0,005$), гемоглобіну ($r = -0,28$; $p = 0,026$). Крім того, виявили негативні кореляції між ІММ ЛШ і рівнями сироваткового заліза, феритину. В дослідженні, яке здійснили, виявили: ІММ ЛШ позитивно корелював із насиченням трансферину залізом тільки у групі хворих із латентним ЗД. Втім, встановили низку кореляційних зв'язків між показниками кардіального ремоделювання та ферокінетики у хворих з абсолютним ЗД: між рівнем феритину та товщиною міжшлуночкової перетинки ($r = +0,84$; $p < 0,05$); СЗ і поперечним розміром лівого передсердя ($r = -0,73$; $p < 0,05$); ЗЗС і поперечним розміром аорти ($r = -0,78$; $p < 0,05$), латентною ЗЗС і кінцевим систолічним розміром лівого шлуночка ($r = +0,71$; $p < 0,05$). Це підтверджує негативний вплив абсолютного та латентного залізодефіциту на процеси кардіального ремоделювання. У разі функціонального латентного залізодефіциту, що характеризується збереженням тканинним запасом заліза в організмі, не виявили кореляції між показниками обміну заліза й кардіального ремоделювання.

Висновки

1. Інтенсивність процесів кардіального ремоделювання у хворих на ІХС і супутній залізодефіцит зростає

прямо пропорційно ступеню прогресування сидеропенії. Це підтверджено збільшенням об'ємних і лінійних показників серця та вираженості гіпертрофії ЛШ порівняно з хворими без супутнього залізодефіциту.

2. У хворих на ІХС і ЗДА виявили зв'язок усіх ферокінетичних показників (СЗ, рівня феритину, ЗЗС, латентної ЗЗС) зі структурно-функціональними параметрами серця, а при абсолютному латентному залізодефіциті провідну роль у цих асоціаціях відіграють рівень феритину та насичення трансферину залізом. У разі функціонального латентного залізодефіциту не визначили кореляції між показниками обміну заліза та кардіального ремоделювання.

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

Фінансування

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

Конфлікт інтересів:

відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 31.01.2023

Після доопрацювання / Revised: 20.02.2023

Прийнято до друку / Accepted: 14.03.2023

Відомості про авторів:

Коновалова М. О., PhD аспірант каф. загальної практики – сімейної медицини та внутрішніх хвороб, Запорізький державний медичний 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 медичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0001-6781-9406

Information about authors:

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

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

References

[1] Sirenko, Yu. M. (2022). Stan problemy sertsevo-sudynnoi zakhvoriuvanosti ta smertnosti v Ukraini [The state of the problem of cardiovascular morbidity and mortality in Ukraine]. *Liky Ukrainy*, (2), 11-14. [in Ukrainian]. [https://doi.org/10.37987/1997-9894.2022.2\(258\).264084](https://doi.org/10.37987/1997-9894.2022.2(258).264084)

[2] Kotseva, K., De Backer, G., De Bacquer, D., Rydén, L., Hoes, A., Grobbee, D., Maggioni, A., Marques-Vidal, P., Jennings, C., Abreu, A., Aguiar, C., Badierne, J., Bruthans, J., Cifkova, R., Davletov, K., Dilic, M., Dolzhenko, M., Gaita, D., Gotcheva, N., Hasan-Ali, H., ... EUROASPIRE V Investigators (2021). Primary prevention efforts are poorly developed in people at high cardiovascular risk: A report from the European Society of Cardiology EUROASPIRE V Observational Research Programme EUROASPIRE V survey in 16 European countries. *European journal of preventive cardiology*, 28(4), 370-379. <https://doi.org/10.1177/2047487320908698>

[3] Gupta, P. M., Hammer, H. C., Suchdev, P. S., Flores-Ayala, R., & Mei, Z. (2017). Iron status of toddlers, nonpregnant females, and pregnant females in the United States. *The American journal of*

clinical nutrition, 106(Suppl 6), 1640S-1646S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155978>

[4] Koval, O. A. (2020). Diahnostyka ta korektsiia zalizodefitsytnykh staniv u patsientiv iz sertsevo-sudynnyimi zakhvoriuvanniami [Diagnosis and correction of iron deficiency conditions in patients with cardiovascular diseases]. *Zdorovia Ukrainy*, (4), 44-45. [in Ukrainian].

[5] Schrage, B., Rübsem, N., Ojeda, F. M., Thorand, B., Peters, A., Koenig, W., Söderberg, S., Söderberg, M., Mathiesen, E. B., Njølstad, I., Kee, F., Linneberg, A., Kuulasmaa, K., Tarja, P., Salomaa, V., Blankenberg, S., Zeller, T., & Karakas, M. (2021). Association of iron deficiency with incident cardiovascular diseases and mortality in the general population. *ESC heart failure*, 8(6), 4584-4592. <https://doi.org/10.1002/ehf2.13589>

[6] Kondratiuk, V. K., & Kondratiuk, K. O. (2021). Zalizodefitsytni stany kriz pryzmu dokazovoi medytsyny [Iron deficiency states through the prism of evidence-based medicine]. *Zdorovia Ukrainy* 21 storichchia, (9), 12-13. [in Ukrainian].

[7] Tsyhanenko, I. V., Ovcharenko, L. K., & Zaiats, Yu. B. (2022). Anemiia, yak faktor sertsevo-sudynnoho ryzyku na prykladi patsientiv z khronichnoiu sertsevoiu nedostatnistiu [Anemia as a Cardiovascular Risk Factor in Patients with Chronic Heart Failure]. *Ukrainskyi zhurnal medytsyny, biolohii ta sportu*, (3), 200-205. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.26693/jmbs07.03.200>

[8] 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>

[9] Ministry of Health of Ukraine. (2015, November 2). Unifikovanyi klinichniy protokol pervynnoi ta vtornyoi (spetsializovanoi) medychnoi dopomohy. Zalizodefitsytna anemiia. Nakaz Ministerstva okhorony zdorovia Ukrainy vid 02.11.2020 № 709. [Unified clinical protocol for primary, secondary (specialized) care: iron deficiency anemia (No. 709)]. <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0709282-15#Text>

[10] Weiss, G., Ganz, T., & Goodnough, L. T. (2019). Anemia of inflammation. *Blood*, 133(1), 40-50. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-856500>

[11] Auerbach, M., & Spivak, J. (2019). Treatment of Iron Deficiency in the Elderly: A New Paradigm. *Clinics in geriatric medicine*, 35(3), 307-317. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.03.003>

[12] Tatarchuk, T. F. (2020). "Masky" latentnoho zalizodefitsytu: syndrom khronichnoi vtomy ta retsydyvuiuchi infektsii statevykh shliakhiv ["Masks" of latent iron deficiency: chronic fatigue syndrome and recurrent infections of the genital tract]. *Akusherstvo, Hinekologhiia, Reproduktsiia*, (5), 11. [in Ukrainian].

[13] Ruhe, J., Waldeyer, C., Ojeda, F., Altay, A., Schnabel, R. B., Schäfer, S., Lackner, K. J., Blankenberg, S., Zeller, T., & Karakas, M. (2018). Intrinsic Iron Release Is Associated with Lower Mortality in Patients with Stable Coronary Artery Disease-First Report on the Prospective Relevance of Intrinsic Iron Release. *Biomolecules*, 8(3), 72. <https://doi.org/10.3390/biom8030072>

[14] Zeller, T., Waldeyer, C., Ojeda, F., Schnabel, R. B., Schäfer, S., Altay, A., Lackner, K. J., Anker, S. D., Westermann, D., Blankenberg, S., & Karakas, M. (2018). Adverse Outcome Prediction of Iron Deficiency in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Biomolecules*, 8(3), 60. <https://doi.org/10.3390/biom8030060>

[15] Alnuwaysir, R. I. S., Hoes, M. F., van Veldhuisen, D. J., van der Meer, P., & Grote Beverborg, N. (2021). Iron Deficiency in Heart Failure: Mechanisms and Pathophysiology. *Journal of clinical medicine*, 11(1), 125. <https://doi.org/10.3390/jcm11010125>

[16] Moliner, P., Enjuanes, C., Tajés, M., Cainzos-Achirica, M., Lupón, J., Garay, A., Jimenez-Marrero, S., Yun, S., Farré, N., Cladellas, M., Díez, C., Gonzalez-Costello, J., & Comin-Colet, J. (2019). Association Between Norepinephrine Levels and Abnormal Iron Status in Patients With Chronic Heart Failure: Is Iron Deficiency More Than a Comorbidity?. *Journal of the American Heart Association*, 8(4), e010887. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.010887>

[17] Núñez, J., Miñana, G., Cardells, I., Palau, P., Làcer, P., Fàcila, L., Almenar, L., López-Lereu, M. P., Monmeneu, J. V., Amiguet, M., González, J., Serrano, A., Montagud, V., López-Vilella, R., Valero, E., García-Blas, S., Bodí, V., de la Espriella-Juan, R., Lupón, J., Navarro, J., ... Myocardial-IRON Investigators* † (2020). Noninvasive Imaging Estimation of Myocardial Iron Repletion Following Administration of Intravenous Iron: The Myocardial-IRON Trial. *Journal of the American Heart Association*, 9(4), e014254. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.014254>

[18] Ambrosy, A. P., Gurwitz, J. H., Tabada, G. H., Arz, A., Schrier, S., Rao, S. V., Barnhart, H. X., Reynolds, K., Smith, D. H., Peterson, P. N., Sung, S. H., Cohen, H. J., Go, A. S., & RBC HEART Investigators (2019). Incident anaemia in older adults with heart failure: rate, aetiology, and association with outcomes. *European heart journal*. Quality of care & clinical outcomes, 5(4), 361-369. <https://doi.org/10.1093/ehjqcco/qcz010>

- [19] Alnuwaysir, R. I. S., Hoes, M. F., van Veldhuisen, D. J., van der Meer, P., & Grote Beverborg, N. (2021). Iron Deficiency in Heart Failure: Mechanisms and Pathophysiology. *Journal of clinical medicine*, 11(1), 125. <https://doi.org/10.3390/jcm11010125>
- [20] Núñez, J., Miñana, G., Cardells, I., Palau, P., Llàcer, P., Fàcila, L., Almenar, L., López-Lereu, M. P., Monmeneu, J. V., Amiguet, M., González, J., Serrano, A., Montagud, V., López-Vilella, R., Valero, E., García-Blas, S., Bodí, V., de la Espriella-Juan, R., Lupón, J., Navarro, J., ... Myocardial-IRON Investigators* † (2020). Noninvasive Imaging Estimation of Myocardial Iron Repletion Following Administration of Intravenous Iron: The Myocardial-IRON Trial. *Journal of the American Heart Association*, 9(4), e014254. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.014254>
- [21] Sutil-Vega, M., Rizzo, M., & Martínez-Rubio, A. (2019). Anemia and iron deficiency in heart failure: a review of echocardiographic features. *Echocardiography*, 36(3), 585-594. <https://doi.org/10.1111/echo.14271>
- [22] Schwartz, A. J., Converso-Baran, K., Michele, D. E., & Shah, Y. M. (2019). A genetic mouse model of severe iron deficiency anemia reveals tissue-specific transcriptional stress responses and cardiac remodeling. *The Journal of biological chemistry*, 294(41), 14991-15002. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009578>
- [23] Rineau, E., Gaillard, T., Gueguen, N., Procaccio, V., Henrion, D., Prunier, F., & Lasocki, S. (2018). Iron deficiency without anemia is responsible for decreased left ventricular function and reduced mitochondrial complex I activity in a mouse model. *International journal of cardiology*, 266, 206-212. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.02.021>
- [24] Haddad, S., Wang, Y., Galy, B., Korf-Klingebiel, M., Hirsch, V., Baru, A. M., Rostami, F., Rebol, M. R., Heineke, J., Flögel, U., Groos, S., Renner, A., Toischer, K., Zimmermann, F., Engeli, S., Jordan, J., Bauersachs, J., Hentze, M. W., Wollert, K. C., & Kempf, T. (2017). Iron-regulatory proteins secure iron availability in cardiomyocytes to prevent heart failure. *European heart journal*, 38(5), 362-372. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw333>
- [25] Anker, S. D., Kirwan, B. A., van Veldhuisen, D. J., Filippatos, 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/ehfj.823>
- [26] Balendran, S., & Forsyth, C. (2021). Non-anaemic iron deficiency. *Australian prescriber*, 44(6), 193-196. <https://doi.org/10.18773/aust-prescr.2021.052>
- [27] Savarese, G., von Haehling, S., Butler, J., Cleland, J. G. F., Ponikowski, P., & Anker, S. D. (2023). Iron deficiency and cardiovascular disease. *European heart journal*, 44(1), 14-27. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac569>
- [28] Martens, P. (2022). The Effect of Iron Deficiency on Cardiac Function and Structure in Heart Failure with Reduced Ejection Fraction. *Cardiac failure review*, 8, e06. <https://doi.org/10.15420/cfr.2021.26>
- [29] Xu, H. Y., Yang, Z. G., Li, R., Shi, K., Zhang, Y., Li, Z. L., Xia, C. C., Peng, W. L., Chen, Q. Y., & Guo, Y. K. (2017). Myocardial Iron Deficiency in Hemodialysis-Dependent End-Stage Renal Disease Patients Undergoing Oral Iron Therapy. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(19), 2455-2456. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.09.013>
- [30] Melenovsky, V., Petrak, J., Mracek, T., Benes, J., Borlaug, B. A., Nuskova, H., Pluhacek, T., Spatenka, J., Kovalcikova, J., Drahota, Z., Kautzner, J., Pirk, J., & Houstek, J. (2017). Myocardial iron content and mitochondrial function in human heart failure: a direct tissue analysis. *European journal of heart failure*, 19(4), 522-530. <https://doi.org/10.1002/ehfj.640>
- [31] Kitamura, N., Yokoyama, Y., Taoka, H., Nagano, U., Hosoda, S., Tawornawat, T., Nakamura, A., Ogawa, Y., Tsubota, K., & Watanabe, M. (2021). Iron supplementation regulates the progression of high fat diet induced obesity and hepatic steatosis via mitochondrial signaling pathways. *Scientific reports*, 11(1), 10753. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89673-8>
- [32] Chung, Y. J., Swietach, P., Curtis, M. K., Ball, V., Robbins, P. A., & Lakhall-Littleton, S. (2021). Iron-Deficiency Anemia Results in Transcriptional and Metabolic Remodeling in the Heart Toward a Glycolytic Phenotype. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 7, 616920. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.616920>
- [33] Biegus, J., Zymliński, R., Sokolski, M., Jankowska, E. A., Banasiak, W., & Ponikowski, P. (2019). Elevated lactate in acute heart failure patients with intracellular iron deficiency as identifier of poor outcome. *Kardiologia polska*, 77(3), 347-354. <https://doi.org/10.5603/KP.a2019.0014>
- [34] Petrak, J., Havlenova, T., Krijt, M., Behounek, M., Franekova, J., Cervenka, L., Pluhacek, T., Vyoral, D., & Melenovsky, V. (2019). Myocardial iron homeostasis and hepcidin expression in a rat model of heart failure at different levels of dietary iron intake. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1863(4), 703-713. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.01.010>
- [35] Chen, Y., Wan, J., Xia, H., Li, Y., Xu, Y., Lin, H., & Iftikhar, H. (2020). Total iron binding capacity (TIBC) is a potential biomarker of left ventricular remodeling for patients with iron deficiency anaemia. *BMC cardiovascular disorders*, 20(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12872-019-01320-3>

The clinical and prognostic role of changes in parameters of the hemostasis system and C-reactive protein in the development of thrombotic complications in oxygen-dependent patients with coronavirus disease (COVID-19)

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

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

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

Aim. The purpose of our work was to find out the clinical and prognostic role of changes in hemostasis parameters and C-reactive protein (CRP) in the development of thrombotic complications in oxygen-dependent patients with coronavirus disease (COVID-19).

Materials and methods. 211 oxygen-dependent patients with COVID-19 were examined. To assess the prognostic role of changes in hemostasis parameters and CRP, patients were divided into groups: I group – 94 patients who recovered, II group – 117 patients who died. Subgroups: II-A subgroup – 35 patients with thrombotic complications and II-B subgroup – 82 patients without these complications. All patients were examined and received treatment according to the normative documents in force at the relevant time.

Results. The frequency of thrombotic complications in oxygen-dependent patients with COVID-19 was 16.6 %, among which the most common were pulmonary embolism (6.6 %), myocardial infarction (6.2 %), and ischemic stroke (3.2 %). Lifetime diagnosis of thrombotic complications took place on the 18th [16.0; 24.0] day of illness in 45.9 % of cases. Deathtime diagnosis of thrombotic complications took place on the 24th [20.0; 28.0] day of illness in 54.1 % of cases. Lifetime pulmonary artery thromboembolism was diagnosed less frequently than ischemic stroke ($p = 0.002$) and myocardial infarction ($p = 0.02$).

With the development of oxygen dependence and admission to the intensive care unit on the 9th [8.0; 11.0] day of illness, changes in the hemostasis system were characterized as prothrombotic with an increase above the reference values of fibrinogen and D-dimer in patients of all groups. CRP in patients with fatal outcomes of the disease, regardless of the development of thrombotic complications, was higher ($p < 0.05$) than in patients who subsequently recovered, and was accordingly in patients of the I group – 67.65 [41.20; 139.95] mg/l, in the II-A group – 122.2 [61.2; 178.0] mg/l, and in patients of the II-B group – 109.8 [56.3; 180.0] mg/l.

In the dynamics of complex treatment after 5–7 days, the level of fibrinogen, D-dimer and CRP had a diagnostic value in predicting the further development of thrombotic complications. With an increase in the level of fibrinogen >4.6 g/l (AUC = 0.600, $p = 0.042$), D-dimer >2.1 μ g/ml (AUC = 0.704, $p = 0.001$) and CRP >89.3 mg/l (AUC = 0.720, $p < 0.001$) the probability of developing thrombotic complications was significant.

Conclusions. In dynamics of complex treatment of oxygen-dependent patients after 5–7 days, the levels of fibrinogen, D-dimer and C-reactive protein had consistent diagnostic value in predicting further development of thrombotic complications. Increased fibrinogen >4.6 g/l, D-dimer >2.1 μ g/ml, and CRP >89.3 mg/l were important for predicting the risk of developing thrombotic complications.

Key words:

COVID-19, viral infection, thrombotic complications, diagnosis, hemostasis, C-reactive protein, risk factors, prognosis.

Pathologia

2023; 20 (1), 27-35

*E-mail:

ryabokonksmu@ukr.net

Клініко-прогностична роль змін параметрів системи гемостазу та С-реактивного протеїну в розвитку тромботичних ускладнень у кисневозалежних хворих на коронавірусну хворобу (COVID-19)

В. В. Черкаський, О. В. Рябоконт, Ю. Ю. Рябоконт

Мета роботи – з'ясувати клініко-прогностичну роль змін параметрів гемостазу та С-реактивного протеїну (СРП) в розвитку тромботичних ускладнень у кисневозалежних хворих на коронавірусну хворобу (COVID-19).

Матеріали та методи. Обстежено 211 кисневозалежних хворих на COVID-19. Для оцінювання прогностичної ролі змін параметрів гемостазу та СРП пацієнтів поділили на групи: I – 94 хворих, які одужали; II – 117 осіб, які померли. Підгрупи пацієнтів: II-A – 35 хворих із тромботичними ускладненнями; II-B підгрупа – 82 особи без таких ускладнень. Усіх хворих обстежили, призначили лікування згідно з чинними на той час нормативними документами.

Результати. Частота виникнення тромботичних ускладнень у кисневозалежних хворих на COVID-19 становила 16,6 %. Найчастіші з-поміж них – тромбоемболія легеневої артерії (6,6 %), інфаркт міокарда (6,2 %), ішемічний інсульт (3,2 %). Прижиттєва діагностика тромботичних ускладнень відбулася на 18 [16,0; 24,0] день хвороби в 45,9 % випадків. По-смертна діагностика тромботичних ускладнень – на 24,0 [20,0; 28,0] день хвороби в 54,1 % випадків. Тромбоемболію легеневої артерії прижиттєво діагностували рідше, ніж ішемічний інсульт ($p = 0,002$) та інфаркт міокарда ($p = 0,02$).

Ключові слова:

COVID-19, вірусна інфекція, тромботичні ускладнення, діагностика, гемостаз, С-реактивний протеїн, фактори ризику, прогноз.

Патологія. 2023.

Т. 20, № 1(57).
С. 27-35

У разі виникнення кисневої залежності та надходження до реанімаційного відділення на 9,0 [8,0; 11,0] добу хвороби зміни в системі гемостазу характеризувалися як протромботичні з перевищенням референтних значень фібриногену та D-димеру в пацієнтів усіх груп. СРП у хворих із летальним наслідком хвороби незалежно від виникнення тромботичних ускладнень був вищим ($p < 0,05$), ніж у хворих, які надалі одужали, та становив у хворих I групи 67,65 [41,20; 139,95] мг/л, II-A групи – 122,2 [61,2; 178,0] мг/л, II-B групи – 109,8 [56,3; 180,0] мг/л.

У динаміці комплексного лікування через 5–7 діб діагностичне значення щодо прогнозування наступного виникнення тромботичних ускладнень мали рівень фібриногену, D-димеру та СРП. При підвищенні рівня фібриногену $>4,6$ г/л (AUC = 0,600, $p = 0,042$), D-димеру $>2,1$ мкг/мл (AUC = 0,704, $p = 0,001$) та СРП $>89,3$ мг/л (AUC = 0,720, $p < 0,001$) імовірність виникнення тромботичних ускладнень значуща.

Висновки. У динаміці комплексного лікування кисневозалежних хворих через 5–7 діб діагностичне значення щодо прогнозування наступного виникнення тромботичних ускладнень мають рівень фібриногену, D-димеру та С-реактивного протеїну. Для прогнозування ризику виникнення тромботичних ускладнень мають значення підвищення фібриногену $>4,6$ г/л, D-димеру $>2,1$ мкг/мл та СРП $>89,3$ мг/л.

The new coronavirus disease (COVID-19), which started its journey in December 2019 from the Chinese province of Wuhan, turned into a pandemic in a fairly short period of time and created an irrevocable challenge to the global health care system [1]. Despite the polymorphism of clinical manifestations, the calling card of COVID-19 there were rapidly progressive lesions of the lungs, which led to the development of acute respiratory distress syndrome, severe respiratory insufficiency and high mortality [2,3]. The SARS-CoV-2 virus, due to its binding to the receptor of angiotensin-converting enzyme type 2, penetrates into the goblet cells of the nasal mucosa and alveolar pneumocytes of type II, where it replicates [3,4]. It is believed that excessive inflammatory response that arises as a result of this is the main reason for the complicated course and the fatal outcome of COVID-19 [5,6]. An excessive inflammatory response during the progression of the disease is accompanied by a significant increase in C-reactive protein (CRP) level, which is a known marker of systemic inflammation. Already at the beginning of the study of this new disease, it was found that the level of CRP can exceed the upper limits of the norm by more than ten times and correlates with severity of the course of COVID-19 and the frequency of fatal consequences [7–9].

Today, the elucidation of the pathogenetic mechanisms of the progression of the new coronavirus disease continues, while attention is paid to the interrelationships of immunoinflammatory reactions with changes in the hemostasis system, which is the basis of the formation of acute respiratory distress syndrome, multiple organ insufficiency, and fatal thrombotic complications. It is believed that a cascade of complex interrelated inflammatory reactions occurs through the activation of complement, the release of cytokines, which leads to the development of endothelial dysfunction, thrombotic microangiopathy, and pathological angiogenesis [10–12]. The currently known model of the pathogenesis of this infection is being refined and supplemented. In particular, the role of certain signs of antiphospholipid syndrome and disseminated intravascular coagulation syndrome is discussed [12–14].

As the main clinical manifestations of this disease were studied, it became obvious that a unique tendency to thrombus formation without further development of the processes of generalized fibrinolysis is typical for its complicated course [15–17]. Literature data show significant discrepancies in the frequency of diagnosis of thrombotic

complications in patients with the new coronavirus disease, even when taking into account the severity of the course. Thus, among patients with COVID-19 of light and medium severity, venous thrombotic events are registered with a frequency from 0.09 % to 8.00 %. Among intensive care unit patients, the frequency of thrombotic events are increasing, but the frequency of their diagnosis ranges from 24 % to 85 % [18–20] even despite anticoagulant therapy [10,21].

If according to most researchers, the spectrum of thrombotic complications of COVID-19 includes pulmonary embolism and deep vein thrombosis of the lower extremities as dominant [22,23], then statistical data on the frequency of ischemic strokes and arterial thrombosis vary from 0.9 % to 5.6 % [24,25]. During research of the pathogenetic mechanisms of the development of thrombosis in COVID-19, the attention of researchers is drawn to the abnormality of changes in the hemostasis system at the progression of this disease. Changes in the hemostasis system are characterized by high levels of D-dimer, fibrinogen and fibrin breakdown products, longer prothrombin time and activated partial thromboplastin time, the development of thrombocytosis or thrombocytopenia [26–28].

In April 2020, the International Society of Thrombosis and Hemostasis (ISTH) published interim guidelines for the diagnosis and treatment of COVID-19-associated coagulopathy [29]. This document focused on the strong association between D-dimer levels >2.0 $\mu\text{g/ml}$ and hospital mortality [29]. In fact, according to literary sources, high values fibrinogen and D-dimer have a direct relationship with a significant risk of developing systemic thrombosis and death [30–32]. At the same time, the predictors of the development of venous thrombotic complications still remain insufficiently defined. A few researches draw attention to the fact that only in the case of a combined increase of CRP, as a marker of systemic inflammation, and D-dimer, as a product of fibrin degradation, there is a significantly increased risk of developing venous thrombosis [33].

Therefore, significant discrepancies in the frequency of registration of thrombotic complications in patients with COVID-19 and in the spectrum of these events, insufficient clarity of the features of changes in the hemostasis system in relation to the expressiveness of the inflammatory reaction require further research in this direction in order to determine early predictors of the risk of developing thrombotic complications.

Aim

The purpose of our work was to find out the clinical and prognostic role of changes in hemostasis parameters and C-reactive protein in the development of thrombotic complications in oxygen-dependent patients with coronavirus disease (COVID-19).

Materials and methods

The research included 211 oxygen-dependent patients with coronavirus disease (COVID-19), who during 2020–2021 were being treated in the intensive care unit of the Municipal Non-Profit Enterprise “Regional infectious clinical hospital” Zaporizhzhia Regional Council. The diagnosis in all patients was confirmed by the detection of RNA-SARS-CoV-2 by the polymerase chain reaction method. All patients were examined and received treatment according to the normative documents in force at the relevant time [34–36].

To assess the clinical and prognostic role of changes in hemostasis parameters and CRP, patients were divided into groups: I group – 94 patients who recovered, II group – 117 patients whose disease ended fatally. For analyze the characteristics of changes in laboratory indicators, patients of the II group were additionally divided into subgroups: II-A subgroup – 35 patients who developed thrombotic complications and II-B subgroup – 82 patients without thrombotic complications. The presence of comorbid pathology in the stage of decompensation was a criterion for exclusion from the research. During monitoring of patients for the diagnosis of thrombotic complications were carried out comprehensive assessment of clinical data, laboratory indicators of hemostasis (coagulogram, platelets, D-dimer), electrocardiographic examination, consultations of related specialists (neurologist, cardiologist)

Statistical data processing was carried out using the created patient database in the program Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., No. JPB8041382130ARCN10-J). The χ^2 test was used to determine the differences between qualitative features, and the Mann–Whitney test was used between quantitative features. To establish the diagnostic significance of the investigated parameters in predicting outcomes regarding the development of thrombotic complications in oxygen-dependent patients with COVID-19, ROC-analysis was performed with determination of the cut-off point. Spearman's correlation was used to establish relationships between quantitative traits.

Results

Analysis of demographic parameters of oxygen-dependent patients of the investigated groups showed the absence of a statistically significant difference in the median age of patients ($p > 0.05$). Thus, the median age of patients of the I group was 63.0 [56.0; 70.0] years, II-A subgroup – 67.0 [57.0; 79.0] years, II-B subgroup – 67.5 [61.0; 74.0] years old. Patients of the investigated groups also did not statistically differ by gender ($p > 0.05$). Thus, among patients of the I group there were 54 (57.4 %) men, 40 (42.6 %) women; among patients of the II-A

Table 1. Frequency of development and spectrum of thrombotic complications in oxygen-dependent patients with COVID-19 depending on the consequences of the disease, abs. (%)

Group	Patients (n = 211)	Patients	
		I group (n = 94)	II group (n = 117)
Presence of thrombotic complications	37 (16.6 %)	2 (2.1 %)	35 (29.9 %)*
Ischemic stroke	7 (3.2 %)	1 (1.1 %)	6 (5.1 %)
Transient ischemic attack	1 (0.5 %)	1 (1.1 %)	–
Thromboembolism of the pulmonary artery	14 (6.6 %)	–	14 (12.0 %)
Myocardial infarction	13 (6.2 %)	–	13 (11.1 %)
Acute coronary syndrome	1 (0.5 %)	–	1 (0.9 %)
Thrombosis of upper extremity veins	2 (0.9 %)	–	2 (1.7 %)
Catheter associated venous thrombosis	1 (0.5 %)	–	1 (0.9 %)
Thrombosis of lower limb arteries	2 (0.9 %)	–	2 (1.7 %)
A combination of several thrombotic complications	3 (1.4 %)	–	3 (2.6 %)

*: the difference is significant, compared to the I group ($p < 0.05$).

subgroup, men – 21 (60.0 %), women – 14 (40.0 %); among patients of II-B subgroup, men – 43 (52.4 %), women – 39 (47.6 %).

At the time of hospitalization of oxygen-dependent patients to the intensive care unit, the median indicator of oxygen saturation in air was 84.5 [80.0; 88.0] %; in patients of II-A subgroup – 78.0 [70.0; 82.0] %; in II-B subgroup patients – 78.0 [74.0; 84.0] %. Statistically significant differences in this parameter were not found when comparing the studied groups of patients at the time of observation ($p > 0.05$). From the moment of hospitalization to the intensive care unit, 12 (12.8 %) patients of the I group, 7 (20.0 %) patients of the II-A subgroup, and 14 (17.1 %) patients of the II-B subgroup needed non-invasive lung ventilation. The other patients were started on oxygen support using a mask with an accumulation bag and a non-reversible valve in a volume of at least 15 L/min. There were no statistically significant differences in the degree of severity of acute respiratory deficiencies and the need for non-invasive lung ventilation at the start of the observation ($p > 0.05$).

According to the results of the research, it was established that among oxygen-dependent patients, 16.6 % (37 out of 211) were diagnosed with thrombotic complications, among which the most frequent were thromboembolism of the pulmonary artery (6.6 %), myocardial infarction (6.2 %) and ischemic stroke (3.2 %), while a combination of two thrombotic complications was recorded in 3 (1.4 %) cases. Thrombotic complications were significantly more often registered in patients of the II group, in whom the disease ended fatally, compared to patients of the I group, who recovered (29.9 % vs. 2.1 %, respectively, $\chi^2 = 27.83$, $p < 0.0001$). It should be noted that the development of ischemic stroke and transient ischemic attack was diagnosed only in isolated cases among patients of the I group (Table 1).

Thrombotic complications in 54.1 % (20 out of 37) of patients were diagnosed only on the basis of pathological examinations with a fatal outcome of COVID-19 at 24.0 [20.0; 28.0] day of illness. Lifetime diagnosis of thrombotic complications occurred in 45.9 % (17 out of 37) of patients at 18 [16.0; 24.0] day of illness. Arterial and venous thrombosis of the extremities in all cases was diagnosed with the development of venous thromboembolism during lifetime.

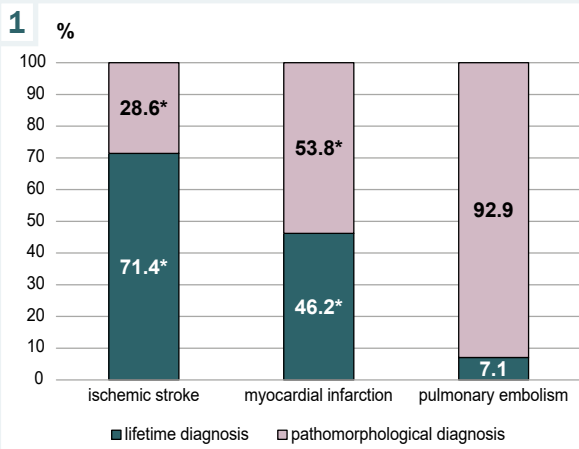
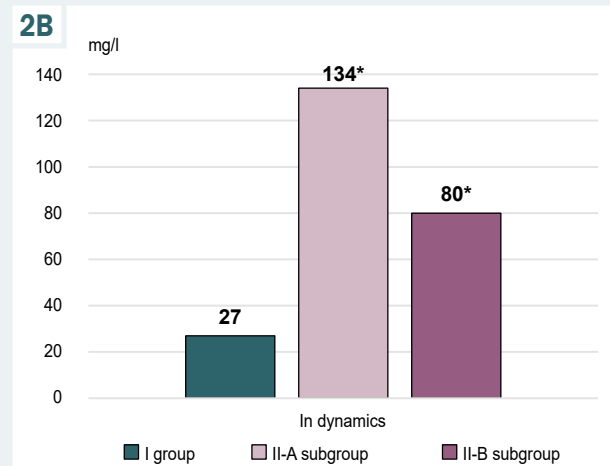
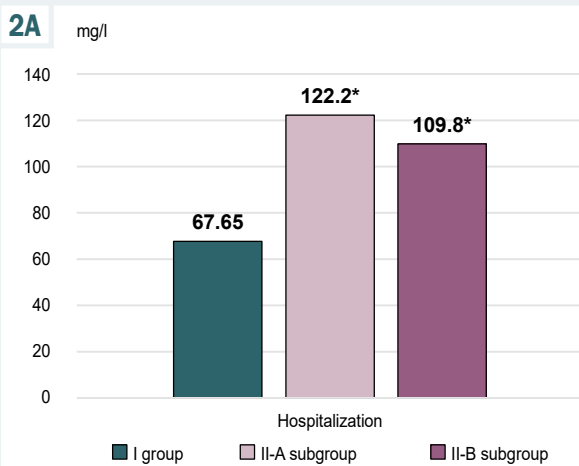


Fig. 1. Comparison of the frequency of intravital and pathological diagnosis of the main thrombotic complications of COVID-19.

*: the difference is significant, compared to the development of pulmonary embolism ($p < 0.05$).

Fig. 2. Comparison of CRP content in patients with COVID-19 depending on the development of thrombotic complications and consequences of the disease during hospitalization (A) and in dynamics after 5–7 days (B).

*: the difference is significant, compared to the I group ($p < 0.05$).



Ischemic stroke in the vast majority of patients (71.4 %) and myocardial infarction in almost half of patients (46.2 %) were also diagnosed during lifetime. However, pulmonary embolism, conversely, was diagnosed during lifetime only in isolated cases (7.1 %). Comparison of the frequency of intravital diagnosis of fatal thrombotic complications showed that pulmonary embolism was diagnosed intravitaly statistically significantly less often than ischemic stroke ($\chi^2 = 9.45$, $p = 0.002$) and myocardial infarction ($\chi^2 = 5.34$, $p = 0.02$) (Fig. 1).

Analysis of hemostasis parameters at the time of admission to the intensive care unit at 9.0 [8.0; 11.0] day of illness showed that in patients of all investigated groups, changes in hemostasis parameters indicated the development of a prothrombotic state. This was confirmed by an increase in the average prothrombin index (PTI), the level of fibrinogen and D-dimer above the reference values. In the vast majority of patients of all observe groups, the fibrinogen content exceeded upper limits of the norm, namely in 77.7 % of patients of I group, 77.1 % of patients of II-A subgroup and 82.9 % of patients of II-B subgroup. The frequency of increasing the level of D-dimer was similar, namely in 70.2 %, 88.9 % and 95.5 % of patients in the respective groups. At the same time, it should be noted that the level of D-dimer increase was statistically significantly higher in patients with a fatal outcome of the disease of both observe subgroups, compared to patients

of the I group ($p < 0.05$). It is worth noting that the median level of the international normalized ratio (INR) in patients of all studied groups was within the reference values. The analysis of the platelet link of hemostasis showed that 29.9 % (63 out of 211) of patients had deviations in level of platelets from normal values, but these changes were multidirectional in nature. Thrombocytopenia was most often registered and the frequency of it did not differ statistically ($p > 0.05$) in the studied groups of patients and amounted to 21.3 %, 14.3 % and 31.7 %, respectively, at the time of hospitalization in the intensive care unit. Thrombocytosis was recorded only in individual patients of all studied groups (Table 2).

At the time of hospitalization of patients with COVID-19, the presence of a pronounced inflammatory reaction was confirmed by a high level of CRP in the blood of patients of all investigated groups, the level of which was 67.65 [41.20; 139.95] mg/l in patients of the I group, II-A subgroup – 122.2 [61.2; 178.0] mg/l and in II-B subgroup – 109.8 [56.3; 180.0] mg/l. Comparative analysis showed that the level of CRP in patients with a fatal outcome of both II-A subgroup ($p = 0.027$) and II-B subgroup ($p = 0.029$) was higher than in patients of I group who recovered (Fig. 2A).

The conducted ROC analysis did not establish the cut-off level of the investigated parameters of hemostasis such as fibrinogen (AUC = 0.530, $p = 0.578$), D-dimer

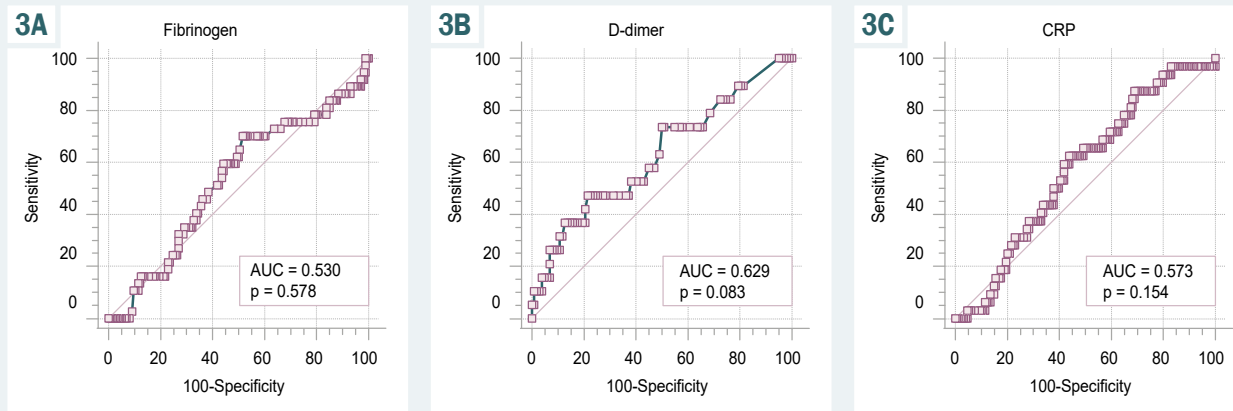


Fig. 3. Prediction of the probability of developing thrombotic complications in oxygen-dependent patients with COVID-19 based on the level of increased fibrinogen (A), D-dimer (B) and CRP (C) at the time of hospitalization.

(AUC = 0.629, $p = 0.083$) and CRP (AUC = 0.573, $p = 0.154$) in order to identify their prognostic value of the development of thrombotic complications at the time of the appearance of oxygen dependence and, accordingly, the admission of patients to the intensive care unit ($p > 0.05$) (Fig. 3).

Comparison of hemostasis parameters in patients with COVID-19 in dynamics after 5–7 days of treatment, which was carried out according to the protocol and included the mandatory use of low-molecular-weight heparins, showed that the median level of fibrinogen remained above the upper limit of the reference value in patients of all investigated groups. In particular, the tendency towards a higher frequency of detection of hyperfibrinogenemia in patients of the II-A subgroup, compared to patients of the I group (68.6 % vs. 54.3 %, respectively, $p > 0.05$) and a significantly higher frequency of hyperfibrinogenemia in patients II-A subgroup, compared with II-B subgroup patients (68.6 % vs. 9.8 %, respectively, $\chi^2 = 42.71$, $p = 0.0001$). The level of the median D-dimer also remained above the upper limit of the reference value against the background of treatment in patients of all investigated groups, while the median D-dimer of patients of both II-A subgroup and II-B subgroup was statistically significantly higher than in I group patients who recovered ($p < 0.05$). In addition, the frequency of increased levels of D-dimer in patients of II-A subgroup (100 % vs. 70.3 %, respectively, $\chi^2 = 6.69$, $p = 0.009$) and II-B subgroup (96.4 % vs. 70.3 %, respectively, $\chi^2 = 7.24$, $p = 0.007$) turned out to be the highest and significantly exceeded the corresponding indicator of patients of the I group (Table 3).

A comparison of the CRP content in blood of patients with COVID-19 after 5–7 days of treatment, depending on the development of thrombotic complications and the consequences of the disease, showed that its highest level remained precisely in patients of II-A subgroup, which developed fatal thrombotic complications and was 134.0 [52.2; 247.9] mg/l. In patients of II-B subgroup, the content of CRP in the blood had a clear tendency to a lower level of increase than in patients of II-A group and amounted to 80.0 [30.5; 172.2] mg/l. The lowest level of CRP is 27.00 [9.80; 59.00] mg/l was recorded in I group patients who

recovered. In group I patients, the CRP content during this period of observation was statistically significantly lower, compared to patients of group II-A ($p = 0.0001$) and compared to patients of group II-B ($p = 0.0001$) (Fig. 2B).

Interrelationship of inflammation parameters according to the level of CRP and indicators of hemostasis confirmed the established direct correlative relationships between the level of CRP and D-dimer ($r = 0.40$, $p < 0.05$) and fibrinogen ($r = 0.38$, $p < 0.05$).

In the dynamics after 5–7 days of the treatment, according to the ROC analysis, the results regarding the clarification of the role of such indicators as the level of fibrinogen, D-dimer and CRP turned out to be statistically significant.

According to the obtained result of the ROC analysis, the cut-off level of fibrinogen, which indicated a high probability of fatal thrombosis in oxygen-dependent patients with COVID-19, was 4.6 g/l (AUC = 0.600, $p = 0.042$) (sensitivity – 62.16 %, specificity – 57.65 %) (Fig. 4).

Limit level of D-dimer, which indicated a high probability of developing thrombotic complications due to COVID-19, was 2.1 $\mu\text{g/ml}$ (AUC = 0.704, $p = 0.001$) (sensitivity – 83.33 %, specificity – 53.97 %) ($p = 0.001$) (Fig. 5).

The threshold level of CRP, which indicated a high probability of developing thrombotic complications due to COVID-19, was 89.3 mg/l (AUC = 0.720, $p < 0.001$) (sensitivity – 69.23 %, specificity – 71.43 %) (Fig. 6).

Discussion

According to the data of various research [18–20], the frequency of detected venous thrombosis among oxygen-dependent patients who were treated in intensive care units varied in a fairly wide range from 24 % to 85 %. According to the results of our research, the frequency of thrombotic complications in oxygen-dependent patients was 16.6 % at the same time, the development of pulmonary embolism (7.1 %), myocardial infarction (6.2 %) and ischemic stroke (3.2 %) was most often recorded. It should be noted that arterial and catheter-associated thrombosis were diagnosed during lifetime in all cases, ischemic stroke – in most patients (71.4 %). It was the identified clear clinical symptoms that allowed us to establish the development of

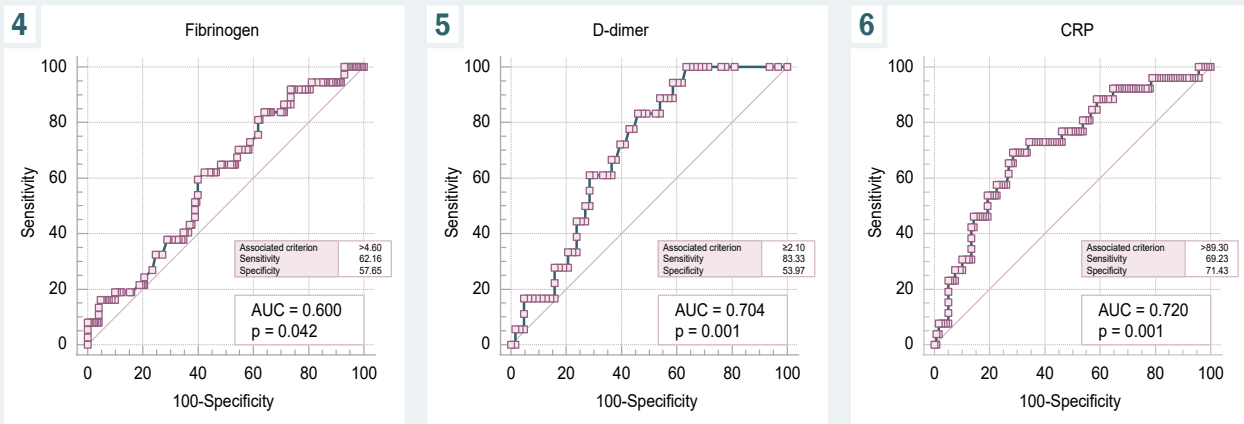


Fig. 4. Prediction of the probability of developing thrombotic complications in oxygen-dependent patients with COVID-19 by the level of increased fibrinogen.

Fig. 5. Prediction of the probability of developing thrombotic complications in oxygen-dependent patients with COVID-19 based on the level of D-dimer elevation.

Fig. 6. Prediction of the probability of the development of fatal thrombotic complications in oxygen-dependent patients with COVID-19 according to the level of CRP increase.

Table 3. Parameters of hemostasis and CRP in oxygen-dependent patients with COVID-19 depending on the development of thrombotic complications and consequences of the disease in dynamics after 5–7 days against the background of treatment

Indicator, units of measurement	Reference values	I group (n = 94)	II group (n = 117)	
			II-A subgroup (n = 35)	II-B subgroup (n = 82)
PTI, %	80–100	102.0 [90.0; 115.5]	88.6 [64.5; 102.0]*	84.7 [64.8; 99.0]*
INR	0.80–1.24	0.98 [0.90; 1.06]	1.08 [0.98; 1.33]	1.14 [1.00; 1.41]
Fibrinogen, g/l	2–4	4.15 [3.29; 5.10]	4.86 [3.90; 5.80]	5.00 [2.94; 6.06]
Fibrinogen increase, abs (%)	–	51 (54.3 %)	24 (68.6 %)	8 (9.8 %)**
Platelets, ×10 ⁹ /l	180–390	283.0 [218.0; 345.0]	239.0 [159.0; 315.0]	189.5 [136.0; 273.5]
Thrombocytosis, abs (%)	–	19 (20.2 %)	4 (11.4 %)	7 (8.5 %)*
Thrombocytopenia, abs (%)	–	5 (5.3 %)	10 (28.6 %)*	38 (46.3 %)*
D-dimer, µg/ml	<0.1	1.01 [0.50; 2.03]	6.80 [3.68; 23.30]*	12.00 [4.15; 21.90]*
Increase in D-dimer, abs (%)	–	70.3 % (26 of 37)	100 % (18 of 18)*	96.4 % (27 of 28)*

*: the difference is significant compared to patients of the I group (p < 0.05); **: compared with II-A subgroup patients (p < 0.05).

these thrombotic complications during lifetime. Less than half of the patients managed to diagnose a myocardial infarction during lifetime (46.2 %), at the same time, the basis of the diagnosis was the detection of changes on the electrocardiogram in combination with an increase in the level of troponin.

In contrast to the above, pulmonary embolism was suspected during lifetime in only one patient, and in 92.9 % of cases this diagnosis was established only on the basis of pathomorphological examination of the lungs of the deceased. In our previous publication [37], we analyzed the results of pathomorphological examinations of 41 deceased persons and also demonstrated that thrombotic complications were detected in 22.0 % of deceased persons as a result of COVID-19, and pulmonary embolism occurred in every third deceased person in the absence of its diagnosis during lifetime in any case.

The results obtained in our research to a certain extent coincide with the data of the literature, and the discrepancies in the frequency of lifetime diagnosis of pulmonary embolism have an explanation. On the one hand, it is known that rapidly progressing acute respiratory distress syndrome and thromboembolism of the pulmonary artery have a certain similarity in clinical symptoms, which in the conditions of a severe and critical course of COVID-19

most often prompts the doctor to intensively treat acute respiratory distress syndrome, and the diagnosis of probable pulmonary embolism artery on the background of severe acute respiratory distress syndrome is not considered accordingly. On the other hand, the absence in the vast majority of cases of the possibility of conducting computed tomography of the lungs in oxygen-dependent patients treated in intensive care units led to the fact that the only reliable tool for in situ diagnosis of pulmonary thrombotic lesions was not used [31,38,39]. Precisely because of these and other similar moments, the question of the impact of thrombotic complications on the overall mortality rate and on the progression of disorders of the external respiratory system among patients with COVID-19 still remains open and continues to be studied [39,40].

A number of researchers believe that one of the ways to increase the effectiveness of lifetime diagnosis of thrombotic complications can be ultrasound screening of the venous system of the extremities of patients with a severe course of COVID-19 [41,42]. The hypothesis proposed by researchers [32] regarding the stage course of COVID-19-associated coagulopathy indicates that there are no thromboembolic complications at the initial stage of its development. With systemic activation of the processes of thrombus formation, which is clearly evidenced by a

rapid increase in the level of D-dimer, signs of deep vein thrombosis of the extremities can already be detected, but only with the help of ultrasound examination, since these thrombotic complications are asymptomatic in the vast majority of patients [41–43]. The above is confirmed by the results of a research in which, during a full autopsy with the use of postmortem computed tomography, deep vein thrombosis was detected in 58 % of the deceased, in whom there was no suspicion of the development of venous thromboembolism during lifetime [44].

Significant discrepancies in literature data regarding the frequency of thrombotic complications in patients with COVID-19 can also be explained by the polymorphism of genetic factors that have an impact on the features of the immune response to SARS-CoV-2 antigens, which determines the features of the course of the disease, in particular, the risk of developing coagulopathy and related thrombotic complications [45,46].

Abnormal changes in the hemostasis system during COVID-19 in patients with a critical course reach their maximum expression and are able to persist for a long time, despite anticoagulant therapy [21]. Already at the initial stages of studying the pathogenetic mechanisms of the progression of COVID-19, attention was paid to the increase in the level of D-dimer in the blood of patients. At the same time, in clinically significant cases, this indicator was increased in patients at the time of hospitalization and subsequently, during the first five days of treatment, it continued to increase, reaching its maximum [47]. According to the results of many research, precisely the level of D-dimer in blood that is one of the informative prognostic indicators regarding the risk of an adverse outcome of the disease. Among patients with a critical course of COVID-19, level of D-dimer is significantly higher, compared to patients with a medium and light degree of severity, and a high level of this indicator is closely related to the development of thrombotic complications and hospital mortality [36,37,39].

According to the results of our research, on the day of admission of oxygen-dependent patients to the intensive care unit by the 9th [8.0; 11.0] day of the illness, the analysis of hemostasis parameters revealed development of a prothrombotic state in them. The medians of such parameters as PTI, fibrinogen and D-dimer were higher than the reference values. At the same time, the level of increase in D-dimer was statistically significantly higher in patients with subsequent development of a fatal outcome of the disease ($p < 0.05$). Our results correspond to the interim recommendations of the International Society of Thrombosis and Hemostasis (ISTH) regarding the recognition and treatment of COVID-19-associated coagulopathy, according to which D-dimer level $>2.0 \mu\text{g/ml}$ is a marker of significantly higher hospital mortality [35]. The median of this indicator, among the patients examined by us who later died due to thrombotic complications, was $2.25 [1.20; 8.40] \mu\text{g/ml}$. According to the results of our research, more pronounced laboratory signs of a prothrombotic state were combined with a higher level of CRP increase in patients with a fatal outcome of the disease ($p < 0.05$) than in patients who subsequently recovered. When observing the dynamics after 5–7 days in patients with the subsequent development of

fatal thrombotic complications, the detected disorders worsened, despite the treatment. It was during these observation periods that we managed to establish the threshold levels of fibrinogen $>4.6 \text{ g/l}$ (AUC = 0.600, $p = 0.042$), D-dimer $>2.1 \mu\text{g/ml}$ (AUC = 0.704, $p = 0.001$) and CRP $>89.3 \text{ mg/l}$ (AUC = 0.720, $p < 0.001$), which have diagnostic value in predicting further development of thrombotic complications.

Data from the literature indicate that the excessive inflammatory response that occurs as a result of infection with the SARS-CoV-2 virus is the main cause of the complicated course of the disease and death [5,6,8]. A severe course of COVID-19 is accompanied by an increase more than ten times the level of CRP already in the early stages of the disease. A high level of CRP correlates with the severity of the disease and the risk of death [7–9]. And the risk of developing venous thromboembolic complications among patients with a critical course of the disease is the highest in the case of a combined increase in the levels of CRP and D-dimer [7].

Conclusions

1. The frequency of developing thrombotic complications in oxygen-dependent patients with COVID-19 is 16.6 %, among which the most common are pulmonary embolism (6.6 %), myocardial infarction (6.2 %), ischemic stroke (3.2 %) and in some cases a combination of thrombotic complications (1.4 %). Thrombotic complications are more often registered in oxygen-dependent patients with a fatal outcome of the disease, compared to patients who recovered (29.9 % vs. 2.1 %, respectively, $p < 0.0001$).

2. Lifetime diagnosis of thrombotic complications in oxygen-dependent patients with COVID-19 occurs in 45.9 % of patients on the 18th [16.0; 24.0] day of the illness. Thromboembolism of the pulmonary artery is less often diagnosed during lifetime than ischemic stroke (7.1 % vs. 71.4 %, respectively, $p = 0.002$) and myocardial infarction (7.1 % vs. 46.2 %, respectively, $p = 0.02$).

3. With the development of oxygen-dependence and admission to the intensive care unit on the 9th [8.0; 11.0] day of the illness, changes in the hemostasis system are characterized as prothrombotic with increased levels of fibrinogen and D-dimer in patients of all investigated groups, regardless of the risk of further development of thrombotic complications. C-reactive protein in patients with a subsequent fatal outcome of the disease, regardless of the development of thrombotic complications, is higher ($p < 0.05$) than in patients who subsequently recover.

4. In dynamics of complex treatment of oxygen-dependent patients after 5–7 days, the level of fibrinogen, D-dimer and C-reactive protein have a diagnostic value in predicting the further development of thrombotic complications. When the level of fibrinogen increases $>4.6 \text{ g/l}$ (AUC = 0.600, $p = 0.042$), D-dimer $>2.1 \mu\text{g/ml}$ (AUC = 0.704, $p = 0.001$) and C-reactive protein $>89.3 \text{ mg/l}$ (AUC = 0.720, $p < 0.001$), the probability of developing thrombotic complications is significant.

Prospects for further research. In our opinion, a promising direction of research is to find out the risk of developing thrombotic complications depending on the presence of various comorbid pathologies.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 06.02.2023

Після доопрацювання / Revised: 03.03.2023

Прийнято до друку / Accepted: 13.03.2023

Information about authors:

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

ORCID ID: 0000-0003-2959-8803

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

ORCID ID: 0000-0002-7394-4649

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

ORCID ID: 0000-0002-2273-8511

Відомості про авторів:

Черкаський В. В., асистент каф. інфекційних хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Рябоконе О. В., д-р мед. наук, професор, зав. каф. інфекційних хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.



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

References

- Muralidar, S., Ambi, S. V., Sekaran, S., & Krishnan, U. M. (2020). The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. *Biochimie*, 179, 85-100. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.09.018>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 395(10223), 497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Synowiec, A., Szczepański, A., Barreto-Duran, E., Lie, L. K., & Pyc, K. (2021). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): a Systemic Infection. *Clinical microbiology reviews*, 34(2), e00133-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00133-20>
- Zhang, S., Liu, Y., Wang, X., Yang, L., Li, H., Wang, Y., Liu, M., Zhao, X., Xie, Y., Yang, Y., Zhang, S., Fan, Z., Dong, J., Yuan, Z., Ding, Z., Zhang, Y., & Hu, L. (2020). SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19. *Journal of hematology & oncology*, 13(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00954-7>
- Merad, M., & Martin, J. C. (2020). Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nature reviews. Immunology*, 20(6), 355-362. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0331-4>
- Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., Manson, J. J., & HLH Across Speciality Collaboration, UK (2020). COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*, 395(10229), 1033-1034. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)
- Petrilli, C. M., Jones, S. A., Yang, J., Rajagopalan, H., O'Donnell, L., Chernyak, Y., Tobin, K. A., Cerfolio, R. J., Francois, F., & Horwitz, L. I. (2020). Factors associated with hospital admission and critical illness among 5279 people with coronavirus disease 2019 in New York City: prospective cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)*, 369, m1966. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1966>
- 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>
- 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>
- Smadja, D. M., Mentzer, S. J., Fontenay, M., Laffan, M. A., Ackermann, M., Helms, J., Jonigk, D., Chocron, R., Pier, G. B., Gendron, N., Pons, S., Diehl, J. L., Margadant, C., Guerin, C., Huijbers, E. J. M., Philippe, A., Chapuis, N., Nowak-Sliwinska, P., Karagiannidis, C., Sanchez, O., ... Griffioen, A. W. (2021). COVID-19 is a systemic vascular hemopathy: insight for mechanistic and clinical aspects. *Angiogenesis*, 24(4), 755-788. <https://doi.org/10.1007/s10456-021-09805-6>
- Connors, J. M., & Levy, J. H. (2020). COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood*, 135(23), 2033-2040. <https://doi.org/10.1182/blood.2020060000>
- Singhania, N., Bansal, S., Nimmatouri, D. P., Ejaz, A. A., McCullough, P. A., & Singhania, G. (2020). Current Overview on Hypercoagulability in COVID-19. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions*, 20(5), 393-403. <https://doi.org/10.1007/s40256-020-00431-z>
- Levi, M., & Iba, T. (2021). COVID-19 coagulopathy: is it disseminated intravascular coagulation?. *Internal and emergency medicine*, 16(2), 309-312. <https://doi.org/10.1007/s11739-020-02601-y>
- van der Linden, J., Almskog, L., Liliequist, A., Grip, J., Fux, T., Rysz, S., Agren, A., Oldner, A., & Ståhlberg, M. (2020). Thromboembolism, Hypercoagulopathy, and Antiphospholipid Antibodies in Critically Ill Coronavirus Disease 2019 Patients: A Before and After Study of Enhanced Anticoagulation. *Critical care explorations*, 2(12), e0308. <https://doi.org/10.1097/CCE.0000000000000308>
- Becker, R. C. (2020). COVID-19 update: Covid-19-associated coagulopathy. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 50(1), 54-67. <https://doi.org/10.1007/s11239-020-02134-3>
- Colling, M. E., & Kanthi, Y. (2020). COVID-19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms. *Vascular medicine*, 25(5), 471-478. <https://doi.org/10.1177/1358863X20932640>
- Peyvandi, F., Artoni, A., Novembrino, C., Aliberti, S., Panigada, M., Boscarino, M., Gualtierotti, R., Rossi, F., Palla, R., Martinelli, I., Grasselli, G., Blasi, F., & Tripodi, A. (2021). Hemostatic alterations in COVID-19. *Haematologica*, 106(5), 1472-1475. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.262634>
- Ribes, A., Vardon-Boune, F., Mémier, V., Poette, M., Au-Duong, J., Garcia, C., Minville, V., Sié, P., Bura-Rivière, A., Voisin, S., & Payrastre, B. (2020). Thromboembolic events and Covid-19. *Advances in biological regulation*, 77, 100735. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2020.100735>
- Middelorp, S., Coppens, M., van Haaps, T. F., Foppen, M., Vlaar, A. P., Müller, M. C. A., Bouman, C. C. S., Beenen, L. F. M., Kootte, R. S., Heijmans, J., Smits, L. P., Bonta, P. I., & van Es, N. (2020). Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 18(8), 1995-2002. <https://doi.org/10.1111/jth.14888>
- Malas, M. B., Naazie, I. N., Elsayed, N., Mathlouthi, A., Marmor, R., & Clary, B. (2020). Thromboembolism risk of COVID-19 is high and associated with a higher risk of mortality: A systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*, 29, 100639. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100639>
- Lopes, R. D., de Barros E Silva, P. G. M., Furtado, R. H. M., Macedo, A. V. S., Bronhara, B., Damiani, L. P., Barbosa, L. M., de Aveiro Morata, J., Ramacciotti, E., de Aquino Martins, P., de Oliveira, A. L., Nunes, V. S., Ritt, L. E. F., Rocha, A. T., Tramuas, L., Santos, S. V., Diaz, D. R. A., Viana, L. S., Melro, L. M. G., de Alcântara Chaud, M. S., ... ACTION Coalition COVID-19 Brazil IV Investigators (2021). Therapeutic versus prophylactic anticoagulation for patients admitted to hospital with COVID-19 and elevated D-dimer concentration (ACTION): an open-label, multicentre, randomised, controlled trial. *Lancet*, 397(10291), 2253-2263. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01203-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01203-4)
- Jenner, W. J., Kanji, R., Mirsadraee, S., Gue, Y. X., Price, S., Prasad, S., & Gorog, D. A. (2021). Thrombotic complications in 2928 patients with COVID-19 treated in intensive care: a systematic review. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 51(3), 595-607. <https://doi.org/10.1007/s11239-021-02394-7>
- Nahum, J., Morichau-Beauchant, T., Daviaud, F., Echegut, P., Fichet, J., Maillat, J. M., & Thierry, S. (2020). Venous Thrombosis Among Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA network open*, 3(5), e2010478. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.10478>
- Rey, J. R., Caro-Codón, J., Poveda Pineda, D., Merino, J. L., Iniesta, Á. M., López-Sendón, J. L., & investigadores CARD-COVID (2020). Complicaciones arteriales trombóticas en pacientes hospitalizados con COVID-19 [Arterial thrombotic complications in hospitalized patients with COVID-19]. *Revista española de cardiología*, 73(9), 769-771. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2020.05.013>
- Tan, Y. K., Goh, C., Leow, A. S. T., Tambyah, P. A., Ang, A., Yap, E. S., Tu, T. M., Sharma, V. K., Yeo, L. L., Chan, B. P. L., & Tan, B. Y. Q. (2020). COVID-19 and ischemic stroke: a systematic review and meta-summary of the literature. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 50(3), 587-595. <https://doi.org/10.1007/s11239-020-02228-y>

- [26] Levi, M., Thachil, J., Iba, T., & Levy, J. H. (2020). Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *The Lancet Haematology*, 7(6), e438-e440. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(20\)30145-9](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(20)30145-9)
- [27] Thachil, J., Cushman, M., & Srivastava, A. (2020). A proposal for staging COVID-19 coagulopathy. *Research and practice in thrombosis and haemostasis*, 4(5), 731-736. <https://doi.org/10.1002/rth2.12372>
- [28] Helms, J., Severac, F., Merdji, H., Anglés-Cano, E., & Mezzani, F. (2020). Prothrombotic phenotype in COVID-19 severe patients. *Intensive care medicine*, 46(7), 1502-1503. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06082-7>
- [29] Thachil, J., Tang, N., Gando, S., Falanga, A., Cattaneo, M., Levi, M., Clark, C., & Iba, T. (2020). ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 18(5), 1023-1026. <https://doi.org/10.1111/jth.14810>
- [30] Shah, S., Shah, K., Patel, S. B., Patel, F. S., Osman, M., Velagapudi, P., Turagam, M. K., Lakkireddy, D., & Garg, J. (2020). Elevated D-Dimer Levels Are Associated With Increased Risk of Mortality in Coronavirus Disease 2019: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cardiology in review*, 28(6), 295-302. <https://doi.org/10.1097/CRD.0000000000000330>
- [31] Kwee, R. M., Adams, H. J. A., & Kwee, T. C. (2021). Pulmonary embolism in patients with COVID-19 and value of D-dimer assessment: a meta-analysis. *European radiology*, 31(11), 8168-8186. <https://doi.org/10.1007/s00330-021-08003-8>
- [32] Chocron, R., Duceau, B., Gendron, N., Ezzouhairi, N., Khider, L., Trimaille, A., Goudot, G., Weizman, O., Alsac, J. M., Pommier, T., Bory, O., Cellier, J., Philippe, A., Geneste, L., Ben Abdallah, I., Panagides, V., El Batti, S., Marsou, W., Juvin, P., Deney, A., ... Critical COVID-19 France investigators (2021). D-dimer at hospital admission for COVID-19 are associated with in-hospital mortality, independent of venous thromboembolism: Insights from a French multicenter cohort study. *Archives of cardiovascular diseases*, 114(5), 381-393. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2021.02.003>
- [33] Smilowitz, N. R., Kunichoff, D., Garshick, M., Shah, B., Pillinger, M., Hochman, J. S., & Berger, J. S. (2021). C-reactive protein and clinical outcomes in patients with COVID-19. *European heart journal*, 42(23), 2270-2279. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa1103>
- [34] Ministry of Health of Ukraine. (2021, January 7). *Pro zatverdzhennia Zmin do Standartiv medychnoi dopomohy "Koronavirusna khvoroba (COVID-19)". Nakaz MOZ Ukrainy No. 10* [On the approval of the Amendments to the Medical Care Standards "Coronavirus Disease (COVID-19)" (No. 10)]. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0010282-21?lang=en#Text>
- [35] Ministry of Health of Ukraine. (2020, April 2). *Protokol nadannia medychnoi dopomohy dlia likuvannia koronavirusnoi khvoroby (COVID-19)*. Nakaz MOZ Ukrainy No. 762 [Protocol for the provision of medical assistance for the treatment of the coronavirus disease (COVID-19) (No. 762)]. <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0762282-20#Text>
- [36] Ministry of Health of Ukraine. (2020, March 28). *Orhanizatsiia nadannia medychnoi dopomohy khvorym na koronavirusnu khvorobu (COVID-19)*. Nakaz MOZ Ukrainy No. 722 [Organization of medical care for patients with coronavirus disease (COVID-19) (No. 722)]. <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0722282-20?lang=en#Text>
- [37] Riabokon, O. V., Tumanska, L. M., Cherkaskyi, V. V., & Riabokon, Yu. Yu. (2021). Clinical and pathomorphological analysis of deaths from COVID-19 in 2020. *Pathologia*, 18(3), 269-277. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2021.3.242247>
- [38] Longchamp, A., Longchamp, J., Manzocchi-Besson, S., Whiting, L., Haller, C., Jeanneret, S., Godio, M., Garcia Martinez, J. J., Bonjour, T., Caillat, M., Maitre, G., Thaler, J. M., Pantet, R., Donner, V., Dumoulin, A., Emonet, S., Greub, G., Friolet, R., Robert-Ebadi, H., Righini, M., ... Delaloye, J. (2020). Venous thromboembolism in critically ill patients with COVID-19: Results of a screening study for deep vein thrombosis. *Research and practice in thrombosis and haemostasis*, 4(5), 842-847. <https://doi.org/10.1002/rth2.12376>
- [39] Lodigiani, C., Iapichino, G., Carenzo, L., Cecconi, M., Ferrazzi, P., Sebastian, T., Kucher, N., Studt, J. D., Sacco, C., Bertuzzi, A., Sandri, M. T., Barco, S., & Humanitas COVID-19 Task Force (2020). Venous and arterial thromboembolic complications in COVID-19 patients admitted to an academic hospital in Milan, Italy. *Thrombosis research*, 191, 9-14. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.04.024>
- [40] Kollias, A., Kyriakoulis, K. G., Lagou, S., Kontopantelis, E., Stergiou, G. S., & Syrigos, K. (2021). Venous thromboembolism in COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Vascular medicine*, 26(4), 415-425. <https://doi.org/10.1177/1358863X21995566>
- [41] Mansory, E. M., Srigunapalan, S., & Lazo-Langner, A. (2021). Venous Thromboembolism in Hospitalized Critical and Noncritical COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. *TH open : companion journal to thrombosis and haemostasis*, 5(3), e286-e294. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1730967>
- [42] Nopp, S., Moik, F., Jilma, B., Pabinger, I., & Ay, C. (2020). Risk of venous thromboembolism in patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Research and practice in thrombosis and haemostasis*, 4(7), 1178-1191. <https://doi.org/10.1002/rth2.12439>
- [43] Voicu, S., Bonnin, P., Stépanian, A., Chousterman, B. G., Le Gall, A., Malissin, I., Deye, N., Siguret, V., Mebazaa, A., & Mégarbane, B. (2020). High Prevalence of Deep Vein Thrombosis in Mechanically Ventilated COVID-19 Patients. *Journal of the American College of Cardiology*, 76(4), 480-482. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.05.053>
- [44] Wichmann, D., Sperhake, J. P., Lütgehetmann, M., Steurer, S., Edler, C., Heinemann, A., Heinrich, F., Mushumba, H., Kniep, I., Schröder, A. S., Burdelski, C., de Heer, G., Nierhaus, A., Frings, D., Pfefferle, S., Becker, H., Bredereke-Wiedling, H., de Weerth, A., Paschen, H. R., Sheikhzadeh-Eggers, S., ... Kluge, S. (2020). Autopsy Findings and Venous Thromboembolism in Patients With COVID-19: A Prospective Cohort Study. *Annals of internal medicine*, 173(4), 268-277. <https://doi.org/10.7326/M20-2003>
- [45] Deng, H., Yan, X., & Yuan, L. (2021). Human genetic basis of coronavirus disease 2019. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 344. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00736-8>
- [46] Carter-Timofte, M. E., Jørgensen, S. E., Freytag, M. R., Thomsen, M. M., Brinck Andersen, N. S., Al-Mousawi, A., Hait, A. S., & Mogensen, T. H. (2020). Deciphering the Role of Host Genetics in Susceptibility to Severe COVID-19. *Frontiers in immunology*, 11, 1606. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01606>
- [47] Berger, J. S., Kunichoff, D., Adhikari, S., Ahuja, T., Amoroso, N., Aphinyanaphongs, Y., Cao, M., Goldenberg, R., Hindenburg, A., Horowitz, J., Parnia, S., Petrilli, C., Reynolds, H., Simon, E., Slater, J., Yaghi, S., Yuriditsky, E., Hochman, J., & Horwitz, L. I. (2020). Prevalence and Outcomes of D-Dimer Elevation in Hospitalized Patients With COVID-19. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 40(10), 2539-2547. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314872>

Ammonia level and Alzheimer type 2 astrocytes in the brain of deceased patients with liver cirrhosis of the varying degree

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

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

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

Key words:
liver cirrhosis,
ammonia, hepatic
encephalopathy,
histochemistry,
optical density,
Alzheimer type 2
astrocytes, bilirubin.

Pathologia
2023; 20 (1), 36-44

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

The aim of the study – comparative analysis of the ammonia level and Alzheimer type 2 astrocytes in the brain cortex and white matter of cerebral hemispheres, hippocampus, thalamus, striatum and cerebellum in the deceased patients with liver cirrhosis of classes A, B and C according to Child–Pugh.

Materials and methods. The study was performed on the brain of deceased 90 patients (65 ± 3 years) suffered from non-alcoholic liver cirrhosis (LC) of classes A (n = 30, group “A”), B (n = 30, group “B”) and C (n = 30, group “C”) according to Child–Pugh score, among which 59 (65.55 %) patients had clinical symptoms of hepatic encephalopathy of I–IV grades. The control group included postmortem brains of 30 patients (59.0 ± 2.5 years) who died from acute cardiovascular insufficiency and did not suffer from liver diseases or intoxication. A retrospective analysis of clinical and laboratory data from case histories was carried out. For histochemical (HC) determination of the ammonia in paraffin sections of the cerebral cortex and white matter, hippocampus, thalamus, striatum and cerebellum we used the protocol with Nessler’s reagent proposed by Gutierrez-de-Juan et al. (2017). In the noted brain regions, the analysis of HC ammonia optical density was performed in five standardized fields of view (×200) of the microscope scope A1 “Carl Zeiss” (Germany) with Jenoptik camera progress Gryphax 60 N-C1”1.0x426114 (Germany) using ImageJ software; in each noted brain region the number of Alzheimer’s type 2 astrocytes (AA2) was counted per twenty standardized fields of view at magnification ×400.

Results. HC method for ammonia detection with Nessler’s reagent according to V. Gutiérrez-de-Juan et al. (2017) reveals region-dependent fine-grained expression of ammonia in the brain neuropil of deceased patients in control and cirrhotic groups. In control patients, a very low HC ammonia expression is observed with higher values in cerebellum, thalamus, and striatum, while still ranked as negative. Increased HC ammonia expression (compared to control) is observed in deceased patients with compensated LC of “A” group in the cortex, thalamus, striatum and cerebellum; in subcompensated LC of “B” group – as well in the white matter and hippocampus. In deceased patients with decompensated LC of “C” group, in cerebellum, thalamus and striatum HC ammonia expression is maximally increased (by 6.18, 5.72, and 5.50 folds, respectively). Significant correlations are present between patients’ postmortem brain HC ammonia expression and the last intravital indicators of the blood total bilirubin, AST, ALT, albumin, leukocytic intoxication index. In compensated cirrhosis, increase in AA2 numbers compared to control is found in thalamus, striatum and cerebellum, which corresponds to AA2-astrocytosis of I degree. In subcompensated cirrhosis, AA2-astrocytosis of moderate II degree is found in the cortex, thalamus and cerebellum; AA2-astrocytosis of I degree – in striatum. In decompensated cirrhosis, pronounced AA2-astrocytosis of III degree is determined in the cortex, thalamus, striatum and cerebellum; moderate AA2-astrocytosis of II degree – in cerebral white matter, and mild AA2-astrocytosis of I degree – in the hippocampus. There is a moderate, strong, and very strong positive relationship between the levels of AA2-astrocytosis and HC ammonia expression in the thalamus, striatum, and cerebellum.

Conclusions. In deceased patients with LC, the neuropil HC ammonia expression in cerebellum, thalamus, striatum, and cerebral cortex directly correlates with the severity of LC according to Child–Pugh, reaching a maximum in LC of class C, and has significant correlations with intravital blood levels of total bilirubin, AST, ALT, albumin, leukocytic intoxication index. With LC progression, AA2-astrocytosis increases significantly in thalamus, cerebellum, striatum and cerebral cortex, which positively correlates with HC ammonia expression in these brain regions.

Ключові слова:
цироз печінки,
аміак, печінкова
енцефалопатія,
гістохімія,
оптична щільність,
астроцити
Альцгеймера 2
типу, білірубін.

Патологія. 2023.
Т. 20, № 1(57).
С. 36-44

Рівень аміаку й астроцитів Альцгеймера 2 типу в головному мозку померлих хворих на цироз печінки різних ступенів тяжкості

Т. В. Шулятнікова, В. О. Туманський

Мета роботи – порівняльний аналіз рівня аміаку й астроцитів Альцгеймера 2 типу в тканині кори та білої речовини великих півкуль головного мозку, гіпокампу, таламусу, смугастого тіла та мозочка у померлих хворих на цироз печінки класу А, В та С за Чайлд–П’ю.

Матеріали та методи. Дослідили головний мозок (ГМ) 90 померлих хворих (віком 65 ± 3 роки) на неалкогольний цироз печінки (ЦП) класу А, В і С за Чайлд–П’ю. Визначили 3 групи спостережень: «А» (n = 30), «В» (n = 30) та «С» (n = 30). У 59 (65,55 %) хворих груп «А», «В» і «С» виявили клінічну симптоматику печінкової енцефалопатії I–IV ступенів. У групі контролю дослідили ГМ 30 померлих (віком 59,0 ± 2,5 року) від гострої серцево-судинної недостатності, в яких не діагностували захворювання печінки або інтоксикацію. У кожному випадку виконали ретроспективний аналіз клінічних і лабораторних даних історій хвороб. Методом V. Gutiérrez-de-Juan et al. (2017) з використанням реактиву Несслера здійснили гістохімічне (ГХ) визначення вмісту аміаку в парафінових зрізах тканини кори та білої речовини великих півкуль головного мозку (ВПГМ), гіпокампу, таламусу, смугастого тіла та мозочка. У цих відділах ГМ виконали порівняльний

аналіз оптичної щільності ГХ експресії аміаку в п'яти стандартизованих полях зору (при збільшенні $\times 200$) мікроскопа Score A1 «Carl Zeiss» (Germany) з камерою Jenoptik Progres Gryphax 60N-C1 J; у кожному відділі ГМ у двадцяти стандартизованих полях зору зі збільшенням $\times 400$ обрахували кількість астроцитів Альцгеймера 2 типу (AA2).

Результати. Завдяки застосуванню ГХ методу виявлення аміаку в нервовій тканині з використанням реактиву Несслера за V. Gutiérrez-de-Juan et al. (2017) визначили регіон-залежну дрібнозернисту експресію аміаку в нейропілі тканини ГМ померлих контрольної групи та померлих хворих на ЦП. У померлих контрольної групи виявили дуже низьку ГХ експресію аміаку з відносно вищими значеннями в мозочку, таламусі та смугастому тілі, яку за градацією, що застосували, визначили як негативну. Підвищену ГХ експресію аміаку (порівняно з групою контролю) встановили в померлих хворих на компенсований ЦП групи «А» в корі ВПГМ, таламусі, смугастому тілі та мозочку; в померлих пацієнтів із субкомпенсованим ЦП групи «В» – також у білій речовині ВПГМ і гіпокампі. У померлих хворих на декомпенсований ЦП групи «С» у мозочку, таламусі та смугастому тілі ГХ експресія аміаку підвищена максимально (у 6,18, 5,72 та 5,50 раза відповідно). Між посмертним ступенем ГХ експресії аміаку в тканині ГМ та останніми прижиттєвими показниками рівня загального білірубину, АсАт, АлАт, альбуміну, лейкоцитарного індексу інтоксикації в крові хворих виявили значущі кореляційні зв'язки.

У померлих хворих на компенсований ЦП у таламусі, смугастому тілі та мозочку встановили підвищену (щодо контролю) кількість AA2, що відповідала I ступеню AA2-астроцитозу. У померлих хворих на субкомпенсований ЦП AA2-астроцитоз помірного II ступеня виявили в корі ВПГМ, таламусі та мозочку; AA2-астроцитоз I ступеня – в смугастому тілі. У померлих пацієнтів із декомпенсованим ЦП виражений AA2-астроцитоз III ступеня визначили в корі ВПГМ, таламусі, смугастому тілі та мозочку; AA2-астроцитоз помірного II ступеня зафіксували в білій речовині ВПГМ, слабкий AA2-астроцитоз I ступеня – в гіпокампі. Кореляційний аналіз показав наявність середнього, сильного та дуже сильного позитивного зв'язку між середніми кількісними показниками AA2-астроцитозу та ГХ експресією аміаку в таламусі, смугастому тілі та мозочку.

Висновки. У померлих хворих на ЦП груп «А», «В» і «С» ступінь ГХ експресії аміаку в нейропілі тканини мозочка, таламусу, смугастого тіла та кори ВПГМ прямо корелює зі ступенем тяжкості ЦП за Чайлд–П'ю, досягаючи максимуму при тяжкому ЦП класу С, має значущі кореляційні зв'язки з рівнем загального білірубину, АсАт, АлАт, альбуміну, лейкоцитарного індексу інтоксикації в крові хворих. Із прогресуванням тяжкості ЦП спостерігали істотне підвищення ступеня AA2-астроцитозу в таламусі, мозочку, смугастому тілі та корі ВПГМ, що позитивно корелювало зі ступенем ГХ експресії аміаку в тканині цих відділів ГМ.

Among the main manifestations of decompensated liver cirrhosis (LC), along with fatal complications, represented by profuse esophageal variceal bleeding and septic conditions, severe refractory ascites, jaundice and hepatic encephalopathy (HE) are also often observed. The latter is the second most common complication of decompensated LC after ascites and is typical for 30–45 % of patients [1]. HE is characterized by a spectrum of neuropsychiatric disorders from hardly noticeable to a lethal form – hepatic coma [2]; the grade of HE is assessed from 0 to IV according to the West Haven criteria [3]. According to the Child–Pugh cirrhosis scoring [4] patients with subcompensated cirrhosis of class B mostly manifest with “overt” HE II grade, while in patients with decompensated cirrhosis of class C, severe forms of HE III–IV grades prevail [2]. Severe forms of HE reduce the survival rate of patients with liver cirrhosis to 2 years [1].

The central factor in the pathophysiology of HE is the neurotoxic effect of NH_4^+ and NH_3 forms of ammonia, which levels markedly increase in the blood of cirrhotic patients [5]. Diffusible gaseous NH_3 ammonia freely penetrates through the blood-brain barrier (BBB), and in the ionized form NH_4^+ pass BBB through K^+ channels and cellular transmembrane transporters [6]. NH_4^+ and NH_3 , as well as cytotoxic bile acids significantly increase in the blood and the brain tissue [7], while both NH_4^+ and NH_3 are capable to change the pH of the cellular cytoplasm and liquid sectors of the brain significantly [5]. In astrocytes, high ammonia concentration and glutamate are metabolized via glutamine synthetase in osmotically active glutamine, accumulation of which causes astrocytes swelling and subsequent generalized brain edema [8]. Glutamine overloading of astrocytes leads to its hydrolysis in mitochondria followed by releasing of new portions of ammonia (the “Trojan horse” hypothesis

and reactive oxygen species [9,10]. Stimulation of benzodiazepine receptors by ammonia instigates an increase in the activity of gamma-aminobutyric acid (GABA) and leads to a neurotransmitter imbalance with a predominance of GABAergic tone [2]. Violation of the glutamine–glutamate astrocytic shuttle, direct ammonia inhibition of EAAT-1 (GLAST) and EAAT-2 (GLT-1) transporters contribute to the growth of synaptic glutamate followed by persistent depolarization of neuronal membranes, while gaining oxidative stress may lead to neuronal death [9,11].

Despite the prognostic value of HE in assessing the risk of lethal outcome in LC, its clinical diagnosis remains low since 80 % of cirrhotic patients predominately suffer from its covert forms [12]. Currently, a large number of morphological studies of the brain in the experimental liver failure contrasts sharply with single pathomorphological studies of the human brain in cases of HE, coma, or liver failure. The ambiguous relationship between plasma ammonia levels and HE clinical manifestation has been studied extensively [12] whereas pathomorphology of the brain damage in hepatogenic neurotoxicosis is reflected only partially in a few works of 2001–2020, indicating that the main histopathologic hallmark for HE is the detection of the so-called Alzheimer's type 2 astrocytes (AA2) in the brain [5,13–16]. Postmortem histochemical determination of tissue ammonia in different organs was performed in a single study of V. Gutiérrez-de-Juan et al. (2017) [17], which showed its effectiveness in comparison with the standard colorimetric method for ammonia detection. The relationship of pathomorphological signs of hepatogenic brain damage with the level of ammonia in the brain tissue, as well as with the main intravital laboratory parameters in deceased cirrhotic patients, has not yet been elucidated in the literature.

Aim

Comparative analysis of the ammonia level and Alzheimer type 2 astrocytes in the brain cortex and white matter of cerebral hemispheres, hippocampus, thalamus, striatum and cerebellum in the deceased patients with liver cirrhosis of classes A, B and C according to Child–Pugh.

Materials and methods

The brains and livers from 90 deceased patients (65 ± 3 years) suffered from non-alcoholic LC of classes A, B, C according to the Child–Pugh score [4], which composed 3 groups: “A” ($n = 30$, compensated LC), “B” ($n = 30$, sub-compensated LC) and “C” ($n = 30$, decompensated LC), were studied. Among noted 90 patients, 59 (65.55 %) patients had clinical symptoms of HE grades I–IV. Cases with comorbidity with systemic intoxication, endocrine disorders, as well as patients cancerous and alcoholic liver diseases, were excluded from the study. Control group was designed from 30 patients (59.0 ± 2.5 years) who died from acute cardiovascular insufficiency and did not suffer from liver diseases or intoxication. In each case, a retrospective analysis of clinical and laboratory data from case histories was carried out with an emphasis on the dynamics of laboratory blood parameters, presence of HE clinical symptoms and ascites. According to clinical data, LC was verified as viral in 64 (71.12 %) patients, secondary biliary – in 13 (14.44 %) patients, congestive – in 9 (10.00 %) patients, drug-induced – in 2 (2.22 %) observations and as cryptogenic – in 2 (2.22 %) patients. In group A, LC was morphologically represented by macronodular form in 27 (90.00 %) cases and was accompanied by clinical symptoms of I grade HE in 8 (26.66 %) patients. In group B, LC was macronodular in 13 (43.33 %) cases, micronodular in 4 (13.33 %) patients, macromicronodular in 8 (26.66 %) patients, and macronodular-septal in 5 (16.68 %) patients. In group B, 21 (70.00 %) patients with subcompensated LC had symptoms of I–II grades HE. In group C, LC was ranked as micronodular in 23 (76.66 %) patients, macronodular in 2 (6.68 %) patients, and macromicronodular in 5 (16.66 %) patients. In group C, II–III grades HE occurred in 23 (76.66 %) patients, and HE IV degree (hepatic coma according to the Glasgow coma scale [18]) developed in 7 (23.33 %) patients before death.

During the autopsy, specimens of the liver, as well as the cortex and subcortical white matter from the frontal, parietal, temporal and occipital lobes of the brain hemispheres, hippocampus, thalamus, striatum (putamen, globus pallidus, caudate nucleus) and the cerebellum were taken from the deceased of 3 groups and the control group. The choice of these brain regions is conditioned by the previous neuroimaging and experimental studies highlighted the presumable regional selectivity of the brain hepatogenic toxic damage in acute and chronic liver failure [19–21]. Pieces of the brain and liver were fixed in 10 % buffered formalin followed by and paraffin embedding. Serial tissue slices thickened of 4 μm were prepared on a precision rotary microtome HM 3600 (MICROM Laborgerate GmbH, Germany); after deparaffination they were stained with hematoxylin and eosin for a general histopathological assessment.

The levels of ammonia in deparaffinized brain sections were determined histochemically (HC) using Nessler's reagent according to the V. Gutiérrez-de-Juan et al. (2017) method [17]. Aqueous solution of Nessler's reagent (potassium tetraiodomercurate dihydrate, $\text{K}_2\text{HgI}_4 \cdot \text{KOH}$) has pale yellow coloring; in the presence of ammonia it becomes darker, and when high ammonia concentrations, forms small orange-brown granules / precipitates of different density in the tissues [17]. In preliminary studies, for determining the ammonia level in the brain tissue we used 2 options for assessing the HC reaction:

1. determining the relative area of HC-positive (orange-brown) granules to the area of the standardized field of view at magnification $\times 200$ of the microscope Scope.A1 “Carl Zeiss” (Germany) with Jenoptik progress Gryphax 60N-C1”1.0x426114 (Germany) camera using Videotest-Morphology 5.2.0.158 (VideoTest LLC) software;
2. determination of the optical density (staining intensity) of HC-positive granules in conditional units of optical density (CUOD) in a standardized field of view of the same microscope at magnification $\times 200$ using an automatic analysis system and standard plugin color deconvolution-“H DAB” of ImageJ software.

The results of the preliminary studies have shown that in the dynamics of LC decompensation, the rates of optical density of HC-positive granules changed more significantly than their relative area. Therefore, for the quantitative assessment of the brain HC reaction to ammonia, the HC optical density values (measured in CUOD) was chosen. At CUOD values from 0 to 20, the degree of HC ammonia expression in the brain tissue is assessed as negative (“-”); from 21 to 50 – as weak (“+”); from 51 to 100 – as moderate (“++”); from 101 and above – as high (“+++”).

In each case, in the cortex and subcortical white matter of the aforementioned 4 cerebral lobes, hippocampus, thalamus, striatum (putamen, globus pallidum, caudate nucleus) and cerebellum, a comparative analysis of the optical density of HC ammonia expression was performed in five standardized fields of view (SFV) (at magnification $\times 200$) of the microscope Scope.A1 “Carl Zeiss” (Germany) with Jenoptik camera progress Gryphax 60 N – C 1”1.0 x 426114 (Germany) using ImageJ software; in twenty standardized fields of view (mag. of $\times 400$) of each noted brain region, the number of Alzheimer's type 2 astrocytes was counted. Based on our preliminary studies, as well as the data provided by A. N. Agarwal & D. D. Mais (2019), according to the numbers of AA2 in SFV of the microscope (at magnification $\times 400$), we designed 4 degrees of AA2-astrocytosis: 1-5 AA2/ 20 fields of view, $\times 400$ – 0 degree of AA2-astrocytosis (absent); 6–10 AA2/ 20 fields of view, $\times 400$ – I degree of AA2-astrocytosis (weak); 11–20 AA2/ 20 fields of view, $\times 400$ – II degree AA2-astrocytosis (moderate); from 21 or more AA2/ 20 fields of view, $\times 400$ – III degree of AA2-astrocytosis (severe).

The results were analyzed using the Statistica® package for Windows 13.0 (StatSoft Inc., License No. JPZ8041382130ARCN10-J). Correspondence of quantitative indicators to the law of normal distribution was determined using the Kolmogorov–Smirnov test. Results were expressed as median (Me) with range (Q1; Q3) and as mean \pm standard deviation. The Mann–Whitney U-test was used to compare two groups, and the Kruskal–Wallis

Table 1. HC ammonia expression (in CUOD), HC ammonia scale, numbers of AA2 and AA2-score in deceased patients with LC of "A", "B", "C" groups and control

Brain region	Parameter	Group "A"	Group "B"	Group "C"	Control group
Cerebral cortex	CUOD	27.11 (23.82; 28.85)*	29.54 (24.34; 35.12)*	64.23 (53.12; 76.07)*#	18.14 (15.26; 19.53)
	Ammonia scale	+	+	++	-
	AA2 numbers	3.50 (2.40; 5.20)	12.50 (6.30; 14.20)*	21.10 (15.50; 26.20)*#	3.10 (1.20; 4.50)
	AA2-score	0	II	III	0
Cerebral subcortical white matter ⁰	CUOD	11.23 (10.75; 15.81)	12.47 (11.15; 16.25)	21.15 (20.22; 22.73)*#	11.10 (10.34; 2.26)
	Ammonia scale	-	-	+	-
	AA2 numbers	3.60 (2.70; 5.40)	3.70 (2.90; 5.90)	14.50 (7.20; 15.60)*#	3.40 (1.80; 4.30)
	AA2-score	0	0	II	0
Hippocampus	CUOD	18.12 (15.57; 19.37)	22.48 (21.39; 33.79) *	55.43 (52.61; 61.48)*#	17.25 (14.68; 18.72)
	Ammonia scale	-	+	++	-
	AA2 numbers;	2.60 (1.80; 3.40)	3.40 (2.70; 5.20)	6.10 (4.80; 9.50) *	2.10 (1.50; 3.20)
	AA2-score	0	0	I	0
Thalamus	CUOD	26.68 (24.72; 29.35)*	65.47 (51.71; 78.89)*†	110.23 (99.22; 112.35)*#	19.25 (16.58; 19.72)
	Ammonia scale	+	++	+++	-
	AA2 numbers	9.30 (7.40; 10.60)*	15.20 (12.60; 19.90)*†	35.70 (21.50; 54.10)*#	4.10 (3.70; 6.20)
	AA2-score	I	II	III	0
Striatum	CUOD	24.37 (22.68; 28.61)*	55.52 (52.48; 65.57)*†	101.56 (100.48; 103.27)*#	18.46 (15.69; 18.93)
	Ammonia scale	+	++	+++	-
	AA2 numbers	7.60 (6.30; 9.70) *	8.30 (6.70; 10.20) *	25.20 (21.30; 45.20) *#	3.80 (3.20; 5.90)
	AA2-score	I	I	III	0
Cerebellum	CUOD	29.27 (26.48; 31.43)*	67.08 (54.29; 84.27)*†	122.16 (107.37; 131.27)*#	19.74 (18.32; 19.83)
	Ammonia scale	+	++	+++	-
	AA2 numbers	9.10 (7.50; 10.20)*	16.10 (14.60; 20.40)*†	32.40 (20.90; 52.20)*#	3.90 (3.80; 6.10)
	AA2-score	I	II	III	0

*; reliable difference compared to control ($p < 0.05$); †; reliable difference compared to group "A" ($p < 0.05$); #: reliable difference compared to groups "A" and "B" ($p < 0.05$); data are presented as median with lower and upper quartiles – Me (Q1; Q3).

test was used to compare more than two groups. Correlation analysis was performed using Spearman's rank correlation coefficient (r). The results were considered statistically significant at the level of 95 % ($p < 0.05$).

Results

HC ammonia detection method with Nessler's reagent according to V. Gutiérrez-de-Juan et al. (2017) reveals region-dependent, fine-grained, ammonia expression of different optical density in the brain neuropil of deceased cirrhotic and control patients. In the brain of deceased patients from control (did not suffer from liver diseases), in all six studied regions, HC ammonia expression is weak and correspond to "negative expression" according to ammonia scoring we used. The lowest ammonia expression is determined in the cerebral subcortical white matter: 11.10 (10.34; 14.26), CUOD, and the highest – in cerebellum 19.74 (18.32; 19.83) CUOD, and thalamus: 19.25 (16.58; 19.72) CUOD (Table 1, Fig. 1).

In deceased cirrhotic patients of the three main groups, regional heterogeneity of HC ammonia expression is also observed with its gradual proportional increase (from LC class A to class C) in the corresponding brain regions (Table 1, Fig. 1). In compensated cirrhosis, weak HC ammonia expression is observed in the cortex, thalamus, striatum, and cerebellum (Table 1). In deceased patients with subcompensated LC, moderate ammonia expression appears in the thalamus, striatum and cerebellum, which is higher compared to group "A". Weak ammonia expression is observed in the cortex and hippocampus, while negative – in the cerebral white matter (Table 1).

In decompensated cirrhosis, among all the studied brain regions, the highest compared to control, "A" and "B" groups HC ammonia expression is found. The maximally increased, strong HC expression is observed in cerebellum [122.16 (107.37; 131.27), CUOD (6.18 times higher, by 518.84 % compared to control)]; thalamus [110.23 (99.22; 112.35), CUOD (5.72 times higher, by 472.62 %)]; striatum [101.56 (100.48; 103.27), CUOD (5.50 times higher, by 450.16 %)]. Moderate HC expression is noted in the cortex [64.23 (53.12; 76.07), CUOD (3.54 times higher, by 254.07 % compared to control)], and hippocampus [55.43 (52.61; 61.48), CUOD (3.21 times higher, by 221.23 %)]; and weak HC expression is observed in the white matter [21.15 (20.22; 22.73), CUOD (1.90 times higher, by 90.54 % compared to control)] (Table 1).

Histopathological examination of 6 brain regions of 90 deceased cirrhotic patients of groups "A", "B" and "C", revealed astrocytes with specific morphotype, so-called Alzheimer type 2 astrocytes, which are well distinguishable when stained with hematoxylin-eosin, as well as in the HC ammonia reaction (Fig. 2, 3, 4). They have an enlarged, watery, vacuolated nucleus with a prominent nucleolus adjacent to the nuclear membrane as well as peripherally localized punctate chromatin accumulations beside the nucleolemma. The nuclei of AA2 can be very large and at least 2 times the size of the nuclei of neighboring oligodendrocytes, while the cytoplasm of AA2 is represented by an inconspicuous rim ("naked nuclei"). AA2 are often arranged in pairs, sometimes forming astrocytic triplets. In the brain of deceased patients of control group, such astrocytes in different brain regions are observed in single numbers / 20 SFV, which corre-

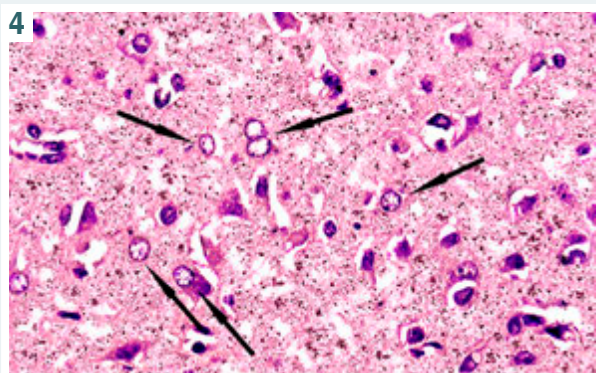
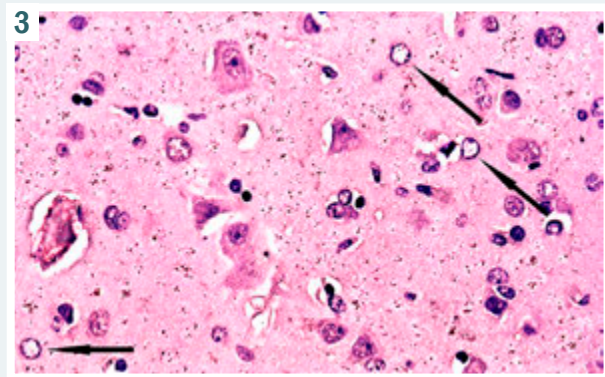
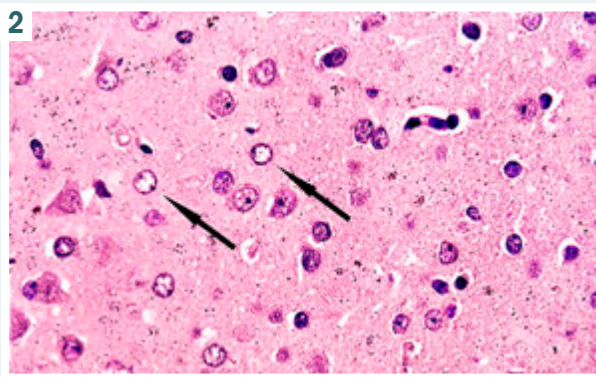
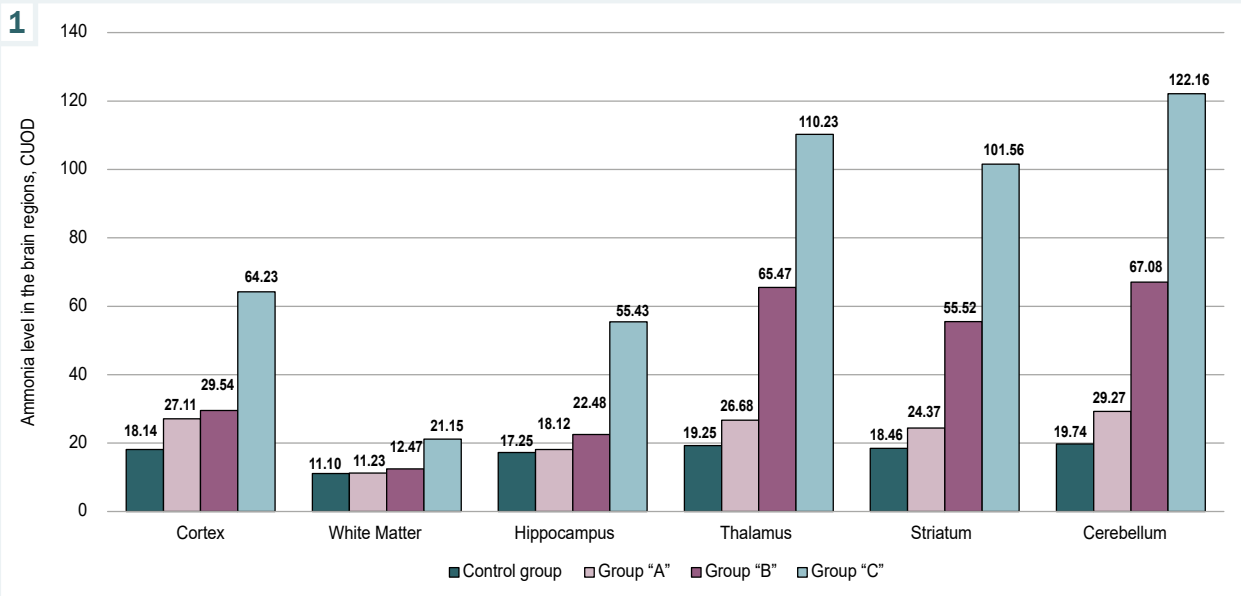


Fig. 1. HC ammonia expression, expressed in CUOD in different brain regions of deceased cirrhotic patients with compensated (group "A"), subcompensated (group "B") and decompensated (group "C") LC and control values.

Fig. 2. Weak HC ammonia expression with presence of AA2-astrocytes (arrows) in the cortex of deceased patient with compensated cirrhosis of group "A". HC reaction with Nessler's reagent. Mag. x200.

Fig. 3. Moderate HC ammonia expression with presence of AA2-astrocytes (arrows) in the cortex of deceased patient with subcompensated cirrhosis of group "B". HC reaction with Nessler's reagent. Mag. x200.

Fig. 4. Strong HC ammonia expression with presence of AA2-astrocytes (arrows) in the cortex of the patient with decompensated cirrhosis of group "C" died in hepatic coma. HC reaction with Nessler's reagent. Mag. x200.

sponds to "0" degree of AA2-astrocytosis according to the scale we used (Table 1).

According to ultrastructure analysis performed as early as 1987 [22], at the first stages of AA2 formation, the cytoplasmic volume of AA2 increases due to mitochondrial and granular / smooth endoplasmic reticulum hyperplasia, appearing of lipofuscin inclusions, accumulation of glycogen in the cytoplasm and the nucleus. Subsequently, a noticeable rarefaction of nuclear chromatin occurs with the formation of clumpy clusters under the nucleolemma. When metabolic potential depletion of AA2 finally reaches its extreme, pronounced hydropic degeneration

of the nucleus, mitochondria and vacuolization of the cytoplasm appear.

With exacerbation of LC, in deceased patients of "A", "B", and "C" groups, a gradual region-dependent increase in numbers of AA2 astrocytes is observed in the following brain regions in descending order: thalamus, cerebellum, striatum, cortex, white matter, hippocampus (Table 1). In compensated LC, increased numbers of AA2 are found in thalamus, striatum and cerebellum, which corresponds to AA2-astrocytosis of weak (I degree). In subcompensated LC, a moderate (II degree) AA2-astrocytosis is noted in the cortex, thalamus and cerebellum, herewith in the two

Table 2. In vivo blood laboratory parameters in patients with liver cirrhosis of groups "A", "B" and "C"

Parameters, units of measurement	Group "A"	Group "B"	Group "C"	Control group
Albumin (Alb), g/L	37.00 (36.30; 45.20)	33.20 (30.50; 35.30)*	25.70 (22.40; 32.20)*	43.00 (36.50; 46.30)
Bilirubin total (Bil), $\mu\text{mol/L}$	21.57 (20.65; 32.84)*	82.41 (46.83; 97.72)*	172.12 (122.52; 315.23)*	11.23 (9.35; 16.43)
AST (aspartate aminotransferase), $\mu\text{mol}/(\text{sec}\times\text{L})$	0.46 (0.38; 0.55)	0.92 (0.82; 1.34)*	2.25 (1.72; 2.93)*	0.23 (0.18; 0.37)
ALT (alanine aminotransferase), $\mu\text{mol}/(\text{sec}\times\text{L})$	0.35 (0.29; 0.71)	0.75 (0.57; 1.12)*	1.74 (1.33; 2.25)*	0.34 (0.20; 0.55)
LII (leukocytic intoxication index by Kalf-Kalif formula), units	0.65 (0.57; 1.47)	0.93 (0.74; 1.78)	1.92 (1.57; 2.97)*	0.52 (0.34; 1.12)

*: significant differences relative to the control ($p < 0.05$); data are presented as median with lower and upper quartiles – Me (Q1; Q3).

latter, the indicators are higher than those in control and group "A" ($p < 0.05$). Weak (I degree) AA2-astrocytosis is determined in the striatum (Table 1).

In decompensated LC, the highest AA2-astrocytosis of III degree is determined in the cortex, thalamus, striatum, cerebellum; moderate (II degree) – in the white matter, wherein indicators are higher than control, "A" and "B" groups values ($p < 0.05$). Weak (I degree) AA2-astrocytosis is observed in hippocampus, where indicators differ only from the control. In patients with decompensated LC, AA2-astrocytosis average values are higher compared to control: in thalamus – 8.71 times; in cerebellum – 8.30 times; in cortex – 6.81 times; in striatum – 6.63 times, in white matter – 4.26 times, in hippocampus – 2.90 times (Table 1).

Correlation analysis revealed moderate, strong, and very strong positive relationship between the average number of AA2 and indicators of HC ammonia expression in the thalamus, striatum, and cerebellum. Thus, in the thalamus from patients of group "A", the correlation coefficient (r) between these parameters is 0.52 ($p < 0.05$), in the group "B" – $r = 0.68$ ($p < 0.05$), group "C" – $r = 0.92$ ($p < 0.05$). In the striatum from patients of group "A" $r = 0.47$ ($p < 0.05$), group "B" – $r = 0.61$ ($p < 0.05$), group "C" – $r = 0.79$ ($p < 0.05$). In the cerebellum of patients of group "A" – $r = 0.75$ ($p < 0.05$), group "B" – $r = 0.86$ ($p < 0.05$), group "C" – $r = 0.93$ ($p < 0.05$). Moderate and weak correlation is observed in the cortex and white matter, as well as in the hippocampus. In the cortex from patients of group "A", the correlation coefficient (r) between these indicators is 0.63 ($p < 0.05$), group "B" – $r = 0.48$ ($p < 0.05$), group "C" – $r = 0.47$ ($p < 0.05$). In the hippocampus from patients of group "A", the correlation coefficient $r = 0.41$ ($p < 0.05$), group "B" – $r = 0.65$ ($p < 0.05$), group "C" – $r = 0.43$ ($p < 0.05$). In the white matter from deceased patients of group "A" – $r = 0.51$ ($p < 0.05$), group "B" – $r = 0.52$ ($p < 0.05$), group "C" – $r = 0.39$ ($p < 0.05$).

An analysis of the latest intravital laboratory parameters from the case histories of cirrhotic patients showed that in compensated patients there is upward trend for the blood total bilirubin, AST, ALT, as well as downward trend for albumin levels. These trends progress in patients with subcompensated LC and reach maximum values in patients with decompensated cirrhosis and hepatocellular insufficiency (Table 2). The leukocytic intoxication index (LII), calculated according to Y. Y. Kalf-Kalif's formula, in patients with compensated and subcompensated cirrhosis tends to increase by 25.00 % and 78.84 %, respectively compared to control; in patients with decompensated cirrhosis, this indicator was increased by 3.69 times (by 269.23 %) compared to control group (Table 2).

Correlation analysis confirmed the presence of positive relationships between the morphological manifestations of elevated tissue ammonia (HC ammonia expression, AA2-astrocytosis degree) in deceased patients of groups "A", "B", "C" and their intravital laboratory parameters of liver failure, which contributed to hyperammonemia.

In deceased patients with compensated LC, a positive weak relationship exists between the ratio of total plasma bilirubin and HC ammonia expression, as well as indicators of AA2-astrocytosis ($\text{Bil}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{Bil}/\text{AA2}$) in the cortex, thalamus, striatum and cerebellum.

In deceased patients with subcompensated LC, a positive moderate relationship exists between the plasma total bilirubin, HC ammonia expression, and AA2-astrocytosis in the cortex, thalamus and cerebellum. In the thalamus, a moderate positive correlation takes place for $\text{AST}/\text{AA2}$. Weak positive correlation takes place in the cortex – between $\text{AST}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{AST}/\text{AA2}$; $\text{ALT}/\text{AA2}$; $\text{LII}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{LII}/\text{AA2}$; in white matter – $\text{AST}/A_{\text{CUOD}}$; in the hippocampus – $\text{Bil}/\text{AA2}$; in thalamus – $\text{AST}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{ALT}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{ALT}/\text{AA2}$; $\text{LII}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{LII}/\text{AA2}$; in striatum – $\text{Bil}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{Bil}/\text{AA2}$; $\text{AST}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{AST}/\text{AA2}$; $\text{ALT}/\text{AA2}$; $\text{LII}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{LII}/\text{AA2}$; in the cerebellum – $\text{AST}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{AST}/\text{AA2}$; $\text{ALT}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{ALT}/\text{AA2}$; $\text{LII}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{LII}/\text{AA2}$. In the thalamus, a negative weak correlation exists between $\text{Alb}/\text{AA2}$.

In deceased patients with decompensated LC, a very strong positive correlation takes place in the cortex – $\text{Bil}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{Bil}/\text{AA2}$; in thalamus – $\text{Bil}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{Bil}/\text{AA2}$; in cerebellum – $\text{Bil}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{Bil}/\text{AA2}$. Strong negative correlation is noted: in the cortex – $\text{Alb}/\text{AA2}$; in thalamus – $\text{Alb}/\text{AA2}$; in cerebellum – $\text{Alb}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{Alb}/\text{AA2}$. Strong positive correlation is present in the cortex – $\text{AST}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{AST}/\text{AA2}$; $\text{LII}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{LII}/\text{AA2}$; in thalamus – $\text{AST}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{AST}/\text{AA2}$; $\text{ALT}/\text{AA2}$; $\text{LII}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{LII}/\text{AA2}$; in striatum – $\text{Bil}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{Bil}/\text{AA2}$; $\text{AST}/\text{AA2}$; in the cerebellum – $\text{AST}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{AST}/\text{AA2}$; $\text{ALT}/\text{AA2}$. Moderate positive correlation is observed in the cortex – $\text{ALT}/A_{\text{CUOD}}$; in hippocampus – $\text{Bil}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{Bil}/\text{AA2}$; in striatum – $\text{AST}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{ALT}/\text{AA2}$; in cerebellum – $\text{ALT}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{LII}/A_{\text{CUOD}}$; $\text{LII}/\text{AA2}$. Moderate negative correlation is present in the cortex – $\text{Alb}/A_{\text{CUOD}}$; in thalamus – $\text{Alb}/A_{\text{CUOD}}$; in the striatum – $\text{Alb}/\text{AA2}$.

Discussion

Over the last decade, it has been proven that neurotoxic effect of ammonia is the key factor in the HE pathophysiology. Considering pathological data, HE is classified on three types: type A – occurs in acute liver failure; type B – develops as a result of portosystemic shunting (e. g., transjugular intrahepatic portosystemic shunting); type C – develops with LC [23]. During significant hyperam-

monemia in patients with LC, the level of both ionized NH_4^+ and gaseous NH_3 ammonia forms increases in the blood and brain tissue [5–7]. High ammonia levels in the brain of cirrhotic patients was confirmed using dynamic $^{13}\text{NH}_3$ -positron emission tomography [5].

A large amount of ammonia is produced in the intestine during the degradation of urea, digestion of proteins and the deamination of amino acids. High concentrations of intestinal ammonia are absorbed into the portal vein, and then in the liver, up to 80 % of circulating ammonia is extracted via its conversion to urea in the periportal hepatocytes and the formation of glutamine in the perivenous hepatocytes. A minor part of the circulating ammonia is metabolized in skeletal muscles, where glutamine is formed with the participation of glutamine synthetase [2]. In cirrhotic patients, significant increase in blood ammonia occurs with porto-systemic shunting and decrease in the metabolic activity of hepatocytes [5]. Moreover, in chronic liver failure, increased reabsorption of conjugated bile acids from the intestinal lumen occurs, while increased intestinal pH contributes to the conversion of the predominant intestinal ionized ammonium (NH_4^+) into the easily diffusing gaseous form (NH_3) leading to increased blood and brain ammonia levels and correlating with HE severity [7].

HE more often develops in alcoholic cirrhosis, severe portal hypertension, in combination with metabolic syndrome and kidney disease, as well as when cirrhotic patients take proton pump inhibitors, opiates, GABAergic drugs and benzodiazepines [24]. HE is a prognostic marker of imminent threat of death in cirrhotic patients. When cirrhosis is compensated, the average survival of patients exceeds 12 years, while with its decompensation, determined by the development of HE, jaundice, ascites and variceal bleeding, the average survival declining to 2 years [1].

In HE pathogenesis, the main attention is turned to the systemic toxic effects of ammonia, which disrupts BBB functions, promotes neuroinflammation, astrocytes swelling, affects pH and brain cellular membrane potential, violates neurotransmission, changes intercellular communication and causes clinical manifestations of HE [2,5].

Despite the key role of ammonia in HE, determination of blood ammonia in cirrhotic patients has shown conflicting and heterogeneous results, which can be explained by the incomplete compliance of researchers with the difficult technological protocol for its laboratory determination [12,25]. Number of studies have not confirmed a direct relationship between plasma ammonia and HE development. In some patients with cirrhosis, blood ammonia may be within normal limits, while in other patients with mild, minimal HE or its absence ammonia may be high [26]. By results of other studies [27], in severe forms of HE, blood ammonia rarely remains within conventionally normal values. Probably, given the ambiguity of the aforementioned results AASLD and Choosing Wisely Campaign-2017 protocols does not recommend mandatory testing of blood ammonia to make or exclude the diagnosis of HE [12].

The relationship of neuropathological manifestations of hepatotoxic brain damage with the cerebral ammonia is not reflected in the literature, and its histochemical detection in paraffin sections of various organs is described

only in one study [17]. We have managed to reproduce proposed by V. Gutiérrez-de-Juan et al. in 2017 [17] HC method for ammonia determination in the brain of cirrhotic patients. Our results have showed that among six studied brain regions, the cerebellum, thalamus and striatum are the richest with ammonia. Increased HC ammonia expression (compared to control) is observed in deceased patients with compensated LC, in the cortex, thalamus, striatum and cerebellum; in deceased patients with subcompensated LC, HC ammonia expression is increased in all six studied brain regions. In deceased patients with decompensated cirrhosis, in the cerebellum, thalamus and striatum the level of HC ammonia increases maximally. A significant increase in brain ammonia level in patients with decompensated LC may be due to the presence of the largest number of cases with severe forms of HE including hepatic coma in this group, as well as increased BBB permeability for ammonia due to neurotoxicosis occurred with multiple organ failure in this category of patients. Among the studied brain regions, hippocampus and white matter shows the lowest ammonia values, as well as weak correlations between neuropathological and intravital laboratory parameters. The revealed heterogeneity of ammonia levels in different brain regions is most likely due to the initially different levels of enzymes involved in ammonia metabolism, as well as different levels of glutamate, dopamine, GABA, and other neurotransmitters associated with ammonia metabolism.

Neuropathological changes characteristic for HE in conjunction with *in vivo* increased blood ammonia have been described in a few works. Hyperammonemia causes astrocytes swelling and increase in AA2 numbers [16], stimulates Iba1+ microglia activation [28], disrupts synapse architecture and structure of neurons, contributing to their death [5]. In cirrhotic patients, after several episodes of coma, spongy degeneration can develop in the deep cortical layers, basal ganglia and cerebellum, as well as demyelination of straight and crossed cortical-spinal tracts, leading to paralysis of the lower extremities; deficiency of dopaminergic neurons leading to parkinsonism [5]. Experimental hyperammonemia at rats reduces density of dendritic spines sensorimotor cortical layer V and pyramidal neurons of hippocampal CA1 [29].

We have confirmed the data [14, 16] that hepatogenic damage induces formation of the so-called Alzheimer type 2 astrocytes in significant quantities, which were described for the first time in 1912 by von Hosslin and Alzheimer and since 1936 have been considered as the histopathological hallmark of HE [16]. In our study, in deceased patients with compensated cirrhosis, a significant increase in numbers of AA2 is found in the thalamus, striatum, and cerebellum. In deceased patients with subcompensated cirrhosis, pronounced AA2-astrocytosis is determined in the cortex, thalamus, striatum and cerebellum; moderate AA2-astrocytosis occurs in the white matter, and mild AA2-astrocytosis occurs in the hippocampus. The relationship between AA2-astrocytosis and HC ammonia expression in the same brain regions is confirmed by correlation analysis, which shows the presence of a moderate, strong, and very strong positive relationship between these indicators in the thalamus, striatum, and cerebellum.

AA2-astrocytosis in different brain regions which increases with the severity of LC, could be explained by the peculiarities of the intensive ammonia metabolism in the brain during hyperammonemia. As the excess of brain ammonia is metabolized in astrocytes with synthesis of osmotically active glutamine, the accumulation of the latter causes swelling of astrocytes and their nuclei [8], as well as glutamine hydrolysis in mitochondria with the release of new amounts of ammonia [9]. In our opinion, the presence of AA2 in the brain of cirrhotic patients reflects the transformation of astrocytes, which is characteristic of hyperammonemia due to a persistent high level of osmotically active glutamine in them; therefore, astrocytes swollen due to osmotic imbalance are not strictly specific cells for only HE. It is in line with A. N. Agarwal i D. D. Mais (2019) [16], who emphasized that astrocytes AA2 are regular and highly sensitive findings in HE. Morphologically similar AA2-astrocytosis has also been described in other critical conditions accompanied by acute ion-osmotic imbalance [16,30,31].

Analysis of clinical and laboratory data revealed that the most significant correlations take place between elevated blood levels of total bilirubin, AST, ALT, LII, as well as hypoalbuminemia and the HC ammonia expression, as well as AA2-astrocytosis in the patient's brain. The strongest correlations between these parameters can be traced in the cerebellum, thalamus, striatum, and cortex; a correlation of lesser strength takes place in the white matter and hippocampus. The elevated leukocytic intoxication index in decompensated cirrhotic patients, as well as a significant direct correlation of its level with the HC ammonia expression and AA2-astrocytosis in all six brain regions confirm the contribution of systemic neurotoxicosis and neuroinflammation to the complex pathogenesis of HE in cirrhosis [32].

Conclusions

1. Histochemical method of the ammonia detection in the nervous tissue using the Nessler's reagent (according to V. Gutiérrez-de-Juan et al., 2017) determines an increased region-dependent fine-grained expression of ammonia in the neuropil of different brain regions in deceased patients with liver cirrhosis.

2. In deceased cirrhotic patients, histochemical ammonia expression in the tissue neuropil of the cerebellum, thalamus, striatum, and cerebral cortex directly correlates with the severity of Child-Pugh score, reaching a maximum in severe class C liver cirrhosis, and possessing significant correlations with intravital blood total bilirubin, AST, ALT, albumin, leukocytic intoxication index. In the cerebellum, thalamus, and striatum of the deceased cirrhotic patients of class C, the histochemical ammonia expression is maximally increased (by 6.18, 5.72, and 5.50 times, respectively) in comparison with similar brain regions of deceased patients who did not suffer from liver diseases.

3. With progression of liver cirrhosis, the maximal increase in Alzheimer2-astrocytosis in the thalamus, cerebellum, striatum and cerebral cortex is observed, which directly correlates with histochemical ammonia expression in the same brain regions.

4. An increased histochemical ammonia expression and Alzheimer-2-astrocytosis in the cerebral cortex, thalamus, striatum and cerebellum in deceased patients with intravitaly elevated blood levels of total bilirubin, AST, ALT, leukocytic intoxication index and hypoalbuminemia may be used as the pathomorphological confirmation of hepatogenic toxic damage of the brain.

Prospects for further research. Further study on regional ammonia brain level in other life-threatening somatogenic toxic states, as well as its correlation with central astroglial markers are needed to improve our knowledge on the brain cellular responsibility in patho- and morphogenesis of acute and chronic metabolic encephalopathies.

Funding

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

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

Надійшла до редакції / Received: 20.01.2023
Після доопрацювання / Revised: 28.02.2023
Прийнято до друку / Accepted: 03.03.2023

Information about authors:

Shulyatnikova T. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0002-0196-9935

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

Відомості про авторів:

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

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

References

- [1] Bohra, A., Worland, T., Hui, S., Terbah, R., Farrell, A., & Robertson, M. (2020). Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis treated with current standards of care. *World journal of gastroenterology*, 26(18), 2221–2231. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i18.2221>
- [2] Shulyatnikova, T. V., & Shavrin, V. A. (2017). Modern view on hepatic encephalopathy: basic terms and concepts of pathogenesis. *Pathologia*, 14(3), 371–380. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2017.3.118773>
- [3] Ferenci, P. (2017). Hepatic encephalopathy. *Gastroenterology report*, 5(2), 138–147. <https://doi.org/10.1093/gastro/gox013>
- [4] Wan, S. Z., Nie, Y., Zhang, Y., Liu, C., & Zhu, X. (2020). Assessing the Prognostic Performance of the Child-Pugh, Model for End-Stage Liver Disease, and Albumin-Bilirubin Scores in Patients with Decompensated Cirrhosis: A Large Asian Cohort from Gastroenterology Department. *Disease markers*, 2020, 5193028. <https://doi.org/10.1155/2020/5193028>
- [5] Butterworth, R. F. (2019). Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis: Pathology and Pathophysiology. *Drugs*, 79(Suppl 1), 17–21. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-1017-0>

- [6] Adlimoghaddam, A., Sabbir, M. G., & Albensi, B. C. (2016). Ammonia as a Potential Neurotoxic Factor in Alzheimer's Disease. *Frontiers in molecular neuroscience*, 9, 57. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00057>
- [7] Xie, G., Wang, X., Jiang, R., Zhao, A., Yan, J., Zheng, X., Huang, F., Liu, X., Panee, J., Rajani, C., Yao, C., Yu, H., Jia, W., Sun, B., Liu, P., & Jia, W. (2018). Dysregulated bile acid signaling contributes to the neurological impairment in murine models of acute and chronic liver failure. *EBioMedicine*, 37, 294-306. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.10.030>
- [8] Jayakumar, A. R., & Norenberg, M. D. (2018). Hyperammonemia in Hepatic Encephalopathy. *Journal of clinical and experimental hepatology*, 8(3), 272-280. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2018.06.007>
- [9] Lu, K. (2023). Cellular Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy: An Update. *Biomolecules*, 13(2), 396. <https://doi.org/10.3390/biom13020396>
- [10] Görg, B., Karababa, A., Schütz, E., Paluschinski, M., Schrimpf, A., Shafiqullina, A., Castoldi, M., Bidmon, H. J., & Häussinger, D. (2019). O-GlcNAcylation-dependent upregulation of HO1 triggers ammonia-induced oxidative stress and senescence in hepatic encephalopathy. *Journal of hepatology*, 71(5), 930-941. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.06.020>
- [11] Angelova, P. R., Kerbert, A. J. C., Habtesion, A., Hall, A., Abramov, A. Y., & Jalan, R. (2022). Hyperammonaemia induces mitochondrial dysfunction and neuronal cell death. *JHEP reports: innovation in hepatology*, 4(8), 100510. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2022.100510>
- [12] Deutsch-Link, S., Moon, A. M., Jiang, Y., Barritt, A. S., 4th, & Tapper, E. B. (2022). Serum Ammonia in Cirrhosis: Clinical Impact of Hyperammonemia, Utility of Testing, and National Testing Trends. *Clinical therapeutics*, 44(3), e45-e57. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2022.01.008>
- [13] Ma, K. C. (2001). Alzheimer-type I astroglial pathology (AIA) and its implications for dynamic plasticity of astroglia: a historical review of the significance of AIA. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 60(2), 121-131. <https://doi.org/10.1093/jnen/60.2.121>
- [14] Gelpi, E., Rahimi, J., Klotz, S., Schmid, S., Ricken, G., Forcen-Vega, S., Budka, H., & Kovacs, G. G. (2020). The autophagic marker p62 highlights Alzheimer type II astrocytes in metabolic/hepatic encephalopathy. *Neuropathology*, 40(4), 358-366. <https://doi.org/10.1111/neup.12660>
- [15] Norenberg, M., Tong, X., Shamaladevi, N., Ahmad, A., Arcuri, J., Mehran, T., & Jayakumar, A. (2019). P-78 Mechanism of Alzheimer Type II Astrocyte Development: Implication for the Defective Neuronal Integrity and Neurobehavioral Deficits Associated With Chronic Hepatic Encephalopathy. *American Journal of Gastroenterology*, 114(1), S38-S39. <https://doi.org/10.14309/01.ajg.0000582288.72427.46>
- [16] Agarwal, A. N., & Mais, D. D. (2019). Sensitivity and Specificity of Alzheimer Type II Astrocytes in Hepatic Encephalopathy. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 143(10), 1256-1258. <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0455-OA>
- [17] Gutiérrez-de-Juan, V., López de Davaillo, S., Fernández-Ramos, D., Barbier-Torres, L., Zubiete-Franco, I., Fernández-Tussy, P., Simon, J., Lopitz-Otsoa, F., de Las Heras, J., Iruzebieta, P., Arias-Loste, M. T., Villa, E., Crespo, J., Andrade, R., Lucena, M. I., Varela-Rey, M., Lu, S. C., Mato, J. M., Delgado, T. C., & Martínez-Chantar, M. L. (2017). A morphological method for ammonia detection in liver. *PLoS one*, 12(3), e0173914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173914>
- [18] Mehta, R., GP trainee, Chinthapalli, K., & consultant neurologist (2019). Glasgow coma scale explained. *BMJ (Clinical research ed.)*, 365, l1296. <https://doi.org/10.1136/bmj.l1296>
- [19] Zhu, L., Zhang, W., Chen, L., Ren, Y., Cao, Y., Sun, T., Sun, B., Liu, J., Wang, J., & Zheng, C. (2022). Brain Gray Matter Alterations in Hepatic Encephalopathy: A Voxel-Based Meta-Analysis of Whole-Brain Studies. *Frontiers in human neuroscience*, 16, 838666. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2022.838666>
- [20] Wang, M., Cui, J., Liu, Y., Zhou, Y., Wang, H., Wang, Y., Zhu, Y., Ngu-chu, B. A., Qiu, B., Wang, X., & Yu, Y. (2019). Structural and functional abnormalities of vision-related brain regions in cirrhotic patients: a MRI study. *Neuroradiology*, 61(6), 695-702. <https://doi.org/10.1007/s00234-019-02199-9>
- [21] Lu, C. Q., Jiao, Y., Meng, X. P., Cai, Y., Luan, Y., Xu, X. M., & Ju, S. (2018). Structural change of thalamus in cirrhotic patients with or without minimal hepatic encephalopathy and the relationship between thalamus volume and clinical indexes related to cirrhosis. *NeuroImage Clinical*, 20, 800-807. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2018.09.015>
- [22] Norenberg, M. D. (1987). The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochemical pathology*, 6(1-2), 13-33. <https://doi.org/10.1007/BF02833599>
- [23] Swaminathan, M., Ellul, M. A., & Cross, T. J. (2018). Hepatic encephalopathy: current challenges and future prospects. *Hepatic medicine: evidence and research*, 10, 1-11. <https://doi.org/10.2147/HMER.S118964>
- [24] Tapper, E. B., Henderson, J. B., Parikh, N. D., Ioannou, G. N., & Lok, A. S. (2019). Incidence of and Risk Factors for Hepatic Encephalopathy in a Population-Based Cohort of Americans With Cirrhosis. *Hepatology communications*, 3(11), 1510-1519. <https://doi.org/10.1002/hep4.1425>
- [25] Goldstein, B. N., Wesler, J., Nowacki, A. S., Reineks, E., & Natowicz, M. R. (2017). Investigations of blood ammonia analysis: Test matrices, storage, and stability. *Clinical biochemistry*, 50(9), 537-539. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.01.002>
- [26] Haj, M., & Rockey, D. C. (2020). Ammonia Levels Do Not Guide Clinical Management of Patients With Hepatic Encephalopathy Caused by Cirrhosis. *The American journal of gastroenterology*, 115(5), 723-728. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000343>
- [27] Vierling, J. M., Mokhtarani, M., Brown, R. S., Jr, Mantry, P., Rockey, D. C., Ghabril, M., Rowell, R., Jurek, M., Coakley, D. F., & Schar Schmidt, B. F. (2016). Fasting Blood Ammonia Predicts Risk and Frequency of Hepatic Encephalopathy Episodes in Patients With Cirrhosis. *Clinical gastroenterology and hepatology*, 14(6), 903-906. e1. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2015.11.018>
- [28] Jaeger, V., DeMorrow, S., & McMillin, M. (2019). The Direct Contribution of Astrocytes and Microglia to the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy. *Journal of clinical and translational hepatology*, 7(4), 352-361. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2019.00025>
- [29] Chen J. R., Wang B. N., Tseng G. F., Wang Y. J., Huang Y. S., & Wang T. J. (2014). Morphological changes of cortical pyramidal neurons in hepatic encephalopathy. *BMC Neurosci*, 15, 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-15-15>
- [30] Finnie, J. W., Blumbergs, P. C., & Williamson, M. M. (2010). Alzheimer type II astrocytes in the brains of pigs with salt poisoning (water deprivation/intoxication). *Australian veterinary journal*, 88(10), 405-407. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2010.00630.x>
- [31] Hough, S., Jennings, S. H., & Almond, G. W. (2015). Thiamine-responsive neurological disorder of swine. *Journal of Swine Health and Production*, 23, 143-151. <https://www.aasv.org/shap/issues/v23n3/v23n3p143.html>
- [32] Cabrera-Pastor, A., Llansola, M., Montoliu, C., Malaguana, M., Balzano, T., Taoro-Gonzalez, L., Garcia-Garcia, R., Mangas-Losada, A., Izquierdo-Altarejos, P., Arenas, Y. M., Leone, P., & Felipe, V. (2019). Peripheral inflammation induces neuroinflammation that alters neurotransmission and cognitive and motor function in hepatic encephalopathy: Underlying mechanisms and therapeutic implications. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 226(2), e13270. <https://doi.org/10.1111/apha.13270>

Проблеми стадіювання ускладнених форм карциноми ободової кишки у пацієнтів, оперованих в ургентному порядку в умовах загальнохірургічного стаціонара

М. А. Кубрак *^{A,B,C,D}, С. М. Завгородній ^{E,F}, М. Б. Данилюк ^{E,F}

Запорізький державний медичний університет, Україна

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

Мета роботи – здійснити аналіз результатів хірургічного лікування та патоморфологічного дослідження препаратів хворих, які оперовані ургентно з приводу ускладнених форм раку ободової кишки, та оцінити їхній вплив на правильність стадіювання пухлинного процесу в післяопераційному періоді.

Матеріали та методи. Здійснили аналіз результатів патоморфологічних досліджень 71 (100 %) пацієнта, які перебували на лікуванні на базі хірургічного відділення з приводу ускладнених форм раку ободової кишки.

Результати. У всіх пацієнтів (100 %) виявили аденокарциному товстого кишківника: у 3 (4,23 %) хворих діагностували муцинозну аденокарциному, в 68 (95,77 %) випадках аденокарцинома не уточнена. У 44 (61,97 %) пацієнтів виявили помірно диференційовану аденокарциному товстого кишківника, у 25 (35,21 %) – низькодиференційовану, в 2 (2,82 %) випадках – високодиференційовану пухлину.

Висновки. У разі оперативних втручань з приводу ускладнених форм раку ободової кишки лімфатична дисекція в мінімальному обсязі (D1) здійснена 54 (76,06 %) хворим, без видалення лімфатичних вузлів прооперували 17 (23,94 %) пацієнтів. Недостатній рівень виконання лімфатичних дисекцій у хворих з ускладненими формами злоякісної патології товстого кишківника не дає змогу оцінити реальну картину метастатичного ураження регіонарних лімфовузлів і правильно визначити стадію pN за TNM 8 (у 17 (23,94 %) хворих взагалі не здійснили патоморфологічне оцінювання, в 40 (56,34 %) пацієнтів у препараті не наведена кількість досліджених лімфатичних вузлів). У структурі стадійності онкопатології в 12 (16,90 %) хворих стадію онкозахворювання визначили лише за критерієм ступеня інвазії (T), ще у 5 (7,04 %) – за даними інструментального обстеження й інтраопераційної ревізії (клінічно), стадія була завищена.

Те, що не здійснили чітке послідовне оцінювання макроскопічних, мікроскопічних, імуногістохімічних і молекулярних характеристик пухлинного процесу в 17 (23,94 %) пацієнтів, призвело до неточностей під час визначення стадійності пухлинного процесу, а отже вплинуло на прогноз щодо рецидивування та виживаності хворого, тактику післяопераційного лікування.

Ключові слова:

товста кишка, рак, хірургічна патологія, морфологічні та мікроскопічні висновки.

Патологія. 2023.

Т. 20, № 1(57).
С. 45-49

*E-mail:

bravorio@gmail.com

Problems of staging complicated forms of colon carcinoma in patients who were urgently operated in a general surgical hospital

M. A. Kubrak, S. M. Zavorodnii, M. B. Danyliuk

The aim of the study: to analyze the results of surgical treatment and pathomorphological examination of preparations of patients who were urgently operated on for complicated forms of colon cancer, and to assess their influence on the correct staging of the tumor process in the postoperative period.

Materials and methods. An analysis of data from pathomorphological studies of 71 (100 %) patients who underwent treatment at the surgical department for complicated forms of colon cancer was carried out.

Results. Colon adenocarcinoma was detected in all 71 (100 %) patients (mucinous adenocarcinoma in 3 (4.23 %) patients, and the rest 68 (95.77 %) – unspecified adenocarcinoma). 44 (61.97 %) patients were diagnosed with moderately differentiated adenocarcinoma of the colon, 25 (35.21 %) – with poorly differentiated, and 2 (2.82 %) – with highly differentiated tumors.

Conclusions. In the case of surgical interventions for complicated forms of colon cancer, lymphatic dissection in the minimum extent (D1) was performed in 54 (76.06 %) patients, and 17 (23.94 %) patients were operated on without removal of lymph nodes. The insufficient level of performing lymphatic dissections in patients with complicated forms of malignant pathology of the large intestine does not make it possible to assess the real picture of metastatic lesions of regional lymph nodes and to assign the correct stage of pN according to TNM 8 (in 17 (23.94 %) patients, no pathomorphological assessment was performed at all, and in 40 (56.34 %) patients, the number of examined lymph nodes were not indicated in the preparation). In the structure of staging of oncopathology, in 12 (16.90 %) patients, the stage of cancer was assigned only according to the criterion of the degree of invasion (T) and in 5 (7.04 %) patients – only according to the data of instrumental examination and intraoperative revision (clinically), and was overestimated. Lack of a clear consistent assessment of the macroscopic, microscopic, immunohistochemical and molecular characteristics of the tumor process in 17 (23.94 %) patients leads to inaccuracies in the assessment of the stage of the tumor process, which in turn affects the prognosis for relapse and survival of the patient, and the tactic of postoperative treatment.

Key words:

intestine, large, cancer, surgical pathology, morphological and microscopic findings.

Pathologia

2023; 20 (1), 45-49

Операціям з приводу ускладнених форм злоякісних захворювань товстого кишківника належить провідне місце в структурі ургентних оперативних втручань загальнохірургічних стаціонарів.

У разі ускладнених форм колоректального раку 45,0–57,0 % пацієнтів звертаються за медичною допомогою з поширеним онкопроцесом, віддаленими солітарними чи множинними метастазами, канцероматозом очеревини (III та IV стадії) [1]. У цих хворих більшість операцій спрямовані тільки на усунення місцевопоширеної ускладненої пухлини, а 5,0–12,6 % випадків взагалі завершуються симптоматичним втручанням. Такі операції, на жаль, не дають пацієнтові шансів на одужання [2]. Крім цього, виконання хірургічного втручання в мінімальному обсязі створює певні складнощі для правильності стадіювання пухлинного процесу товстого кишківника.

Обсяг лімфатичної дисекції, що виконують під час таких операцій, у 62,0 % гістологічних препаратів становить менше ніж 4 лімфатичні вузли, що не відповідає критеріям онкорадикальності оперативного втручання та не дає змоги оцінити вираженість регіонарного метастазування [3].

У 3,0–5,0 % пацієнтів, оперованих з приводу ускладнених форм колоректального раку, під час гістологічного дослідження препарату виявляють пухлинний ріст у краях резекції (R1) [4]. У результаті нерадикальності хірургічних втручань виникають проблеми під час стадіювання злоякісного захворювання, що впливає на наступну тактику лікування цих хворих. Отже, у 16,9–41,2 % пацієнтів має місце локальний рецидив пухлини протягом першого року після резекції, а п'ятирічна виживаність цих хворих становить 3,0–38,0 % [5].

Дискутабельним залишається питання щодо здійснення циторедуктивних втручань при ускладнених формах злоякісних уражень ободової кишки. Чимало авторів виявили, що такі операції в разі виконання повної циторедукції (R0–R1), покращують п'ятирічну виживаність до 32,0–48,0 %. Отже, віддалені результати лікування більшою мірою залежать від радикальності хірургічного втручання, а не від специфічної хіміотерапії [6].

Ця проблема постає досить гостро в сучасній ургентній онкохірургії, потребує детальнішого аналізу та вирішення.

Мета роботи

Здійснити аналіз результатів хірургічного лікування та патоморфологічного дослідження препаратів хворих, які оперовані ургентно з приводу ускладнених форм раку ободової кишки, та оцінити їхній вплив на правильність стадіювання пухлинного процесу в післяопераційному періоді.

Матеріали і методи дослідження

Здійснили ретроспективний аналіз даних 71 (100 %) пацієнта, які перебували на лікуванні на базі хірургічного відділення КНП «Міська лікарня екстреної та швидкої медичної допомоги» ЗМП в період з 2018 до

2019 року з приводу ускладнених форм раку ободової кишки. У групу дослідження залучили 35 (49,29 %) жінок і 36 (50,71 %) чоловіків, середній вік становив $67,97 \pm 12,71$ року.

За результатами діагностики та хірургічного втручання, у 49 (69,01 %) пацієнтів діагностували пухлину товстого кишківника з гострою кишковою непрохідністю, у 13 (18,31 %) – з перфорацією пухлини, у 3 (4,23 %) хворих виявлена гостра кишкова кровотеча, у 4 (5,63 %) госпіталізованих – поєднання гострої кишкової непрохідності з перфорацією пухлини товстої кишки, ще у 2 (2,82 %) – кишкової непрохідності з кровотечею.

Пухлину сліпої кишки діагностували у 8 (11,27 %) хворих, висхідної ободової кишки – у 8 (11,27 %), печінкового згину – в 5 (7,04 %), поперечної ободової кишки – у 2 (2,82 %), селезінкового згину – в 1 (1,41 %), низхідної ободової кишки – у 8 (11,27 %), сигмоподібної – у 30 (42,25 %), ректосигмоїдного відділу – у 9 (12,68 %) випадках [7]. Усі пацієнти прооперовані в невідкладному, ургентному чи відтермінованому періоді (після стабілізації стану), середній термін – 8,2 (5,00; 15,50) години після госпіталізації.

Після оперативного втручання видалені препарати всіх хворих (100 %) передавали для патоморфологічного дослідження в КНП «Запорізьке обласне патологоанатомічне бюро» ЗОР. За результатами патоморфологічного дослідження препаратів, застосування додаткових методів обстеження й інтраопераційних даних пацієнтам встановлювали остаточний діагноз зі стадіюванням онкопроцесу за класифікацією TNM 8 перегляду UICC і AJCC 2017 [8].

У післяопераційному періоді після отримання результатів патоморфологічного дослідження пацієнтів направили на наступне лікування до онколога в КНП «Запорізький регіональний протипухлинний центр» ЗОР.

Статистичне опрацювання результатів здійснили за допомогою програм Statistica 13.0, TIBCO Software Inc. (ліцензія № JPZ804I382130ARCN10-J) і Microsoft Excel 2013 (ліцензія № 00331-10000-00001-AA404). Результати в тексті та таблицях наведено як $M \pm t$ – середнє арифметичне \pm стандартне відхилення.

Результати

У структурі оперативних втручань превалювали первинні радикальні – 48 (67,61 %) випадків. У 17 (35,42 %) хворих виконали правобічну геміколектомію, в 23 (47,92 %) – резекцію лівих відділів товстого кишківника з пухлиною, у 8 (16,66 %) – лівобічну геміколектомію. У 40 (83,33 %) пацієнтів здійснили лімфодисекцію D1, у 8 (16,67 %) хворих пухлина видалена без лімфодисекції.

У 18 (25,35 %) госпіталізованих здійснили паліативні операції: в 4 (22,22 %) – правобічну геміколектомію, в 11 (61,11 %) – резекцію лівих відділів товстої кишки, у 3 (16,66 %) – лівобічну геміколектомію. Лімфодисекцію D1 виконали в 14 (77,78 %) пацієнтів, 4 (22,22 %) випадки – без лімфодисекції.

У 5 (7,04 %) хворих здійснили симптоматичні операції: 3 (60,00 %) хворим виконали цекостомію, 2

(40,00 %) – накладання обхідних тонко-товстокишко-вих анастомозів (табл. 1).

За результатами патоморфологічного дослідження препаратів хворих з ускладненими формами раку ободової кишки, у всіх пацієнтів (100 %) діагностували аденокарциному товстого кишківника. Під час більш детального аналізу виявили, що тільки у 3 (4,23 %) пацієнтів наведено гістологічний підтип пухлини – муцинозна аденокарцинома. У решти 68 (95,77 %) хворих гістологічний підтип не зазначено – аденокарцинома не уточнена. У 44 (61,97 %) пацієнтів виявили помірно-диференційовану аденокарциному товстого кишківника, у 25 (35,21 %) – низькодиференційовану, в 2 (2,82 %) випадках – високодиференційовану пухлину, без згадки щодо low-grade чи high-grade диференціювання.

Під час макроскопічного оцінювання параметрів пухлини виявили, що в понад половині випадків (n = 36, 50,70 %) не зазначена інформація щодо характеру росту пухлини, її локалізації, діаметра пухлини та її протяжності, відстані від пухлини до країв резекції (проксимального, дистального), а це доволі важливі критерії для колоректального раку.

Оцінюючи глибину інвазії (T) за класифікацією TNM 8 перегляду, визначили: в 6 (8,45 %) пацієнтів ріст пухлини обмежений м'язовим шаром (pT2), у 52 (73,24 %) випадках виявлена інвазія в субсерозну оболонку або в непокріті очеревину органи (pT3). У 8 (11,27 %) хворих діагностували проростання в інші органи чи структури та/або в вісцеральну очеревину (pT4): інвазія в очеревину (pT4a) виявлена у 5 (62,50 %) пацієнтів, в сусідні органи чи структури (pT4b) – у 3 (37,50 %) випадках. У 5 (7,04 %) прооперованих не було змоги здійснити патоморфологічне оцінювання первинної пухлини (pTx), оскільки в них пухлина не була видалена під час операції. Цим пацієнтам здійснили симптоматичне оперативне втручання (цекостомія або накладання обхідного анастомозу) з інцизійною біопсією пухлини в зв'язку з її нерезектабельністю (cT4).

Оцінювання перинеуральної (PNI) та лімфоваскулярної (LVI) інвазії наведено лише в 24 (33,80 %) і 37 (52,11 %) пацієнтів відповідно. Перинеуральна інвазія (PNI 1) виявлена в 11 (45,83 %) хворих, а лімфоваскулярна (LVI 1/2) – в 23 (62,16 %) пацієнтів.

Краї резекції (R) описано у 62 (87,32 %) патоморфологічних висновках, у 2 (3,23 %) із них виявлено пухлинні клітини (R1), у 60 (96,77 %) у краях резекції не виявлено пухлинний ріст (R0).

Під час мікроскопічного оцінювання регіонарних лімфатичних вузлів у 19 (26,76 %) пацієнтів не виявили ознаки метастатичного ураження лімфатичних вузлів (pN0). У 12 (16,90 %) хворих діагностували метастатичне ураження одного регіонарного лімфатичного вузла (pN1a), ще у 12 (16,90 %) – метастаз у 2–3 лімфовузла (pN1b). У 4 (5,63 %) прооперованих не наведено кількість уражених лімфатичних вузлів, але у висновку зазначено pN1. Не зафіксували випадки наявності пухлинних клітин (сателітів) у параколіній клітковині без ураження лімфатичних вузлів (pN1c). Метастатичне ураження 4–6 лімфовузлів виявили тільки у 6 (8,45 %) хворих (pN2a), в 1 (1,41 %) випадку – метастаз у понад 7 лімфатичних вузлах (pN2b).

Таблиця 1. Структура оперативних втручань у пацієнтів з ускладненими формами раку товстого кишківника (n = 71)

Тип оперативного втручання	Вид операції	Кількість пацієнтів, n (%)
Радикальні операції, n = 48 (67,61 %)	Правобічна геміколектомія	17 (35,42 %)
	Резекція лівих відділів кишківника з пухлиною	23 (47,92 %)
	Лівобічна геміколектомія	8 (16,66 %)
	З лімфодисекцією D1	40 (83,33 %)
	Без лімфодисекції	8 (16,67 %)
Паліативні операції, n = 18 (25,35 %)	Правобічна геміколектомія	4 (22,22 %)
	Резекція лівих відділів кишківника з пухлиною	11 (61,11 %)
	Лівобічна геміколектомія	3 (16,66 %)
	З лімфодисекцією D1	14 (77,78 %)
Симптоматичні операції, n = 5 (7,04 %)	Без лімфодисекції	4 (22,22 %)
	Цекостомія	3 (60,00 %)
	Накладання обхідних анастомозів	2 (40,00 %)

Зазначимо, що у 17 (23,94 %) пацієнтів не здійснили оцінювання регіонарних лімфатичних вузлів (pNx). Це пов'язано з особливостями виконаного оперативного втручання в умовах загальноклінічного стаціонара (здійснили або симптоматичну операцію – 5 (29,41 %) випадків, або втручання без лімфатичної дисекції – 12 (70,59 %) хворих). Лише у 14 (19,71 %) хворих під час патоморфологічної діагностики у висновках наведено не тільки кількість уражених, але й загальну кількість досліджених лімфатичних вузлів; це важливо для правильності визначення ступеня метастатичного ураження регіонарних вузлів.

Оцінювання метастатичного ураження віддалених органів здійснили на етапі інструментального обстеження (УЗД органів черевної порожнини, комп'ютерна томографія з внутрішньовенним контрастуванням) та інтраопераційної ревізії органів черевної порожнини. У 12 (16,90 %) пацієнтів виявили метастатичне ураження в межах одного органа (M1a): у 9 (75,00 %) випадках – печінка, у 2 (16,67 %) – нирки, в 1 (8,33 %) – легені. У 2 (2,82 %) хворих діагностували вторинне пухлинне ураження двох і більше органів (M1b) – поєднане ураження печінки та легенів. У 4 (5,63 %) госпіталізованих виявили метастази на очеревині (M1c) – канцероматоз. Під час оперативного втручання в 2 (16,67 %) хворих із метастазами здійснили видалення солітарного метастазу печінки (атипова резекція). Отже, лише у 2 (16,67 %) пацієнтів із поширеним раком товстого кишківника в групі дослідження здійснили циторедуктивне оперативне втручання.

Комплексне оцінювання названих параметрів – основа для стадіювання онкопроцесу за класифікацією TNM 8 перегляду UICC і AJCC 2017 року. В результаті аналізу виявлено, що більшість пацієнтів з ускладненими формами колоректального раку мають злویкісну пухлину на III–IV стадії – 56 (78,87 %) випадків (табл. 2).

Розглядаючи структуру стадійності онкопатології в групі дослідження, звернули увагу, що у 12 (16,90 %) хворих стадія онкозахворювання була визначена лише за критерієм ступеня інвазії (T). У них не було даних щодо ступеня метастатичного ураження лімфатичних вузлів у зв'язку з виконанням оперативного втручання без здійснення навіть мінімальної лімфатичної дисекції

Таблиця 2. Стадіювання онкопроцесу за класифікацією TNM 8 перегляду UICC і AJCC 2017 (n = 71)

TNM класифікація	Кількість хворих, n	Частка хворих у групі, %	Стадіювання	Кількість хворих, n	Частка хворих у групі, %
pT2N0M0	2	2,82	I	2	2,82
pT3N0M0	11	15,49	IIA	11	15,49
pT4aN0M0	2	2,82	IIB	2	2,82
pT2N1aM0	1	1,41	IIIA	4	5,64
pT2N1bM0	1	1,41			
pT2NxM0	2	2,82			
pT3N1aM0	7	9,86	IIIB	27	38,04
pT3N1bM0	8	11,27			
pT3N1M0	3	4,23			
pT3N2aM0	3	4,23			
pT3NxM0	5	7,04			
pT4aN1M0	1	1,41			
pT4bN2bM0	1	1,41	IIIC	1	1,41
pT3N0M1a	2	2,82	IVA	17	23,95
pT3N1aM1a	2	2,82			
pT3N1bM1a	2	2,82			
pT3N2aM1a	1	1,41			
pT3NxM1a	5	7,04			
pT4aN0M1a	1	1,41			
pT4bN2aM1a	1	1,41			
cT4NxMx	3	4,22			
pT3N1aM1b	1	1,41	IVB	2	2,82
pT3N1bM1b	1	1,41			
pT4aN1aM1c	1	1,41	IVC	5	7,04
pT3N0M1c	1	1,41			
cT4NxM1c	2	2,82			
pT4bN2aM1c	1	1,41			

(D1). В результаті у цих пацієнтів стадійність пухлини була завищена, і це вплинуло на тактику їхнього післяопераційного лікування та прогностичне оцінювання виживаності та рецидиву.

У 5 (7,04 %) прооперованих стадія пухлинного процесу визначена тільки за результатами інструментального обстеження й інтраопераційної ревізії (клінічно); у 3 (60,00 %) із них не було даних щодо вторинного метастатичного ураження інших органів, але стадійність пухлинного процесу визначена як IV.

Обговорення

Нова класифікація злоякісних захворювань товстої та прямої кишки WHO 2019 (V видання) в поєднанні зі стадіюванням пухлинного процесу за TNM 8 перегляду UICC і AJCC 2017 року – доволі потужний, структурований і простий для розуміння інструмент, що створений для легшої взаємодії лікарів різних спеціальностей на всіх етапах лікування пацієнтів зі злоякісними захворюваннями ободової кишки. Правильність клінічного та морфологічного оцінювання злоякісного процесу обґрунтовує вибір ефективного методу лікування хворого, впливаючи на виживаність пацієнтів і відсутність рецидивів пухлини в майбутньому [9,10].

Автори V видання класифікації WHO 2019 наголошують, що для оцінювання злоякісного процесу треба використовувати комплексний підхід, що передбачає низку ознак: макроскопічних (якість препарату та зразків, локалізацію пухлини, її діаметр, відстань

від країв резекції, зовнішні характеристики пухлини); мікроскопічних (гістологічний тип і підтип пухлини, ступінь диференціації, глибина інвазії, периневральний ріст і лімфоваскулярна інвазія, оцінювання країв резекції, загальна кількість лімфатичних вузлів у препараті та кількість уражених метастазами, наявність сателітів, пухлинне брунькування); імуногістохімічних і молекулярних (мікросателітний статус, наявність білків репарації ДНК, наявність або відсутність певних мутацій гена); відповідь пухлини на лікування хворого [11].

Наголошують, що ступінь злоякісності пухлини треба оцінювати за шкалою low- або high-grade, а не за ступенем диференціації пухлини (G). У групі пацієнтів, яку дослідили, в жодному випадку не було згадки щодо low- або high-grade ступеня злоякісності пухлини [12].

Виявили, що в разі ургентних операцій у 55,00–80,70 % випадків (у нашому дослідженні – 76,06 %) під час втручань обмежуються частковою лімфодисекцією (D1), у 15,00–40,00 % операцій (за нашими даними, – 23,94 %) взагалі не видаляють лімфатичні вузли. Це вкрай негативно впливає на наступний прогноз щодо рецидиву пухлини та виживаність пацієнтів [13,14].

Якщо лімфодисекцію не здійснили або виконали на недостатньому рівні, патоморфолог не має змоги оцінити реальну картину ураження регіонарних лімфатичних вузлів (у препараті має бути не менше ніж 12 лімфатичних вузлів), і це впливає на правильність встановлення післяопераційного діагнозу, враховуючи стадійність за TNM 8 перегляду, та тактику лікування пацієнта [15].

Отже, аналіз результатів хірургічного лікування та патоморфологічного дослідження препаратів хворих із ускладненими формами раку ободової кишки виявив низку проблем. Деякі з них стосуються етапу оперативного втручання (недостатньо оцінено макроскопічні параметри пухлини, не виконано мікроскопічне визначення гістологічного підтипу злоякісного процесу, низький відсоток даних щодо кількості досліджених лімфовузлів у препараті, не здійснено оцінювання ступеня злоякісності пухлини за шкалою low- або high-grade тощо).

Висновки

1. Під час оперативних втручань з приводу ускладнених форм раку ободової кишки лімфатична дисекція в мінімальному обсязі (D1) виконана 54 (76,06 %) пацієнтам, без видалення лімфатичних вузлів оперовано 17 (23,94 %) хворих.

2. Недостатній рівень виконання лімфатичних дисекцій у хворих із ускладненими формами злоякісної патології товстої кишки не дає змоги оцінити реальну картину метастатичного ураження регіонарних лімфовузлів і визначити правильну стадію pN за TNM 8 (у 17 (23,94 %) хворих взагалі не здійснили патоморфологічне оцінювання, у 40 (56,34 %) пацієнтів у препараті не наведено кількість досліджених лімфатичних вузлів).

3. У структурі стадійності онкопатології в 12 (16,90 %) хворих стадію онкозахворювання визначили тільки за критерієм ступеня інвазії (T), у 5 (7,04 %) хворих

– лише за даними інструментального обстеження й інтраопераційної ревізії (клінічно), стадія була завищена.

4. Те, що не здійснили чітке послідовне оцінювання макроскопічних, мікроскопічних, імуногістохімічних і молекулярних характеристик пухлинного процесу в 17 (23,94 %) пацієнтів, призвело до неточностей під час визначення стадійності пухлинного процесу, а отже вплинуло на прогноз щодо рецидивування та виживаності хворих, тактику післяопераційного лікування.

Перспективи подальших досліджень. Створення чітких, обґрунтованих рекомендацій щодо інтраопераційної тактики в разі ускладнених форм злоякісної патології товстого кишківника, а також щодо послідовного аналізу макроскопічних, мікроскопічних, імуногістохімічних і молекулярних характеристик пухлинного процесу під час патоморфологічного дослідження дасть змогу здійснити всебічне оцінювання пухлинного процесу та визначити оптимальну тактику лікування хворого.

Фінансування

Дослідження виконане в рамках НДР Запорізького державного медичного університету «Модифікація хірургічних аспектів лікування пацієнтів різних вікових груп в мирний та військовий час», № 01.22U201.230 (2022–2026 рр.)

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 14.02.2023

Після доопрацювання / Revised: 10.03.2023

Прийнято до друку / Accepted: 16.03.2023

Відомості про авторів:

Кубрак М. А., д-р філософії, асистент каф. загальної хірургії та післядипломної хірургічної освіти, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-4051-9336

Завгородній С. М., д-р мед. наук, професор каф. загальної хірургії та післядипломної хірургічної освіти, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-3082-3406

Данилюк М. Б., канд. мед. наук, доцент каф. загальної хірургії та післядипломної хірургічної освіти, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-4515-7522

Information about authors:

Kubrak M. A., PhD, Assistant of the Department of General Surgery and Postgraduate Surgical Education, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Zavhorodnii S. M., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of General Surgery and Postgraduate Surgical Education, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.


Danyliuk M. B., MD, PhD, Associate Professor of the Department of General Surgery and Postgraduate Surgical Education, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

References

[1] Shishkin, M. A., & Kabachenko, V. O. (2015). Epidemiologia raku товстого kyshechnyka v umovakh velykoho promyslovoho mista [Epidemiology of the colorectal cancer in big industrial city]. *Pathologia*, (3), 61-65. [In Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2015.3.55611>

- [2] Bracale, U., Sodo, M., Merola, G., & Di Salvo, E. (2016). Reply to Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *ESMO open*, 1(6), e000110. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2016-000110>
- [3] Lugli, A., Kirsch, R., Ajioka, Y., Bosman, F., Cathomas, G., Dawson, H., El Zimaity, H., Fléjou, J. F., Hansen, T. P., Hartmann, A., Kakar, S., Langner, C., Nagtegaal, I., Puppa, G., Riddell, R., Ristimäki, A., Sheahan, K., Smyrk, T., Sugihara, K., Terris, B., ... Quirke, P. (2017). Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern pathology*, 30(9), 1299-1311. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.46>
- [4] Balbaa, M. A., Elkady, N., & Abdelrahman, E. M. (2020). Predictive Factors of Positive Circumferential and Longitudinal Margins in Early T3 Colorectal Cancer Resection. *International journal of surgical oncology*, 2020, 6789709. <https://doi.org/10.1155/2020/6789709>
- [5] Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359-E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- [6] Shyskin, M. A. (2019). Comparative immunohistochemical study of Ki-67, p53, caspase-3 in distal colonic polyps and colorectal adenocarcinoma. *Morphologia*, 13(3), 149-155. <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.3.149-155>
- [7] Kubrak, M. A., Zavgorodnii, S. M., Danilyuk, M. B., & Ryllov, A. I. (2023). Problemy peredoperatsiinoi diahnozyky khvorykh z uskladnenymy formamy kolorektalnoho raku v umovakh zahalnoklinichnykh stacionariv [Problems of preoperative diagnostics of patients with complicated forms of colorectal cancer in general surgical hospitals]. *Visnyk problem biologii ta medytsyny*, (4), 179-186. [In Ukrainian]. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2022-4-167-179-186>
- [8] Shevchenko, A. I. (Ed.). (2019). *TNM klasyfikatsiia zloiakisnykh pukhlyn* [TNM classification of malignant tumors]. Vinnytsia: Nova Knyha. [In Ukrainian].
- [9] GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*, 396(10258), 1204-1222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9)
- [10] Biondo, S., Gálvez, A., Ramírez, E., Frago, R., & Kreisler, E. (2019). Emergency surgery for obstructing and perforated colon cancer: patterns of recurrence and prognostic factors. *Techniques in coloproctology*, 23(12), 1141-1161. <https://doi.org/10.1007/s10151-019-02110-x>
- [11] Jesinghaus, M., Schmitt, M., Lang, C., Reiser, M., Scheiter, A., Konukiewitz, B., Steiger, K., Silva, M., Tschurtschenthaler, M., Lange, S., Foersch, S., Becker, K. F., Saur, D., Friess, H., Halfer, K., Engel, J., Boxberg, M., Pfarr, N., Wilhelm, D., & Weichert, W. (2021). Morphology Matters: A Critical Reappraisal of the Clinical Relevance of Morphologic Criteria From the 2019 WHO Classification in a Large Colorectal Cancer Cohort Comprising 1004 Cases. *The American journal of surgical pathology*, 45(7), 969-978. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001692>
- [12] Barresi, V., Reggiani Bonetti, L., Ieni, A., Caruso, R. A., & Tuccari, G. (2015). Histological grading in colorectal cancer: new insights and perspectives. *Histology and histopathology*, 30(9), 1059-1067. <https://doi.org/10.14670/HH-11-633>
- [13] 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>
- [14] Chen, K., Wang, H., Collins, G., Hollands, E., Law, I. Y. J., & Toh, J. W. T. (2022). Current Perspectives on the Importance of Pathological Features in Prognostication and Guidance of Adjuvant Chemotherapy in Colon Cancer. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 29(3), 1370-1389. <https://doi.org/10.3390/curroncol29030116>
- [15] Lang-Schwarz, C., Melcher, B., Haumaier, F., Schneider-Fuchs, A., Lang-Schwarz, K., Krugmann, J., Vieth, M., & Sterlacci, W. (2019). Budding, tumor-infiltrating lymphocytes, gland formation: scoring leads to new prognostic groups in World Health Organization low-grade colorectal cancer with impact on survival. *Human pathology*, 89, 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2019.04.006>

Використання стромально-васкулярної фракції жирової тканини при відновленні розривів дистального сухожилка двоголового м'яза плеча

М. С. Лісунов ^{*C,D}, М. Л. Головаха ^{A,E,F}, М. О. Кожем'яка ^{B,E}

Запорізький державний медичний університет, Україна

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

Ключові слова: стромально-васкулярна фракція жирової тканини, травми сухожилків, двоголовий м'яз плеча, хірургічне лікування.

Патологія. 2023.
Т. 20, № 1(57).
С. 50-57

*E-mail:
lisunovmykhaylo@gmail.
com

Розрив дистального сухожилка двоголового м'яза найчастіше діагностують у чоловіків працездатного віку, тому терміни лікування та рівень функціонального відновлення має важливе соціально-економічне значення. Сучасний науковий пошук здійснюють зокрема і для мінімізації кількості ускладнень, як-от повторних розривів. Науковий інтерес викликають сучасні технології, спрямовані на стимуляцію регенеративних процесів, а саме використання стромально-васкулярної фракції (СВФ) абдомінальної жирової тканини. У статті наведено результати практичного застосування СВФ під час хірургічного відновлення дистального сухожилка двоголового м'яза плеча.

Мета роботи – шляхом використання стромально-васкулярної фракції, що отримана з жирової тканини, покращити результати хірургічного лікування розриву дистального сухожилка двоголового м'яза плеча, скоротити терміни відновлення та зменшити питому вагу ускладнень.

Матеріали та методи. Дослідження здійснили шляхом оцінювання результатів хірургічного відновлення дистального сухожилка двоголового м'яза в 34 пацієнтів. Хворих поділили на 2 групи: з інтраопераційним введенням СВФ у місце рефіксації (група дослідження, n = 14) та без нього (група порівняння, n = 20). На контрольних оглядах через 3 дні, 2 і 6 тижнів, 3 місяці оцінили результати пацієнтів, застосувавши шкали VAS, DASH, а також визначили обсяг рухів в ураженому ліктьовому суглобі. Перед операцією та на контрольних оглядах виконали загальний аналіз крові (ЗАК), здійснили кількісне визначення С-реактивного білка.

Результати. Не зафіксували виникнення ускладнень, а також не виявили різницю за рівнем С-реактивного білка та ЗАК у пацієнтів обох груп у всі терміни дослідження. Визначили, що на 2 тижні оцінка за VAS у групі дослідження статистично значущо менша, а оцінка за DASH на контрольних оглядах на 2 і 6 тижні в цій групі статистично значущо краща. На контрольних оглядах через 2 і 6 тижнів встановили, що обсяг просупінаційних рухів у групі дослідження є більшим.

Висновки. Використання СВФ не призвело до виникнення післяопераційних ускладнень. Застосування СВФ сприяло зменшенню больового синдрому в перші два тижні післяопераційного періоду. Введення СВФ у ділянку рефіксації та навколишні тканини дало змогу скоротити терміни реабілітації внаслідок більш раннього відновлення просупінаційних рухів у перші 6 тижнів після оперативного лікування.

Key words: stromal vascular fraction, tendon injuries, biceps brachii muscle, surgical procedures.

Pathologia
2023; 20 (1), 50-57

Stromal-vascular fraction of adipose tissue using in the repair of distal biceps tendon tears

M. S. Lisunov, M. L. Holovakha, M. O. Kozhemiaka

Distal biceps tendon rupture is most commonly found in working-age men, making the treatment terms and functional recovery level of significant socio-economic importance. Modern scientific research aims to minimize the number of complications, particularly recurrent ruptures. Attention is drawn to modern technologies aimed at stimulating regenerative processes, including the use of the stromal vascular fraction (SVF) of abdominal adipose tissue. The article presents the results of the practical application of SVF in the surgical restoration of the distal biceps tendon of the shoulder.

The aim of the study: to improve the results of surgical treatment of distal biceps tendon rupture, shorten recovery times and reduce the incidence of complications using stromal vascular fraction obtained from adipose tissue.

Materials and methods. The study was carried out by evaluating the results of surgical restoration of the distal biceps tendon in 34 patients who were divided into 2 groups – with intraoperative introduction of SVF at the reattachment site (n = 14) and without it (n = 20). At follow-up examinations after 3 days, 2 weeks, 6 weeks, and 3 months, the results of the patients were evaluated using the VAS, DASH scales and the range of motion in the affected elbow joint was measured. In addition, a general blood analysis and quantitative determination of C-reactive protein were performed before the operation and at follow-up visits.

Results. There was no difference in the level of C-reactive protein and the general blood analysis score between patients in both groups at all study time points. It was found that after 2 weeks, the VAS score was significantly lower in the study group. The DASH score on follow-up examinations after 2 and 6 weeks was significantly better in the study group. Also, at follow-up examinations after 2 and 6 weeks, a greater volume of supination movements was observed in the study group.

Conclusions. The using of SVF did not lead to the development of postoperative complications. The using of SVF allowed the reduction of the recovery time and decreased in the incidence of complications, as well as improved functional outcomes.

Розрив дистального сухожилка двоголового м'яза діагностують із частотою 1,25 випадку на 100 000 пацієнтів за рік [1,3,4]. Найчастіше виникає у чоловіків середнього (найбільш працездатного) віку [2,5–7] за класифікацією ВООЗ [8]. Здебільшого відрив спричинений дегенеративно-дистрофічним ураженням дистального сухожилка двоголового м'яза в місці прикріплення до горбистості променевої кістки, виникає під час розгинання передпліччя під дією вантажу або внаслідок насильного перерозгинання в ліктьовому суглобі.

Відомо, що консервативне лікування призводить до неповного відновлення функції ліктьового суглоба, тому оперативне лікування є варіантом вибору для забезпечення повноцінного відновлення працездатності в найкоротші терміни. Чимало уваги приділяють вибору методу оперативного лікування, з-поміж них розрізняють анкерну фіксацію, фіксацію з використанням кортикального гудзикового фіксатора овальної форми, фіксацію інтерферентним гвинтом тощо. Втім, незалежно від методу, визначають певний відсоток ускладнень: втрату стабільності фіксатора, повторний розрив, гетеротопічну осифікацію, контрактуру ліктьового суглоба, ушкодження заднього міжкісткового нерва й інфекційні ускладнення [9,10].

Сучасний науковий пошук спрямований на мінімізацію кількості ускладнень і покращення функціональних результатів. Варто розрізняти ускладнення, що пов'язані з пацієнтом, та ускладнення, асоційовані з технікою оперативного втручання. Науковий пошук, спрямований на зменшення ускладнень, триває. Зокрема, вдосконалюють методики оперативного втручання [11,12], розробляють нові фіксатори, визначають безпечні в аспекті анатомії напрями свердлення [13], оцінюють вплив точки рефіксації на відновлення функції ліктьового суглоба. Питання щодо того, як вплинути на фактори, пов'язані з пацієнтом, залишається актуальним. Варто звернути увагу на втрату стабільності фіксаторів і повторні розриви дистального сухожилка двоголового м'яза.

Актуальними є сучасні технології, що спрямовані на стимуляцію регенеративних процесів у місці ушкодження, як-от використання стромально-васкулярної фракції жирової тканини (СВФ) і мезенхімальних стовбурових клітин у підтримці регенеративних процесів. Поліпотентні клітини, введені в місце ушкодження, під впливом біологічно активних речовин диференціюються в заданому напрямі та сприяють відновленню тканин із необхідними властивостями. Polly S. S. et al. довели, що вони експресують фактори росту, важливі для відновлення сухожилка. Експресія та продукція SDF-1 α мають виражений хемоатракційний ефект і спричиняють міграцію клітин. Сумісне культивування з теноцитами дало додаткові докази анаболічного впливу СВФ [14].

Джерелом таких клітин може бути кістковий мозок і жирова тканина. Процес отримання мезенхімальних стовбурових клітин із кісткового мозку більш інвазивний і складніший технічно, потребує селекції клітин *in vitro* та характеризується низькою кількістю мезенхімальних стовбурових клітин у субстраті. Отримання СВФ із жирової тканини технічно

простіше, має менші ризики виникнення ускладнень; концентрація мезенхімальних стовбурових клітин є достатньою, а процес є швидшим, супроводжується меншою кількістю технічних складнощів і потребує меншої кількості обладнання. За даними сучасних досліджень, фізіологічні властивості мезенхімальних стовбурових клітин, що одержані з кісткового мозку, та в СВФ жирової тканини є ідентичними [15]. За результатами дослідження, такі поліпотентні клітини, розміщені біля сухожилка, сприяють його відновленню, а це може скоротити тривалість регенерації, позитивно вплинути на відновлення структури та покращити його біомеханічні властивості [16].

Liang-Yu Lu et al. дослідили процес регенерації ротаторної манжети плеча кролів із використанням СВФ жирової тканини та без неї. За результатами дослідження, в місці рефіксації сухожилка в разі застосування СВФ визначили чотиришарову структуру, що включала сухожилок, волокнистий хрящ, кальцифікований хрящ і кісткову тканину. У контрольній групі місце рефіксації здебільшого складалося з колагенових волокон із незначною кількістю схожих на хондроцити клітин [16]. Крім того, в групі СВФ визначили переважання колагену саме I типу та посиленний синтез BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein), що також позитивно вплинуло на структуру місця прикріплення. Про це свідчать і результати оцінювання максимального навантаження та жорсткості місця рефіксації манжети, які досягали найбільших значень на 8 тижні після операції [16].

Під час аналізу результатів використання СВФ жирової тканини та мезенхімальних стовбурових клітин визначили, що певна кількість робіт присвячена їх використанню під час лікування розриву ахілового сухожилка, пошкодження ротаторної манжети, латерального й медіального епіконділітів, тендинопатії власної зв'язки надколінка тощо [17]. Показано перспективність і дієвість застосування СВФ у терапії ушкодження скелетно-м'язової системи, але в доступній фаховій літературі не виявили дослідження, що присвячені впливу мезенхімальних стовбурових клітин на відновлення пацієнтів із рефіксацією дистального сухожилка двоголового м'яза плеча.

Мета роботи

Шляхом використання стромально-васкулярної фракції, що отримана з жирової тканини, покращити результати хірургічного лікування розриву дистального сухожилка двоголового м'яза плеча, скоротити терміни відновлення та зменшити питому вагу ускладнень.

Матеріали і методи дослідження

У дослідженні взяли участь 34 пацієнти зі свіжим розривом дистального сухожилка двоголового м'яза плеча, з-поміж них 33 (97,05 %) чоловіки. Середній вік хворих становив 49,5 року (від 34 до 62 років). Критерії залучення – наявність свіжого (до 7 діб) відриву дистального сухожилка двоголового м'яза плеча, відсутність в анамнезі травм і захворювань травмованої верхньої кінцівки, що можуть впливати на її функцію.

Оперативне лікування та контрольні огляди здійснили на базі травматологічного відділення КНП «Запорізька обласна клінічна лікарня» ЗОР, травматологічного відділення ООО «КЛІНІКА МОТОР-СІЧ», ортопедо-травматологічного відділення з ліжками політравми КНП «Міська лікарня екстреної та швидкої медичної допомоги» ЗМР (м. Запоріжжя). Пацієнтів поінформували про участь у клінічному дослідженні, ознайомили з його дизайном; вони надали письмову інформовану згоду на участь.

Усі 34 пацієнти прооперовані за однаковою методикою – модифікованим способом фіксації дистального сухожилка двоголового м'яза з використанням кортикального гудзикового фіксатора овальної форми. Хворих поділили на дві групи: група порівняння – 20 пацієнтів, яким здійснили оперативне втручання без введення біологічно активних речовин у місце ушкодження; у групу дослідження залучили 14 осіб, яких оперували за такою самою хірургічною технікою, але з введенням СВФ у кукусу дистального сухожилка двоголового м'яза та в місце рефіксації. Пацієнтів проінформували щодо особливостей обох методів хірургічних втручань, можливих ускладнень, після цього вони самостійно обирали метод лікування.

Хірургічне втручання з використанням кортикального гудзикового фіксатора овальної форми здійснили модифікованим способом [18,19]. В обох групах застосували кортикальний гудзиковий фіксатор виробництва ТОВ «НВП ІНТРАМЕД-СЕРВІС», виготовлений зі сплаву титану BT-6, і шовний матеріал, що не розсмоктується #2 FiberWire Suture. У післяопераційному періоді в пацієнтів обох груп здійснили іммобілізацію косинковою пов'язкою терміном 2 тижні.

Обидві вибірки проаналізували за віком, статтю, ІМТ, періодом від виникнення травми до оперативного лікування. Встановили, що групи пацієнтів статистично не відрізняються за віком ($p = 0,74$), статтю ($p = 0,23$), ІМТ ($p = 0,50$) і терміном після травми ($p = 0,82$).

Діагноз розриву дистального сухожилка двоголового м'яза встановили клінічно: на підставі характерних скарг на біль у ліктьовому суглобі та дистальній третині плеча з порушенням функції (ослаблення згинання та супінації передпліччя, болісність під час виконання цих рухів), виникнення яких пов'язане з розгинанням передпліччя під впливом ваги або під час підняття вантажу. Об'єктивно в пацієнтів визначали позитивний hook-тест, пальпаторно виявили скорочення черевця двоголового м'яза в дистальній третині плеча та западання в місці анатомічного прикріплення дистального сухожилка. За необхідності здійснили УЗД або МРТ ліктьового суглоба, що дало підстави остаточно встановити діагноз.

СВФ одержали перед оперативним втручанням за методикою, що наведена нижче. Як донорську ділянку обрали передню черевну стінку. В умовах операційної здійснили інфільтрацію місця взяття розчином 100 мл 0,9 % NaCl, 5 мл 2 % розчину лідокаїну з додаванням 0,05 мг адреналіну гідрохлориду. Жирову тканину отримали методом мікроліпосакції. Для взяття застосували набір Microlyzer SVF Kit (виробник – T-Biotechnology Ltd.). Використовуючи шприц і довгу голку для ліпосакції, здійснили забір жирової

тканини; після цього матеріал помістили в пробірки, центрифугували при 2400 обертах впродовж 5 хвилин. Здійснили забір середньої фракції в шприц і шляхом повторного переміщення отриманого матеріалу через фільтр 100 мк виконали подрібнення фракції, цей субстрат повторно центрифугували. Здійснили забір найнижчої фракції за допомогою шприца 5,0 мл, яка й становила СВФ. Приблизний час отримання препарату відповідав початку оперативного втручання, аби мінімізувати період від приготування препарату до його введення – близько 20–30 хвилин.

До СВФ додавали отриману за класичною методикою [20] та збагачену тромбоцитами плазму (PRP) в об'ємі 2–4 мл. Цей препарат вводили в зону прикріплення й інфільтрували дистальну частину сухожилка двоголового м'яза плеча після виконання хірургічної рефіксації сухожилка.

Під час огляду через 3 дні, 2 і 6 тижнів, 3 місяці після втручання пацієнт оцінював свій больовий синдром, застосовуючи шкалу ВАШ [21]. На 3 день після операції пацієнту пропонували оцінити больовий синдром у спокої. На оглядах через 2 і 6 тижнів, 3 місяці після оперативного втручання оцінювали активні рухи в ліктьовому суглобі та больові відчуття за ВАШ. Звертали увагу на болісність пронації та супінації передпліччя, розгинання.

Оцінювання функціональних результатів здійснили за шкалою DASH через 3 дні, 2 і 6 тижнів після операції. Цей опитувальник включає 30 запитань щодо проблем у повсякденному житті, вираженості симптомів і соціальних обмежень, що зумовлені травмою верхньої кінцівки. Відповіді наводять у балах (від 1 до 5 для кожного запитання). Інтерпретують за 100-бальною шкалою, за допомогою якої можна кількісно оцінити обмеження життєвої активності через дисфункцію травмованої верхньої кінцівки (0 – немає обмежень, 100 – надзвичайно виражені обмеження) [22].

Крім того, для оцінювання функції ліктьового суглоба виміряли обсяг активних рухів, використавши гоніометр.

Для визначення можливого системного запалення в результаті впливу СВФ на організм пацієнта до операції, на 3 день, через 2 і 6 тижнів виконали загальний аналіз крові, а також кількісне визначення С-реактивного білка.

Статистичне опрацювання числових значень здійснили за допомогою програми Statistica 13.0 Tlco Software Inc. (ліцензія № Jpz8041382130ARCN10-J). Для аналізу оцінок за DASH і ВАШ (ординальний тип шкали) використали медіану та довірчий інтервал для медіани. Аналіз віку, терміну після травми до оперативного лікування, ІМТ, результатів аналізів крові та обсягу рухів (інтервальний тип шкали) здійснили за середнім арифметичним і стандартною похибкою. Під час аналізу оцінок за DASH, ВАШ, обсягу рухів і результатів аналізу крові (дві непов'язані сукупності з розподілом, що відрізнявся від нормального) використали методи непараметричної варіаційної статистики – U-критерій Манна-Вітні. Для порівняння вибірок за статтю пацієнтів застосували χ^2 -критерій Пірсона. Різницю між вибірками вважали достовірною, якщо значення $p < 0,05$.

Таблиця 1. Оцінки за шкалою ВАШ через 3 дні, 2 і 6 тижнів після оперативного втручання

Група	3 дні	2 тижні	6 тижнів
Група дослідження	4,0 (95 % CI = 4,0–5,0)	5,0 (95 % CI = 3,0–5,0)*	2,0 (95 % CI = 1,0–2,0)
Група контролю	5,0 (95 % CI = 5,0–6,0)	6,0 (95 % CI = 6,0–6,0)	2,0 (95 % CI = 1,0–2,0)

*: статистично значуща різниця для групи дослідження та порівняння, $p = 0,0006$.

Таблиця 2. Оцінки за шкалою DASH через 3 дні, 2 і 6 тижнів, 3 місяці після оперативного втручання

Група	3 дні	2 тижні	6 тижнів	3 місяці
Група дослідження	81,0 (95 % CI = 76,0–84,0)	48,0 (95 % CI = 40,0–50,0)* ($p = 0,0043$)	28,0 (95 % CI = 23,0–32,0)* ($p = 0,0086$)	20,5 (95 % CI = 17,0–24,0)
Група порівняння	78,0 (95 % CI = 74,0–80,0)	54,0 (95 % CI = 53,0–55,0)	33,0 (95 % CI = 31,0–34,0)	22,5 (95 % CI = 21,0–24,0)

*: позначено статистично значуща різниця для групи дослідження та порівняння.

Таблиця 3. Результати вимірювання обсягу рухів на контрольних оглядах у групі використання СВФ і в групі контролю

Показник	3 день		2 тижні		6 тижнів	
	СВФ	Контроль	СВФ	Контроль	СВФ	Контроль
Згинання	98,50 ± 1,93° $p = 0,411$	101,00 ± 1,87°	85,79 ± 1,71° $p = 0,382$	87,70 ± 1,35°	58,00 ± 2,27° $p = 0,637$	56,25 ± 2,13°
Розгинання	128,14 ± 1,52° $p = 0,806$	127,05 ± 1,89°	142,36 ± 1,28° $p = 0,637$	143,55 ± 1,36°	172,43 ± 0,98° $p = 0,861$	172,75 ± 1,03°
Супінація	34,71 ± 0,97° $p = 0,944$	34,90 ± 0,63°	55,64 ± 0,64° $p = 0,041^*$	53,5 ± 0,62°	76,14 ± 1,05° $p = 0,037^*$	73,00 ± 0,91°
Пронація	34,50 ± 1,05° $p = 0,726$	35,05 ± 0,74°	56,21 ± 0,97° $p = 0,044^*$	53,25 ± 0,82°	76,78 ± 0,98° $p = 0,003^*$	73,10 ± 0,54°

*: статистично значуща різниця.

Результати

Усі хірургічні втручання здійснили в період 3–7 день після травми. У ранньому післяопераційному періоді ускладнення не зафіксували. За результатами загального аналізу крові, в пацієнтів обох груп визначали підвищення вмісту лейкоцитів у крові на 3 доби після операції, але без перевищення референтних значень. Патологічний зсув лейкоцитарної формули вліво в пацієнтів групи дослідження та групи контролю не виявили. У всіх хворих до втручання показники С-реактивного білка – в межах референтних значень: $1,70 \pm 0,17$ мг/л і $1,89 \pm 0,14$ мг/л у групі використання СВФ і групі контролю відповідно ($p = 0,46$).

Надалі спостерігали підвищення рівня С-реактивного білка у відповідь на оперативне втручання, але на жодному з контрольних досліджень не встановили статистично значущу різницю в групі використання СВФ і групі порівняння: на третій день після показники становили $49,40 \pm 3,02$ мг/мл і $50,20 \pm 1,73$ мг/мл ($p = 0,90$), через 2 тижні після операції – $16,80 \pm 1,38$ мг/мл і $18,87 \pm 1,25$ мг/мл ($p = 0,51$), через 6 тижнів – $6,00 \pm 1,01$ мг/мл і $7,30 \pm 0,77$ мг/мл ($p = 0,19$) у групі застосування СВФ і групі порівняння відповідно. Не діагностували інфекційні ускладнення в пацієнтів обох груп. Ускладнення, що пов'язані із втратою стабільності фіксатора, не виявили.

Медіана оцінки за ВАШ у групі дослідження через 3 дні після втручання становила 4,0 (95 % CI = 4,0–5,0) бала, у групі контролю – 5,0 (95 % CI = 5,0–6,0), що статистично вірогідно не відрізняється ($p = 0,146$) (табл. 1). Медіана оцінки за ВАШ у групі дослідження через 2 тижні після втручання дорівнювала 5,0 (95 % CI = 3,0–5,0) бала. Це статистично значущо менше ($p = 0,0006$), ніж показник у групі порівняння, де меді-

ана оцінок за ВАШ становила 6,0 (95 % CI = 6,0–6,0) бала. Через 6 тижнів після операції медіана оцінки за ВАШ у групі дослідження становила 2,0 (95 % CI = 1,0–2,0) бала, в групі контролю – 2,0 (95 % CI = 1,0–2,0) бала ($p = 0,41$) (рис. 1).

Медіана оцінок за шкалою DASH у групі з використанням СВФ і групі контролю через 3 доби після втручання становила 81,0 (95 % CI = 76,0–84,0) та 78,0 (95 % CI = 74,0–80,0) відповідно; статистично значуща різниця не виявлена ($p = 0,05$) (табл. 2, рис. 2). Результати під час огляду через 2 тижні після операції статистично значущо кращі в групі застосування СВФ: 48,0 (95 % CI = 40,0–50,0) проти 54,0 (95 % CI = 53,0–55,0) у групі контролю ($p = 0,0043$) (рис. 3). Обстеження на 6 тижні після операції також показало кращий результат у групі дослідження – 28,0 (95 % CI = 23,0–32,0), ніж у групі контролю – 33,0 (95 % CI = 31,0–34,0) ($p = 0,0086$) (рис. 4). Контрольний огляд через 3 місяці після оперативного втручання не виявив статистично значущі відмінності між групою, де використовували СВФ, і групі контролю ($p = 0,156$). Медіана оцінок за групами становила 20,5 (95 % CI = 17,0–24,0) та 22,5 (95 % CI = 21,0–24,0) відповідно (рис. 5).

На контрольному огляді через 2 тижні після оперативного лікування аналіз обсягу рухів у ліктьовому суглобі оперованої кінцівки показав статистично значущу різницю за показником супінації між групою, де застосовували СВФ, і групою порівняння (табл. 3). Обсяг супінації становив $55,64 \pm 0,64^\circ$ і $53,50 \pm 0,62^\circ$ відповідно ($p = 0,041$); на огляді через 6 тижнів – $76,14 \pm 1,05^\circ$ і $73,00 \pm 0,91^\circ$ відповідно ($p = 0,037$). На контрольному огляді через 2 тижні встановили також статистично вірогідну різницю для пронації, що становила $56,21 \pm 0,97^\circ$ для групи СВФ і $53,25 \pm 0,82^\circ$ для групи порівняння ($p = 0,044$). Через 6 тижнів обсяг

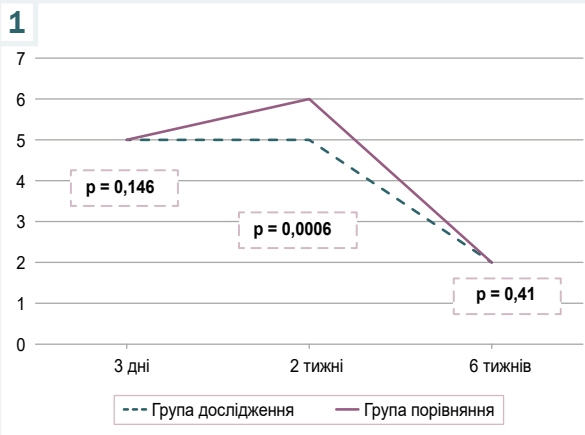


Рис. 1. Оцінки за шкалою ВАШ через 3 дні, 2 і 6 тижнів після оперативного втручання, наведено медіану оцінок та значення p для U-критерію Манна-Вітні. Вісь x : термін контрольного огляду; вісь y : оцінка за ВАШ; пунктирна: 1 група, суцільна крива: 2 група.

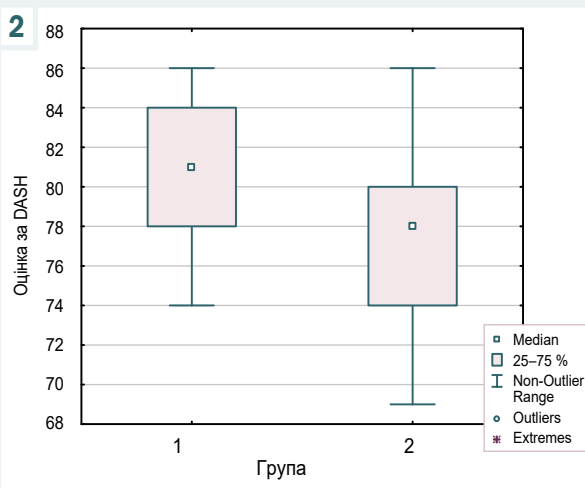
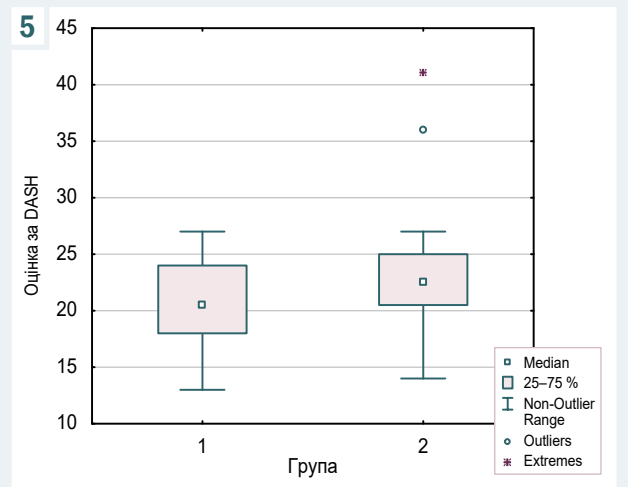
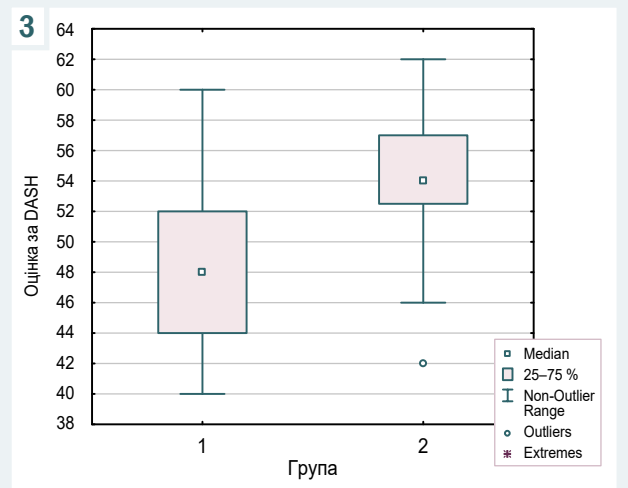
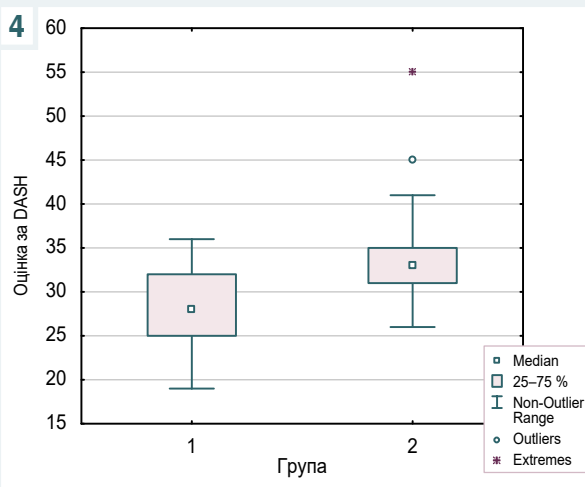


Рис. 2. Оцінки за шкалою DASH через 3 дні після оперативного втручання, наведено медіану оцінок та значення p за U-критерієм Манна-Вітні. Вісь X : група дослідження (1 – група з використанням СВФ; 2 – контрольна група), вісь Y : оцінка за DASH.

Рис. 3. Оцінки за шкалою DASH через 2 тижні після оперативного втручання, наведено медіану оцінок і значення p за U-критерієм Манна-Вітні. Вісь X : група дослідження (1 – група з використанням СВФ; 2 – контрольна група), вісь Y : оцінка за DASH.

Рис. 4. Оцінки за шкалою DASH через 6 тижнів після оперативного втручання, наведено медіану оцінок і значення p за U-критерієм Манна-Вітні. Вісь X : група дослідження (1 – група з використанням СВФ; 2 – контрольна група), вісь Y : оцінка за DASH.

Рис. 5. Оцінки за шкалою DASH через 3 місяці після оперативного втручання, наведено медіани оцінок та значення p за U-критерієм Манна-Вітні. Вісь X : група дослідження (1 – група з використанням СВФ; 2 – контрольна група), вісь Y : оцінка за DASH.



пронації становив $76,78 \pm 0,98^\circ$ і $73,10 \pm 0,54^\circ$ для груп 1 і 2 відповідно ($p = 0,003$). Для згинання та розгинання не визначили статистично значущу різницю на всіх контрольних оглядах (рис. 6).

Обговорення

Основні проблеми після рефіксації сухожилка двоголового м'яза плеча виникають у післяопераційному періоді під час реабілітації та повернення пацієнта до

повноцінного життя. За даними J. W. Hinchey et al., повторний розрив найчастіше виникає в перші три тижні після оперативного лікування [23]. Зазначимо, що мета рефіксації – створити умови для відновлення анатомічної цілісності дистального сухожилка двоголового м'яза в місці його прикріплення. У дослідженні C. C. Schmidt et al. післяопераційні МРТ-сканування показали, що морфологія дистального сухожилка двоголового м'яза плеча не повертається до непошкодженого стану [24]. Через дегенеративні зміни в

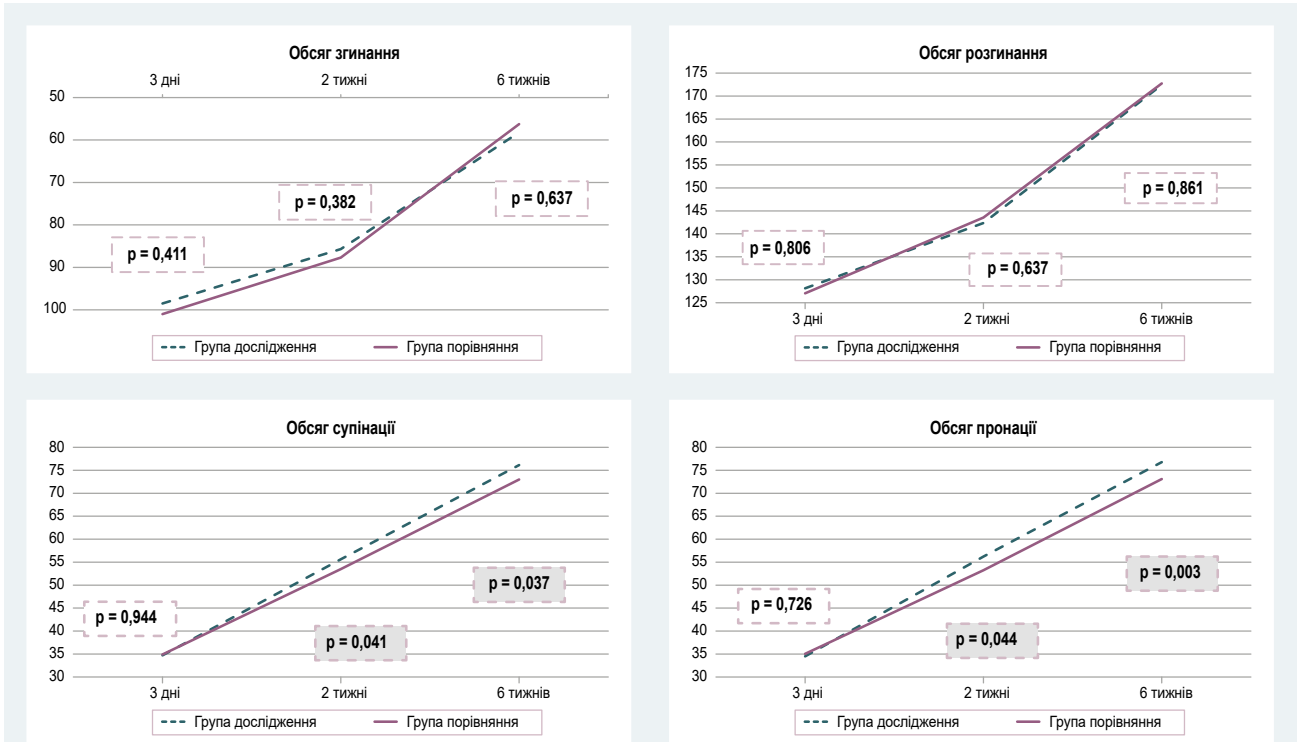


Рис 6. Результати вимірювання обсягу рухів на контрольних оглядах в групі використання СВФ та в групі контролю.

Групи порівняння, для яких є статистично значуща різниця, позначені сірим кольором.

місці ушкодження у певній кількості пацієнтів процес прирощення сухожилка сповільнюється, в місці прикріплення він не відновлює свою нормальну структуру та біомеханічні властивості. Тому міцність прикріплення є недостатньою для фізіологічних навантажень, і це може спричинити втрату стабільності фіксації та повторний розрив [25].

Використання СВФ стає все поширенішим у косметології та пластичній хірургії. Мезенхімальні клітини дають змогу стимулювати процеси регенерації майже в будь-якій тканині. Під час дослідження здійснили попередній аналіз локального та системного впливу СВФ на організм людини. Не визначили патологічні зміни в загальному аналізі крові, встановили зівставні рівні С-реактивного білка в обох групах у відповідь на оперативне втручання. Це свідчить про відсутність системного впливу стромально-васкулярної фракції на організм людини, а також відсутність гіперергічної відповіді та локального запалення в місці введення препарату. Втім, ці питання потребують детальнішого вивчення.

Аналіз больового синдрому в післяопераційному періоді показав: у групі, де пацієнтам вводили СВФ, була менша інтенсивність больового синдрому на контрольному огляді через 2 тижні після втручання. Можна припустити, що завдяки скороченню тривалості перебігу деяких ланок запального процесу спостерігали зменшення тривалості гострого больового синдрому в ранньому післяопераційному періоді. Вплив біологічно активних речовин, що містить СВФ, можливо, сприяв зниженню інтенсивності больового синдрому. Необхідно враховувати, що мезенхімальні

клітини експресують фактори росту, важливі для відновлення сухожилка (експресія та продукція SDF-1 α має виражений хемоатракційний ефект і спричиняє міграцію клітин, а сумісне культивування з теночитами дало додаткові докази анаболічного впливу SVF) [26]. Проте прирощення сухожилка здійснюється не завдяки колагеновим волокнам, а через формування сполучної тканини з повноцінною структурою: сухожилок, волокнистий хрящ, кальцифікований хрящ і кістка [16]. Тому стимулювання росту сполучної тканини також позитивно впливає на терміни запальної реакції в місці ушкодження та функціональний результат.

Проаналізувавши функціональні результати, значимо, що пацієнти з групи дослідження внаслідок меншого больового синдрому могли досягти більших успіхів під час реабілітації. Це підтверджують вищі бали за шкалою оцінювання DASH на 2 і 6 тижнях після оперативного втручання. У попередніх дослідженнях визначили скорочення тривалості локальних запальних реакцій та інтеграції сухожилка внаслідок диференціації мезенхімальних стовбурових клітин, перичитів у напрямі сухожилкової тканини з повноцінною структурою, що призводило до меншого формування безструктурної сполучної тканини в місці ушкодження та навколишніх тканинах [16]. Можливо, це позитивно вплинуло на обсяг рухів після операції. Під час гоніометрії на 2 і 6 тижнях після операції амплітуда супінації та пронації в групі використання СВФ статистично значущо вища, ніж у групі контролю. Оскільки анатомічно сухожилок двоголового м'яза кріпиться за задньо-медіальною поверхнею шийки променевої кістки, тобто фактично у проміжку між ліктьовою та променевою

кістками, будь-які патологічні розростання сполучної тканини призводитимуть до обмеження ротаційних рухів, що спричинятимуть зменшення обсягу супінації, пронації та функції ліктьового суглоба загалом. Проте застосування СВФ не спричинило розвиток спайкового процесу й обмеження рухів.

До обмежень цієї роботи належить оцінювання характеру місцевого запального процесу в місці введення СВФ за неспецифічними показниками: загальним аналізом крові, ШОЕ, СРБ. Зазначимо також, що безпосередньо не аналізували процес регенерації сухожилка. Ці обмеження будуть враховані в наступних дослідженнях.

Висновки

1. Використання СВФ з абдомінальної жирової тканини під час рефіксації дистального сухожилка двоголового м'яза плеча не призвело до виникнення післяопераційних ускладнень.

2. Використання СВФ під час рефіксації дистального сухожилка двоголового м'яза плеча сприяло зменшенню больового синдрому в перші 2 тижні післяопераційного періоду.

3. Введення СВФ у ділянку рефіксації дистального сухожилка двоголового м'яза та навколишні тканини сприяло скороченню термінів реабілітації внаслідок більш раннього відновлення просупінаційних рухів у перші 6 тижнів після оперативного лікування.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні гістологічних і патофізіологічних особливостей впливу СВФ на сухожилки і кістку у місці прикріплення, детальному дослідженні структури сухожилка в місці рефіксації, визначенні впливу СВФ на кількість і вид ускладнень після оперативного лікування тощо.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 07.02.2023

Після доопрацювання / Revised: 06.03.2023

Прийнято до друку / Accepted: 14.03.2023

Відомості про авторів:

Лісунов М. С., старший лаборант каф. травматології та ортопедії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-4796-6019

Головаха М. Л., д-р мед. наук, професор, зав. каф. травматології та ортопедії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-2835-9333

Кожем'яка М. О., канд. мед. наук, доцент каф. травматології та ортопедії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-3700-6436

Information about authors:

Lisunov M. S., Senior laboratory technician of the Department of Orthopedics and Traumatology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Holovakha M. L., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Orthopedics and Traumatology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Kozhemiaka M. O., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Traumatology and Orthopedics, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

References

- Matzon, J. L., Graham, J. G., Penna, S., Ciccotti, M. G., Abboud, J. A., Lutsky, K. F., & Beredjikian, P. K. (2019). A Prospective Evaluation of Early Postoperative Complications After Distal Biceps Tendon Repairs. *The Journal of hand surgery*, 44(5), 382-386. <https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2018.10.009>
- Launonen, A. P., Huttunen, T. T., Lepola, V., Niemi, S. T., Kannus, P., Felländer-Tsai, L., Berg, H. E., Laitinen, M. K., & Mattila, V. M. (2020). Distal Biceps Tendon Rupture Surgery: Changing Incidence in Finnish and Swedish Men Between 1997 and 2016. *The Journal of hand surgery*, 45(11), 1022-1028. <https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2020.07.024>
- Luokkala, T., Sidharthan, S. K., Karjalainen, T. V., Paloneva, J., & Watts, A. C. (2022). Distal biceps tendon repairs and reconstructions-an analysis of demographics, prodromal symptoms and complications. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 142(7), 1351-1357. <https://doi.org/10.1007/s00402-021-03750-1>
- Caekebeke, P., Duerinckx, J., & van Riet, R. (2021). Acute complete and partial distal biceps tendon ruptures: what have we learned? A review. *EFORT open reviews*, 6(10), 956-965. <https://doi.org/10.1302/2058-5241.6.200145>
- Huynh, T., Leiter, J., MacDonald, P. B., Dubberley, J., Stranges, G., Old, J., & Marsh, J. (2019). Outcomes and Complications After Repair of Complete Distal Biceps Tendon Rupture with the Cortical Button Technique. *JB & JS open access*, 4(3), e0013.1-6. <https://doi.org/10.2106/JBJS.OA.19.00013>
- Nicolay, R. W., Lawton, C. D., Selley, R. S., Johnson, D. J., Vassa, R. R., Prescott, A. E., Omar, I. M., & Marra, G. (2020). Partial rupture of the distal biceps brachii tendon: a magnetic resonance imaging analysis. *Journal of shoulder and elbow surgery*, 29(9), 1859-1868. <https://doi.org/10.1016/j.jse.2020.04.021>
- Oyadomari, S., Kaplan, J., Johnston, T., & Wang, D. (2023). Trends and complications of distal biceps tendon repair among American Board of Orthopaedic Surgery part II oral examination candidates. *Journal of shoulder and elbow surgery*, 32(2), 348-352. <https://doi.org/10.1016/j.jse.2022.09.014>
- Dyussenbayev, A. (2017). Age Periods of Human Life. *Advances in Social Sciences Research Journal*, 4(6). <https://doi.org/10.14738/assrj.46.2924>
- Amarasooriya, M., Bain, G. I., Roper, T., Bryant, K., Iqbal, K., & Phadnis, J. (2020). Complications After Distal Biceps Tendon Repair: A Systematic Review. *The American journal of sports medicine*, 48(12), 3103-3111. <https://doi.org/10.1177/0363546519899933>
- Litowski, M. L., Purnell, J., Hildebrand, K. A., & Bois, A. J. (2020). Surgical outcomes and complications following distal biceps tendon reconstruction: a systematic review and meta-analysis. *JSES international*, 5(1), 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.jseint.2020.09.010>
- Caekebeke, P., Duerinckx, J., Bellemans, J., & van Riet, R. (2020). A new intramedullary fixation method for distal biceps tendon ruptures: a biomechanical study. *Journal of shoulder and elbow surgery*, 29(10), 2002-2006. <https://doi.org/10.1016/j.jse.2020.01.102>
- Colantonio, D. F., Le, A. H., Keeling, L. E., Slaven, S. E., Vipra, T. K., Helgeson, M. D., & Chang, E. S. (2022). Intramedullary Unicortical Button and All-Suture Anchors Provide Similar Maximum Strength for Onlay Distal Biceps Tendon Repair. *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery*, 38(2), 287-294. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2021.06.036>
- Becker, D., Lopez-Marambio, F. A., Hammer, N., & Kieser, D. (2019). How to Avoid Posterior Interosseous Nerve Injury During Single-Incision Distal Biceps Repair Drilling. *Clinical orthopaedics and related research*, 477(2), 424-431. <https://doi.org/10.1097/CORR.0000000000000534>
- Polly, S. S., Nichols, A. E. C., Donnini, E., Inman, D. J., Scott, T. J., Apple, S. M., Werre, S. R., & Dahlgren, L. A. (2019). Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction and Cultured Stromal Cells as Trophic Mediators for Tendon Healing. *Journal of orthopaedic research*, 37(6), 1429-1439. <https://doi.org/10.1002/jor.24307>
- Mazini, L., Rochette, L., Amine, M., & Malka, G. (2019). Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs). Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2523. <https://doi.org/10.3390/ijms20102523>
- Lu, L. Y., Ma, M., Cai, J. F., Yuan, F., Zhou, W., Luo, S. L., Pan, Z. Y., Zeng, W., Zhong, N., & Yin, F. (2018). Effects of Local Application of Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction on Tendon-Bone Healing after Rotator Cuff Tear in Rabbits. *Chinese medical journal*, 131(21), 2620-2622. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.244120>
- Trebinjac, S., & Gharairi, M. (2020). Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Tendon and Ligament Injuries-clinical Evidence. *Medical*

- archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)*, 74(5), 387-390. <https://doi.org/10.5455/medarh.2020.74.387-390>
- [18] Holovakha, M. L., Kozhemiaka, M. O., Lisunov, M. S., & Bohdan, O. V. (2020). Sposib fiksatsii dystalnogo sukhozhyka bitepsa pry yoho rozryvi [Method of fixation of the distal biceps tendon rupture]. Ukraine Patent UA 144648. State Enterprise "Ukrainian Institute of Intellectual Property". [in Ukrainian]. <https://sis.ukrpatent.org/uk/search/detail/1458389/>
- [19] Lisunov, M. S., Holovakha, M. L., & Kozhemiaka, M. O. (2022). Rezultaty khirurhichnoho likuvannia rozryvu dystalnogo sukhozhyka dvoholovoho miaza plecha [Results of surgical treatment of distal biceps tendon ruptures]. *Zaporozhye medical journal*, 24(6), 714-720. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2022.6.261148>
- [20] Hausauer, A. K. (2021). Platelet-Rich Plasma Preparation Methodologies. In *Platelet-Rich Plasma in Dermatologic Practice* (pp. 13-25). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-66230-1_2
- [21] Sung, Y. T., & Wu, J. S. (2018). The Visual Analogue Scale for Rating, Ranking and Paired-Comparison (VAS-RRP): A new technique for psychological measurement. *Behavior research methods*, 50(4), 1694-1715. <https://doi.org/10.3758/s13428-018-1041-8>
- [22] Hammond, A., Prior, Y., & Tyson, S. (2018). Linguistic validation, validity and reliability of the British English versions of the Disabilities of the Arm, Shoulder and Hand (DASH) questionnaire and QuickDASH in people with rheumatoid arthritis. *BMC musculoskeletal disorders*, 19(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s12891-018-2032-8>
- [23] Hinchey, J. W., Aronowitz, J. G., Sanchez-Sotelo, J., & Morrey, B. F. (2014). Re-rupture rate of primarily repaired distal biceps tendon injuries. *Journal of shoulder and elbow surgery*, 23(6), 850-854. <https://doi.org/10.1016/j.jse.2014.02.006>
- [24] Schmidt, C. C., Diaz, V. A., Weir, D. M., Latona, C. R., & Miller, M. C. (2012). Repaired distal biceps magnetic resonance imaging anatomy compared with outcome. *Journal of shoulder and elbow surgery*, 21(12), 1623-1631. <https://doi.org/10.1016/j.jse.2012.03.009>
- [25] Koch, S., & Tillmann, B. (1995). The distal tendon of the biceps brachii. Structure and clinical correlations. *Annals of Anatomy*, 177(5), 467-474. [https://doi.org/10.1016/S0940-9602\(11\)80155-X](https://doi.org/10.1016/S0940-9602(11)80155-X)
- [26] Behfar, M., Javanmardi, S., & Sarrafzadeh-Rezaei, F. (2014). Comparative study on functional effects of allotransplantation of Bone Marrow stromal cells and adipose derived stromal vascular fraction on tendon repair: A biomechanical study in rabbits. *Cell Journal*, 16(3), 263-270.

Dynamics of prostaglandin E₂ in the surgical treatment of gastroesophageal reflux disease

Ye. I. Haidarzhii *

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

Key words:gastroesophageal reflux disease, hiatal hernia, prostaglandin E₂.**Pathologia**

2023; 20 (1), 58-62

***E-mail:**

eig1981@yahoo.com

Gastroesophageal reflux disease (GERD) is one of the most common gastroenterological diseases. Therefore, the issues of diagnosis and the most effective treatment of GERD are extremely relevant. Achieving a stable positive result of treatment is impossible without taking into account the pathogenetic mechanisms of the development of GERD. Particularly relevant are the little-studied issues of the influence of humoral factors on the development of GERD in the course of treatment. One of the interesting biologically active substances is prostaglandin E₂, the possible involvement of which in the mechanisms of the development of GERD is insufficiently reported.

The aim of the study is to evaluate the effect of antireflux surgery on the level of prostaglandin E₂ in blood serum and to verify that its changes after surgical treatment are associated with the decrease of gastroesophageal reflux and esophageal inflammation.

Materials and methods. 35 patients were examined with GERD who underwent laparoscopic total antireflux fundoplication. There were 26 women (74.3 %) and 9 men (25.7 %). Their age is 55.3 ± 11.3. The control group consisted of 20 practically healthy people (women – 14 (70.0 %), men – 6 (30.0 %), average age – 56.7 ± 10.6).

Immunoenzymatic analysis of prostaglandin E₂ was performed in blood plasma, which was obtained according to a standard method. Determination of prostaglandin E₂ (Prostaglandin E₂ ELISA, KGE004B, RnD Systems) was carried out by the immunoenzymatic method based on the use of the "sandwich" variant of the solid-phase immunoenzymatic analysis. The procedure was carried out on the immunoenzyme complex ImmunoChem-2100 (USA) at the Department of Clinical Laboratory Diagnostics in Zaporizhzhia State Medical University. Research on the level of prostaglandin E₂ in the main group was carried out before surgical treatment and 2–3 months after surgery by taking venous blood and using the above test systems. Statistical evaluation of the research results was performed using the Statistica for Windows 13 software package (StatSoft Inc., No. JPZ804I382130ARCN10-J).

Results. The level of prostaglandin E₂ in the blood of practically healthy people was 16.7 ± 6.1 pg/ml. In the main group, the values of prostaglandin E₂ before surgical treatment were 25.8 ± 5.7 pg/ml, after surgical treatment, they decreased to 13.5 ± 5.3 pg/ml. The detailed analysis of patients in the main group showed that the level of prostaglandin E₂ did not differ statistically in different erosive forms of esophagitis, or CLE and NERD. But it is statistically different from the level of prostaglandin E₂ in practically healthy individuals of the control group. The conducted correlation analysis indicated that the level of prostaglandin E₂ did not depend on the duration of acid exposure in the esophagus, as well as on the severity of esophagitis or the presence of CLE.

Conclusions. With effective surgical treatment of gastroesophageal reflux disease, a decrease in the level of prostaglandin E₂ after surgery is determined compared to preoperative data to the level obtained in a group of practically healthy patients. The obtained dynamics of the level of prostaglandin E₂ indicates the possibility of this hormone influencing the tone of the lower esophageal sphincter and active participation in the pathogenesis of GERD, which confirms the possibility of its use as an additional diagnostic marker of inflammation in the esophagus and a marker of the effectiveness of surgical treatment.

Ключові слова:гастроезофагеальна рефлюксна хвороба, грижа стравохідного отвору діафрагми, простагландин E₂.**Патологія. 2023.**

Т. 20, № 1(57).

С. 58-62

Динаміка простагландину E₂ при хірургічному лікуванні гастроезофагеальної рефлюксної хвороби

Є. І. Гайдаржі

Гастроезофагеальна рефлюксна хвороба (ГЕРХ) – одне з найпоширеніших гастроентерологічних захворювань. Тому питання щодо діагностики та найбільш ефективного лікування ГЕРХ мають неабияку актуальність. Досягнення стійкого позитивного результату лікування не можливе без урахування патогенетичних механізмів виникнення ГЕРХ. Особливо актуальними є недостатньо вивчені питання щодо впливу гуморальних факторів на виникнення ГЕРХ у процесі лікування. Одна з цікавих біологічно активних речовин – простагландин E₂, можлива участь якого в механізмах виникнення ГЕРХ досліджена недостатньо.

Мета роботи – оцінити вплив антирефлюксної операції на рівень простагландину E₂ в сироватці крові та переконатися, що його зміни після хірургічного лікування пов'язані зі зменшенням гастроезофагеального рефлюксу та запалення стравоходу.

Матеріали та методи. Обстежили 35 пацієнтів із ГЕРХ, яким виконали лапароскопічну тотальну антирефлюксну фундоплакцію (26 (74,3 %) жінок, 9 (25,7 %) чоловіків). Вік пацієнтів становив 55,3 ± 11,3 року. В контрольну групу залучили 20 практично здорових осіб (14 (70,0 %) жінок, 6 (30,0 %) чоловіків), середній вік – 56,7 ± 10,6 року.

Імуноферментне дослідження простагландину E₂ здійснили в плазмі крові, яку одержали за стандартною методикою. Простагландин E₂ (Prostaglandin E₂ ELISA, KGE004B, RnD Systems) визначили імуноферментним методом, що базується на використанні «сендвіч»-варіанта твердофазного імуноферментного аналізу. Процедуру здійснили на імуноферментному комплексі ImmunoChem-2100 (США) на кафедрі клінічної лабораторної діагностики Запорізького державного

медичного університету. Дослідження рівня простагландину E_2 в основній групі здійснили до оперативного лікування та через 2–3 місяці після операції шляхом забору венозної крові та використання названих тест-систем. Статистично результати дослідження оцінили, застосувавши програмний пакет Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., ліцензія № JPZ8041382130ARCN10-J).

Результати. У практично здорових осіб рівень простагландину E_2 у крові становив $16,7 \pm 6,1$ пг/мл. В основній групі значення простагландину E_2 до хірургічного лікування дорівнювали $25,8 \pm 5,7$ пг/мл, після нього знизилися до $13,5 \pm 5,3$ пг/мл. Детальний аналіз структури основної групи показав, що рівень простагландину E_2 статистично не відрізнявся в пацієнтів із різними ерозивними формами езофагіту, CLE і неерозивною рефлюксною хворобою. Статистично вірогідну різницю визначили щодо рівня простагландину E_2 у практично здорових осіб контрольної групи. Кореляційний аналіз показав, що рівень простагландину E_2 не залежить від тривалості кислотної експозиції в стравоході, а також від ступеня тяжкості езофагіту чи наявності CLE.

Висновки. У разі ефективного хірургічного лікування гастроєзофагеальної рефлюксної хвороби спостерігали зниження рівня простагландину E_2 після операції порівняно з доопераційними даними до рівня, що встановили в групі практично здорових пацієнтів. Така динаміка рівня простагландину E_2 вказує на можливий вплив цього гормону на тонус нижнього стравохідного сфінктера й активну участь у патогенезі ГЕРХ. Отже, можливе його використання як додаткового діагностичного маркера запалення в стравоході та маркера ефективності хірургічного лікування.

Gastroesophageal reflux disease (GERD) is one of the most common gastroenterological diseases [13,17]. The number of patients in the population today is rapidly increasing [15,16]. In this regard, the issues of diagnosis and the most effective treatment of GERD remain relevant [14,18,21]. Achieving a stable positive result of treatment is impossible without taking into account the pathobiochemical and pathophysiological mechanisms of GERD, the study of which is increasingly attracting the attention of specialists both among therapists and surgeons [2,3,19,20]. Particularly relevant are the little-studied issues of the influence of humoral factors and their dynamics on the development of GERD during treatment [1,5,8,10,12]. One of the biologically active substances of interest is prostaglandin E_2 , the possible involvement of which in the mechanisms of GERD development is reported in separate works [4,6–8,11]. However, the available data are based on an insufficient number of studies and require further study of the pathogenetic role of prostaglandin E_2 in patients with GERD.

Aim

To evaluate the effect of antireflux surgery on the level of prostaglandin E_2 in the blood serum and to verify that its changes after surgical treatment are associated with the decrease of gastroesophageal reflux and esophageal inflammation.

Materials and methods

We examined 35 patients who underwent laparoscopic total fundoplication in the Short Floppy Nissen modification. There were 26 women (74.3 %) and men – 9 (25.7 %). Their age is 55.3 ± 11.3 . The control group consisted of 20 practically healthy individuals (women – 14 (70.0 %), men – 6 (30.0 %), mean age – 56.7 ± 10.6). The groups of sick and healthy individuals did not differ in sex ($p = 0.73$) and age ($p = 0.70$). The diagnosis of GERD was confirmed on the basis of the results obtained from the clinical manifestations analysis using valid questionnaires, video esophagogastroduodenoscopy with a lower third mucous membrane biopsy of the esophagus, and daily pH-impedance-metry. Immunoenzymatic analysis of prostaglandin E_2 was performed in blood plasma, which

was obtained according to a standard method. Previously studied samples were stored in a low-temperature freezer at a temperature of 80 C0. Determination of prostaglandin E_2 (Prostaglandin E2 ELISA, KGE004B, RnD Systems) was carried out by the immunoenzymatic method based on the use of the “sandwich” variant of the solid-phase immunoenzymatic analysis. The detection of the studied marker was carried out according to a standard procedure using the ImmunoChem-2100 immunoenzymatic complex (USA) at the Department of Clinical Laboratory Diagnostics in Zaporizhzhia State Medical University. The concentration of experimental indicators was expressed in pg/ml [22].

The criteria for inclusion in the study were confirmed GERD, consent to surgical treatment, and the absence of general contraindications to surgery. Exclusion criteria were the absence of GERD, other chronic gastroenterological diseases in the stage of exacerbation, acute surgical pathology, and refusal of operative treatment. The levels of prostaglandin E_2 in the main group were tested before surgery and 2–3 months after surgery by taking venous blood and using the above test systems. Statistical evaluation of the research results was carried out using the Statistica for Windows 13 software package (StatSoft Inc., No. JPZ8041382130ARCN10-J)

The obtained results are presented in the form of arithmetic mean and mean square deviation $M \pm s$. Differences between groups were assessed using non-parametric methods using the Mann–Whitney test, the Kruskal–Wallis test, the Wilcoxon test, Spearman’s non-parametric method, as well as with the help of the “Differential tests” submodule in the “Basic statistics and tables” module. Differences at $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

The analysis of the obtained results showed that in practically healthy people the level of prostaglandin E_2 in the blood was 16.7 ± 6.1 pg/ml. In the main group, the values of prostaglandin E_2 before surgical treatment were 25.8 ± 5.7 pg/ml, which is statistically higher compared to the control group ($p < 0.05$) (Table 1). After the surgical treatment, the level of prostaglandin E_2 in the blood of the studied patients decreased to 13.5 ± 5.3 pg/ml and signi-

Table 1. The level of prostaglandin E₂ in the groups of patients under study

Parameter, units of measurement	Control group (n = 20)	1 group (n = 35) GERD	
		Before the operation	After the operation
Prostaglandin E ₂ , pg/ml	16.7 ± 6.1	25.8 ± 5.7*	13.5 ± 5.3**

*: p < 0.05 in comparison with the control group and with post-operative data; **: p < 0.05 in comparison with the preoperative data; p: the value of statistical difference.

Table 2. Characterization of the prostaglandin E₂ level and the number of patients with reflux esophagitis and columnar-lined esophagus in the studied groups of patients

Parameter, units of measurement	Control patients (n = 20)	1 group (n = 35) GERD	
		Before the operation	After the operation
Prostaglandin E ₂ , pg/ml	16.7 ± 6.1	25.8 ± 5.7*	13.5 ± 5.3**
Reflux esophagitis/CLE, n	no	21 (60.0%)*	2 (5.7%)**

*: p < 0.05 in comparison with the control group and with post-operative data; **: p < 0.05 in comparison with the preoperative data; p: the value of statistical difference; **CLE**: columnar-lined esophagus.

Table 3. Distribution of patients with various forms of esophageal mucosa inflammation and their dynamics in the studied groups

Degree of esophagitis	1 group (n = 35)		p
	Before the operation	After the operation	
NORM	–	27 (77.1 %)	0.00001
Non-erosive reflux disease	14 (40 %)	6 (17.1 %)	0.03
Erosive esophagitis (Los Angeles A, B, C)	12 (34.3 %)	–	0.0001
Columnar-lined esophagus	9 (25.7 %)	2 (5.7 %)	0.02

p: the value of statistical difference.

Table 4. Comparative characteristics of the acid exposure dynamics in the esophagus in the studied groups

Parameter, units of measurement	Control patients (n = 20)	1 group (n = 35) GERD	
		Before the operation	After the operation
Prostaglandin E ₂ , pg/ml	16.7 ± 6.1	25.8 ± 5.7*	13.5 ± 5.3**
Reflux esophagitis/CLE, n	–	21 (60.0%)*	2 (5.7%)**
Acid exposure (%)	2.1 ± 0.9	30.8 ± 27.1*	2.5 ± 1.7**

*: p < 0.05 in comparison with the control group and with post-operative data; **: p < 0.05 in comparison with the preoperative data; p: the value of statistical difference; **CLE**: columnar-lined esophagus.

Table 5. Comparative characteristics of the prostaglandin E₂ level depending on the esophageal inflammation form

Esophageal inflammation form	Number of patients	PGE ₂
NERD	14 (40 %)	23.9 ± 3.3
Erosive esophagitis (Los Angeles A, B, C)	12 (34.3 %)	26.0 ± 4.5
CLE	9 (25.7 %)	28.3 ± 8.7
P		0.1438

p: the value of statistical difference.

Table 6. Characteristics of the prostaglandin E₂ level depending on the form of esophageal inflammation in comparison with the control group

Pathological features	PGE ₂
No GERD	16.7 ± 6.1
NERD	23.9 ± 3.3*
Erosive esophagitis (Los Angeles A, B, C)	26.0 ± 4.5*
CLE	28.3 ± 8.7*

*: p < 0.05 in comparison with the control group.

ificantly differed from the preoperative values (p = 0.01), however, it did not statistically differ from the values obtained in practically healthy persons (p = 0.08) (Table 1).

During analyse there was noted the dynamics of the inflammation degree of the esophageal mucosa in the main group: the predominance of erosive forms with pronounced inflammatory lesions of the esophageal epithelium before surgery and a statistically significant decrease in inflammatory forms in the postoperative period (Table 2).

The detailed analysis of the number distribution of patients with different types and degrees of esophageal mucosa inflammation duplicates this trend (Table 3).

Similarly, there is a decrease in acid exposure in the lower third esophagus during daily monitoring in GERD patients from 30.8 ± 27.1 percent of daily preoperative monitoring to normal values of 2.5 ± 1.7 percent after surgery, which is presented in Table 4.

The detailed analysis of mucous membrane inflammation of the lower third esophagus of the main group patients before surgery showed that the level of prostaglandin E₂ did not statistically differ in various erosive forms of esophagitis, columnar-lined esophagus (CLE), and non-erosive reflux disease (NERD) (Table 5).

But it is statistically different from the prostaglandin E₂ level in practically healthy persons of the control group (Table 6).

Analysis of the correlation between the prostaglandin E₂ level and the severity of mucous membrane inflammation of the lower third esophagus showed the absence of a correlation (Fig. 1).

Fig. 1 shows that the prostaglandin E₂ level does not depend on the severity of esophagitis or the presence of CLE (p = 0.52). A similar situation is observed when analyzing the dependence of the prostaglandin E₂ level on the time of acid exposure in the lower third of the esophagus (Fig. 2).

The diagram presented in Fig. 2 also shows that the level of prostaglandin E₂ also does not depend on the duration of acid exposure in the esophagus (p = 0.33), which allows us to draw certain conclusions.

Discussion

Today, the main role of prostaglandin E₂ in the pathogenesis of GERD is attributed to its hypotensive effect on the lower esophageal sphincter and participation in the inflammatory process. There are separate works on the role of prostaglandin E₂ in the formation of the pre-epithelial barrier.

The results obtained in our work also confirm that prostaglandin E₂ is a pro-inflammatory marker of inflammation, can indicate the presence of esophagitis in GERD, and can have an effect on the tone of the lower esophageal sphincter. The effective surgical intervention led to the elimination of pathological reflux in all studied patients, as well as restoration of the esophageal mucosa in dynamics, which is visually presented in Tables 2, 3, and 4, and confirmed histologically and by daily pH-impedance-monitoring. In the postoperative period, patients with erosive esophagitis and CLE became much less compared to preoperative data. Acid exposure also

significantly decreased after the operation and reached normal values. At the same time, the prostaglandin E₂ level decreased to 13.5 ± 5.3 pg/ml, which is significantly lower than the preoperative level and the level in the control group (Table 1). Such a trend confirms the fact that against the background of the elimination of the inflammatory process in the esophagus, which is associated with the reduction of acid exposure as a result of successful surgical treatment, the level of the pro-inflammatory marker prostaglandin E₂ also decreases to the level of practically healthy patients of the control group.

At the same time, the decrease in the level of prostaglandin E₂ as a result of the reflux elimination limits the development of prostaglandin E₂-mediated oxidative and nitrosative stress and also may lead to a decrease in its stimulating effect on the hypotonus of the lower esophageal sphincter (LES). Thereby interrupting the pathogenetic closed circle of GERD: reflux – inflammation – increased level of prostaglandin E₂ – oxidative/nitrosative stress – increased hypotonia of the LES – increased reflux. According to the data obtained during our research, there was no correlation between the level of prostaglandin E₂, the degree of severity and the form of inflammation in the esophagus, as well as between the level of prostaglandin E₂ and the level of acid daily exposure (Fig. 1, 2). And the patients of the main group with NERD, reflux esophagitis or CLE also did not differ among themselves in terms of the level of the studied hormone (Tables 5, 6). This indicates the possible diagnostic role of prostaglandin E₂ as a marker of inflammation in erosive and non-erosive forms of GERD.

In view of the data, we received and their analysis, as well as the data indicated in the literature, we believe that currently the role of prostaglandin E₂ in the pathogenesis and diagnosis of GERD is not given enough attention, and its influence on the development of this disease is underestimated and insufficiently studied. The available data on this hormone do not reveal its involvement in the pathogenesis of GERD and its role in achieving a persistent therapeutic effect during surgical treatment, and also limit the possibility of using this hormone as a diagnostic marker and the effectiveness of surgical treatment of GERD. Our conducted research and the obtained results contribute to approaching the solution to these questions.

Conclusions

1. During the surgical treatment of gastroesophageal reflux disease, a significant decrease in the level of prostaglandin E₂ is determined after surgery compared to preoperative data to the level observed in a group of practically healthy patients.

2. The dynamics of the level of prostaglandin E₂ indicates its involvement in the pathogenesis of GERD and reflux elimination, which confirms the possibility of its use as an additional diagnostic marker of esophagitis and a marker of the effectiveness of surgical treatment.

3. Determining the level of prostaglandin E₂ in the absence of visible inflammatory changes in the esophagus, in particular with NERD, allows for an increase in the effectiveness of diagnosing the pathological process in patients with GERD.

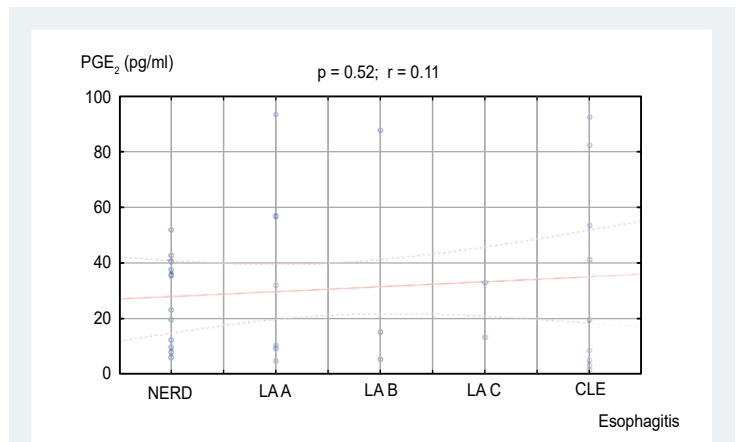


Fig. 1. Correlation between the prostaglandin E₂ level and the severity of inflammation in the mucous membrane of the lower third esophagus.

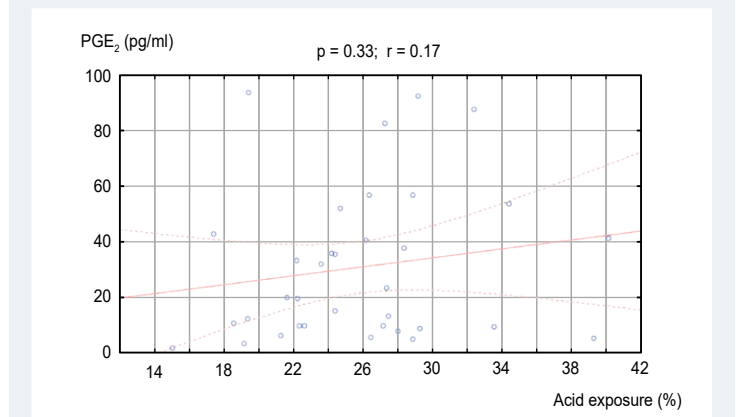


Fig. 2. Correlation between the level of prostaglandin E₂ and the time of acid exposure in the lower third of the esophagus.

4. The results of the conducted study confirm the role of prostaglandin E₂ in the pathogenesis and diagnosis of GERD and require continued work in the direction of studying the dynamics of this hormone in this disease.

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

Конфлікт інтересів: відсутній.

Надійшла до редакції / Received: 18.01.2023

Після доопрацювання / Revised: 15.02.2023

Прийнято до друку / Accepted: 20.02.2023

Information about the author:

Haidarzhi Ye. I., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Hospital Surgery, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0001-7211-1795

Відомості про автора:

Гайдаржі Є. І., канд. мед. наук, доцент каф. госпітальної хірургії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

References

- [1] Bai, X., Ihara, E., Otsuka, Y., Tsuruta, S., Hirano, K., Tanaka, Y., Ogino, H., Hirano, M., Chinen, T., Akiho, H., Nakamura, K., Oda, Y., & Ogawa, Y. (2019). Involvement of different receptor

- subtypes in prostaglandin E2-induced contraction and relaxation in the lower esophageal sphincter and esophageal body. *European journal of pharmacology*, 857, 172405. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172405>
- [2] Soma, T., Shimada, Y., Kawabe, A., Kaganoi, J., Kondo, K., Imamura, M., & Uemoto, S. (2007). Induction of prostaglandin E synthase by gastroesophageal reflux contents in normal esophageal epithelial cells and esophageal cancer cells. *Diseases of the esophagus*, 20(2), 123-129. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2050.2007.00657.x>
- [3] Sarosiek, J., & McCallum, R. W. (2000). Mechanisms of oesophageal mucosal defence. *Bailliere's best practice & research. Clinical gastroenterology*, 14(5), 701-717. <https://doi.org/10.1053/bega.2000.0119>
- [4] Costa, P. M., & Fernandes, F. V. (1985). Efeito do betanecol e das prostaglandinas E2 sobre o refluxo gastroesofágico e o esvaziamento esofágico, em doentes com esofagite de refluxo, propostos para terapêutica cirúrgica [Effect of bethanecol and prostaglandin E2 on gastroesophageal reflux and esophageal emptying, in patients with reflux esophagitis proposed for surgical therapy]. *Acta medica portu-guesa*, 6(2), 83-94. [in Portuguese].
- [5] Giuli, R., Siewert, J. R., Couturier, D., & Scarpignato, C. (Eds.) (2003). *Barrett's esophagus. Columnar lined esophagus. 250 questions – 250 answers* (Vol. 1). John Libbey Eurot ext.
- [6] Sadatomi, D., Kono, T., Mogami, S., & Fujitsuka, N. (2020). Weak acids induce PGE₂ production in human oesophageal cells: novel mechanisms underlying GERD symptoms. *Scientific reports*, 10(1), 20775. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77495-z>
- [7] Namiot, Z., Yu, Z. J., Piascik, R., Hetzel, D. P., McCallum, R. W., & Sarosiek, J. (1997). Modulatory effect of esophageal intraluminal mechanical and chemical stressors on salivary prostaglandin E2 in humans. *The American journal of the medical sciences*, 313(2), 90-98. <https://doi.org/10.1097/0000441-199702000-00004>
- [8] Long, J. D., & Orlando, R. C. (1997). Eicosanoids and the esophagus. *Digestive diseases*, 15(3), 145-154. <https://doi.org/10.1159/000171595>
- [9] Kondo, T., Sei, H., Yamasaki, T., Tomita, T., Ohda, Y., Oshima, T., Fukui, H., Watari, J., & Miwa, H. (2017). A novel prostanoid EP1 receptor antagonist, ONO-8539, reduces acid-induced heartburn symptoms in healthy male volunteers: a randomized clinical trial. *Journal of gastroenterology*, 52(10), 1081-1089.
- [10] Triadafilopoulos, G., Kaczynska, M., & Iwane, M. (1996). Esophageal mucosal eicosanoids in gastroesophageal reflux disease and Barrett's esophagus. *The American journal of gastroenterology*, 91(1), 65-74.
- [11] Ottignon, Y., Alber, D., Moussard, C., Deschamps, J. P., Carayon, P., & Henry, J. C. (1987). Esophageal mucosal prostaglandin E2 levels in health and in gastroesophageal reflux disease. *Prostaglandins, leukotrienes, and medicine*, 29(2-3), 141-151.
- [12] Sarosiek, J., Yu, Z., Namiot, Z., Rourk, R. M., Hetzel, D. P., & McCallum, R. W. (1994). Impact of acid and pepsin on human esophageal prostaglandins. *The American journal of gastroenterology*, 89(4), 588-594.
- [13] Richter, J. E., & Rubenstein, J. H. (2018). Presentation and Epidemiology of Gastroesophageal Reflux Disease. *Gastroenterology*, 154(2), 267-276.
- [14] Sandhu, D. S., & Fass, R. (2018). Current Trends in the Management of Gastroesophageal Reflux Disease. *Gut and liver*, 12(1), 7-16.
- [15] Katzka, D. A., & Kahrilas, P. J. (2020). Advances in the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. *BMJ (Clinical research ed.)*, 371, m3786.
- [16] Fass, R., Boeckxstaens, G. E., El-Serag, H., Rosen, R., Sifrim, D., & Vaezi, M. F. (2021). Gastro-oesophageal reflux disease. *Nature reviews. Disease primers*, 7(1), 55.
- [17] Slater, B. J., Dirks, R. C., McKinley, S. K., Ansari, M. T., Kohn, G. P., Thosani, N., Qumseya, B., Billmeier, S., Daly, S., Crawford, C., P Ehlers, A., Hollands, C., Palazzo, F., Rodriguez, N., Train, A., Wassenaar, E., Walsh, D., Pryor, A. D., & Stefanidis, D. (2021). SAGES guidelines for the surgical treatment of gastroesophageal reflux (GERD). *Surgical endoscopy*, 35(9), 4903-4917.
- [18] Yadlapati, R., Gyawali, C. P., & Pandolfino, J. E. (2022). Personalized Approach to the Evaluation and Management of Gastroesophageal Reflux Disease. *Clinical gastroenterology and hepatology*, S1542-3565(22)00079-9. Advance online publication.
- [19] Fuchs, K. H., Lee, A. M., Breithaupt, W., Varga, G., Babic, B., & Horgan, S. (2021). Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease-which factors are important?. *Translational gastroenterology and hepatology*, 6, 53.
- [20] Fuchs, K. H., & Meining, A. (2021). Current Insights in the Pathophysiology of Gastroesophageal Reflux Disease. *Chirurgia (Bucharest, Romania : 1990)*, 116(5), 515-523.
- [21] Chen, S., Du, F., Zhong, C., Liu, C., Wang, X., Chen, Y., Wang, G., Gao, X., Zhang, L., Li, L., & Wu, W. (2021). Gastroesophageal reflux disease: recent innovations in endoscopic assessment and treatment. *Gastroenterology report*, 9(5), 383-391.
- [22] Allan, V. J. (2000). Basic immunofluorescence. In V. J. Allan (ed.), *Protein localization by fluorescent microscopy. A practical approach*. Oxford University Press.

Вплив метаболічної активності кишкової мікрофлори на тяжкість і тривалість ротавірусної діареї в дітей раннього віку

Н. В. Воробйова ^{*B,C,D}, О. В. Усачова ^{A,E,F}, Є. А. Сіліна ^{A,E}, О. О. Фурик ^{A,E}

Запорізький державний медичний університет, Україна

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

Мета роботи – визначити патогенетичну роль метаболічної активності кишкової мікрофлори у формуванні тяжкості та тривалості ротавірусної діареї в дітей раннього віку.

Матеріали та методи. Метаболічну активність кишкової мікрофлори в динаміці хвороби визначили в 60 дітей віком 1–24 місяці з ротавірусною інфекцією (РВІ), яких залучили у групу дослідження, шляхом детекції коротколанцюгових жирних кислот (КЖК) у фекаліях (визначали абсолютну концентрацію (мкмоль/л) ацетату, пропіонату, бутирату, сумарну концентрацію КЖК і величину анаеробного індексу (АІ) на другу – третю, п'яту та десятю добу РВІ). Високоєфективну рідинну хроматографію здійснили, застосувавши хроматограф LC MS Agilent 1260 Infinity HPLC System, США.

Результати. Від п'ятої доби РВІ при мінімально вираженому діарейному синдромі реєстрували вищий загальний пул КЖК і вищі значення АІ, ніж при середньотяжкій і тяжкій діарей (p < 0,05 на п'яту та десятю добу РВІ). Зі зниженням метаболічної активності цукролітичних кишкових бактерій асоціювалася більша тривалість діарейного синдрому в дітей: при діарей ≤5 днів хворі на другу – третю добу мали в 2,4 рази вищі показники сумарного пулу КЖК, ніж при діарей, що тривала ≥6 днів (p < 0,05). Ступінь зниження концентрації С3 і значень АІ на другу – третю добу РВІ прямо корелював із тривалістю діарей, що подовжувалася на одну добу при зниженні С3 на 20,6 мкмоль/л або зменшенні АІ на 0,05.

Висновки. Вплив зниження метаболічної активності кишкової мікрофлори на виразність діарей при РВІ у дітей раннього віку визначають, починаючи з п'ятої доби хвороби. Зниження концентрації пропіонату та значень АІ на другу – третю добу хвороби є найбільш раннім предиктором тривалої діарей при РВІ в дітей.

Ключові слова:

ротавірусна інфекція, інфекційна діарея, діти, ранній вік, кишкова мікрофлора, коротколанцюгові жирні кислоти, фактори ризику, прогноз.

Патологія. 2023. Т. 20, № 1(57). С. 63-68

*E-mail: natahich19881988@gmail.com

The influence of the metabolic activity of the intestinal microflora on the severity and duration of rotavirus diarrhea in early-aged children

N. V. Vorobiova, O. V. Usachova, Ye. A. Silina, O. O. Furyk

The aim is to determine the pathogenetic role of the metabolic activity of the intestinal microflora in the formation of the severity and duration of rotavirus diarrhea in early-aged children.

Materials and methods. 60 children aged 1–24 months with RVI were included in the research group. The metabolic activity of the intestinal microflora was determined by detecting short-chain fatty acids (SCFAs) in feces in the dynamics of the disease (the absolute concentration (μmol/l) of acetate, propionate, butyrate, the total concentration of SCFAs and the value of the anaerobic index (AI) on the 3rd, 5th and 10th days of RVI) using high-performance liquid chromatography with LC-MS chromatography Agilent 1260 Infinity HPLC System, USA.

Results. From the 5th day of RVI, with a minimally expressed diarrheal syndrome, a higher total pool of SCFA and higher AI values were observed than with moderate-severe and severe diarrhea (p < 0.05 on the 5th and 10th days of RVI). A longer duration of the diarrheal syndrome in children was associated with a decrease in the metabolic activity of sacrolytic intestinal bacteria: patients with diarrhea ≤5 days had 2.4 times higher indicators of the total pool of SCFA, than patients with the duration of diarrhea ≥6 days (p < 0.05). The degree of reduction in the concentration of C3 and the value of AI on the 2–3rd days of RVI was directly correlated with the duration of diarrhea, which increased by 1 day with a decrease in C3 by 20.6 μmol/l or a decrease in AI by 0.05.

Conclusions. The influence of the intestinal microflora metabolic deficiency on the severity of diarrhea in early-aged children manifests itself from the 5th day of illness. A decrease in the concentration of propionate and the value of AI on the 2–3rd days of the disease is the earliest indicator of prolonged diarrhea in children with RVI.

Key words:

viral infection, infectious diarrhea, children, early age, intestinal microflora, short-chain fatty acids, risk factors, prognosis.

Pathologia 2023; 20 (1), 63-68

Гострий гастроентерит залишається основною причиною захворюваності та смертності дітей раннього віку у всьому світі, спричиняючи щороку майже 1,34 млн або 15 % усіх летальних випадків у дітей віком до п'яти років. Серед збудників гострих кишкових інфекцій в останні роки переважають віруси, що викликають 70–80 % діарейних захворювань у дітей [1–3].

Серед вірусних збудників ротавірусної інфекції (РВІ) належить провідне місце, вона залишається най-

частішою причиною інфекційної діареї [4,5]. Ротавірус уражає тонкий кишечник, важливу ділянку колонізації мікробіоти. Складна система взаємодії ротавірусів і кишкової мікрофлори стала предметом вивчення в багатьох дослідженнях [6–8].

Підтверджено стійкі порушення і таксономічного складу, і різноманітності кишкової мікробіоти в дітей після РВІ, що може обтяжувати перебіг захворювання та спричиняти виникнення функціональних розладів

шлунково-кишкового тракту в період реконвалесценції [6,8,9].

Усі товстокишкові бактерії є облигатними й факультативними анаеробами, виробляють енергію в процесі бродіння. Представники мікрофлори нижніх відділів шлунково-кишкового тракту (ШКТ) метаболізують вуглеводи й білки до коротколанцюгових жирних кислот (основні з них – ацетат (C2), пропіонат (C3) і бутират (C4)) і газів (H₂, CO₂, CH₄) [10,11].

Коротколанцюгові жирні кислоти (КЖК) – монокарбонові кислоти з довжиною ланцюга до 6 атомів вуглецю. Ацетат, пропіонат і бутират становлять 90–95 % загального пулу легких кислот, що містяться в товстому кишківнику [12]. Основне джерело КЖК – вуглеводи, але такі амінокислоти, як валін, лейцин та ізолейцин (продукти розпаду білків), у процесі метаболізму можуть перетворюватися на ізобутират, ізовалеріат та ізокапронову кислоту (розгалужені КЖК), що становлять лише 5 % загального пулу легких кислот [13–15].

Оскільки КЖК є основними метаболітами кишкових бактерій, відхилення їхнього рівня та спектра від норми може відбивати ступінь порушення мікрофлори кишечника в дітей із РВІ.

Мета роботи

Визначити патогенетичну роль метаболічної активності кишкової мікрофлори у формуванні тяжкості та тривалості ротавірусної діареї в дітей раннього віку.

Матеріали і методи дослідження

У дослідження залучили 60 дітей віком 1–24 місяці, які перебували на грудному вигодовуванні, з РВІ: 38 (63,3 %) хлопців і 22 (36,7 %) дівчини. Пацієнти перебували на лікуванні в дитячому кишковому відділенні КНП «Обласна інфекційна клінічна лікарня» ЗОР. Критерії залучення в дослідження – госпіталізація в термін не пізніше ніж третя доба хвороби, виявлення антигену ротавірусу в фекаліях (за допомогою імунохроматографічного методу з використанням тест-систем СІТО TEST ROTA, Pharmasco); крім того, залучали тільки дітей, у яких із фекалій не виділено патогенну кишкову флору, не діагностовано вроджену та хронічну патологію ШКТ, вроджений чи набутий імунodefіцит.

З-поміж клінічних проявів хвороби найчастіше фіксували діарейний синдром (59 (98 %) дітей), лихоманку (51 (85 %) випадок) і блювання (37 (62 %) пацієнтів). Середня тривалість діареї становила 8,50 (6,50; 10,00) доби. Тяжкість перебігу ротавірусного гастроентериту визначали за 20-бальною шкалою Везікарі, згідно з якою 70,0 % дітей мали тяжкий перебіг РВІ, 23,3 % – середньотяжкий, 6,7 % – легкий. Базисне лікування в умовах стаціонара передбачало регідраційну та дезінтоксикаційну терапію (орально та/або інфузійно), призначення сорбентів і пробіотиків.

У групу порівняння залучили 30 здорових дітей, репрезентативних за віком і статтю.

Метаболічну активність кишкової мікрофлори дослідили шляхом вивчення КЖК, детекцію яких здійснили методом високоефективної рідинної хрома-

тографії з використанням хроматографа LC MS Agilent 1260 Infinity HPLC System, США (Degasser, Bynary Pump, Autosampler, Thermostat Column Compartment), Agilent single-quadrupole mass spectrometer 6120 with electrospray ion-source з комп'ютерною підтримкою програм OpenLAB CDS Software.

У зразках фекалій визначали абсолютні концентрації (мкмоль/л) оцтової (C2), пропіонової (C3) та масляної (C4) кислот, після чого обчислювали їхню сумарну концентрацію та значення анаеробного індексу (AI), який відбиває ступінь анаеробіозу середовища в нижніх відділах кишківника. AI визначали за формулою: $AI = (KC3 + KC4) / KC2$, де KC2 – концентрація оцтової кислоти (C2), мкмоль/л; KC3 – концентрація пропіонової кислоти (C3), мкмоль/л; KC4 – концентрація масляної кислоти (C4), мкмоль/л. Дослідження здійснили в Навчальному медико-лабораторному центрі Запорізького державного медичного університету на базі кафедри фізикоїдної хімії (зав. кафедри – А. Г. Каплаушенко).

Дітям основної групи визначення КЖК здійснили тричі в динаміці хвороби (на другу – третю, п'яту та десяту добу РВІ), здоровим дітям – одноразово. Показники здорових дітей групи порівняння визначили як фізіологічні для цього віку.

Дослідження здійснили відповідно до принципів Гельсінської декларації. Всі батьки надали письмову інформовану згоду на участь у дослідженні.

Статистично результати опрацювали за допомогою програми Statistica for Windows 13 (StatSoftInc., ліцензія № JPZ804I382130ARCN10-J). Оскільки розподіл даних відрізнявся від нормального, використали непараметричні методи. Кількісні значення наведено як медіана (Me) та міжквартильний розмах (IQR: Q25–Q75). Для порівняння двох незалежних груп застосували U критерій Манна–Вітні. Під час заставлення показників понад двох груп використали тест Краскела–Волліса. Нульову гіпотезу відкидали при рівні статистичної значущості $p < 0,05$. Напрямок, силу кореляційних зв'язків (R) та їхню достовірність визначали методом кореляційного аналізу Спірмена. Для оцінювання залежності між показниками застосували регресійний аналіз. Для встановлення прогностичного впливу показників метаболічної активності кишкової мікрофлори на тривалість діарейного синдрому використали парну лінійну регресію з обчисленням параметрів моделі методом найменших квадратів. Якщо між показниками виявляли статистично значущий кореляційний зв'язок, для кожного з факторів будували прогностичну модель парної лінійної регресії. В кожному конкретному випадку обирали кращий варіант регресійного рівняння, який визначали за коефіцієнтом детермінації R². Рівняння регресії мали вигляд $y = a + b \times x$, де y – передбачуване значення залежної змінної (тривалість ротавірусної діареї), x – фактичне значення незалежної змінної (предиктора), a і b – коефіцієнти (константи).

Результати

Оцінювання метаболічної активності кишкової мікрофлори показало значне зниження концентрацій усіх КЖК та їхнього сумарного пулу в фекаліях дітей на всіх етапах перебігу РВІ (рис. 1) з більш виразним

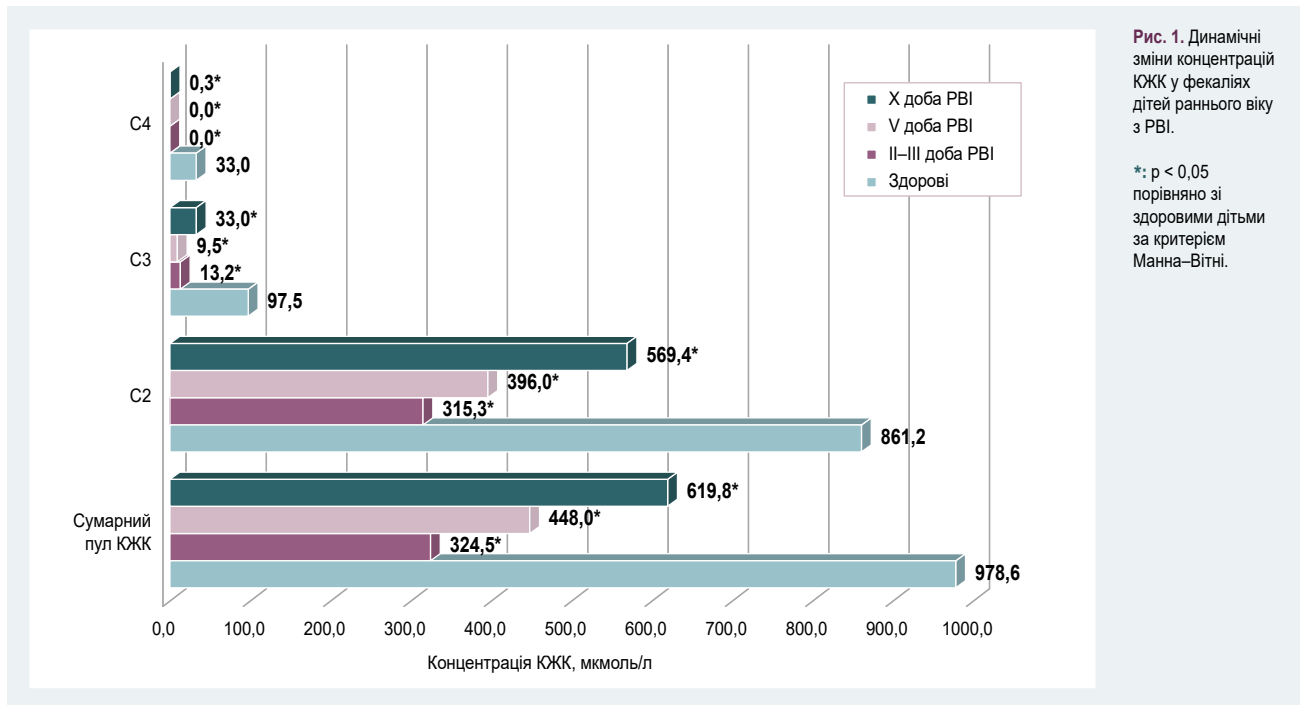


Рис. 1. Динамічні зміни концентрацій КЖК у фекаліях дітей раннього віку з РВІ.

*: $p < 0,05$ порівняно зі здоровими дітьми за критерієм Манна-Вітні.

дефіцитом кишкових метаболітів у гострий період хвороби, певним підвищенням показників у реконвалесцентний період, але без наближення до норми ($p < 0,05$ порівняно зі здоровими дітьми). Це свідчить про зниження інтегральної ферментативної активності кишкових бактерій у дітей із РВІ.

Крім того, при РВІ в дітей визначили вірогідне зниження показників АІ – в 5,0 і 2,2 раза менше за нормальні вікові значення в гострий період хвороби (на другу – третю та п'яту добу) та в реконвалесцентний період (на десятю добу) відповідно (0,04 (0,01; 0,11) та 0,04 (0,01; 0,10) проти 0,20 (0,11; 0,34) відповідно, $p < 0,01$).

Надалі виявили, що від ступеня функціонального дефіциту й структурного дисбалансу кишкової мікрофлори залежали виразність і тривалість ротавірусної діареї. Зазначимо, що вплив цих порушень спостерігали тільки з п'ятої доби хвороби. В ранні терміни перебігу не виявили статистично значущу різницю концентрацій КЖК і значень АІ в дітей із різною добовою частотою діареї. Так, на п'яту добу РВІ частота рідких випорожнень мала зворотний кореляційний зв'язок середньої сили з сумарною фекальною концентрацією КЖК ($r = -0,41$, $p < 0,05$), концентраціями С2 ($r = -0,37$, $p < 0,05$) і С3 ($r = -0,45$, $p < 0,05$).

Виявили, що у хворих із найменшою добовою частотою рідких випорожнень (1–3 рази) сумарний пул КЖК в 1,6 і 2,5 раза перевищував показник дітей із середньою (4–5 разів) та значною (6 і більше разів) виразністю діареї відповідно ($p < 0,05$) (табл. 1). Різниця за концентрацією С2 майже ідентична в названих групах пацієнтів ($p < 0,05$). Особливу увагу привернула концентрація С3, що в пацієнтів із мінімально вираженим діарейним синдромом була в 5,5 раза вищою, ніж у дітей із добовою частотою діареї >4 рази ($p < 0,05$).

Проаналізувавши вплив структурного дисбалансу кишкового мікробіоценозу на виразність ротавірусної

діареї в період розпаду хвороби, зауважимо: в групі пацієнтів із максимальною добовою частотою випорожнень (≥ 6 разів) АІ мав найнижчі значення та становив 1/7 від показників здорових дітей ($p < 0,01$). Це свідчить про істотні порушення структурної рівноваги мікрофлори кишечника в бік зниження її анаеробіозу при тяжкій ротавірусній діареї.

За даними, що наведені в таблиці 2, на початку другого тижня хвороби мінімальні прояви діареї (1–3 рази на добу) й нормалізація випорожнень супроводжувалися вдвічі вищою загальною концентрацією КЖК і рівнем С2 у фекаліях порівняно з пацієнтами з виразним діарейним синдромом (>4 рази на добу). У дітей із виразною діареєю серед всіх метаболітів кишкової мікрофлори найбільше знижувалася концентрація С3 ($p < 0,05$); це свідчило про збереження значного пригнічення її продуцентів у цей строк хвороби. Крім того, в пацієнтів цієї групи визначили збереження та поглиблення структурних порушень кишкового мікробіоценозу. Зокрема, встановили зниження АІ понад у 5 разів щодо показника дітей із мінімальними проявами діареї (1–3 рази на добу) ($p < 0,05$), в 11,1 раза щодо параметра здорових дітей відповідного віку ($p < 0,05$).

Аналіз результатів показав, що зі зниженням метаболічної активності та структурними порушеннями кишкової мікробіоти вже на ранніх стадіях РВІ асоціювалася більша тривалість діареї. Так, виявили зворотні кореляційні зв'язки середньої сили між тривалістю діарейного синдрому та фекальною концентрацією С3, значенням АІ ($r = -0,59$ та $r = -0,64$, $p < 0,05$ на другу – третю добу РВІ відповідно).

За даними, що наведені в таблиці 3, діти з нетривалим діарейним синдромом (≤ 5 діб) мали в 2,4 і 1,4 раза вищі значення загальної концентрації КЖК на другу – третю та п'яту добу хвороби відповідно, ніж пацієнти, в яких рідкі випорожнення продовжувалися

Таблиця 1. Порівняльна характеристика виразності ротавірусної діареї на п'яту добу хвороби залежно від показників метаболічної активності кишкової мікрофлори (n = 60), Ме (Q25; Q75)

Метаболіт кишкової мікрофлори, одиниці вимірювання	Здорові діти	Частота випорожнень на добу			p Краскела-Волліса	
		1–3 рази (n = 27)	4–5 разів (n = 23)	≥6 разів (n = 10)		
Сумарний пул КЖК, мкмоль/л	978,60 (681,83; 1286,05)	492,69 (403,00; 651,52)] ^{1,2}	306,32 (130,08; 711,92)	199,20 (139,77; 597,71)	0,0262	
Концентрація окремих КЖК, мкмоль/л	Оцтова (C2)	861,17 (606,26; 993,61)	442,05 (388,56; 611,68) ²	297,03 (127,57; 704,29)	194,46 (135,77; 593,04)	0,0319
	Пропіонова (C3)	97,49 (74,73; 183,85)	37,97 (5,68; 97,95) ¹	4,90 (0,00; 22,80)	8,16 (4,00; 12,21)	0,0365
	Масляна (C4)	32,99 (14,43; 53,21)	0,00 (0,00; 6,57)	0,00 (0,00; 1,33)	0,00 (0,00; 0,00)	0,3144
Анаеробний індекс	0,20 (0,11; 0,34)	0,065 (0,010; 0,226)	0,05 (0,010; 0,084)	0,029 (0,008; 0,055)	0,1631	

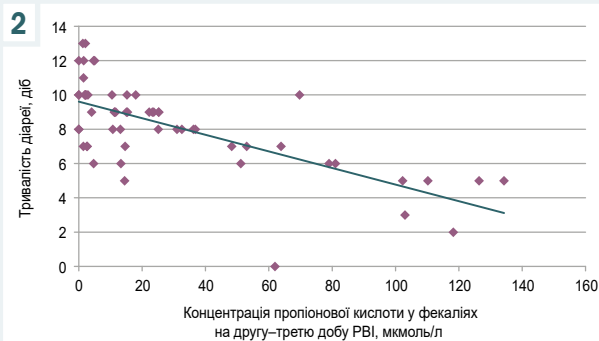
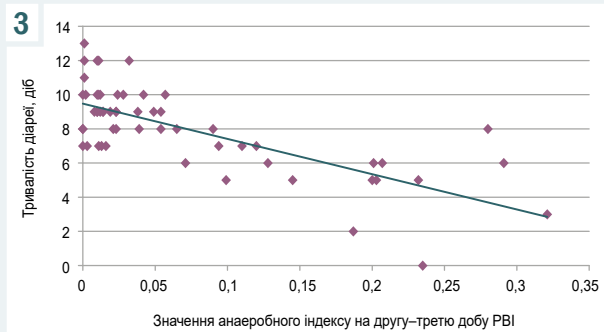
1: p < 0,05 порівняно з другою групою; 2: p < 0,01 порівняно з третьою групою.

Таблиця 2. Порівняльна характеристика виразності діарейного синдрому на десяту добу РВІ залежно від показників метаболічної активності кишкової мікрофлори (n = 60), Ме (Q25; Q75)

Метаболіт кишкової мікрофлори, одиниці вимірювання	Здорові діти	Частота випорожнень на десяту добу РВІ			p Манна-Вітні	
		1–3 рази (n = 46)	4–5 разів (n = 14)			
Сумарний пул КЖК, мкмоль/л	978,60 (681,83; 1286,05)	640,08 (379,01; 811,19)	335,03 (232,23; 747,37)		0,107874	
Концентрація окремих КЖК, мкмоль/л	Оцтова (C2)	861,17 (606,26; 993,61)	577,91 (358,65; 763,09)	292,10 (230,80; 698,43)		0,180750
	Пропіонова (C3)	97,49 (74,73; 183,85)	33,68 (17,13; 85,00)	5,99 (0,00; 42,56)		0,010991
	Масляна (C4)	32,99 (14,43; 53,21)	0,13 (0,00; 4,12)	0,37 (0,00; 1,43)		0,595883
Анаеробний індекс	0,20 (0,11; 0,34)	0,093 (0,032; 0,214)	0,018 (0,004; 0,146)		0,047905	

Таблиця 3. Порівняльна характеристика тривалості ротавірусної діареї в дітей раннього віку залежно від показників метаболічної активності кишкової мікрофлори в гострий період хвороби (n = 60), Ме (Q25; Q75)

Доба РВІ	Метаболіт кишкової мікрофлори, одиниці вимірювання	Тривалість діареї, діб		p Манна-Вітні	
		<6 діб (n = 46)	≥6 діб (n = 14)		
Друга – третя	Сумарний пул КЖК, мкмоль/л	749,68 (331,00; 1402,70)	316,28 (249,29; 542,85)	0,04290	
	Концентрація окремих КЖК, мкмоль/л	Оцтова (C2)	631,42 (267,90; 1229,69)	315,27 (224,54; 472,19)	0,07142
		Пропіонова (C3)	118,26 (61,97; 126,40)	4,68 (1,43; 15,39)	0,00002
		Масляна (C4)	0,03 (0,00; 1,13)	0,00 (0,00; 0,00)	0,11390
	Анаеробний індекс	0,145 (0,100; 0,187)	0,013 (0,003; 0,057)	0,00060	
П'ята	Сумарний пул КЖК, мкмоль/л	569,42 (492,69; 1081,11)	393,94 (172,54; 581,20)	0,00679	
	Концентрація окремих КЖК, мкмоль/л	Оцтова (C2)	428,85 (396,02; 896,55)	388,17 (158,46; 543,98)	0,04931
		Пропіонова (C3)	124,70 (97,95; 184,56)	6,22 (2,16; 22,80)	0,00002
		Масляна (4)	6,18 (0,00; 6,57)	0,00 (0,00; 1,10)	0,16469
Анаеробний індекс	0,226 (0,206; 0,268)	0,026 (0,007; 0,077)	0,00022		

**Рис. 2.** Залежність тривалості діарейного синдрому від фекальної концентрації C3 на другу – третю добу РВІ в дітей раннього віку (R Спірмена = -0,59, p < 0,05, n = 58).**Рис. 3.** Залежність тривалості діарейного синдрому від значень анаеробного індексу на другу – третю добу РВІ в дітей раннього віку (R Спірмена = -0,64, p < 0,05, n = 57).

6 діб і більше (p < 0,05). У цих групах пацієнтів виявили вірогідну різницю за концентраціями C2 (p < 0,05 на п'яту добу РВІ) та C3, яка в дітей із короткотривалою діареєю (≤5 діб) на другу – третю та п'яту добу РВІ відповідала віковій нормі та в 25 і 20 разів відповідно пе-

ревищувала показники пацієнтів із тривалою діареєю (p < 0,01). Крім того, у хворих цієї групи від перших днів хвороби (на другу – третю добу) та в період її розпаду (на п'яту добу) зафіксували нормальні показники AI, що в 11,1 і 8,7 раза відповідно перевищували значення

AI дітей із тривалою діареєю ($p < 0,01$). Це є ознакою того, що в пацієнтів немає істотних структурних порушень кишкового мікробіоценозу.

Оскільки ступінь зниження фекальної концентрації C3 і значення AI – найбільш ранні та чутливі маркери тривалої ротавірусної діареї (коефіцієнт детермінації $R^2 > 0,5$), надалі ці показники використали для визначення прогностичного впливу функціональних, структурних порушень мікрофлори кишківника в ранньому терміні PBI на тривалість діарейного синдрому.

Залежність тривалості ротавірусної діареї від фекальної концентрації C3 на другу – третю добу хвороби в дітей раннього віку ($r = -0,59$, $p < 0,05$) можна описати рівнянням парної лінійної регресії (рис. 2):

$$y = 9,61 - 0,048x,$$

де y – тривалість діареї (дів), x – фекальна концентрація C3 на другу – третю добу PBI (мкмоль/л).

За цим рівнянням, при зниженні фекальної концентрації C3 на другу – третю добу хвороби на 20,6 мкмоль/л тривалість діареї збільшується на 1 добу. Концентрація C3 визначає 50 % дисперсії значень тривалості діареї.

Статистично значущий зворотний кореляційний зв'язок середньої сили між тривалістю діареї та значенням AI на другу – третю добу PBI ($r = -0,64$, $p < 0,05$) можна описати таким рівнянням лінійної парної регресії:

$$y = 9,47 - 20,65x,$$

де y – тривалість діареї (дів), x – значення AI на другу – третю добу PBI.

Ця залежність наведена на рис. 3: при зниженні AI на 0,05 слід очікувати збільшення тривалості діареї на 1 добу. Величина AI визначає 52 % дисперсії значень тривалості діареї.

Обговорення

У результаті дослідження встановили вірогідне зниження рівня окремих КЖК та їхнього загального пулу на всіх етапах хвороби з більш виразним зменшенням рівнів пропіонату й бутирату, а також значуще зниження AI ($p < 0,01$).

Оскільки, як відомо, продуцентами C2 є облигатні анаероби, факультативні анаероби, а також деякі аероби, а C3 й C4 – метаболіти тільки облигатних анаеробів приєпителіального шару мікробної кишкової біоплівки [11], значно нижчий ступінь зниження абсолютних концентрацій C2 порівняно з C3, C4 та, відповідно, зниження значень AI пов'язані з пригніченням анаеробів біоплівки кишечника (*Bacteroidetes*, *Prevotella* та *Veillonella spp.*, *Propionibacterium shermanii*, *Ruminococcus*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Coprococcus*, *Bacteroides*, *Megasphaera*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Faecalibacterium*) [14, 16] та збільшенням у структурі його мікробіоценозу представників аеробної мікрофлори, зокрема умовнопатогенних бактерій (як-от *E. coli*, *Proteus*, *Staphylococcus* тощо), які в більшій мірі продукують C2, протягом усього перебігу PBI в дітей раннього віку.

Повідомляли про наявність зв'язку метаболічної активності кишкової мікробіоти з особливостями клінічного перебігу PBI у дітей [17–19]. Так, у роботі В. А. Babayeva et al. показано зворотну кореляцію між ступенем тяжкості ротавірусного гастроентериту й концентраціями C2 ($p < 0,05$), C3 ($p < 0,05$), C4 ($p < 0,01$), а також загальним пулом КЖК у фекаліях ($p < 0,05$) [17]. У дослідженні І. І. Незгоди, О. М. Науменко та ін. найвищі рівні пропіонової кислоти зафіксовано при легкій формі PBI, а середньотяжкий перебіг асоціювався з достовірно нижчими концентраціями пропіонату ($p < 0,05$) [18].

Під час нашого дослідження виявили вплив структурних і функціональних змін кишкової мікробіоти на виразність і тривалість ротавірусної діареї в дітей раннього віку.

Один із механізмів такого впливу можна пояснити накопиченням олігоцукридів у просвіті кишечника внаслідок недостатньої їх ферментації кишковою мікрофлорою з підтриманням надалі осмотичного компонента діареї. Так, у попередньому дослідженні показано наявність зворотної кореляції між загальною кількістю кишкових метаболітів (КЖК), величиною AI та рівнем нерозщеплених цукрів у фекаліях у гострий період PBI [20].

Отже, результати цього дослідження та відомості наукової літератури доводять, що зниження метаболічної активності бактерій кишківника та зміни інфраструктури кишкової мікробіоти спричиняють накопичення нерозщеплених олігоцукридів у просвіті кишківника, підвищення в ньому осмотичного тиску, створюючи патогенетичне підґрунтя для виникнення та підтримання діарейного синдрому при PBI.

Крім того, масляна кислота й інші КЖК є стимуляторами абсорбції NaCl колоноцитами. Взаємодіючи з двома транспортними системами щіткової облямівки кишечника (Cl-/HCO₃⁻ і Na+/H⁺ та Cl-/бутират і Na+/H⁺), КЖК зумовлюють підвищення всмоктування води й електролітів, знижуючи осмотичний тиск кишкового вмісту та сприяючи збереженню рідини в просвіті кишківника [18]. Отже, дефіцитом КЖК можна пояснити триваліший діарейний синдром при ротавірусному гастроентериті в дітей.

Оскільки зниження рівня пропіонату та значень AI – найбільш ранні маркери тривалого діарейного синдрому в дітей, пропонуємо визначення саме цих показників у ранні терміни хвороби для прогнозування тривалості діареї при PBI.

Висновки

1. Вплив зниження метаболічної активності кишкової мікрофлори на виразність діареї при PBI в дітей виявляють, починаючи з п'ятої доби хвороби, за зниженням в 1,6 та 2,5 раза загального пулу КЖК у дітей із максимально вираженою діареєю (6 і більше разів на добу) щодо показників хворих із середньою (4–5 разів) і мінімальною (1–3 рази) її виразністю ($p < 0,05$). Ці закономірності зберігалися на десятю добу перебігу PBI.

2. Для прогнозування тривалості діарейного синдрому в дітей раннього віку з ротавірусним гастроентеритом доцільно в перші дні хвороби визна-

чати фекальні концентрації КЖК, зокрема ацетату, пропіонату та бутирату, й обчислювати величину AI. Тривалість діареї рекомендовано розраховувати за формулами:

• $y = 9,61 - 0,048x$, де y – тривалість діареї (діб), x – концентрація СЗ у фекаліях на другу – третю добу РВІ, мкмоль/л;

• $y = 9,47 - 20,65x$, де y – тривалість діареї (діб), x – значення AI на другу – третю добу РВІ.

Перспективи подальших досліджень полягають у продовженні вивчення ступеня виразності порушень метаболічної активності кишкової мікрофлори в хворих на РВІ дітей залежно від віку та наявної коморбідної патології.

Подяка

Автори висловлюють подяку доценту кафедри фізіології хімії Запорізького державного медичного університету Б. О. Варинському за допомогу в здійсненні дослідження.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 25.01.2023

Після доопрацювання / Revised: 24.02.2023

Прийнято до друку / Accepted: 02.03.2023

Відомості про авторів:

Воробйова Н. В., аспірант каф. дитячих інфекційних хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0001-7610-8067

Усачова О. В., д-р мед. наук, професор, зав. каф. дитячих інфекційних хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0003-0250-1223

Сіліна Є. А., канд. мед. наук, асистент каф. дитячих інфекційних хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0002-3199-9297

Фурик О. О., д-р мед. наук, доцент каф. інфекційних хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0002-5196-7698

Information about authors:

Vorobiova N. V., PhD student of the Department of Pediatric Infectious Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Usachova O. V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Pediatric Infectious Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Silina Ye. A., PhD, Assistant of the Department of Pediatric Infectious Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Furik O. O., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Infectious Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

References

- [1] Abdoli, A., & Maspi, N. (2018). Commentary: Estimates of Global, Regional, and National Morbidity, Mortality, and Aetiologies of Diarrhoeal Diseases: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Frontiers in medicine*, 5, 11. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00011>
- [2] Fernandez-Cassi, X., Martínez-Puchol, S., Silva-Sales, M., Comejo, T., Bartolome, R., Bofill-Mas, S., & Girones, R. (2020). Unveiling Viruses Associated with Gastroenteritis Using a Metagenomics Approach. *Viruses*, 12(12), 1432. <https://doi.org/10.3390/v12121432>
- [3] GBD 2016 Diarrhoeal Disease Collaborators (2018). Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet. Infectious diseases*, 18(11), 1211-1228. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30362-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30362-1)
- [4] Badur, S., Öztürk, S., Pereira, P., AbdelGhany, M., Khalaf, M., Lagoubi, Y., Ozudogru, O., Hanif, K., & Saha, D. (2019). Systematic review of the rotavirus infection burden in the WHO-EMRO region. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 15(11), 2754-2768. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1603984>
- [5] Fischer, T. K., Rasmussen, L. D., & Fonager, J. (2019). Taking gastro-surveillance into the 21st century. *Journal of clinical virology*, 117, 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.05.013>
- [6] Sohail, M. U., Al Khatib, H. A., Al Thani, A. A., Al Ansari, K., Yassine, H. M., & Al-Asmakh, M. (2021). Microbiome profiling of rotavirus infected children suffering from acute gastroenteritis. *Gut pathogens*, 13(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s13099-021-00411-x>
- [7] Engevik, M. A., Banks, L. D., Engevik, K. A., Chang-Graham, A. L., Perry, J. L., Hutchinson, D. S., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., & Hyser, J. M. (2020). Rotavirus infection induces glycan availability to promote ileum-specific changes in the microbiome aiding rotavirus virulence. *Gut microbes*, 11(5), 1324-1347. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1754714>
- [8] Kim, A. H., Hogarty, M. P., Harris, V. C., & Baldridge, M. T. (2021). The Complex Interactions Between Rotavirus and the Gut Microbiota. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 586751. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.586751>
- [9] Mathew, S., Smatti, M. K., Al Ansari, K., Nasrallah, G. K., Al Thani, A. A., & Yassine, H. M. (2019). Mixed Viral-Bacterial Infections and Their Effects on Gut Microbiota and Clinical Illnesses in Children. *Scientific reports*, 9(1), 865. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37162-w>
- [10] Blaak, E. E., Canfora, E. E., Theis, S., Frost, G., Groen, A. K., Mithieux, G., Nauta, A., Scott, K., Stahl, B., van Harsselaar, J., van Tol, R., Vaughan, E. E., & Verbeke, K. (2020). Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. *Beneficial microbes*, 11(5), 411-455. <https://doi.org/10.3920/BM2020.0057>
- [11] Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., & Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European journal of nutrition*, 57(1), 1-24. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8>
- [12] Tsukuda, N., Yahagi, K., Hara, T., Watanabe, Y., Matsumoto, H., Mori, H., Higashi, K., Tsuji, H., Matsumoto, S., Kurokawa, K., & Matsuki, T. (2021). Key bacterial taxa and metabolic pathways affecting gut short-chain fatty acid profiles in early life. *The ISME journal*, 15(9), 2574-2590. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00937-7>
- [13] Harris, H. C., Morrison, D. J., & Edwards, C. A. (2021). Impact of the source of fermentable carbohydrate on SCFA production by human gut microbiota *in vitro* – a systematic scoping review and secondary analysis. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(22), 3892-3903. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1809991>
- [14] Rios-Covian, D., Salazar, N., Gueimonde, M., & de Los Reyes-Gavilan, C. G. (2017). Shaping the Metabolism of Intestinal *Bacteroides* Population through Diet to Improve Human Health. *Frontiers in microbiology*, 8, 376. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00376>
- [15] Diether, N. E., & Willing, B. P. (2019). Microbial Fermentation of Dietary Protein: An Important Factor in Diet-Microbe-Host Interaction. *Microorganisms*, 7(1), 19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010019>
- [16] Rios-Covian, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de Los Reyes-Gavilan, C. G., & Salazar, N. (2016). Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Frontiers in microbiology*, 7, 185. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>
- [17] Babayeva, B. A., & Valiyeva, K. T. (2019). [Diagnostic value the short chain fatty acids at viral diarrheas at children of the first year of life]. *Azerbaijan Journal of Perinatology and Pediatrics*, 5(1), 61-64. <https://doi.org/10.28942/jpp.v5i1.85>
- [18] Nezhoda, I. I., Naumenko, O. M., & Nikulchenko, O. V. (2019). Letki zhymni kysloty yak metabolični markery porushennia mikrobiotsenozy kyshechnyku pry rotavirusnii infektsii u ditei [Volatile fatty acids as metabolic markers of intestinal microbiocenosis in children with rotavirus infection]. *Infektsiini khvoroby*, (3), 24-32 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.11603/1681-2727.2019.3.10632>
- [19] Ivanko, O. H., & Bilykh, V. M. (2022). Fekalni kontsentratsii molochnoi kysloty ta korotkolantsiuhovykh zhymnykh kyslot u ditei rannoho viku, hospitalizovanykh v infektsiino-diahnostychnyi statsionar iz diareieiu [Fecal concentrations of lactic acid and short-chain fatty acids in young children hospitalized in an infectious-diagnostic hospital with diarrhea]. *Zaporozhye medical journal*, 24(3), 332-337. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2022.3.247605>
- [20] Vorobiova, N. V., Usachova, O. V., & Kaplaushenko, A. H. (2021). Pathogenetic role of intestinal microflora in carbohydrate malabsorption syndrome in early-aged children with rotavirus infection. *Zaporozhye medical journal*, 23(5), 683-690. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2021.5.231265>

Дослідження капілярного кровотоку слизової оболонки періімплантатної ділянки методом лазерної доплерівської флоуметрії

Д. Я. Максимов^{ID *A,B,D}, С. Д. Варжапетян^{ID C,E}, Д. П. Пархоменко^{ID B},
В. І. Сальников^B, О. М. Міщенко^{ID A,E,F}

Запорізький державний медичний університет, Україна

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

Мета роботи – здійснити клінічний аналіз капілярного кровотоку слизової оболонки періімплантатної зони за допомогою лазерної доплерівської флоуметрії (ЛДФ), а також порівняльне оцінювання ефективності імплантованої конструкції з поверхнею, модифікованою наночастинами срібла (AgNP).

Матеріали та методи. У дослідженні взяли участь 40 пацієнтів, які перебували на реабілітації щодо вторинної часткової адентії методом дентальної імплантації. Обстежених поділили на 2 групи: пацієнтам 1 групи (n = 20) встановлено формувачі ясен із поверхнею, модифікованою методом плазмової електроокисації та допованою AgNP; хворим 2 групи (n = 20) встановлено стандартні формувачі ясен використовуваної імплантаційної системи з полірованою поверхнею. Контрольна група (n = 20) сформована для визначення референтних значень. Загалом у дослідження залучено 60 пацієнтів. Швидкість кровотоку у групах дослідження визначали методом ЛДФ.

Результати. На 10 день при використанні формувачів ясен з поверхнею, що містить AgNP, визначили позитивну динаміку, збільшення швидкості кровотоку слизової оболонки періімплантатної зони (6,97 мм/с), на відміну використання формувачів ясен із полірованою поверхнею (5,43 мм/с). У разі застосування формувачів ясен із поверхнею, що містить AgNP, збільшення швидкості капілярного кровотоку (на 22,2 %) в окремій локації є свідченням зменшення запальних процесів та вираженого протизапального ефекту AgNP поверхні.

Висновки. Вищі (на 22,2 %) показники швидкості капілярного кровотоку слизової оболонки періімплантатної зони, які визначили в разі застосування формувачів ясен, що містять AgNP, порівняно з полірованими формувачами свідчать про виражений протизапальний ефект поверхні, допованої AgNP.

Показники, що визначили в групі з AgNP, максимально наближені до референтних показників швидкості кровотоку в капілярному руслі маргінальних ясен здорових людей. Отже, можна припустити наявність вираженого антимікробного ефекту наночастинок срібла на поверхні формувачів ясен.

Оскільки кровотік у тканинах безпосередньо пов'язаний з оксигенацією клітин, зменшенням локального ацидозу та запальних реакцій, а також визначає стан тканинного імунітету та безпосередньо позначається на якості репаративних процесів у пошкодженій тканині, результати, що одержали, обґрунтовують рекомендацію запропонованої AgNP-поверхні до використання у клінічній практиці.

Ключові слова:

лазерна доплерівська флоуметрія, імплантат, капілярний кровотік, плазмове електроокисування, наночастини.

Патологія. 2023.

T. 20, № 1(57).
C. 69-75

*E-mail:

Maximovdenis0064@gmail.com

Study of the capillary blood flow of the mucous membrane of the peri-implant area by laser Doppler flowmetry

D. Ya. Maksymov, S. D. Varzhapetian, D. P. Parkhomenko, V. I. Salnykov, O. M. Mishchenko

Aim: to conduct a clinical analysis of the capillary blood flow of the mucous membrane of the peri-implant zone using laser Doppler flowmetry (LDF), as well as a comparative assessment of the effectiveness of the implanted structure with a surface, modified with silver nanoparticles (AgNP).

Materials and methods. The study involved 40 patients undergoing rehabilitation for secondary partial adentia by the method of dental implantation. The examinees were divided into 2 groups: Group 1 (20 patients) – gingival formers with a surface modified by plasma electrooxidation and doped with AgNP were installed; Group 2 (20 patients) – standard gingival formers of the used implant system with a polished surface were installed. A control group (20 patients) was formed to determine the reference values. In total, 60 patients were involved in the study. Blood flow velocity in the studied groups was determined by laser Doppler flowmetry.

Results. On the 10th day, when using gingival formers with a surface containing AgNP, a positive trend with increasing the blood flow rate of the mucous membrane of the peri-implant zone (6.97 mm/s) is determined, in contrast of using the gingival formers with a polished surface (5.425 mm/s). In the process of using the gum formers with a surface containing AgNPs, an increase in capillary blood flow rate (by 22.2 %) in a separate location is evidence of a reduction in inflammatory processes and a pronounced anti-inflammatory effect of the AgNP surface.

Conclusions. Higher (by 22.2 %) indicators of capillary blood flow rate of the mucous membrane of the peri-implant zone in patients using gingival formers containing AgNP, compared to polished formers, indicates a pronounced anti-inflammatory effect of the proposed AgNP-doped surface.

Key words:

laser Doppler flowmetry, implant, capillary blood flow, plasma electrooxidation, nanoparticles.

Pathologia

2023; 20 (1), 69-75

The values obtained in the group with AgNPs are as close as possible to the reference indicators of the blood flow rate in the capillary channel of the marginal gingiva of healthy people, which suggests the presence of a pronounced antimicrobial effect of silver nanoparticles on the surface of the gingival formers.

Since blood flow in tissues is directly related to oxygenation of cells, reduction of local acidosis, reduction of inflammatory reactions and determines the state of tissue immunity, as well as directly affects the quality of reparative processes in damaged tissue, the obtained results allow recommending the proposed AgNP – surface for use in clinical practice.

Останніми роками в дентальній імплантації серйозними проблемами стали мукозит і періімплантит, а бактеріальна інфекція та некоректний оклюзійний тиск є основними причинами виникнення запалення [1–3].

У дослідженні Н. Chouirfa et al. [4] показано, що для ефективного функціонування імплантат має бути бактеріостатичним і бактерицидним. Поверхня імплантату повинна добре вбирати молекули води, білків і ліпідів із крові, а також знищувати колонії бактерій. Завдяки цьому процес остеогенезу перебігатиме без ускладнень, сприяючи формуванню інтегрованого активного шару на поверхні імплантату [5,6].

Відомі методи фізичної зміни поверхневих властивостей імплантатів, як-от мікрохвильовий вплив [7,8], хімічне полірування [9] та лазерні технології (селективне лазерне спікання [10] та променево спікання [11]), вважають інноваційними та сучасними.

Антимікробні властивості мають важливе значення для стоматологічних імплантатів за умов свідомо інфікованого середовища ротової порожнини. Нанесення на поверхню внутрішньокісткових металевих імплантатів тонких плівок, що містять різні протимікробні агенти та здатні пригнічувати інфекцію шляхом вивільнення остеогенних та антимікробних компонентів, вважають перспективним рішенням [12–19]. Найбільш поширені серед них – електрофоретичне / електрохімічне покриття [20], золь-гель [21], напилення [22] й імпульсне лазерне напилення.

Щодо поверхні імплантату показали: біоактивні покриття мають не тільки сприяти проліферації остеобластів і секреції кісткового матриксу, але й мінімізувати колонізацію бактерій на інженерній поверхні [23–27].

Доведено, що періодонтальна зв'язка відіграє важливу роль у регенерації тканин пародонта, проте на неї можуть впливати різні фактори довкілля [28]. Тому дослідження стану мікроциркуляції щелепно-лицевої ділянки та порожнини рота викликають науковий і практичний інтерес у лікарів-стоматологів усіх спеціальностей, актуальним залишається пошук оптимальної методики для реалізації цього завдання.

Мережу мікросудин, включаючи тканини пародонта, досліджували на тваринних моделях [29]. Встановили, що у мікроциркуляторному руслі ясен формуються петлеві структури для захисту від бактеріальної інвазії [30]. Крім того, дослідження на людях і тваринах показали, що кровотік у яснах може змінюватися під впливом запального процесу [31,32]. Повідомляли також про модуляцію мікроциркуляції ясен при запальних захворюваннях, включаючи пародонтит, діабет та гіпертонію [33].

Лазерна доплерівська флоуметрія (ЛДФ) – неінвазійний метод, що дає змогу реєструвати мікроциркуляцію в тканинах людини та тварин. Принцип ЛДФ ґрунтується на взаємодії світла з тканиною, тобто на

принципі ефекту Доплера щодо лазерного випромінювання. Це ще одна оптична технологія, що дає інформацію про кровотік у ложі тканини з використанням видимого й інфрачервоного світла [34]. В окремих дослідженнях ЛДФ застосували для вивчення шкірного та м'язового мікросудинного кровотоку та реактивності в пацієнтів у критичному стані [35].

Хоча ЛДФ може дати точну оцінку змінам швидкості кровотоку, що спричинені фармакологічними втручаннями, зміни гематокриту цим методом дослідженні недостатньо. На сигнал ЛДФ можуть впливати артефакти тиску та руху в місці вимірювання, особливо в разі впливу на слизові оболонки. Раннє й точне оцінювання кровотоку – важлива перевага в будь-якій фізіопатологічній чи лікувальній парадигмі. Крім того, оцінювання загоєння ран можна здійснити без ризику контамінації, інфікування або дискомфорту для пацієнта [36].

Мета роботи

Здійснити клінічний аналіз капілярного кровотоку слизової оболонки періімплантатної зони за допомогою лазерної доплерівської флоуметрії, а також порівняльне оцінювання ефективності імплантованої конструкції з поверхнею, модифікованою наночастинами срібла.

Матеріали і методи дослідження

У дослідженні взяли участь 40 пацієнтів, які перебували на реабілітації щодо вторинної часткової адентії методом дентальної імплантації. Обстежених поділили на 2 групи: пацієнтам 1 групи (n = 20) встановлено формувачі ясен із поверхнею, модифікованою методом плазмової електрооксидзації та доповану наночастинами срібла (AgNP); хворим 2 групи (n = 20) встановлено стандартні формувачі ясен використовуваної імплантаційної системи з полірованою поверхнею. Контрольна група (n = 20) сформована для встановлення референтних значень. Загалом у дослідження залучено 60 пацієнтів. Порівняння за віком і статтю обстежених наведено у *таблиці 1*.

Дослідження здійснили на клінічних базах кафедри стоматології післядипломної освіти Запорізького державного медичного університету (КНП «Міська лікарня екстреної та швидкої медичної допомоги № 5» ЗМР і стоматологія «Ексіма»).

Відповідно до термінів, що наведені в кожному індивідуальному протоколі імплантації, пацієнтам встановили формувачі ясен (другий етап, передбачений двоетапним протоколом дентальної імплантації).

Додаткові критерії виключення з дослідження – соматичні захворювання, гемофілія, цукровий діабет, порушення артеріального тиску, вік менше ніж 16 і

понад 50 років, системне приймання антибіотиків принаймні за 3 місяці до початку дослідження.

Усі обстежені надали письмову інформовану згоду на участь у дослідженні.

Для встановлення референтних значень швидкості капілярного кровотоку в групі здорових осіб встановили параметри ЛДФ у зоні міжзубних сосочків у фронтальному та бічних відділах верхньої та нижньої щелепи з вестибулярної поверхні.

У групах порівняння швидкість капілярного кровотоку визначали зі слизової оболонки періімплантатної зони, безпосередньо прилеглої до формувача ясен, у вестибулярній ділянці на 10 день після встановлення формувача.

У всіх випадках для контролю якості інтеграції формувач ясен встановлювали відкритим способом. Для цього під інфільтраційною анестезією робили розріз уздовж вершини альвеолярного гребня в проекції встановленого імплантату, з мінімальною інвазією відшаровували слизову оболонку й окістя до розчинення заглушки. Заглушку видаляли, шахту імплантату промивали розчином антисептика. Після контролю гемостазу встановлювали обраний формувач ясен із торком 5 Н/см, слизову оболонку ушивали кетгуттом.

Пацієнтам призначали ванни з антисептиком. Здійснювали інструктаж із додаткової гігієни порожнини рота зі встановленими формувачами ясен на імплантатах.

Вимірювання ЛДФ. Для стабілізації датчика приладу кожному пацієнту виготовляли силіконову капу (рис. 1, 2) на ділянку, яку досліджували. Робили отвори в проекції досліджуваної точки, на 0,1–0,2 мм менші за діаметр датчика; це забезпечувало його нерухомість у процесі зняття показань (рис. 3). Коливання мікрокровотоку реєстрували аналізатором ЛАКК-02 2003 року випуску (рис. 4).

При взаємодії лазерного випромінювання з тканиною відбитий сигнал має дві складові: постійну та змінну. Постійний сигнал зумовлений відображенням від нерухомих структур тканини, що зондується. Змінний сигнал пов'язаний із частинками, що рухаються, – еритроцитами. У разі взаємодії лазерного випромінювання з нерухою тканиною розсіяне випромінювання має ту саму частоту, що і зондувальне випромінювання, при взаємодії з еритроцитами, що рухаються, частота розсіяного випромінювання відрізняється від частоти випромінювання, що падає, відповідно до доплерівського ефекту. Доплерівський зсув частоти пов'язаний зі швидкістю еритроцитів згідно з виразом:

$$\Delta f = 2nV/\lambda,$$

де Δf – доплерівський зсув частоти, n – показник заломлення випромінювання в тканині, V – швидкість еритроцитів, λ – довжина хвилі зондувального випромінювання).

Результат флоуметрії можна описати виразом:

$$PM = K \times N_{ер} \times V_{сер},$$

де PM – показник мікроциркуляції (амплітуда сигналу, в вольтах), K – коефіцієнт пропорційності ($K = 1$),

Таблиця 1. Характеристики груп за віком і статтю пацієнтів

Показник, одиниці вимірювання	1 група (дослідження) (n = 20)	2 група (порівняння) (n = 20)	3 група (контролю) (n = 20)	p-level між 1 і 2 групами
Вік, роки (M ± m)	49,35 ± 2,20	52,45 ± 2,28	50,35 ± 1,21	0,322
Чоловіки, n/%	11/55,0	5/25,0	9/45,0	0,053
Жінки, n/%	9/45,0	15/75,0	11/55,0	0,053

Групи зіставні за віком ($p > 0,05$); у групі порівняння чоловіків менше, ніж в групі дослідження (25 % проти 55 %), але ця різниця не набула статистичної значущості ($p > 0,05$).

$N_{ер}$ – кількість еритроцитів, $V_{сер}$ – середня швидкість еритроцитів у зондованому об'ємі.

Отже, в неінвазивному методі ЛДФ результуючий параметр визначає динамічну характеристику мікроциркуляції крові – зміну потоку крові (перфузії тканини кров'ю) за одиницю часу в об'ємі, що зондується.

Усі вимірювання ЛДФ здійснили одним і тим самим попередньо каліброваним датчиком. Відтворюваність вимірювань попередньо перевірили на 20 пародонтологічно здорових добровольцях, яким дослідження здійснили у двох ясенних ділянках. Обчислення виконали за допомогою програмного забезпечення LDF 2.20.

Статистичний аналіз здійснили за допомогою пакета Statistica 13, ліцензія № JРZ8041382130ARCN10-J. Дані перевіряли на відповідність нормальному розподілу за допомогою критерію Шапіро–Вілка. Дані, що відповідали закону нормального розподілу, наведено як середнє ± стандартна похибка ($M \pm m$), при відхиленні від нормального закону розподілу – як медіана та міжквартильний розмах Me (Q25; Q75). Відмінності між групами оцінювали за допомогою критерію Стьюдента для незалежних вибірок при відповідності закону нормального розподілу, при відхиленні від нього застосували критерій Манна–Вітні. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати

Модифікація поверхні формувачів ясен. У групі дослідження використали формувачі ясен імплантаційних систем Арт Імплант і ZirconPrior із поверхнею, що модифікована за допомогою плазмової електрооксидзації з доповненням наночастинами срібла.

Окиснення анода здійснювали за допомогою високовольтного джерела струму KIKUSIU PWR800H (Японія), яким управляли за допомогою ПК із програмним забезпеченням Wavy (KIKUSIU, Японія) при щільності струму 150 мА/см². Тривалість процесу щоразу становила 5 хвилин. Розчин при цьому перемішували за допомогою магнітної мішалки. Температура процесу – 15 °С. Після анодування зразки промивали в потоці води DEMI, висушували на повітрі. Після цього наносили наночастинки виробництва компанії NanoWave (Poland).

Попередньо синтез наночастинок срібла здійснили в УФ-реакторі з неіржавної сталі (Nanowave). На кожні 200 мл деіонізованої води додавали 400 мг полівінілпіролідону K30 і 120 мг нітрату срібла, ретельно перемішували. Після отримання гомогенної суміші додавали 150 мкл 20 % натрію гіпохлориту. Реакцію проводили при ретельному перемішуванні протягом

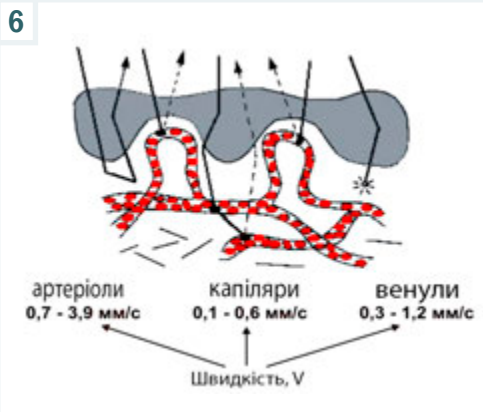
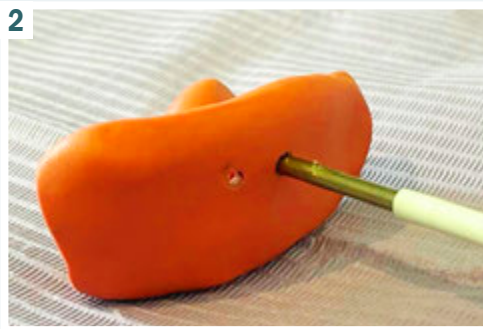
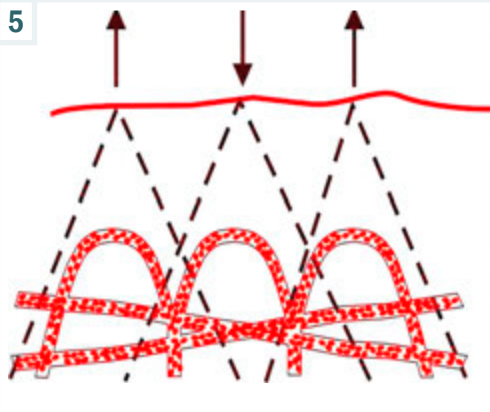


Рис. 1. Вигляд шаблона зсередини.

Рис. 2. Вигляд шаблона зовні.

Рис. 3. Фіксація датчика в порожнині рота.

Рис. 4. Прилад ЛАКК-02.

Рис. 5. Положення судин до хвилі зондувального випромінювання.

Рис. 6. Величина доплерівського зсуву частоти.

1 години. На наступному етапі отриманий колоїд срібла фільтрували, використовуючи мембрану зворотного осмосу (Osmotec M300-O), до отримання концентрації срібла 3 г/л. Наночастини застосовували як наявні без додаткового очищення.

Вимірювання швидкості капілярного кровотоку. Кровоносні судини мікроциркуляторного русла можуть бути орієнтовані щодо фронту хвилі зондувального випромінювання під різними кутами (рис. 5). Максимальна частота доплерівського зсуву виникає, коли вектори напрямку поширення фронту хвилі випромінювання та швидкості руху еритроциту паралельні. Цій ситуації відповідає частотний зсув майже 4,4 кГц для швидкості еритроцитів 1 мм/с і довжини хвилі гелій-неонового лазера 0,638 мкм при показнику заломлення тканини 1,4. Для еритроцитів, що рухаються під кутом до напрямку зондувального випромінювання, величина доплерівського зсуву час-

тоти зменшується пропорційно до значення косинуса цього кута (рис. 6).

Доставлення лазерного випромінювання до тканини та приймання відбитого сигналу в приладах, що реалізують метод ЛДФ, здійснюються, як правило, за допомогою світловодного зонда, що складається з трьох світловодних волокон. Одне світловодне волокно використовують для передачі зондувального випромінювання, а два інших є приймальними, якими відбите випромінювання доставляється до приладу для фотометрування та наступної обробки. Амплітуда відбитого сигналу формується в результаті відбиття випромінювання від ансамблю еритроцитів, що рухаються з різними швидкостями та по-різному кількісно розподілені в артеріолах, капілярах, венулах та артеріоло-венулярних анастомозах. Тому в методі ЛДФ застосовують алгоритм усереднення, що дає змогу отримати середній доплерівський зсув частоти

на всій сукупності еритроцитів, які потрапляють у зондовану ділянку. Внаслідок такого усереднення методом ЛДФ оцінюють зміну потоку еритроцитів. Для цього обробляють відбитий сигнал електронним шляхом, здійснюючи усереднення за швидкостями (доплерівських зсувів частоти). Очевидно, що потужність відбитого випромінювання складається з окремих актів відображення випромінювання на кожному еритроциті, а отже залежить від їхньої концентрації. На виході приладу формується результат флоуметрії – сигнал, амплітуда якого пропорційна швидкості та кількості еритроцитів.

У результаті досліджень у контрольній групі практично здорових людей одержали такі референтні значення швидкості капілярного кровотоку в ділянці кругової зв'язки та зубо-ясенних сосочків: кількість замірів – 40, швидкість – 7,65 (7,52; 7,86) мм/с.

У групі пацієнтів зі встановленими формувачами ясен із полірованою поверхнею (група 2) на 10 день після встановлення формувача зареєстрували такі показники швидкості капілярного кровотоку в ділянці слизової оболонки в періімплантатній зоні: кількість замірів – 68, швидкість – 5,43 (5,12; 5,83) мм/с.

У групі пацієнтів зі встановленими формувачами ясен із поверхнею, що містить AgNP (група 1), на 10 день після встановлення формувача зафіксували такі показники швидкості капілярного кровотоку в ділянці слизової оболонки в періімплантатній зоні: кількість замірів – 71, швидкість – 6,97 (6,79; 7,07) мм/с.

Порівняння параметрів групи 2 із контрольною групою за критерієм Манна–Вітні показало статистично вірогідну різницю ($p < 0,0001$), відношення медіан становить 1,36. Встановили зниження швидкості кровотоку, що підтверджує сильніший запальний процес, ніж у контрольній групі (рис. 7).

У групі пацієнтів зі встановленими формувачами ясен із поверхнею, що модифікована AgNP, на 10 день після встановлення формувача медіана швидкості капілярного кровотоку наближалася до значень, що встановили у референтній групі; відношення медіан становило 1,10, хоча за критерієм Манна–Вітні різниця статистично достовірна ($p < 0,0001$).

Модифікована поверхня AgNP показала покращену регенеративну функцію періімплантатної зони; це зумовлено її вираженим бактерицидним та антибактеріальним ефектом.

Обговорення

У цьому дослідженні вперше застосували неінвазивну методику лазерної доплерівської флоуметрії для оцінювання капілярного кровотоку слизової оболонки періімплантатної зони.

Кровотік у тканинах безпосередньо пов'язаний з оксигенацією клітин, зменшенням локального ацидозу, зменшенням запальних реакцій і визначає стан тканинного імунітету, а також відбивається на клітковому метаболізмі та якості репаративних процесів у пошкодженій тканині. Тому швидкість капілярного кровотоку визначили як один із провідних критеріїв якості регенерації слизової оболонки в періімплантатній зоні в ділянці встановленого формувача ясен.

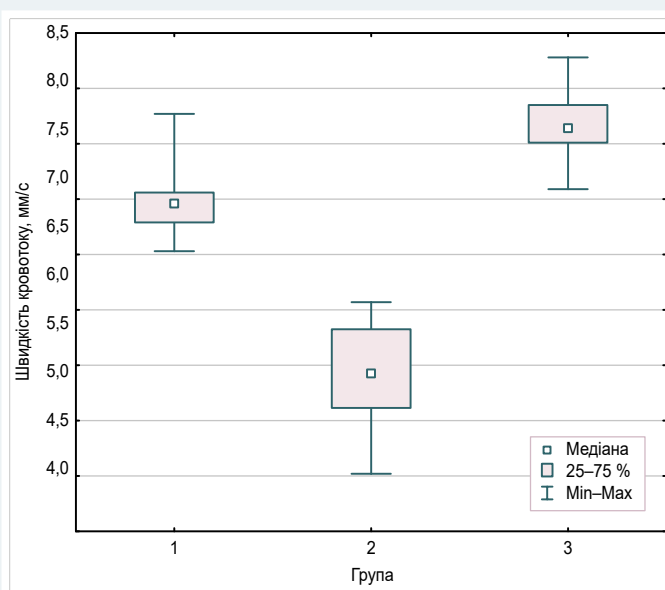


Рис. 7. Порівняння швидкості кровотоку у групах дослідження: група 1 – формувачами з поверхнею, що містить AgNP; група 2 – полірована поверхня формувача; група 3 – контрольна (здорові).

Обґрунтували та клінічно підтвердили доцільність вибору концентрації AgNP і спосіб їх нанесення на поверхню інтраінгівальної частини конструкції. Зважаючи на щільний зв'язок між інфекцією та поверхнею імплантату або формувача ясен, запропонували модифікацію поверхні формувача ясен (плазмова електроокисація – AgNP), що може істотно зменшити мікробну контамінацію в ділянці слизової оболонки періімплантатної зони, на рановій поверхні та в кишені між формувачем ясен або абатментом і слизовою оболонкою. Це сприяє зменшенню запального компонента вже в ранні терміни загоєння.

Ці припущення підтверджено клінічно шляхом використання лазерної доплерівської флоуметрії як єдиного неінвазивного методу клінічної діагностики. У групі пацієнтів зі встановленими формувачами ясен із поверхнею, що містить AgNP, зафіксували швидкість кровотоку, максимально близьку за значеннями до референтної групи (до 91 % від референтних показників).

На 10 день при використанні формувачів ясен із поверхнею, що містить AgNP, спостерігали позитивну динаміку, збільшення швидкості кровотоку слизової оболонки періімплантатної зони (6,97 мм/с) порівняно з групою, де застосували формувачі ясен із полірованою поверхнею (5,425 мм/с). У разі використання формувачів ясен із поверхнею, що містить AgNP, збільшення швидкості капілярного кровотоку (на 22,2 %) в окремій локації свідчить про зменшення локального ацидозу, пригнічення запальних процесів і наявність вираженого протизапального ефекту AgNP поверхні.

Враховуючи результати, що одержали, можна стверджувати: запропонований вид модифікації поверхні частин дентального імплантату, формувача ясен є доцільнішим для використання в імплантології.

Висновки

1. Вищі (на 22,2 %) показники швидкості капілярного кровотоку слизової оболонки періімплантатної зони в пацієнтів у разі використання формувачів ясен, що містять AgNP, порівняно з полірованими формувачами свідчать про виражений протизапальний ефект поверхні, допованої AgNP.

2. Значення, отримані в групі з AgNP, максимально (до 91 %) наближені до референтних показників швидкості кровотоку в капілярному руслі маргінальних ясен здорових людей. Це дає підстави припустити наявність вираженого антимікробного ефекту наночастинок срібла на поверхні формувачів ясен або абатментів.

3. Оскільки кровотік у тканинах безпосередньо пов'язаний з оксигенацією клітин, зменшенням локального ацидозу, зменшенням запальних реакцій і визначає стан тканинного імунітету, а також безпосередньо відбивається на якості репаративних процесів у пошкодженій тканині, результати дослідження обґрунтовують рекомендацію запропонованої AgNP-поверхні до використання у клінічній практиці.

4. Неінвазивність методу, достовірна точність показників і безперечна важливість даних про капілярний кровотік є підставою для рекомендації ЛДФ методу для використання у клінічній практиці, а одержані показники значень ясенного капілярного кровотоку здорових людей вважати референтними.

Перспективи подальших досліджень полягають у визначенні ефективності розробленої методики модифікації поверхні шляхом введення наночастинок срібла та клінічного підтвердження наявності бактеріостатичного та бактерицидного ефекту модифікованої поверхні імпланту.

Фінансування

Дослідження виконане в рамках проекту Європейської Комісії за програмою Горизонт 2020 MSCA-RISE (проект 777926 NanoSurf "Nanostructural surface development for dental implant manufacturing"), проекту Польського національного центру досліджень та розробок (проект POIR.01.01.02-00-0022/16 "Development of technology and launching the production of innovative dental implants with increased osteoinductive properties"), а також НДР Запорізького державного медичного університету «Динамічні зміни морфологічних і біомеханічних властивостей тканин щелепно-лицьової області при реабілітації пацієнтів з адентією», № держреєстрації 0118U007136 (2018–2022 рр.).

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 18.01.2023

Після доопрацювання / Revised: 28.02.2023

Прийнято до друку / Accepted: 10.03.2023

Відомості про авторів:

Максимов Д. Я., PhD аспірант каф. стоматології післядипломної освіти, Запорізький державний медичний університет, Україна. ORCID ID: 0000-0002-3200-3754

Варжапетян С. Д., д-р мед. наук, професор каф. стоматології післядипломної освіти, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-5649-1126

Пархоменко Д. П., асистент каф. терапевтичної, ортопедичної та дитячої стоматології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-8745-5961

Сальников В. І., асистент каф. стоматології післядипломної освіти, Запорізький державний медичний університет, Україна. Міщенко О. М., д-р мед. наук, професор, зав. каф. стоматології післядипломної освіти, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-6378-7061

Information about authors:

Maksymov D. Ya., MD, PhD-student of the Department of Dentistry of Postgraduate Education, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Varzhapetian S. D., MD, DSc, Professor of the Department of Dentistry of Postgraduate Education, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Parkhomenko D. P., MD, Assistant of the Department of Therapeutic, Orthopedic and Pediatric Dentistry, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Salnykov V. I., MD, Assistant of the Department of Dentistry of Postgraduate Education, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Mishchenko O. M., MD, DSc, Professor, Head of the Department of Dentistry of Postgraduate Education, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

References

- [1] Kim, Y., Oh, T. J., Misch, C. E., & Wang, H. L. (2005). Occlusal considerations in implant therapy: clinical guidelines with biomechanical rationale. *Clinical oral implants research*, 16(1), 26-35. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.01067.x>
- [2] Qiao, S., Wu, D., Wang, M., Qian, S., Zhu, Y., Shi, J., Wei, Y., & Lai, H. (2020). Oral microbial profile variation during canine ligature-induced peri-implantitis development. *BMC microbiology*, 20(1), 293. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01982-6>
- [3] Favero, G., Apaza Alccayhuaman, K. A., Silva, E. R., Bengazi, F., Urbizo, J., Kotsu, M., & Botticelli, D. (2020). Effect of lack of plaque control after the surgical treatment of peri-implantitis at surfaces with different characteristics: an experimental study in dogs. *Oral and maxillofacial surgery*, 24(4), 431-439. <https://doi.org/10.1007/s10006-020-00870-7>
- [4] Chouirfa, H., Bouloussa, H., Migonney, V., & Falentin-Daudré, C. (2019). Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications. *Acta biomaterialia*, 83, 37-54. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.036>
- [5] Shah, F. A., Thomsen, P., & Palmquist, A. (2019). Osseointegration and current interpretations of the bone-implant interface. *Acta biomaterialia*, 84, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.018>
- [6] Gittens, R. A., Olivares-Navarrete, R., Schwartz, Z., & Boyan, B. D. (2014). Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: lessons for spine implants. *Acta biomaterialia*, 10(8), 3363-3371. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.037>
- [7] Omoniala, K. (2016). *Surface Modification Strategies for Antimicrobial Titanium Implant Materials with Enhanced Osseointegration* (Thesis PhD). De Montfort University. <https://www.dora.dmu.ac.uk/handle/2086/14462>
- [8] Lin, D. J., Fuh, L. J., & Chen, W. C. (2020). Nano-morphology, crystallinity and surface potential of anatase on micro-arc oxidized titanium affect its protein adsorption, cell proliferation and cell differentiation. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 107, 110204. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110204>
- [9] Lin, D. J., Fuh, L. J., Chen, C. Y., Chen, W. C., Lin, J. C., & Chen, C. C. (2019). Rapid nano-scale surface modification on micro-arc oxidation coated titanium by microwave-assisted hydrothermal process. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 95, 236-247. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.085>
- [10] Soro, N., Sainier, N., Attar, H., & Dargusch, M. S. (2020). Surface and morphological modification of selectively laser melted titanium lattices using a chemical post treatment. *Surface & Coatings Technology*, 393, 125794. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2020.125794>
- [11] Emmelmann, C., Scheinemann, P., Munsch, M., & Seyda, V. (2011). Laser additive manufacturing of modified implant surfaces with osseointegrative characteristics. In *Physics Procedia* (Vol. 12, pp. 375-384). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.phpro.2011.03.048>
- [12] Pires, L. C., Guastaldi, F. P. S., Nogueira, A. V. B., Oliveira, N. T. C., Guastaldi, A. C., & Cirelli, J. A. (2019). Physicochemical, morphological, and biological analyses of Ti-15Mo alloy surface modified by laser

- beam irradiation. *Lasers in medical science*, 34(3), 537-546. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2626-2>
- [13] Awasthi, S., Pandey, S. K., Arunan, E., & Srivastava, C. (2021). A review on hydroxyapatite coatings for the biomedical applications: experimental and theoretical perspectives. *Journal of materials chemistry. B*, 9(2), 228-249. <https://doi.org/10.1039/d0tb02407d>
- [14] Drago, L., Toscano, M., & Bottagisio, M. (2018). Recent Evidence on Bioactive Glass Antimicrobial and Antibiofilm Activity: A Mini-Review. *Materials*, 11(2), 326. <https://doi.org/10.3390/ma11020326>
- [15] Li, B., Xia, X., Guo, M., Jiang, Y., Li, Y., Zhang, Z., Liu, S., Li, H., Liang, C., & Wang, H. (2019). Biological and antibacterial properties of the micro-nanostructured hydroxyapatite/chitosan coating on titanium. *Scientific reports*, 9(1), 14052. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49941-0>
- [16] Stuart, B. W., Gimeno-Fabra, M., Segal, J., Ahmed, I., & Grant, D. M. (2015). Degradation and Characterization of Resorbable Phosphate-Based Glass Thin-Film Coatings Applied by Radio-Frequency Magnetron Sputtering. *ACS applied materials & interfaces*, 7(49), 27362-27372. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b08957>
- [17] Ballarre, J., Aydemir, T., Liverani, L., Roether, J. A., Goldmann, W. H., & Boccaccini, A. R. (2020). Versatile bioactive and antibacterial coating system based on silica, gentamicin, and chitosan: Improving early stage performance of titanium implants. *Surface and Coatings Technology*, 381. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.125138>
- [18] Kulkarni Aranya, A., Pushalkar, S., Zhao, M., LeGeros, R. Z., Zhang, Y., & Saxena, D. (2017). Antibacterial and bioactive coatings on titanium implant surfaces. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 105(8), 2218-2227. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36081>
- [19] Cyphert, E. L., & von Recum, H. A. (2017). Emerging technologies for long-term antimicrobial device coatings: advantages and limitations. *Experimental biology and medicine*, 242(8), 788-798. <https://doi.org/10.1177/1535370216688572>
- [20] Tite, T., Popa, A. C., Balescu, L. M., Bogdan, I. M., Pasuk, I., Ferreira, J. M. F., & Stan, G. E. (2018). Cationic Substitutions in Hydroxyapatite: Current Status of the Derived Biofunctional Effects and Their In Vitro Interrogation Methods. *Materials*, 11(11), 2081. <https://doi.org/10.3390/ma11112081>
- [21] Rivera, L. R., Cochis, A., Biser, S., Canciani, E., Ferraris, S., Rimoncini, L., & Boccaccini, A. R. (2020). Antibacterial, pro-angiogenic and pro-osteointegrative zein-bioactive glass/copper based coatings for implantable stainless steel aimed at bone healing. *Bioactive materials*, 6(5), 1479-1490. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.11.001>
- [22] Soule, L. D., Pajares Chomorro, N., Chuong, K., Mellott, N., Hammer, N., Hankenson, K. D., & Chatzistavrou, X. (2020). Sol-Gel-Derived Bioactive and Antibacterial Multi-Component Thin Films by the Spin-Coating Technique. *ACS biomaterials science & engineering*, 6(10), 5549-5562. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.0c01140>
- [23] Popescu-Pelin, G., Ristoscu, C., Duta, L., Stan, G. E., Pasuk, I., Tite, T., Stan, M., Bleotu, C., Popa, M., Chifriuc, M. C., Oktar, F. N., Nicarel, A., & Mihailescu, I. N. (2020). Antimicrobial and Cytocompatible Bovine Hydroxyapatite-Alumina-Zeolite Composite Coatings Synthesized by Pulsed Laser Deposition from Low-Cost Sustainable Natural Resources. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(10), 4026-4036. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b05031>
- [24] Santos-Coquillat, A., Gonzalez Tenorio, R., Mohedano, M., Martinez-Campos, E., Arrabal, R., & Matykina, E. (2018). Tailoring of antibacterial and osteogenic properties of Ti6Al4V by plasma electrolytic oxidation. *Applied Surface Science*, 454, 157-172. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.04.267>
- [25] Alves Claro, A. P. R., Konatu, R. T., Escada, A. L. do A., de Souza Nunes, M. C., Maurer-Morelli, C. V., Dias-Netipany, M. F., Popat K. C., & Mantovani, D. (2018). Incorporation of silver nanoparticles on Ti7.5Mo alloy surface containing TiO₂ nanotubes arrays for promoting antibacterial coating – In vitro and in vivo study. *Applied Surface Science*, 455, 780-788. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.05.189>
- [26] Ferraris, S., & Spriano, S. (2016). Antibacterial titanium surfaces for medical implants. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 61, 965-978. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.062>
- [27] Jarosz, M., Pawlik, A., Szuwarzyński, M., Jaskuła, M., & Sulka, G. D. (2016). Nanoporous anodic titanium dioxide layers as potential drug delivery systems: Drug release kinetics and mechanism. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 143, 447-454. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.073>
- [28] Croes, M., Bakhshandeh, S., van Hengel, I. A. J., Lietaert, K., van Kessel, K. P. M., Pouran, B., van der Wal, B. C. H., Vogely, H. C., Van Hecke, W., Fluit, A. C., Boel, C. H. E., Alblas, J., Zadpoor, A. A., Weinans, H., & Amin Yavari, S. (2018). Antibacterial and immunogenic behavior of silver coatings on additively manufactured porous titanium. *Acta biomaterialia*, 81, 315-327. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.051>
- [29] Motoji, H., To, M., Hidaka, K., & Matsuo, M. (2020). Vitamin C and eggshell membrane facilitate orthodontic tooth movement and induce histological changes in the periodontal tissue. *Journal of oral biosciences*, 62(1), 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.job.2020.01.006>
- [30] To, M., Matsuo, M., Wada-Takahashi, S., Sugiyama, S., Tamaki, K., & Takahashi, S. S. (2020). Microcirculation changes in gingival tissue after ultrasonic tooth preparation in beagle dogs. *Journal of applied oral science : revista FOB*, 28, e20190145. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0145>
- [31] Wada-Takahashi, S., Hidaka, K. I., Yoshino, F., Yoshida, A., Tou, M., Matsuo, M., & Takahashi, S. S. (2020). Effect of physical stimulation (gingival massage) on age-related changes in gingival microcirculation. *PLoS one*, 15(5), e0233288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233288>
- [32] Molnár, E., Lohinai, Z., Demeter, A., Mikecs, B., Tóth, Z., & Vág, J. (2015). Assessment of heat provocation tests on the human gingiva: the effect of periodontal disease and smoking. *Acta physiologica Hungarica*, 102(2), 176-188. <https://doi.org/10.1556/036.102.2015.2.8>
- [33] Funaki, S., Tokutomi, F., Wada-Takahashi, S., Yoshino, F., Yoshida, A., Maehata, Y., Miyamoto, C., Toyama, T., Sato, T., Hamada, N., Lee, M. C., & Takahashi, S. S. (2016). Porphyromonas gingivalis infection modifies oral microcirculation and aortic vascular function in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP). *Microbial pathogenesis*, 92, 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.12.009>
- [34] Tanaka, Y., Toyama, T., Wada-Takahashi, S., Sasaki, H., Miyamoto, C., Maehata, Y., Yoshino, F., Yoshida, A., Takahashi, S. S., Watanabe, K., Lee, M. C., Todoki, K., & Hamada, N. (2016). Protective effects of (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-l-biopterin on local ischemia/reperfusion-induced suppression of reactive hyperemia in rat gingiva. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 58(1), 69-75. <https://doi.org/10.3164/jcfn.15-69>
- [35] Komaki, S., Ozaki, H., Takahashi, S. S., Wada-Takahashi, S., & Fushima, K. (2022). Gingival blood flow before, during, and after clenching, measured by laser Doppler blood flowmeter: A pilot study. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*, 161(1), 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2020.06.045>
- [36] Broz, P., Aschwanden, M., Partovi, S., Schulte, A. C., Benz, D., Takes, M., Walker, U. A., Bilecen, D., Jaeger, K. A., & Staub, D. (2015). Assessment of cutaneous microcirculation in unaffected skin regions by transcutaneous oxygen saturation monitoring and Laser Doppler flowmetry in systemic sclerosis. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 60(3), 263-271. <https://doi.org/10.3233/CH-131676>

Мезенхімальні стовбурові клітини: різноманітність

О. М. Грабовий ¹A,C,D,F, Н. М. Невмержицька ¹*1,B,D,E,F, Л. М. Яременко ¹D,E,
Г. Б. Костинський ²D,E, А. С. Демидчук ¹B, Г. Ю. Кондаурова ¹B

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна, ²Приватний 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:
мезенхімальні
стовбурові клітини,
гени, регенерація.

Патологія. 2023.
T. 20, № 1(57).
C. 76-84

*E-mail:
natalianmu@ukr.net

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) є різноманітними за пластичними, секреторними й імунотиповими ознаками, що зумовлено особливостями їхнього генетичного ландшафту. МСК, як і інші клітини організму, є результатом реалізації генетичної інформації, але деякі клітини на різних етапах гістогенезу виходять із нього. Такі резидентні клітини у тканинах і є стовбуровими. Вони перебувають у стані пластичного спокою, а їхній геном не зазнає змін, які спричинили б комітування / диференціювання. Однак ці клітини виявляють певну активність, продукуючи різні біологічно активні фактори. Логічно вважати, що клітини, які виходять із процесу гістогенезу на різних його стадіях, матимуть різні генетичні ландшафти, імунотипи, секреторні потенції. За умов фізіологічної або репаративної регенерації відбувається активація МСК, і в другому випадку вона є вибуховою. За природних умов активація МСК при пошкодженнях призводить до диференціювання їх у фібробласти й утворення сполучнотканинного рубця, але такі наслідки репарації часто вступають у конфлікт із ціллю лікування, коли ставиться завдання не утворення рубця, а відновлення паренхіми органа та його функції. Отже, ефекти, що будуть отримані в результаті застосування МСК, залежатимуть від їхнього вихідного стану та способів менеджменту.

Мета роботи – проаналізувати відомості фахової літератури щодо мезенхімальних стовбурових клітин в аспекті їхньої здатності до диференціювання та секреції регуляторних факторів, імунотипових ознак і генетичного ландшафту, що можуть спричинити їхню різноманітність.

Висновки. Для отримання бажаного результату від використання МСК у медицині необхідно враховувати багато факторів. Однак відомості щодо цього питання ще фрагментарні, часто неоднозначні. Крім того, навіть врахування відомих факторів у різних комбінаціях є складним завданням під час менеджменту МСК. Зважаючи на безумовний пріоритет генетичних і молекулярних досліджень МСК, актуальним залишається й емпіричний метод дослідження пластичних і фізіологічних властивостей МСК. Він може не тільки створювати підґрунтя для розроблення новітніх методів лікування, але й визначати напрями пошуків у генетичних і молекулярних дослідженнях.

Key words:
mesenchymal
stem cells, genes,
regeneration.

Pathologia
2023; 20 (1), 76-84

Mesenchymal stem cells: diversity

O. M. Grabovyi, N. M. Nevmerzhitska, L. M. Yaremenko, H. B. Kostynskyi,
A. S. Demydchuk, H. Yu. Kondaurova

Mesenchymal stem cells (MSCs) are diverse in terms of plastic, secretory and immunophenotypic features, which is due to the peculiarities of their genetic landscape. MSCs like other body cells are the result of the implementation of genetic information. However, some cells at different stages of histogenesis leave it. Such resident cells in tissues are stem cells. They are in a state of plastic quiescence and their genome does not undergo changes that would lead to commitment / differentiation. Although, these cells show a certain activity, producing various biologically active factors. It is logical to assume that the cells emerging from the process of histogenesis at its various stages will have different genetic landscapes, immunophenotypes and secretory potentials. The activation of MSCs occurs under conditions of physiological or reparative regeneration. Moreover, on the second hand it is explosive. Under natural conditions, the activation of MSCs during damage leads to their differentiation into fibroblasts and the formation of a connective tissue scar. But such consequences of reparation often come into conflict with the goal of treatment, when the task is not the formation of a scar, but the restoration of the parenchyma of the organ and its function. Therefore, the effects that will be obtained when using MSCs will depend on their initial state and methods of management.

Aim. To analyze literature data on mesenchymal stem cells that reflect their ability to differentiate and secrete regulatory factors, immunophenotypic features and genetic landscape that may underlie their diversity.

Conclusions. To obtain the desired result from the use of MSCs in regenerative medicine many factors must be taken into account. But data in this area is still fragmentary and often ambiguous. In addition, even taking into account the known factors in their various combinations is a very difficult task in the management of MSC. Given the unconditional priority of genetic and molecular research of MSCs the empirical method of studying the plastic and physiological properties of MSCs remains relevant today. It can just not create the basis for the development of the latest treatment methods, but also determine the direction of research in genetic and molecular research.

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) у дорослому організмі – популяції мультипотентних клітин, що здатні до самооновлення, персистенції та диференціювання в різних напрямках. Ці клітини відносно легко виділити з

різних тканин організму та доволі швидко розмножити в культурі, де, крім того, можна, хоч і обмежено, регулювати їхню диференціацію. Це стало основною причиною широкого дослідження і наступного використання МСК.

Мета роботи

Проаналізувати відомості фахової літератури щодо мезенхімальних стовбурових клітин в аспекті їхньої здатності до диференціювання та секреції регуляторних факторів, імунофенотипових ознак і генетичного ландшафту, що можуть спричинити їхню різноманітність.

Загальними функціональними властивостями МСК є їхня здатність до адгезії з пластиком за стандартних умов культивування, експресія CD105, CD73 і CD90 ($\geq 95\%$) та відсутність експресії CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 і HLA II класу ($\leq 2\%$), фібробластоподібна морфологія та можливість диференціюватися в остеобласти, адипоцити та хондробласти [1,2]. За певних умов культивування МСК можуть диференціюватися в немезодермальні клони [3]. Зазначимо, що нові методи виділення стовбурових клітин змінили парадигму щодо їхньої адгезії до пластику. Описано фракції культур МСК, що не прилипають, – так звані неприлипалильні мезенхімальні попередники [4]. Ця клітинна фракція залежить від дії основного фактора росту фіброblastів (bFGF), може розмножуватися як клітинна суспензія, становлячи специфічну популяцію ранніх попередників із менш комітованим фенотипом порівняно з МСК, що прикріплені до пластику [4].

Зміни перебігу регенерації тканин після трансплантації МСК зумовлені інтеграцією в тканини реципієнта та їхньою секреторною (паракринною) активністю [2,5,6].

МСК характеризуються проліферативною, антиапоптотичною, протизапальною, антиоксидантною, проангіогенною [2,7,8], антифібротичною та антимікробною активністю [9]. Мікроезикали, одержані зі стовбурових клітин, що містять мРНК, мікроРНК і білки, котрі вивільняються як екзосоми в міжклітинне середовище, все частіше визначають як потужні терапевтичні агенти [10]. Екзосоми індукують повторний вхід резидентних клітин у клітинний цикл при пошкодженні тканин, що призводить до їх самовідновлення; це тестують при патологіях серця, нервової системи, опорно-рухового апарату [10].

МСК мають імуносупресивні властивості [11] внаслідок антипроліферативного впливу на лімфоцити, інгібування Т-клітин і клітин пам'яті [12]. Крім того, МСК зменшують секрецію інтерферону- γ (ІФН- γ) та збільшують / не змінюють секрецію інтерлейкіну-4 (ІЛ-4), сприяючи «переключенню» імунної відповіді з переважно опосередкованого Th1 із виділенням прозапальних цитокінів на опосередкований Th2 з виділенням протизапальних цитокінів. Це використовують для терапії в разі реакції «трансплантат проти хазяїна» [11].

Імуносупресія зумовлена також паракринними розчинними факторами та прямою міжклітинною комунікацією, що опосередкована рецепторами [13]. Розчинні фактори включають HGF, TGF- β , PGE2, IDO, IL-10, NO, HO-1, HLA-G та екзосоми, що вважають найефективнішими засобами для досягнення імуносупресивних ефектів МСК [13]. Зазначимо, що МСК вивільняють екзосоми з імуносупресивними ефектами тільки після попередньої активації прозапальними ци-

токінами, моделюючи запальне мікросередовище. Екзосоми, що вивільняються з попередньо активованих МСК, можуть переключати макрофаги на M2-подібний фенотип шляхом переміщення miRNAs, які регулюють поляризацію макрофагів [14]. МСК синтезують цитокіни та ростові фактори, необхідні для проліферації та диференціювання попередників кровотворення [15].

Крім того, TNF- α та IFN- λ беруть участь у регуляції про- або протизапальної дії МСК [16]. Коли наявність цих двох цитокінів досягає високого рівня, вони стимулюють МСК до секреції iNOS (миші) або IDO (людина), спричиняючи пригнічення проліферації Т-клітин та індукції Treg [16]. Тому рівень iNOS або IDO запропоновано як «перемикач» між про- та протизапальною дією МСК [16]. Мікрооточення МСК також може переключати стан МСК між прозапальними та протизапальними фенотипами [16]. Прозапальні МСК активують Т-клітини, секретуючи MIP-1, CCL5, CXCL9, CXCL10 і рекрутуючи більше лімфоцитів [16]. Протизапальні МСК можуть інгібувати дозрівання та функції дендритних клітин і макрофагів, водночас зумовлюючи зрушення в бік регуляторних дендритних клітин і протизапальних макрофагів M2 [17], ефективно порушують проліферацію та прозапальні функціональні властивості В- і Т-лімфоцитів, індукують утворення Treg і Vreg [17].

Імуномодулювальні властивості МСК дають підстави до їх використання під час лікування таких захворювань, як експериментальний енцефаломієліт, коліт, тромбоцитопенія тощо [9]. МСК мають виняткову здатність модулювати фенотип і функціональні властивості різних імунних клітин [17].

Здійснили колосальну кількість досліджень із використанням МСК у регенеративній медицині [18–20]. Показали здатність МСК диференціюватись у різні типи клітин і мезодермального, й ектодермального, ентодермального походження [21,22], включаючи ендотеліальні клітини [23], кардіоміоцити [24], гепатоцити [25] та нейтральні клітини [26]. Втім, деякі автори, визнаючи здатність МСК диференціюватись в трьох основних напрямках мезенхімальної диференціації – в остеобласти, хондробласти й адипоцити, вважають сумнівною можливість їх диференціювання в клітини інших зародкових листків (ентодермального й ектодермального) *in vitro* та *in vivo* [1].

МСК – дуже неоднорідна популяція організму [27]. В дорослому організмі їх можна виділити майже з будь-якого органа [3]: кісткового мозку, жирової тканини, периферичної та менструальної крові, шкіри, тимусу, селезінки та ендометрію, легень, скелетних м'язів, синовіальних оболонок і рідин, слинних залоз, очного яблука, тканин зуба (пульпа, молочні зуби, міжзубний сосочок, ясна, періодонт, клітини, отримані з зубних зачатків), тканин, що пов'язані з пологодами (плацента, амніон, пуповинна кров), яєчка та головного мозку [4,6,28–30]. Таке значне поширення МСК пов'язане з концепцією, що вказує на наявність МСК-подібних популяцій майже в усіх органах, оскільки вони пов'язані з кровоносними мікросудинами завдяки периваскулярним стромальним / стовбуровим клітинам [4]. До останніх належать періцити (CD146+) й адвентичні клітини (CD34+) [31].

Наприкінці XIX століття Eberth і Rouget уперше описали клітини, що розташовані біля судин, а у 1923 році Zimmermann назвав ці клітини перицитами, маючи на увазі їхню тенденцію обертатися навколо капілярів [32–34]. Вони вбудовані в базальну мембрану судин та утворюють контакти з ендотеліоцитами [35,36]. Ці клітини після експансії *in vitro* відповідають критеріям МСК [37]. Перицити переважно експресують гени, що пов'язані з ангиогенезом і гладком'язовими клітинами судин (наприклад, ACTA2, ANGPT2, ANGPT1 і α PA) та мають виражений проваскулогенний ефект [31]. Встановили їхню вирішальну роль у дозріванні й підтриманні морфогенезу судин, в утворенні та регуляції функціонування гематоенцефалічного бар'єра [36]. У нирках перицити визначають як мезангіальні клітини, а в печінці – клітини Ito [35].

Адвентиційні клітини також розташовані периваскулярно та можуть набувати перицитоподібного імунотипу за певних умов культивування [31]. Адвентиційні клітини є більш «стовбуровими» порівняно з перицитами. Вони здебільшого експресують кілька генів плюрипотентності або стовбуровості (наприклад, NANOG, SMYС, KLF2), рецептори фактора росту, характерні для клітин-попередників (наприклад, FGFR2, PDGFRA, TGFBR1A), а також остеогенний транскрипційний фактор RUN [31].

Одні автори вказують на ідентичність деяких властивостей МСК, отриманих із різних джерел, а інші дослідники визначили, що навіть при культивуванні за одних і тих самих умов МСК різного походження відрізняються за здатністю формувати колонії, експресією генів і ступенем диференціації [2,6,37]. МСК кісткового мозку показали значно вищу остеогенну та хондрогенну здатність порівняно з адипогенними МСК [38,39], мали більш ранню та високу активність лужної фосфатази, відкладення кальцію та експресію генів, пов'язаних з остеогенезом і хондрогенезом, та асоційованого з остеогенезом білка остеопонтину [38]. МСК, що отримані з кісткового мозку, характеризуються кращою здатністю до проліферації та утворення колоній, ніж МСК, що одержані з жирової тканини [40]. Зазначимо, що МСК кісткового мозку, на відміну від МСК жирової тканини, добре зберігають здатність до диференціювання після багаторазових пасажів [40]. Кількість, частота та ступінь диференціювання МСК кісткового мозку негативно корелюють із віком [41]. МСК жирової тканини мають високий потенціал ангиогенезу та васкулогенезу [42].

Розрізняють дві субпопуляції стовбурових клітин, що отримані з жирової тканини. Так, залежно від місця вилучення визначають підшкірні жирові стовбурові клітини (subcutaneous adipose stem cells, AS-SCs) та вісцеральні жирові стовбурові клітини (visceral adipose stem cells, AV-SCs) [43]. МСК, виділені з підшкірних ділянок, мають вищий остеогенний й хондрогенний потенціали, ніж ті, що одержані з глибокого шару жирової тканини [43]. Білок p53 відіграє ключову роль у диференціації МСК людини, отриманих із жирової тканини, а також впливає на їхній остеогенний і адипогенний потенціал внаслідок збільшення генів *osterix*, транскрипційного фактора *runt* і рецептора, активованого проліфератором пероксисом (PPAR)

[44,45]. МСК, одержані з плаценти, мають хорошу міграційну здатність, потенціали ендотеліального й адипогенного диференціювання [46], але дещо нижчу здатність до остеогенної диференціації (порівняно з МСК кісткового мозку) [47], а виділені з пуповинної крові МСК мають високий потенціал хондрогенної диференціації [48]. МСК зубного походження здатні диференціюватися в остеобласти, хондроцити, міоцити, кардіоміоцити, активні нейрони, клітини Шванна, меланоцити та гепатоцитоподібні клітини [49]. Більше того, МСК пульпи зуба – оптимальний варіант для нейропротекції та нейритогенезу порівняно з МСК кісткового мозку та жирової тканини [50]. МСК м'язової тканини мають вищу здатність до остеогенного й міогенного диференціювання порівняно з кістковими аналогами, а також зівставний адипогенний і хондрогенний потенціали [51]. Секретом МСК, що отримані з ендометрія, характеризується імунотипуванням активністю, стимулює розростання нейритів, але їхній проангіогенний ефект описано недостатньо [4]. Ендометріальні МСК – нова, вичерпно не досліджена популяція мезенхімальних попередників, що досі не мають специфічних маркерів [4].

Гіпоксія посилює та збільшує швидкість проліферації стовбурових клітин [52], підвищує життєздатність клітин *in vitro* та приживлення клітин *in vivo* [53], покращує їхню міграцію та зменшує реплікативне старіння [52,54]. Гіпоксія активує сигнальний шлях Akt шляхом фосфорилування, спричиняючи метаболічне перепрограмування стовбурових клітин у бік гліколізу, підтримує проліферацію клітин при обмеженні надходження кисню [53]. Цей сигнальний шлях відіграє ключову роль у стабілізації фактора транскрипції, що індуктується гіпоксією (HIF)-1, а його димери активують транскрипцію генів, що кодують гліколітичні ферменти та переносники глюкози [53]. В результаті підвищується експресія переносників глюкози, додатково збільшується приплив молекул глюкози та загальна гліколітична активність у клітинах [53]. МСК в умовах гіпоксії секретують більше цитокінів і факторів росту [52].

Враховуючи названі відмінності МСК, що одержані з різних джерел, виникають питання про те, наскільки ці клітини біологічно еквівалентні та чи є ці відмінності наслідком різних біологічних функцій МСК у відповідних тканинах [55]. Гетерогенність МСК визначається безліччю факторів, включаючи донорів і джерела тканин, клітинних популяцій, умов культивування, методи виділення клітин, протоколи криозахисту та відтавання тощо [56]. Тому Міжнародне товариство клітинної терапії (ISCT, Ванкувер, Канада) особливо наголосило на невідповідності гетерогенної популяції МСК в організмі чітким критеріям стовбуровості, запропонувало для них більш «обережний» термін – мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК) [1]. Критерії ISCT фактично описують МСК як гетерогенну, неклональну суміш мультипотентних стовбурових клітин, комітованих клітин-попередників і диференційованих клітин [57,58]. Фенотипи та потенціали диференціювання стовбурових клітин визначаються також профілями експресії їхніх генів [39].

Таблиця 1. Перелік типових генів стовбуровості МСК (за даними T. Zhou et al. [56])

Абревіатура	Назва	Функція
HMGB1	High Mobility Group Box 1	Взаємодіє з SDF-1 і CXCR4; необхідний для відновлення тканин
KLF2	Krüppel-like Factor 2	Посилює проліферацію МСК; необхідний для підтримки стовбуровості
MCM2	Minichromosome maintenance marker 2	Необхідний для поділу клітин і реплікації ДНК
CCNA2	Cyclin A2	Регулює клітинний цикл
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	Рекрутує та утримує багато ферментів, необхідних для реплікації, відновлення ДНК
POLA1	DNA Polymerase Alpha 1	Необхідний для реплікації ДНК
POLD1	DNA Polymerase Delta 1	Необхідний для реплікації ДНК
RFC4	Replication factor C subunit 4	Необхідний для реплікації ДНК
MAD2L1	Mitotic arrest-deficient 2 like 1	Контролює мітоз
CDK1	Cyclin-Dependent Kinase 1	Каталітична субодиниця протеїнкіназного комплексу, що індукує вступ клітини в мітоз
CCNB1	Cyclin B1	Експресується здебільшого в фазі G2/M поділу клітин
CDC45	Cell Division Cycle 45	Важливий компонент реплікації
TUBA1B	Tubulin Alpha 1b	Бере участь у мітозі, русі клітин, зокрема внутрішньоклітинному русі, інших біологічних процесах
E2F1	E2F Transcription Factor 1	Сприяє проліферації або апоптозу у відповідь на пошкодження ДНК
BIRC5	Vaculoviral IAP Repeat Containing 5	Регулює апоптоз
BLM	Bloom syndrome, RecQ helicase-like	Зберігає цілісність геному
ITGAV	Integrin Subunit Alpha V	Належить до сімейства інтегринів, що необхідні для адгезії до клітинної поверхні

Song L. et al. [59] шляхом порівняння профілів експресії генів різних груп стовбурових клітин визначили загальний пул генів, що або є для цих клітин маркерами самооновлення, або підтримують незафіксований стан стовбурових клітин [59]. Диференціювання та дедиференціювання запускалися при додаванні або видаленні факторів індукції. З-поміж усіх генів автори розрізняли дві групи: гени диференціювання (мали підвищену експресію під час диференціювання, але знижували експресію під час дедиференціювання) та гени стовбуровості (пригнічувалися під час диференціювання, але підвищувалися під час дедиференціювання) [59]. Дедиференційовані клітини показали профіль експресії генів, подібний до профілю недиференційованих МСК, й обидві групи клітин відрізнялися від диференційованих клітин, як показав аналіз за допомогою polymerase chain reaction (PCR). Ідентифікували такі гени, що високо експресуються в недиференційованих МСК: віментин, фактор росту сполучної тканини, колаген типу Iа1 та фактор елонгації трансляції еукариотів 1а1. У недиференційованих клітинах значно експресуються також PTPRF, AFAP і RAB3B, FZD7, DKK3, що сприяє виживанню клітин без зміни клітинної проліферації [59].

Експресія генів стовбуровості можлива і в недиференційованих, і в дедиференційованих МСК [56]. Виявили, що ці сильно пов'язані зі стовбуровістю генні кластери в МСК здебільшого беруть участь у проліферації, диференціації та міграції (табл. 1) [56].

Експресія таких генів стовбуровості, як Klf-4, Oct-4, Nanog пов'язана з підтримкою самовідновлення та здатністю до мультидиференціації. Її визначили в МСК різного походження, що підтверджує великий потенціал цих клітин у регенерації тканин [60]. Sox2 разом із Oct4 і Nanog – одні з ключових регуляторів транскрипції плюрипотентних стовбурових клітин, відіграють важливу роль у мезодермальній та ектодермальній диференціації під час ембріонального розвитку [30]. Їхня роль не обмежується ембріогенезом, ці гени також необхідні для належної проліферації та диференціації дорослих стовбурових клітин, як-от

МСК [30]. У контексті МСК Sox2 часто називають «фактором долі» стовбурових клітин, оскільки він є тригером підвищення або зниження регуляції в стадії адипогенної або остеогенної диференціації клітин [30].

Song L. et al. детально описують один із групи генів диференціювання IL1R2 [59]. Він бере участь у багатьох сигнальних шляхах (NF-кВ, p38 MAPK, PPAR та IL-6), діє як рецептор-приманка, що інгібує активність IL1A, IL1B, IL1R2, може інактивувати MAP2K3, активність кінази p38 MAPK, а останні, своєю чергою, пригнічують продукцію цитокінів та апоптоз [59]. Він також може знижувати транскрипційну активність NF-кВ, що призводить до зниження рівня IL-6. Експресія IL-6 зменшується під час диференціювання, підтвержуючи, що опосередкована IL1R2 передача сигналів NF-кВ може бути вирішальним регуляторним шляхом диференціювання стовбурових клітин [59]. Запальний хемокін IL-8 може сприяти міграції МСК у місця ушкодження, стимулювати секрецію таких регенеративних факторів, як фактор росту ендотелію судин (VEGF) [57].

Крім кількох генів, функції яких не відомі, функціональна належність більшості генів відома: хемоатрактанти (CXCL12, CXCR4), фактори транскрипції (TWIST) [61], гени, пов'язані з імунomodуляцією та запаленням (IDO1, COX2, PDL1, TGFB1, IL6, IL10, IL12A, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 і TLR9) [16,61], молекули адгезії (ICAD, V), пов'язані з ангіогенезом і нейрорегенерацією (HGF, BDNF, TUBB3, VEGFA) [61], гени, що беруть участь у рості, виживанні та старінні клітин (AXL, TNFRSF10D), плюрипотентності (NANOG, OCT4 і SOX2) [30,61,62], розвитку (NUMB, JAG1) та передаванні сигналів (PTPRF, FZD7, ICAM1) [59].

Рецептор тромбоцитарного фактора росту альфа (PDGFR α) – основний маркер МСК у кістковому мозку, який також бере участь у ремоделюванні сполучної тканини [2,30]. Експресія PDGFR α критично важлива для розвитку плода, та велика кількість PDGFR α -позитивних клітин, що циркулюють, зменшується відразу після народження. Нокаут PDGFR α призводить до ембріональної летальності в мишей [2]. МСК, що

циркулюють, рідко виявляють у кровоносній системі дорослих, але їх рееструють у пуповинній крові, а отже циркулюючі МСК / стромальні клітини плода мають гематогенне походження [2], характеризуються високим потенціалом диференціювання в мезенхімальних клонах (адипоцити, остеоцити та хондроцити) [2].

PW1 зі спільною експресією PDGFR α характерні для міогенних клітин-попередників, індукованих для адипогенної диференціації [30]. PW1 відіграє допоміжну роль у гомеостазі та регенерації тканин, хоча їхня роль у регенерації тканин змінна, залежить від активності стовбурових клітин / клітин-попередників, що містяться в цій тканині [30]. PW1-позитивні ендотеліальні клітини мають підвищену здатність до проліферації, регенерації та організації кровоносних судин [30]. Експресія PW1 також пов'язана з диференціацією клітин волосяного фолікула *in vivo* [30]. Дослідження впливу PW1 на потенціал диференціації МСК показало, що серцеві клітини PW1+ можуть впливати на мезенхімальну диференціацію та утворювати численні серцево-судинні, мезенхімальні лінії [30].

МСК, що експресують TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 і TLR9, розпізнають молекули пошкоджених клітин, є першою лінією системи імунного захисту. Активація генів TLR може додатково стимулювати імунні клітини та МСК. Активовані МСК реагують на ліганди TLR і вивільняють протизапальні фактори. Різні типи активації TLR (TLR3 або TLR4) можуть індукувати і прозапальний, і протизапальний фенотипи МСК. Наприклад, активація TLR3 індукуює протизапальний фенотип МСК (відомий як фенотип МСК2), а активація TLR4 індукуює прозапальний фенотип (відомий як фенотип МСК1) [16].

c-Мус (CD117) – фактор, що пов'язаний із проліферацією та метаболізмом клітин. Надмірна експресія гена, що кодує c-Мус, призводить до неконтрольованої клітинної проліферації та туморогенезу [30].

Ren J. et al. порівняли стовбурові клітини кісткового мозку, що культивовані в середовищі з додаванням HPGF-C18 (human platelet growth factor C-18) та FBS (fetal bovine serum). Найбільш різючі відмінності в експресії генів були у шляхах, пов'язаних із проліферацією клітин, метаболізмом, сигнальним шляхом MAPK, сигнальним шляхом TGF- β та клітинною адгезією [63]. Автори виявили, що стовбурові клітини, вирощені з HPGF-C18 і FBS, однаково пригнічували проліферацію лімфоцитів. Потім оцінили експресію генів, що беруть участь в імунomodуляції, використовуючи RT-qPCR. Виявили, що експресія багатьох генів, включаючи CXCL12 (SDF1), IGF1, IL6, IL10, RUNX2, суттєво не відрізнялася [63]. Втім, рівні білків SDF1, IL6, TGFB1 і VEGFA у культуральному супернатанті значно відрізнялися від таких у стовбурових клітин, що культивуються з HPGF-C18 і FBS. Стовбурові клітини кісткового мозку, що культивуються з HPGF-C18, експресують нижчі рівні таких молекул клітинної адгезії, як LAMA3, COL4A4, ITGA8, COL4A2, LAMB2, COL11A2, THBS3, LAMC1 та ITGA8, а також високий рівень пов'язаного з рухливістю гена MMP1 [63]. Виявили також різницю за експресією генів, що належать до шляхів метаболізму, порівняно з FBS, HPGF-C18 має вищі концентрації лептину, адипонектину й імунних білків, як-от EGF, MIP-1, PDGF-BB та CCL1 [63].

Нині широко використовують генетичні модифікації МСК для покращення результатів лікування стовбуровими клітинами. МСК можуть бути швидко розмножені, генетично трансдуковані вірусними векторами (аденовірусами, ретровірусами, хелпер-залежними аденовірусними та лентивірусними векторами) [64,65] або трансфіковані невірусними векторами (неорганічними наноматеріалами, катіонними пептидами). Крім того, МСК можуть бути генетично трансформовані за допомогою мікро- та наноін'єкцій, електропорації, мікропорації та нуклеофекції [66,67]. Ефективність трансдукції залежить від клітин-мішеней і вірусних векторів. Вірусні вектори мають високу ефективність трансдукції та інфекційності [66,68]. Система коротких паліндромних повторів із регулярними інтервалами (CRISPR)-Cas – простий та ефективний інструмент генної інженерії, що протестований у клінічних випробуваннях [2,67,69]. У цьому контексті з'явилися перші докази успішного й ефективного управління секретом МСК за допомогою технології редагування геному CRISPR/Cas [2].

Дослідження *in vitro* показали, що експресія інтерферону-бета (IFN- β) у МСК, трансфікованих аденовірусом, може ефективно вбивати клітини гліоми [2]. У моделі метастазів раку простати в легені МСК, що експресують IFN- β , можуть продовжувати період виживання. Можливий механізм полягає в тому, що IFN- β може сприяти апоптозу пухлинних клітин, інгібувати ангиогенез і підвищувати активність природних клітин-кілерів [2]. Аналогічно, МСК, трансфіковані аденовірусом, що експресують інтерферон- γ (IFN- γ), інгібують проліферацію та індукують апоптоз у лейкозних клітинах *in vitro* [2]. Втім, показано також: генетично модифіковані МСК, що експресують IL-12, запобігають метастазуванню та посилюють апоптоз пухлинних клітин у мишей з уже виявленими метастазами меланоми, пухлин молочної залози та гепатоми [2].

CXCR4 – хемокінний рецептор з 352 амінокислотами, що зв'язується з SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) [67]. CXCR4 має трансмембранну структуру з сімома прольотами, відіграє ключову роль при деяких захворюваннях, включаючи синдром WHIM (Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections, and Myelokathexis) [67]. Взаємодія SDF-1 і CXCR4 організовує швидку ревазуляризацію ішемізованих тканин, що має вирішальне значення для відновлення функції органів [57,67]. SDF-1 активується в місцях пошкоджень, є ефективним хемоатрактантом для рекрутування клітин, що циркулюють або знаходяться в ньому, експресують рецептор CXCR4 [67,70]. Генетична модифікація МСК для надмірної експресії CXCR4 дикої типу є перспективним підходом для поліпшення їхнього хоумінгу до місць ішемії як *in vitro*, так і під час доклінічних досліджень [57,67].

Дослідники використовували різні методи вірусної трансдукції або тимчасові методи для надекспресії CXCR4 у стовбурових клітинах [57,67]. Здебільшого вони спостерігали значне посилення міграції трансдукованих клітин у напрямі SDF-1 градієнта *in vitro* [67]. Ciullo et al. показали, що систематичне вливання екстравезикул, що отримані з клітин із надлишковою експресією CXCR4, істотно покращує кардіопротек-

цію [71]. Виявивши CXCR4 на поверхні екзосом, що одержані з генетично модифікованих клітин, автори впровадили поняття про міграцію для клітинних похідних на основі осі SDF-1/CXCR472 [67,71].

МСК із гіперекспресією bFGF або фактора росту тромбоцитів-BB (PDGF-BB) стимулюють проліферацію МСК та остеогенез. Покращення виживання МСК можливе в разі надекспресії PI3K, SDF1, CXCR4, HGF та IGF. Протизапальні гени HGF, IDO, Foxp3 та IL-10 також поліпшують терапевтичну ефективність МСК, а МСК, що трансфіковані Bcl-2, показали, крім хорошого виживання клітин, кращу резистентність до апоптозу й високу секрецію VEGF [2].

Отже, незважаючи на велику кількість виконаних досліджень і отриманих даних, сучасні уявлення про стовбурові клітини, й передусім мезенхімальні, викликають більше питань, ніж дають відповідей [72]. Сподівання отримати «чарівну паличку» для лікування всіх хвороб поступово спричинило розроблення надзвичайно складного напрямку – регенераторної медицини, що має свої досягнення та невдачі. Великий обсяг інформації з цієї галузі, часто неузгодженість, суперечливість даних і їх трактування потребують систематизації та ранжування, що мають базуватися на певних критеріях. Для цього доцільно використати центральну догму молекулярної біології, що сформульована Ф. Сігк у 1970 році [73]. Вона постулює, що універсальним механізмом реалізації спадкової інформації є шлях від ДНК до РНК і потім білка. Кінцевий результат – певний фенотип і властивості клітин, систем, що вони утворюють.

Тому базовою тезою під час визначення властивостей МСК має бути те, що вони, як і всі інші клітини організму, є результатом реалізації генетичної інформації. Втім, деякі клітини на різних етапах гістогенезу виходять з цього процесу, зупиняється прогресивна зміна їхнього геному (активація одних генів і блокування інших), характерна для процесу комітування / диференціювання. Такі клітини резидентно зберігаються в тканинах, їх визначають як стовбурові. Вони перебувають у стані пластичного спокою, а їхній геном не зазнає змін, які спричинили б комітування та диференціювання. Разом із тим, ці клітини мають певну функціональну активність, що виявляють за продукцією різних біологічно активних речовин [74]. Логічно вважати, що клітини, які виходять із процесу гістогенезу на різних стадіях, матимуть різні генетичні ландшафти, імунотипи, секреторні та пластичні властивості [75].

Вважають, що за умов фізіологічного зменшення кількості клітин у тканині або в разі ушкодження відбувається активація МСК, і в останньому випадку вона є вибуховою. Особливо важливо наголосити: за природних умов у людини активація МСК при пошкодженні призводить до реалізації пластичної функції, що виявляють за швидким утворенням сполучнотканинного рубця. Відповідно, основний напрям диференціювання МСК – фібробластичний [76,77]. Однак такі наслідки часто вступають у конфлікт із ціллю лікування, коли ставиться завдання не утворення рубця, а відновлення паренхіми органа та його функції. Для цього потрібно зменшити надмірний розвиток сполучної тканини

(наприклад, регенерація м'яза без грубого рубця, що стане перешкодою для його повноцінного скорочення; ураження очеревини без утворення спайок) і посилити регенерацію паренхіми. У цьому аспекті також треба пам'ятати про безперечну роль МСК у патологічних явищах, як-от фіброзі, склерозі [78,79].

Висновки

1. Для отримання бажаного результату від використання МСК у медицині необхідно враховувати багато факторів. Однак відомості щодо цього питання ще фрагментарні, часто неоднозначні. Крім того, навіть врахування відомих факторів у різних комбінаціях є складним завданням під час менеджменту МСК. Це стосується і забезпечення репаративних процесів, і негативних явищ (побічних ефектів, ускладнень), що виникають під час застосування МСК.

2. Зважаючи на безумовний пріоритет генетичних і молекулярних досліджень МСК, актуальним залишається й емпіричний метод дослідження пластичних і фізіологічних властивостей МСК. Він може не тільки створювати підґрунтя для розроблення новітніх методів лікування, але й визначати напрями пошуків у генетичних і молекулярних дослідженнях.

Фінансування

Дослідження виконане в рамках НДР Національного медичного університету імені О. О. Богомольця: «Вивчити особливості відновлення ушкоджень головного мозку та периферичного нерву за умов стимуляції ендogenous мезенхімальних стовбурових клітин» за програмою наукових досліджень і розробок, що фінансуються з державного бюджету, № держреєстрації 0120U101376.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 30.01.2023

Після доопрацювання / Revised: 10.03.2023

Прийнято до друку / Accepted: 14.03.2023

Відомості про авторів:

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

ORCID ID: 0000-0001-5705-9909

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

ORCID ID: 0000-0002-5378-2267

Яременко Л. М., д-р мед. наук, професор каф. гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-7076-467X

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

ORCID ID: 0000-0002-4984-9764

Демидчук А. С., канд. мед. наук, доцент каф. гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-8074-2829

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

Yaremenko L. M., MD, PhD, Dsc, Professor of the Department of Histology and Embryology, Bogomolets National Medical 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.

Demydchuk A. S., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Histology and Embryology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

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

References

- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Costa, L. A., Eiro, N., Fraile, M., Gonzalez, L. O., Saá, J., Garcia-Portabella, P., Vega, B., Schneider, J., & Vizoso, F. J. (2021). Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 78(2), 447-467. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03600-0>
- Berebichez-Fridman, R., & Montero-Olvera, P. R. (2018). Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review. *Sultan Qaboos University medical journal*, 18(3), e264-e277. <https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.03.002>
- Mastrolia, I., Foppiani, E. M., Murgia, A., Candini, O., Samarelli, A. V., Grisendi, G., Veronesi, E., Horwitz, E. M., & Dominici, M. (2019). Challenges in Clinical Development of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Concise Review. *Stem cells translational medicine*, 8(11), 1135-1148. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0044>
- Mathot, F., Shin, A. Y., & Van Wijnen, A. J. (2019). Targeted stimulation of MSCs in peripheral nerve repair. *Gene*, 710, 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.02.078>
- Maqsood, M., Kang, M., Wu, X., Chen, J., Teng, L., & Qiu, L. (2020). Adult mesenchymal stem cells and their exosomes: Sources, characteristics, and application in regenerative medicine. *Life sciences*, 256, 118002. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118002>
- Hu, M. S., Borrelli, M. R., Lorenz, H. P., Longaker, M. T., & Wan, D. C. (2018). Mesenchymal Stromal Cells and Cutaneous Wound Healing: A Comprehensive Review of the Background, Role, and Therapeutic Potential. *Stem cells international*, 2018, 6901983. <https://doi.org/10.1155/2018/6901983>
- Shafei, A. E., Ali, M. A., Ghanem, H. G., Shehata, A. I., Abdelgawad, A. A., Handal, H. R., Talaat, K. A., Ashaal, A. E., & El-Shal, A. S. (2017). Mesenchymal stem cell therapy: A promising cell-based therapy for treatment of myocardial infarction. *The journal of gene medicine*, 19(12), 10.1002/jgm.2995. <https://doi.org/10.1002/jgm.2995>
- Brown, C., McKee, C., Bakshi, S., Walker, K., Hakman, E., Halassy, S., Svinarich, D., Dodds, R., Govind, C. K., & Chaudhry, G. R. (2019). Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 13(9), 1738-1755. <https://doi.org/10.1002/term.2914>
- Labusca, L., Herea, D. D., & Mashayekhi, K. (2018). Stem cells as delivery vehicles for regenerative medicine-challenges and perspectives. *World journal of stem cells*, 10(5), 43-56. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v10.i5.43>
- Cagliani, J., Grande, D., Molmenti, E. P., Miller, E. J., & Rilo, H. L. R. (2017). Immunomodulation by Mesenchymal Stromal Cells and Their Clinical Applications. *Journal of stem cell and regenerative biology*, 3(2), 10.15436/2471-0598.17.022. <https://doi.org/10.15436/2471-0598.17.022>
- Wu, R., Liu, C., Deng, X., Chen, L., Hao, S., & Ma, L. (2020). Enhanced alleviation of aGVHD by TGF- β 1-modified mesenchymal stem cells in mice through shifting M Φ into M2 phenotype and promoting the differentiation of Treg cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(2), 1684-1699. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14862>
- Liu, S., Liu, F., Zhou, Y., Jin, B., Sun, Q., & Guo, S. (2020). Immunosuppressive Property of MSCs Mediated by Cell Surface Receptors. *Frontiers in immunology*, 11, 1076. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01076>
- Domenis, R., Cifù, A., Quaglia, S., Pistis, C., Moretti, M., Vicario, A., Parodi, P. C., Fabris, M., Niazi, K. R., Soon-Shiong, P., & Curcio, F. (2018). Pro inflammatory stimuli enhance the immunosuppressive functions of adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes. *Scientific reports*, 8(1), 13325. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31707-9>
- Hastreiter, A. A., Dos Santos, G. G., Makiyama, E. N., Santos, E. W. C., Borelli, P., & Fock, R. A. (2021). Effects of protein malnutrition on hematopoietic regulatory activity of bone marrow mesenchymal stem cells. *The Journal of nutritional biochemistry*, 93, 108626. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108626>
- Jiang, W., & Xu, J. (2020). Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell proliferation*, 53(1), e12712. <https://doi.org/10.1111/cpr.12712>
- Müller, L., Tunger, A., Wobus, M., von Bonin, M., Towers, R., Bornhäuser, M., Dazzi, F., Wehner, R., & Schmitz, M. (2021). Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells: An Update. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 637725. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.637725>
- Hassanzadeh, A., Rahman, H. S., Markov, A., Endjun, J. J., Zekiy, A. O., Chartrand, M. S., Beheshthkoo, N., Kouhbanani, M. A. J., Marofi, F., Nikoo, M., & Jarahian, M. (2021). Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes in regenerative medicine and cancer; overview of development, challenges, and opportunities. *Stem cell research & therapy*, 12(1), 297. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02378-7>
- Shimizu, Y., Ntege, E. H., & Sunami, H. (2022). Current regenerative medicine-based approaches for skin regeneration: A review of literature and a report on clinical applications in Japan. *Regenerative therapy*, 21, 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2022.05.008>
- Alonso-Goulart, V., Carvalho, L. N., Marinho, A. L. G., de Oliveira Souza, B. L., de Aquino Pinto Palis, G., Lage, H. G. D., de Lima, I. L., Guimarães, L. D., Peres, L. C., Silveira, M. M., Lopes, G. H. N. L., Ferreira, L. B., & de Souza Castro-Filice, L. (2021). Biomaterials and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine: A Systematic Review. *Materials*, 14(16), 4641. <https://doi.org/10.3390/ma14164641>
- Pushp, P., Sahoo, B., Ferreira, F. C., Sampaio Cabral, J. M., Fernandes-Platzgummer, A., & Gupta, M. K. (2020). Functional comparison of beating cardiomyocytes differentiated from umbilical cord-derived mesenchymal/stromal stem cells and human foreskin-derived induced pluripotent stem cells. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 108(3), 496-514. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36831>
- Berebichez-Fridman, R., Gómez-García, R., Granados-Montiel, J., Berebichez-Fastlicht, E., Olivos-Meza, A., Granados, J., Velasquillo, C., & Ibarra, C. (2017). The Holy Grail of Orthopedic Surgery: Mesenchymal Stem Cells-Their Current Uses and Potential Applications. *Stem cells international*, 2017, 2638305. <https://doi.org/10.1155/2017/2638305>
- Wartalski, K., Gorczyca, G., Wiater, J., Tabarowski, Z., & Duda, M. (2021). Porcine ovarian cortex-derived putative stem cells can differentiate into endothelial cells in vitro. *Histochemistry and cell biology*, 156(4), 349-362. <https://doi.org/10.1007/s00418-021-02016-6>
- Afjeh-Dana, E., Naserzadeh, P., Moradi, E., Hosseini, N., Seifalian, A. M., & Ashtari, B. (2022). Stem Cell Differentiation into Cardiomyocytes: Current Methods and Emerging Approaches. *Stem cell reviews and reports*, 18(8), 2566-2592. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10280-1>
- Luce, E., Messina, A., Duclos-Vallée, J. C., & Dubart-Kupferschmitt, A. (2021). Advanced Techniques and Awaited Clinical Applications for Human Pluripotent Stem Cell Differentiation into Hepatocytes. *Hepatology*, 74(2), 1101-1116. <https://doi.org/10.1002/hep.31705>
- Chen, H., Li, S., Xu, W., Hong, Y., Dou, R., Shen, H., Liu, X., Wu, T., & He, J. C. (2021). Interleukin-17A promotes the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into neuronal cells. *Tissue & cell*, 69, 101482. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2020.101482>
- Ning, K., Yang, B., Chen, M., Man, G., Liu, S., Wang, D. E., & Xu, H. (2022). Functional Heterogeneity of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Subpopulations in Physiology and Pathology. *International journal of molecular sciences*, 23(19), 11928. <https://doi.org/10.3390/ijms231911928>
- Chopra, H., Hung, M. K., Kwong, D. L., Zhang, C. F., & Pow, E. H. N. (2018). Insights into Endothelial Progenitor Cells: Origin, Classification, Potentials, and Prospects. *Stem cells international*, 2018, 9847015. <https://doi.org/10.1155/2018/9847015>
- Alizadeh, R., Bagher, Z., Kamrava, S. K., Falah, M., Ghasemi Hamidabadi, H., Eskandarian Boroujeni, M., Mohammadi, F., Khodaverdi, S., Zare-Sadeghi, A., Olya, A., & Komeili, A. (2019). Differentiation of human mesenchymal stem cells (MSC) to dopaminergic neurons: A comparison between Wharton's Jelly and olfactory mucosa as sources

- of MSCs. *Journal of chemical neuroanatomy*, 96, 126-133. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.01.003>
- [30] Kozłowska, U., Krawczyński, A., Futoma, K., Jurek, T., Rorat, M., Patrzalek, D., & Klimczak, A. (2019). Similarities and differences between mesenchymal stem/progenitor cells derived from various human tissues. *World journal of stem cells*, 11(6), 347-374. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i6.347>
- [31] Wang, Y., Xu, J., Chang, L., Meyers, C. A., Zhang, L., Broderick, K., Lee, M., Peault, B., & James, A. W. (2019). Relative contributions of adipose-resident CD146⁺ pericytes and CD34⁺ adventitial progenitor cells in bone tissue engineering. *NPJ Regenerative medicine*, 4, 1. <https://doi.org/10.1038/s41536-018-0063-2>
- [32] Uemura, M. T., Maki, T., Ihara, M., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2020). Brain Microvascular Pericytes in Vascular Cognitive Impairment and Dementia. *Frontiers in aging neuroscience*, 12, 80. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00080>
- [33] Zimmermann, K. (1923). Der feinere bau der blutcapillaren. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 68(1), 29-109. <https://doi.org/10.1007/BF02593544>
- [34] Beard, D. J., Brown, L. S., & Sutherland, B. A. (2020). The rise of pericytes in neurovascular research. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 40(12), 2366-2373. <https://doi.org/10.1177/0271678X20958497>
- [35] Shaw, I., Rider, S., Mullins, J., Hughes, J., & Péault, B. (2018). Pericytes in the renal vasculature: roles in health and disease. *Nature reviews. Nephrology*, 14(8), 521-534. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0032-4>
- [36] Yamazaki, T., & Mukoyama, Y. S. (2018). Tissue Specific Origin, Development, and Pathological Perspectives of Pericytes. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 5, 78. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00078>
- [37] Andrzejewska, A., Lukomska, B., & Janowski, M. (2019). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem cells*, 37(7), 855-864. <https://doi.org/10.1002/stem.3016>
- [38] Mohamed-Ahmed, S., Fristad, I., Lie, S. A., Suliman, S., Mustafa, K., Vindenes, H., & Idris, S. B. (2018). Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0914-1>
- [39] Yamatani, Y., & Nakai, K. (2022). Comprehensive comparison of gene expression diversity among a variety of human stem cells. *NAR genomics and bioinformatics*, 4(4), lqac087. <https://doi.org/10.1093/nargab/lqac087>
- [40] He, Q., Ye, Z., Zhou, Y., & Tan, W. S. (2018). Comparative study of mesenchymal stem cells from rat bone marrow and adipose tissue. *Turkish journal of biology = Turk biyoloji dergisi*, 42, 477-489. <https://doi.org/10.3906/biy-1802-52>
- [41] Kargozar, S., Mozafari, M., Hashemian, S. J., Brouki Milan, P., Hamzehlou, S., Soleimani, M., Joghataei, M. T., Gholipourmalekabadi, M., Korourian, A., Mousavizadeh, K., & Seifalian, A. M. (2018). Osteogenic potential of stem cells-seeded bioactive nanocomposite scaffolds: A comparative study between human mesenchymal stem cells derived from bone, umbilical cord Wharton's jelly, and adipose tissue. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 106(1), 61-72. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33814>
- [42] Sun, Y., Chen, S., Zhang, X., & Pei, M. (2019). Significance of Cellular Cross-Talk in Stromal Vascular Fraction of Adipose Tissue in Neovascularization. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 39(6), 1034-1044. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312425>
- [43] Mastrangelo, F., Scacco, S., Ballini, A., Quaresima, R., Gnoni, A., De Vito, D., Scarano, A., Dipalma, G., Gargiulo Isacco, C., Cantore, S., Coscia, M. F., Pettini, F., Sammartino, G., Cicciù, M., Conti, P., & Lo Muzio, L. (2019). A pilot study of human mesenchymal stem cells from visceral and sub-cutaneous fat tissue and their differentiation to osteogenic phenotype. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(7), 2924-2934. https://doi.org/10.26355/eurev_201904_17572
- [44] Lee, Y. K., Chung, Y., Lee, J. H., Chun, J. M., & Park, J. H. (2020). The Intricate Role of p53 in Adipocyte Differentiation and Function. *Cells*, 9(12), 2621. <https://doi.org/10.3390/cells9122621>
- [45] Velletri, T., Huang, Y., Wang, Y., Li, Q., Hu, M., Xie, N., Yang, Q., Chen, X., Chen, Q., Shou, P., Gan, Y., Candi, E., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Agostini, M., Yang, H., Melino, G., Shi, Y., & Wang, Y. (2021). Loss of p53 in mesenchymal stem cells promotes alteration of bone remodeling through negative regulation of osteoprotegerin. *Cell death and differentiation*, 28(1), 156-169. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0590-4>
- [46] Zhang, Y., Zhong, Y., Liu, W., Zheng, F., Zhao, Y., Zou, L., & Liu, X. (2022). PFKFB3-mediated glycometabolism reprogramming modulates endothelial differentiation and angiogenic capacity of placenta-derived mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy*, 13(1), 391. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03089-3>
- [47] Phunikom, N., Boonmuen, N., Kheolamai, P., Suksen, K., Manochant, S., Tantrawatpan, C., & Tantikanlayaporn, D. (2021). Androgapholide promotes proliferative and osteogenic potentials of human placenta-derived mesenchymal stem cells through the activation of Wnt/β-catenin signaling. *Stem cell research & therapy*, 12(1), 241. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02312-x>
- [48] Zhang, Y., Liu, S., Guo, W., Wang, M., Hao, C., Gao, S., Zhang, X., Li, X., Chen, M., Jing, X., Wang, Z., Peng, J., Lu, S., & Guo, Q. (2018). Human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells combined with an acellular cartilage extracellular matrix scaffold improve cartilage repair compared with microfracture in a caprine model. *Osteoarthritis and cartilage*, 26(7), 954-965. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.01.019>
- [49] Pérez, S. E., & Haidar, Z. S. (2021). Prologue: Oro-Dental-Derived Stromal Cells for Cranio-Maxillo-Facial Tissue Engineering-Past, Present and Future. In *Biomechanics and Functional Tissue Engineering*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95090>
- [50] Mead, B., Logan, A., Berry, M., Leadbeater, W., & Scheven, B. A. (2014). Paracrine-mediated neuroprotection and neurogenesis of axotomized retinal ganglion cells by human dental pulp stem cells: comparison with human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *PLoS one*, 9(10), e109305. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109305>
- [51] Čamerlik, K., Mihelič, A., Mihalič, R., Marolt Presen, D., Janež, A., Trebše, R., Marc, J., & Zupan, J. (2019). Skeletal-muscle-derived mesenchymal stem/stromal cells from patients with osteoarthritis show superior biological properties compared to bone-derived cells. *Stem cell research*, 38, 101465. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101465>
- [52] Wang, J. P., Liao, Y. T., Wu, S. H., Chiang, E. R., Hsu, S. H., Tseng, T. C., & Hung, S. C. (2020). Mesenchymal stem cells from a hypoxic culture improve nerve regeneration. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 14(12), 1804-1814. <https://doi.org/10.1002/term.3136>
- [53] Salazar-Noratto, G. E., Luo, G., Denoed, C., Padrona, M., Moya, A., Bendsidhoum, M., Bizios, R., Potier, E., Logeart-Avramoglou, D., & Petite, H. (2020). Understanding and leveraging cell metabolism to enhance mesenchymal stem cell transplantation survival in tissue engineering and regenerative medicine applications. *Stem cells*, 38(1), 22-33. <https://doi.org/10.1002/stem.3079>
- [54] Podsednik, A., Cabrejo, R., & Rosen, J. (2022). Adipose Tissue Uses in Peripheral Nerve Surgery. *International journal of molecular sciences*, 23(2), 644. <https://doi.org/10.3390/ijms23020644>
- [55] Nombela-Arrieta, C., Ritz, J., & Silberstein, L. E. (2011). The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(2), 126-131. <https://doi.org/10.1038/nrm3049>
- [56] Zhou, T., Yuan, Z., Weng, J., Pei, D., Du, X., He, C., & Lai, P. (2021). Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. *Journal of hematology & oncology*, 14(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01037-x>
- [57] Ullah, M., Liu, D. D., & Thakor, A. S. (2019). Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. *iScience*, 15, 421-438. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.05.004>
- [58] Squillaro, T., Peluso, G., & Galderisi, U. (2016). Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell transplantation*, 25(5), 829-848. <https://doi.org/10.3727/096368915X689622>
- [59] Song, L., Webb, N. E., Song, Y., & Tuan, R. S. (2006). Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem cells*, 24(7), 1707-1718. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0604>
- [60] Ballini, A., Di Benedetto, A., De Vito, D., Scarano, A., Scacco, S., Perillo, L., Posa, F., Dipalma, G., Quadruano, F., Contaldo, M., Grano, M., Brunetti, G., Colaianni, G., Di Cosola, M., Cantore, S., & Mori, G. (2019). Stemness genes expression in naive vs. osteodifferentiated human dental-derived stem cells. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(7), 2916-2923. https://doi.org/10.26355/eurev_201904_17570
- [61] Petrenko, Y., Vackova, I., Kekulova, K., Chudickova, M., Koci, Z., Turnovcova, K., Kupcova Skalnikova, H., Vodicka, P., & Kubinova, S. (2020). A Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from Different Sources, with a Focus on Neuroregenerative Potential. *Scientific reports*, 10(1), 4290. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61167-z>
- [62] Jauković, A., Kukulj, T., Trivanović, D., Okić-Dorđević, I., Obradović, H., Miletić, M., Petrović, V., Mojsilović, S., & Bugarski, D. (2021). Modulating stemness of mesenchymal stem cells from exfoliated deciduous and permanent teeth by IL-17 and bFGF. *Journal of cellular physiology*, 236(11), 7322-7341. <https://doi.org/10.1002/jcp.30399>
- [63] Ren, J., Ward, D., Chen, S., Tran, K., Jin, P., Sabatino, M., Robey, P. G., & Stroncek, D. F. (2018). Comparison of human bone marrow stromal cells cultured in human platelet growth factors and fetal bovine serum. *Journal of translational medicine*, 16(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1400-3>
- [64] Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New*

- York, N. Y.), 318(5858), 1917-1920. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>
- [65] Keshavarz Shahbaz, S., Mansourabadi, A. H., & Jafari, D. (2022). Genetically engineered mesenchymal stromal cells as a new trend for treatment of severe acute graft-versus-host disease. *Clinical and experimental immunology*, 208(1), 12-24. <https://doi.org/10.1093/ceii/uxac016>
- [66] Rowe, R. G., & Daley, G. Q. (2019). Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nature reviews. Genetics*, 20(7), 377-388. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0100-z>
- [67] Bidkhorji, H. R., Bahrami, A. R., Farshchian, M., Heirani-Tabasi, A., Mirahmadi, M., Hasanzadeh, H., Ahmadiankia, N., Faridhosseini, R., Dastpak, M., Shabgah, A. G., & Matin, M. M. (2021). Mesenchymal Stem/Stromal Cells Overexpressing CXCR4^{334K} Revealed Enhanced Migration: A Lesson Learned from the Pathogenesis of WHIM Syndrome. *Cell transplantation*, 30, 9636897211054498. <https://doi.org/10.1177/09636897211054498>
- [68] Kim, J. Y., Nam, Y., Rim, Y. A., & Ju, J. H. (2022). Review of the Current Trends in Clinical Trials Involving Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem cell reviews and reports*, 18(1), 142-154. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10262-3>
- [69] Golchin, A., Shams, F., & Karami, F. (2020). Advancing Mesenchymal Stem Cell Therapy with CRISPR/Cas9 for Clinical Trial Studies. *Advances in experimental medicine and biology*, 1247, 89-100. https://doi.org/10.1007/5584_2019_459
- [70] Chen, Z., Chen, Q., Du, H., Xu, L., & Wan, J. (2018). Mesenchymal stem cells and CXCR4 chemokine receptor 4 overexpression improved the therapeutic effect on colitis via mucosa repair. *Experimental and therapeutic medicine*, 16(2), 821-829. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6233>
- [71] Ciullo, A., Biemmi, V., Milano, G., Bolis, S., Cervio, E., Fertig, E. T., Gherghiceanu, M., Moccetti, T., Camici, G. G., Vassalli, G., & Barile, L. (2019). Exosomal Expression of CXCR4 Targets Cardioprotective Vesicles to Myocardial Infarction and Improves Outcome after Systemic Administration. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 468. <https://doi.org/10.3390/ijms20030468>
- [72] Lukomska, B., Stanaszek, L., Zuba-Surma, E., Legosz, P., Sarzynska, S., & Dreła, K. (2019). Challenges and Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Stem cells international*, 2019, 9628536. <https://doi.org/10.1155/2019/9628536>
- [73] Crick F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227(5258), 561-563. <https://doi.org/10.1038/227561a0>
- [74] Ahangar, P., Mills, S. J., & Cowin, A. J. (2020). Mesenchymal Stem Cell Secretome as an Emerging Cell-Free Alternative for Improving Wound Repair. *International journal of molecular sciences*, 21(19), 7038. <https://doi.org/10.3390/ijms21197038>
- [75] Galderisi, U., Peluso, G., & Di Bernardo, G. (2022). Clinical Trials Based on Mesenchymal Stromal Cells are Exponentially Increasing: Where are We in Recent Years?. *Stem cell reviews and reports*, 18(1), 23-36. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10231-w>
- [76] Sveiven, S. N., & Nordgren, T. M. (2020). Lung-resident mesenchymal stromal cells are tissue-specific regulators of lung homeostasis. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 319(2), L197-L210. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00049.2020>
- [77] Ugurlu, B., & Karaoz, E. (2020). Comparison of similar cells: Mesenchymal stromal cells and fibroblasts. *Acta histochemica*, 122(8), 151634. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151634>
- [78] Maruyama, K., & Imanaka-Yoshida, K. (2022). The Pathogenesis of Cardiac Fibrosis: A Review of Recent Progress. *International journal of molecular sciences*, 23(5), 2617. <https://doi.org/10.3390/ijms23052617>
- [79] Wang, Y., Yu, F., Li, A., He, Z., Qu, C., He, C., Ma, X., & Zhan, H. (2022). The progress and prospect of natural components in rhubarb (*Rheum ribes* L.) in the treatment of renal fibrosis. *Frontiers in pharmacology*, 13, 919967. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.919967>

Modern approaches to cervical cancer screening (a review)

M. I. Pavliuchenko  *A,B,C,D,F, Yu. Ya. Krut  E,F, V. H. Siusiuka  D,E, O. V. Deinichenko  B,C

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

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

The aim – systematization of data from modern scientific sources and own knowledge and experience regarding the problems, advantages and prospects of the development of various methods of diagnosing pathological conditions of the cervix.

The relevance of the problem of cervical cancer is beyond doubt, which is confirmed by the annual data of the official statistics and recommendations of WHO, European experts and relevant national recommendations. The analysis and generalization of information from the specialized literature regarding the assessment of problems and prospects for the development of leading methods of cervical screening in order to reduce the number of cervical cancer cases in the world is a priority task of the expert society.

Currently, the most recommended approach to cervical screening is to combine HPV testing with cytology but separate testing for HPV is the most promising. Colposcopy remains the only confirmatory method of diagnosing cervical pathology, subject to mandatory cervical biopsy and histopathological examination of the biopsy. Standardization of classifications and terminology in the assessment of cytological, histopathological and colposcopic conclusions will allow to reach an understanding in the issues of optimal management tactics for patients with cervical pathology.

Conclusions. Diagnosis of high-risk carcinogenic types of human papillomavirus is the most promising method of cervical screening in the near future. At the same time, at the moment, we consider it appropriate to use the cytology together with HPV testing, at least as a sorting method. Standardization of cytological/histopathological terminology should be done in accordance with the Bethesda 2014 system update.

Key words:

cervix, precancerous cervical pathology, cervical cancer, human papilloma virus, cervical screening, cytologic method, HPV DNA test, colposcopy.

Pathologia
2023; 20 (1), 85-93

*E-mail:
dr_pavli@ukr.net

Сучасні підходи до скринінгу раку шийки матки (огляд літератури)

М. І. Павлюченко, Ю. Я. Круть, В. Г. Сюсюка, О. В. Дейніченко

Мета роботи – систематизація відомостей сучасних наукових джерел, власних знань і досвіду щодо проблем, переваг і перспектив розвитку різних методів діагностики патологічних станів шийки матки.

Актуальність проблеми раку шийки матки не викликає сумнівів, що підтверджується щорічними даними офіційної статистики та рекомендаціями ВООЗ, європейських експертів і відповідними національними рекомендаціями. Пріоритетне завдання експертного товариства – аналіз та узагальнення відомостей фахової літератури щодо проблем і перспектив розвитку провідних методів цервікального скринінгу для зниження кількості випадків раку шийки матки у світі.

Нині під час цервікального скринінгу найчастіше рекомендують поєднання тестування на вірус папіломи людини (ВПЛ) із цитологічним методом дослідження, а найбільш перспективним вважають окреме тестування на ВПЛ. Єдиний вірогідний метод діагностики патології шийки матки – кольпоскопія за умови обов'язкового виконання цервікальної біопсії та патогістологічного дослідження біоптата. Стандартизація класифікацій, термінології під час оцінювання цитологічних, патогістологічних й кольпоскопічних висновків дасть змогу досягти консенсусу щодо оптимальної тактики ведення пацієнток із патологією шийки матки.

Висновки. Діагностика висококанцерогенних типів ВПЛ – найбільш перспективний метод цервікального скринінгу в найближчому майбутньому. Втім, доцільним вважають використання цитологічного дослідження разом із тестуванням на ВПЛ, принаймні як метод сортування. Стандартизацію цитологічної / гістопатологічної термінології слід здійснювати відповідно до рекомендацій термінологічної системи Бетесда (2014).

Ключові слова:

шийка матки, передракова цервікальна патологія, рак шийки матки, вірус папіломи людини, цервікальний скринінг, цитологічний метод, тест ДНК ВПЛ, кольпоскопія.

Патологія. 2023.
Т. 20, № 1(57).
С. 85-93

In 2020, the WHO approved the Global Strategy to accelerate the elimination of cervical cancer, which sets the ambitious goal of achieving 3 targets – “90–70–90”. They are:

- 1) a 90 % rate of vaccination against the human papilloma virus (HPV) in girls under the age of 15 (before the onset of sexual activity);
- 2) the availability of at least 70 % of women of reproductive age to highly effective methods of screening (diagnosis) of cervical cancer, and finally;
- 3) the provision of treatment for at least 90 % of women diagnosed with cervical cancer [1].

However, despite all the efforts of the expert community, strategies for the prevention of cervical cancer, from our point of view, have acquired a tendency to become complicated in recent years, and some provisions are sometimes contradictory. The last most important breakthrough in the direction of prevention and diagnosis of cervical pathology occurred back in the early 1980s after the discovery of HPV [2]. The vast majority of cases of cervical cancer are associated with high-risk carcinogenic HPV types. And a clear trend towards an increase in confirmed cases of HPV-positive cervical cancer from 85.9 % in 1990 to 92.9 % in 2010 [3] is associated primarily with

the improvement of HPV detection methods. [4]. However, it should be noted that even now 3–8 % of cases of cervical cancer are classified as HPV-negative, that is, they refer to clinical cases where the relationship with HPV has not been proven. [5]. At the same time, a study with 371 biopsy-proven cases of primary cervical cancer found that 68 % of HPV-negative cervical cancers were in fact non-cervical cancers. These data imply that the number of HPV-negative cervical cancers may be overestimated due to false-negative HPV tests and histological diagnosis [6].

Therefore most scientific research has been, and still is, focused on HPV-positive cervical cancer. First, on the issues of vaccination against high-risk carcinogenic types of HPV infection, as a key method of primary prevention of cervical cancer. And, secondly, on the implementation of sensitive for HPV testing in women from risk group of developing cervical cancer [7]. Despite the proven effectiveness of both vaccination [8,9] and HPV tests, the introduction of these methods into practical medicine remains relatively slow in most countries of the world, and vaccination rates today vary significantly [10]. Thus, the level of vaccination against HPV in the USA, despite being one of the highest in the world, does not reach the target values of the WHO and remains below 80 % [11].

Undoubtedly, at the moment, vaccination is the most obvious and vitally important long-term priority in the prevention of cervical cancer. Thus, according to published data, by 2070, vaccination of girls alone will lead to a reduction in mortality by 61.7 %, preventing 4.8 million deaths, and double screening and treatment in addition to vaccination will lead to a corresponding reduction in the number of deaths from cervical cancer by 92.3 %, preventing 14.6 million of deaths [12]. Nevertheless, according to the opinion of the expert community, generally accepted screening diagnostic methods will also remain important in the coming decades.

Aim

Systematization of data from modern scientific sources and own knowledge and experience regarding the problems, advantages and prospects of the development of various methods of diagnosing pathological conditions of the cervix.

From our point of view, there are several unambiguous and undeniable provisions regarding cervical screening. First, the definition of cervical screening. In our opinion, this definition can be formulated as follows. Cervical screening is a process of regular assessment of the condition of the cervix in the target group, the purpose of which is to reduce the total number of cases of cervical cancer through the early diagnostics of precancerous pathology by officially recommended methods [13]. Secondly, there is no doubt that cervical screening, along with HPV vaccination, is currently the most effective approach in reduction of cervical cancer incidence [14]. Thirdly, and this is also a fact, most national guidelines suggest using 3 methods as cervical screening: cytology, cytology in combination with HPV testing (cotest) or separate HPV testing [15–17]. It should be noted, however, that to our knowledge, only the Netherlands and Turkey are the only European countries that have fully implemented

national HPV-based cervical cancer screening. Australia has demonstrated its willingness to be the first country to eliminate cervical cancer (by 2028–2035), but has not yet reached the WHO target for participation in HPV screening (current target – 52 %). It is interesting to note that, for example, in the USA, separate HPV testing is approved for only one specific HPV test [17–19], but FDA approval for other tests is likely to follow. Little prospective comparative data available indicate that the most highly validated tests that have received or are under FDA approval are approximately comparable in terms of analytical sensitivity and predictive risk of subsequent cancer / precancer in a negative result [20].

This is all that is not disputed. In all other issues, related to cervical screening, there is some confusion in the expert community and permanent disputes continue [21–23]. We believe that a discussion of the relevant scientific data is a good starting point for solving existing problems, and accordingly, the following discussion will help to simplify their solution. Let's try to figure it out.

Many important practical factors influence the organization of cervical screening. We list the main ones – the attitude of society to this problem, and, accordingly, the cost, frequency and availability of cervical screening; accepted models of laboratory screening (with the predominant use of cytology) and, finally, the lack of clear standards in the use of various cytological, colposcopic and histological terms.

Thus, the factor of attention of the society / country to the problem of cervical cancer and the attitude of women themselves to this problem correlate with the incidence of cervical cancer in these countries [24–26].

Information about the relevance of the problem of cervical cancer and the possibility of its successful prevention should be conveyed to the target audience by all available and effective means. Every woman from prepubertal age or living in the most remote area should have access to information about cancer and know what simple but regular steps she must take to avoid this disease [27,28]. At the same time, at all levels, there should be an understanding of the presence of a low, but non-zero level of cancer risk, even with regular participation in screening programs. This is the understanding that screening cannot provide complete (100 %) protection against cervical cancer, even with frequent unscheduled co-testing (HPV testing and cytology), even from adolescence, even at the cost of massive overtreatment [16]. The explanation for this is very simple: it is, for example, the presence of cases of rapidly progressive tumors in very young women [29] or deep lesions in the cervical canal that elude screening diagnostics.

Discussions are also ongoing regarding the frequency of screening after both negative and positive results. For example, there is currently a debate about when the next scheduled visit after a negative screening should be done [16,21]. Thus, in the expert community, there is significant resistance to the 5-year screening interval recommended for a negative co-test [21]. At the same time, the American Cancer Society (ACS) recommends starting cervical cancer screening at the age of 25 and having primary human papillomavirus testing every 5 years until the age of 65; and if primary HPV testing is not available, then those aged 25 to 65 should be screened with co-testing (HPV

testing combined with cytology) every 5 years or cytology alone every 3 years [30]. There is an understanding that the choice of an “ideal” interval between screening visits in the event of a negative result would lead to a significantly larger number of identified true precancerous diseases and, accordingly, to almost no cases of cervical cancer. However, the reality is that the existing intervals are either unreasonably short and lead to the detection of very few true precancerous conditions at screening, or vice versa, the detection of too many invasive cancers means that the screening interval is too long [31].

The management of positive screening results is also unresolved. Although it is widely accepted that positive HPV testing require triage rather than a universal, immediate referral for colposcopy with targeted biopsy, optimal triage methods are not defined and are highly variable. Theoretically, the ideal response to the presence of HPV infection without a cytologically confirmed precancer would be to repeat testing at an interval that takes into account the possibility of self-elimination of the most infections, for example, after 2 years. However, in practice, it is difficult for a woman and her doctor/health care provider to endure this period, primarily because of the risk of losing the possibility of observation, and therefore, at present, retesting after about 1 year is most often recommended [16,32]. In this case, possible sorting methods can include both cytology [17,23,33,34], and immunocytochemical dual stain cytology, which can assess as positive or negative (p16 / Ki-67 dual staining) [35], and HPV genotyping in various configurations [16,17,36], and other promising new technologies, including an automated cytological method that be programmed to provide a severity score (presented by Schiffman et al. at the 30th International HPV Conference in 2015). Studies of the methylation methods that would not require the preparation of a cytology slide are also of interest [37]. Thus, the exact balance has yet to be discussed and determined.

There is another problem. It is generally accepted that the main goal of cervical cancer screening programs is not to detect invasive cancer, but to perform its secondary prevention by detecting and treating precancerous conditions. It is, therefore, important to understand how objective the laboratory data are that we receive as a result of cervical screening. Taking this aspect in consideration, it is important to use common terminology when obtaining survey results. We advocate the definition that precancer is a subset of high-grade intraepithelial lesions of HSIL which describe pathological conditions capable of progressing to invasive cancer if left untreated [38,39].

Until now, when assessing the pathology of the cervix, various terms and categories have been used, which do not always fully correspond to the currently established stages of cervical carcinogenesis. According to the most of the experts, and we fully share this point of view, that the key stages of cervical carcinogenesis can be considered simply as a normal cervix, HPV infection of high-risk carcinogenic types, precancer and cancer. From our point of view, the simplification and standardization of terms could contribute to the creation of a unified approach to the management of patients at the post-screening stage: the need for re-screening, the timing of the next screening in case of a negative result, accelerated re-testing for

high-risk HPV infection, colposcopic targeted biopsy, as well as the need and amount of treatment. As an example, one can cite the LAST nomenclature, which recommends p16 staining to rule out dubious precancerous conditions (including CIN2) while completely abandoning CIN terms and older nomenclatures [40,41] or the Bethesda system [42,43] including terms that are in line to the norm (NILM), infection (LSIL), precancer (HSIL/AIS), and cancer [43]. As being strong proponents of the Bethesda system, we can't help but note that the most of high-risk infections are often described as NILM, while the most of histopathological precancerous conditions are found in women with LSIL or questionable LSIL (i. e. ASC-US) and not with HSIL.

However even after obtaining a unified terminological classification, we are forced to admit that at this stage, not a single screening or diagnostic test is perfect. For example, even histological examination, which is considered to be the reference standard of diagnostics, tends to overdiagnose precancerous conditions, due to the lack of clear criteria for determining which intraepithelial microscopic anomalies indicate that the lesion will spread, and which indicate the possibility of regression / self-elimination or persistence. The impact of replacing the CIN score with LAST criteria, including p16 testing, to clarify precancer still needs to be analyzed in detail [44,45]. Similarly, cytological categories tend to misclassify HPV status and the ability of the infection to progress to precancer / cancer. In this regard, for HPV testing is most effective, as it confirms the absence of HPV infection, which automatically implies an extremely low risk of cervical precancer/cancer. At the same time, positive test results cannot differentiate benign conditions from precancerous ones, and even more – from cervical cancer.

That is why we need to understand the strengths and weaknesses of each method of cervical examination (cytology, HPV testing, colposcopy, histopathology after colposcopic biopsy) in order to answer the most important question: what is the true state of the cervix: normal, HPV infected, precancerous, or cancer?

Let's try to evaluate, from the point of view of the objective data that we have, the key advantages and disadvantages of each of the main screening methods and confirmatory methods for diagnosing cervical pathology.

The advantages of cytology are well known, starting from the period of introduction into practical medicine of the original Papanicolaou classification. For more than a hundred years, cytology has transformed from a method for assessing the likelihood of cervical cancer to one of the main screening methods for diagnosing all cervical pathology [46]. The active implementation in recent decades of the methodology of liquid cytology and the Bethesda system [43] has led to a significant increase in the level of objectivity of this diagnostic method and simplification / standardization of the interpretation of cytological findings. However, the accuracy of cytology at the “lower level” for detecting high-risk carcinogenic HPV infection remains very low. Most high-risk infections have concurrent normal cytologic findings, and many minor cytological abnormalities are caused by low-risk carcinogenic HPV types or are unrelated to HPV [7].

At the same time, even evaluating the cytological image as characteristic of the presence of HPV, cytology

does not allow one to objectively predict the possibility of progression of the infection to precancer / cancer.

Large randomized controlled trials and observational studies have shown that HPV-based screening is significantly more sensitive for detecting cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse (CIN2+) and CIN3+ compared to cytological screening. A single negative HPV test provides more confidence in CIN2+ and CIN3+ than a single normal fluid cytology result, safely allowing longer screening test intervals. In addition, HPV-based screening is superior to liquid-based cytology (LBC) for detecting columnar epithelial lesions (eg, adenocarcinoma in situ) and for screening older women. Taken together, these results show that HPV-based screening can prevent more cervical cancer cases and deaths compared to cytology-based screening [47,48].

However, a disadvantage of HPV-based screening, noted by some authors, is its low specificity for detecting CIN2+, which results in more false positive screenings compared to cytology-based screening. The main reason for the lower specificity is that many HPV infections are transient and these short-term findings are associated with a low risk of CIN2+ over 5–10 years.

To increase the specificity of HPV screening and reduce unnecessary colposcopy, various triage strategies have been explored. One of the most commonly used sorting strategies is again cytology, with atypical squamous cells of uncertain significance (ASC-US) being the typical threshold for referral. Other triage strategies include the use of partial or full HPV genotyping of cervical specimens, as several studies have demonstrated a significant difference in CIN2+ risk between genotypes, with HPV type 16 being associated with the highest risk of CIN2+ [49].

Namely, predicting the immediate risk and subsequent outcome of infection is currently a serious problem in cervical screening. Three principles should be emphasized: the group of carcinogenic HPV types that require mandatory treatment should be defined as those that cause invasive cancer, not precancerous conditions (which can be caused by a much larger group of types). Thus, there is no clinical reason to test for HPV infections other than high-risk carcinogenic types [34,50,51]. Secondly, 13 (according to some sources 15) carcinogenic HPV types (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68), which highly differ in the strength of the carcinogenic effect: from uniquely strong (HPV 16) to marginal (for example, HPV 51) [50,52]. And thirdly, different types of HPV infection act independently of each other, and one type can remain in the cell while the other has already been eliminated [7]. It is well known that high-risk types are genetically related and limited to a few species groups within the HPV alpha genus. The first acquaintance with HPV occurs at a very young age with the onset of sexual activity. Therefore, the emerging HPV infection of the cervix or the process of reinfection is likely to end in self-elimination. At the same time, the longer HPV infection persists (remains detectable using one of the standard DNA/RNA tests), the greater the likelihood of a high long-term risk of precancer [7,53]. Lastly, we found no evidence that individual tracking of carcinogenic types is clinically useful. The exception is the individual identi-

fication of the HPV types with the highest carcinogenic risk, such as HPV 16 and/or HPV 18.

Nevertheless, the definition of HPV infection, even related to the infection of the highest risk of cervical precancer, is not the final point of diagnosis. Therefore, it is colposcopy with targeted biopsy of doubtful / aceto-white areas that is currently the best diagnostic / confirmatory method for cervical pathology [54].

We cannot but repeat that this recommendation applies specifically to colposcopy with targeted biopsy. At the same time, the issue of using an isolated, exclusively visual assessment of the cervix as a confirmatory diagnostic method remains one of the most controversial in cervical diagnostics. This is mainly due to two problems of colposcopy. Firstly, colposcopy remains an extremely subjective diagnostic method, in which the frequency of false negative results (missed cases of even squamous intraepithelial pathology / invasive cancer) ranges from 13 % to 69 % [55,56] and directly depends on the competence of a specialist. Secondly, and we have already talked about this, in a certain percentage of cases, cervical pathology is difficult to visualize during colposcopy due to its small size or localization into the cervical canal.

So, to obtain a clinical diagnosis, we primarily rely on the histopathological diagnosis obtained after a colposcopically controlled biopsy. Histopathology remains our reference diagnostic method, yet it is often misclassified at several levels. The histopathological definition of precancer is particularly prone to false positive “high grade lesions” (CIN2 and even CIN3/AIS) [7]. In addition, the biopsy itself, even obtained under colposcopic targeting, often leads to underdiagnosis and underestimation of the prevalence of precancerous cervical lesions [55]. Moreover, the majority of histopathological precancerous conditions are found in women with LSIL or questionable LSIL (i. e., ASC-US) and not in women with HSIL.

In any case, histology cannot accurately distinguish a cervix which is infected by HPV infection from a normal one.

Now let's try, after everything controversial and contradictory in cervical screening, to state all the most interesting positions in the interpretation of diagnostic methods, considering the possibility of their maximum simplified (for accessibility) standardization.

Thus, there is strong evidence supporting the combination of LSIL and HPV-positive ASC-US in the aspect of “cytological evidence of HPV infection” [47]. In general, ASC-US represents abnormal cytological findings, in most cases expressing diagnostic uncertainty between NILM and LSIL. However, this uncertainty can be eliminated by HPV testing for – NILM with a negative result for the presence of high carcinogenic risk HPV [58]. If HPV testing is used instead of cytology to determine infection, the most useful cytological features are those that allow suggesting the presence of a true precancer, namely HSIL or the ambiguous ASC-H [58]. Another complication to keep in mind is that less than 1 % of women receive a HSIL cytology result, and, for example, in screening programs in the United States, it is extremely rare that a cytology result is classified as invasive cancer [7,58]. Likewise, Atypical glandular cells (AGC) and Adenocarcinoma in situ (AIS) results are rarely reported, while remaining clinically useful.

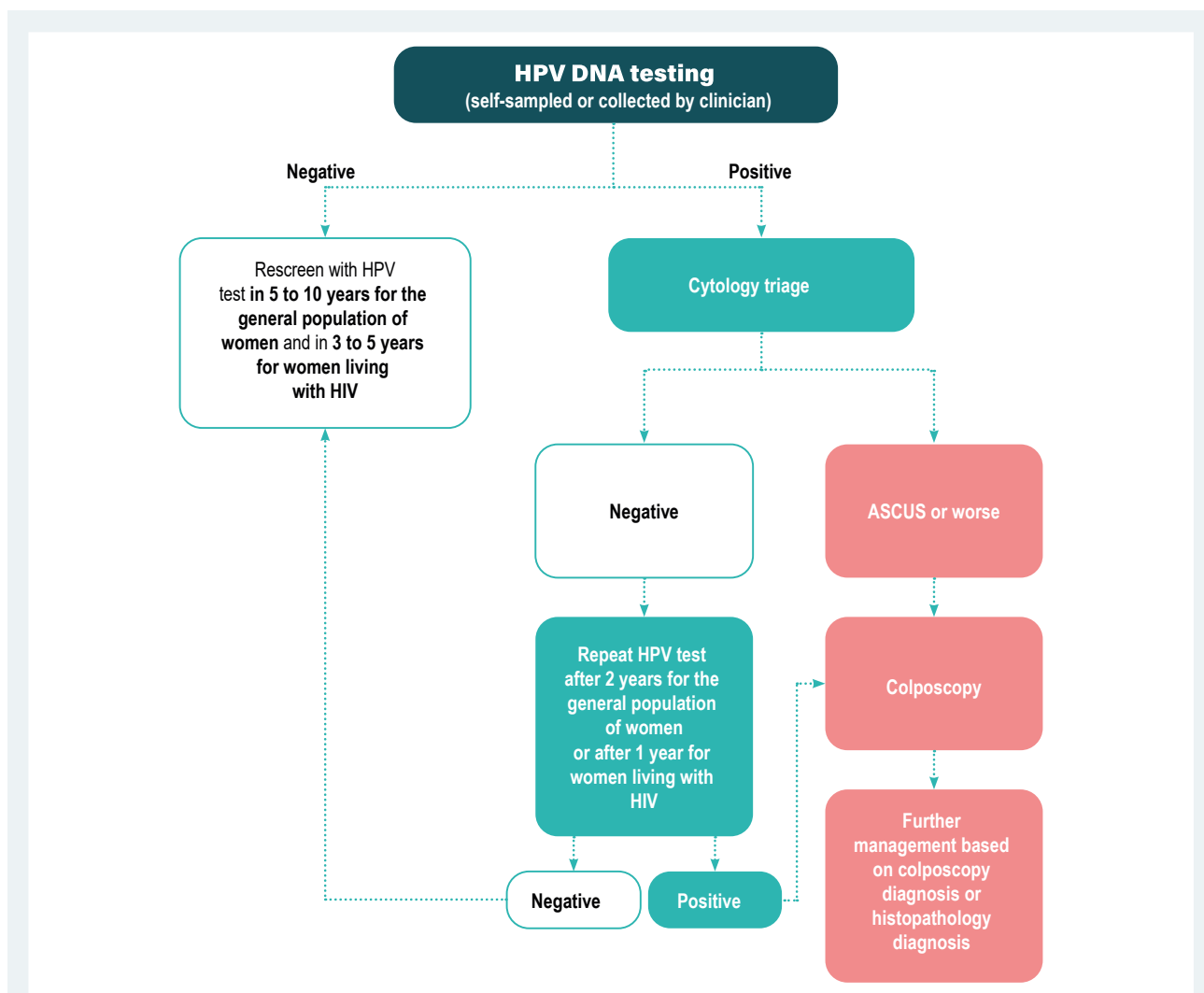


Fig. 1. Primary HPV screening and cytology triage followed by colposcopy (Screen, triage and treat approach) [69].

We cannot but recall that, in accordance with current recommendations, women with HSIL need urgent treatment, subject to the obligatory condition of a positive result for the current infection with high-risk carcinogenic HPV types [16].

It is in relation to the HPV positive patient management tactics that it is assumed that there is a general uncertainty that needs to be discussed and resolved. For example, according to the recommendation of the ASCCP, not all HPV-positive women need to do a colposcopically controlled biopsy [16,59]. Findings from worldwide studies of invasive species of the cervical cancer, including adenocarcinoma, allow to propose that positive HPV16 and HPV18 (and possibly HPV45) genotyping results are the most often indicators for colposcopy and targeted biopsy for definition subsequent management tactic [50,52]. At the same time, the value of detection of other HPV types, even from the carcinogenic group, requires further study. Thus, according to current recommendations in the United States, women with identified genotypes of the highest risk (HPV16 and HPV18) directly sent for colposcopy, and the rest are retested after a year [16], as a rule, using the method of partial genotyping [60–62].

Thus, there is an urgent need to standardize the conduct of such a confirmatory diagnostic method as colposcopy. We are confident that clinical practice of colposcopy without targeted biopsy will continue to lead to missed cases of precancer / cancer. And this, from our point of view, is due to the lack of unified indications for referral for colposcopy. For example, patients with a persistent HPV-positive status or vice versa HPV-negative with an ASC-US cytological result. Of course, in these groups there is a risk of developing cervical precancer, but it is low and its colposcopic diagnostics can be difficult due to the inability to visualize it. Besides, to the best of our knowledge, there are currently no generally accepted recommendations (including the FDA) on what to do with women with questionable colposcopy results, including indications for HPV testing after colposcopy. To avoid creating an even larger group of women who are unreasonably referred for colposcopy, it is necessary to achieve an increase in colposcopic sensitivity, for example, standardization of colposcopic terminology and colposcopy techniques through multiple biopsies targeting areas of the acetowhite epithelium or the introduction of modern, using artificial intelligence models, methods for assessing the visual image [55,63,64].

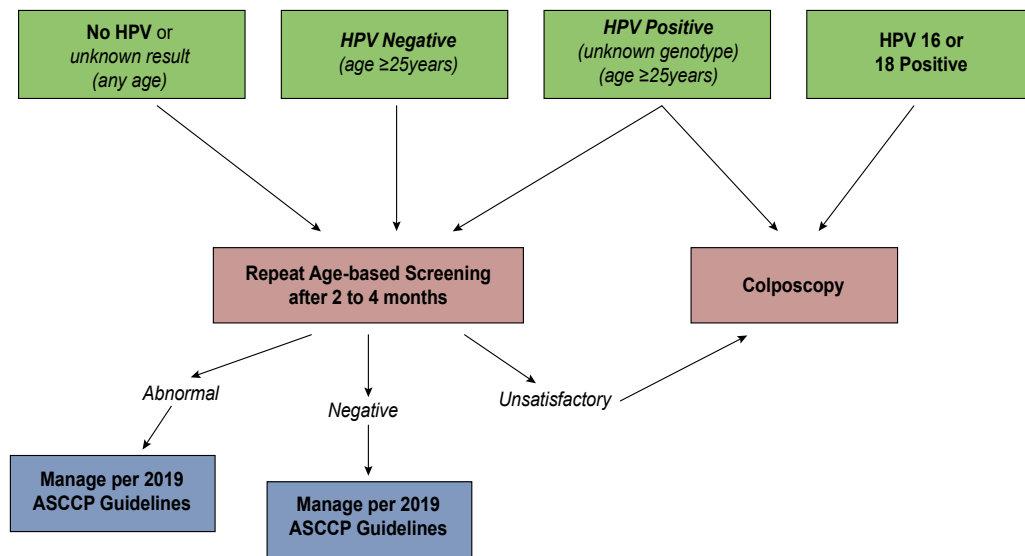


Fig. 2. Management patients with unsatisfactory result of cytology [74].

Nevertheless, there is evidence of the need to obtain a consistently negative HPV test to return women to the general screening group [65].

If only HPV-positive women were referred for colposcopy, pathologists could focus on identifying the histological evidence of squamous or glandular precancer without being distracted by the rather subjective histological features of HPV infection. So, according to the LAST criteria, it is CIN3 that should be accepted as a true precancer (as a practical compromise until a more specific biomarker is found) and p16 staining is recommended to differentiate from other precancerous conditions, primarily CIN2. However, there is a risk of overtreatment in CIN1 cases since many CIN1 lesions are p16 positive [7].

Thus, before proceeding to the presentation of the general conclusions that can be drawn on the basis of the above review, we consider it appropriate to briefly formulate the main positions. First, HPV testing is the most sensitive method for diagnosing HPV infection with a high risk of progression to precancer / cancer and thus already differentiate from a “normal cervix”. All of the data that we obtained, with the exception of studies with a serious statistical error [22,23], showed that HPV is more sensitive and has advantages in determining the prognosis for longer periods [29,66–68]. Most likely, exactly HPV testing in the near future will become the main method of primary cervical screening. In accordance with the recommendations of the WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention, second edition [69] HPV DNA testing is already recommended as a primary screening method for both Screen-and-treat and Screen, triage and treat approaches (Fig. 1). In same time, HPV DNA testing still remains only one of the alternative methods of cervical screening.

In this context, it is interesting that, in accordance with the recommendations of this manual [69], the possibility of self-sampling for HPV DNA testing is confirmed. In support of this thesis, the results of a meta-analysis

by M. Arbyn et al. [70] who showed that the sensitivity to self-obtained sample for HPV testing was similar to physician-collected detection but demonstrated lower sensitivity to cervical intraepithelial neoplasia (CIN) with hybrid capture technology [71].

At the same time, from our point of view, the most promising strategy for the transitional period is the strategy of joint for HPV testing and cytology [72]. However, it should be taken into account that cotesting is an expensive strategy [7], and it has been quite convincingly shown that among HPV-negative women, the additional use of cytology reduces the diagnostic risks of developing cancer within 5 years very slightly (by about 0.003 %) [29]. HPV-negative cancer is rare, and therefore, with HPV-negative results, cytological positive results of co-tests in most cases represent testing errors or such cytological abnormalities as ASC-US [73]. In this regard, the Recommendations of the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP, 2019) Consensus Guidelines [74], for example, on the clinical management patients with unsatisfactory result of cytology according to their age and HPV status, are of particular interest (Fig. 2).

In addition, this Guideline (ASCCP, 2019) recommends the use of a personalized approach, in contrast to the recommendations of the US Preventive Services Task Force (USPSTF) (2012), which proposed compliance with the principles of “equal management of equal risk”, “risk thresholds”, and “benchmarking” [75]. Based on new knowledge about the course of HPV infection and cervical carcinogenesis, these recommendations suggest that when choosing a patient management strategy, it is necessary to take into account not only the current results of screening tests, but also the results of previous screening tests and biopsies, taking into account personal factors such as age and immunosuppression status [74,76,77].

In this regard, there is a need to discuss an impact of HPV vaccination on our approaches to cervical screening.

While we are not yet in a position to discuss the significance of vaccination in terms of the evidence obtained (the first group of vaccinated women continues to be at screening age), it is already clear that vaccination will accelerate the shift in screening priorities from cytology to HPV testing [7]. This is primarily due to the fact that, while objectively reducing the overall frequency of precancer / cancer, vaccination does not contribute to a significant reduction in the total number of abnormal cytological results. Vaccine-targeted types are a minority of the total pool of HPV infections, including the pool of types presenting with ASC-US or LSIL, which are much more common than HSIL / AIS (specific cytological signs of precancer). Thus, in the vaccinated group against the background of a significant decrease in the level of true precancer, there will be slight fluctuations in the total number of cytological anomalies, which casts serious doubt on the need for cytological screening, at least in this group. Given the extremely low risk of developing cancer at an early age, screening before the age of 25 among vaccinated cohorts may not be necessary at all [7,78].

Conclusions

1. Most likely, it is a separate testing for HPV that will become the main monomethod for primary screening of the cervical pathology in the near future.

2. For the period until there are convincing data on the possibility of separate testing for HPV as the optimal method of screening the cervix, the most correct strategy, in our opinion, is the combined use of both HPV testing and cytology, at least as a triage method.

3. When evaluating the results of a cytology / histopathology study, we consider standardization and simplification of terminology in accordance with the Bethesda 2014 system update to be optimal.

Acknowledgements

We thank Ganna Wieler (a senior teacher of Zaporizhzhia State Medical University, MA in English / French Philology and Translation, Cambridge Speaking Examiner, CELTA qualified teacher) for providing assistance in editing this manuscript.

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

Надійшла до редакції / Received: 06.09.2022
Після доопрацювання / Revised: 12.02.2023
Прийнято до друку / Accepted: 22.02.2023

Information about authors:

Pavliuchenko M. I., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0002-9235-0205

Krut Yu. Ya., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Obstetrics and Gynecology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0002-0501-6752

Siusiuka V. H., MD, PhD, DSc, Associate Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0002-3183-4556

Deinichenko O. V., MD, PhD, Assistant of the Department of Obstetrics and Gynecology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0002-8932-230X

Відомості про авторів:

Павлюченко М. І., канд. мед. наук, доцент каф. акушерства і гінекології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Круть Ю. Я., д-р мед. наук, професор, зав. каф. акушерства і гінекології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Сюсюка В. Г., д-р мед. наук, доцент каф. акушерства і гінекології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Дейніченко О. В., PhD, асистент каф. акушерства і гінекології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

References

- [1] World Health Organization. (2020, November 17). *Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem*. <https://www.who.int/publications/item/9789240014107>
- [2] Dürst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., & zur Hausen, H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(12), 3812-3815. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.12.3812>
- [3] Li, N., Franceschi, S., Howell-Jones, R., Snijders, P. J., & Clifford, G. M. (2011). Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *International journal of cancer*, 128(4), 927-935. <https://doi.org/10.1002/ijc.25396>
- [4] Xing, B., Guo, J., Sheng, Y., Wu, G., & Zhao, Y. (2021). Human Papillomavirus-Negative Cervical Cancer: A Comprehensive Review. *Frontiers in oncology*, 10, 606335. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.606335>
- [5] Lee, J. E., Chung, Y., Rhee, S., & Kim, T. H. (2022). Untold story of human cervical cancers: HPV-negative cervical cancer. *BMB reports*, 55(9), 429-438. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2022.55.9.042>
- [6] Petry, K. U., Liebrich, C., Luyten, A., Zander, M., & Iftner, T. (2017). Surgical staging identified false HPV-negative cases in a large series of invasive cervical cancers. *Papillomavirus research (Amsterdam, Netherlands)*, 4, 85-89. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2017.10.003>
- [7] Schiffman, M., & Wentzensen, N. (2016). A Suggested Approach to Simplify and Improve Cervical Screening in the United States. *Journal of lower genital tract disease*, 20(1), 1-7. <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000170>
- [8] Brisson, M., Kim, J. J., Canfell, K., Drolet, M., Gingras, G., Burger, E. A., Martin, D., Simms, K. T., Bénard, É., Boily, M. C., Sy, S., Regan, C., Keane, A., Caruana, M., Nguyen, D. T. N., Smith, M. A., Laprise, J. F., Jit, M., Alary, M., Bray, F., ... Hutubessy, R. (2020). Impact of HPV vaccination and cervical screening on cervical cancer elimination: a comparative modelling analysis in 78 low-income and lower-middle-income countries. *Lancet*, 395(10224), 575-590. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30068-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30068-4)
- [9] Sundström, K., & Elfström, K. M. (2020). Advances in cervical cancer prevention: Efficacy, effectiveness, elimination?. *PLoS medicine*, 17(1), e1003035. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003035>
- [10] Meites, E., Szilagyi, P. G., Chesson, H. W., Unger, E. R., Romero, J. R., & Markowitz, L. E. (2019). Human Papillomavirus Vaccination for Adults: Updated Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 68(32), 698-702. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6832a3>
- [11] Reagan-Steiner, S., Yankey, D., Jeyarajah, J., Elam-Evans, L. D., Curtis, C. R., MacNeil, J., Markowitz, L. E., & Singleton, J. A. (2016). National, Regional, State, and Selected Local Area Vaccination Coverage Among Adolescents Aged 13-17 Years – United States, 2015. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 65(33), 850-858. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6533a4>
- [12] Canfell, K., Kim, J. J., Brisson, M., Keane, A., Simms, K. T., Caruana, M., Burger, E. A., Martin, D., Nguyen, D. T. N., Bénard, É., Sy, S., Regan, C., Drolet, M., Gingras, G., Laprise, J. F., Torode, J., Smith, M. A., Fidarova, E., Trapani, D., Bray, F., ... Hutubessy, R. (2020). Mortality impact of achieving WHO cervical cancer elimination targets: a comparative modelling analysis in 78 low-income and lower-middle-income countries. *Lancet*, 395(10224), 591-603. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30157-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30157-4)
- [13] Wang, J., Elfström, K. M., Andrae, B., Nordqvist Kleppe, S., Ploner, A., Lei, J., Dillner, J., Sundström, K., & Sparén, P. (2020). Cervical cancer case-control audit: Results from routine evaluation of a nationwide cervical screening program. *International journal of cancer*, 146(5), 1230-1240. <https://doi.org/10.1002/ijc.32416>

- [14] Jansen, E. E. L., Zielonke, N., Gini, A., Anttila, A., Segnan, N., Vokó, Z., Ivanuš, U., McKee, M., de Koning, H. J., de Kok, I. M. C. M., & EU-TO-PIA consortium (2020). Effect of organised cervical cancer screening on cervical cancer mortality in Europe: a systematic review. *European journal of cancer*, 127, 207-223. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.12.013>
- [15] Wentzensen, N., & Schiffman, M. (2014). Filling a gap in cervical cancer screening programmes. *The Lancet. Oncology*, 15(3), 249-251. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70073-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70073-7)
- [16] Massad, L. S., Einstein, M. H., Huh, W. K., Katki, H. A., Kinney, W. K., Schiffman, M., Solomon, D., Wentzensen, N., Lawson, H. W., & 2012 ASCCP Consensus Guidelines Conference (2013). 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *Journal of lower genital tract disease*, 19(2 Suppl 1), S1-S27. <https://doi.org/10.1097/LGT.0b013e318287d329>
- [17] Huh, W. K., Ault, K. A., Chelmow, D., Davey, D. D., Goulart, R. A., Garcia, F. A., Kinney, W. K., Massad, L. S., Mayeaux, E. J., Saslow, D., Schiffman, M., Wentzensen, N., Lawson, H. W., & Einstein, M. H. (2015). Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance. *Journal of lower genital tract disease*, 19(2), 91-96. <https://doi.org/10.1097/LGT.000000000000103>
- [18] Canfell, K., Smith, M. A., & Bateson, D. J. (2021). Self-collection for HPV screening: a game changer in the elimination of cervical cancer. *The Medical journal of Australia*, 215(8), 347-348. <https://doi.org/10.5694/mja2.51262>
- [19] Maver, P. J., & Poljak, M. (2020). Primary HPV-based cervical cancer screening in Europe: implementation status, challenges, and future plans. *Clinical microbiology and infection*, 26(5), 579-583. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.09.006>
- [20] Cuzick, J., Cadman, L., Mesher, D., Austin, J., Ashdown-Barr, L., Ho, L., Terry, G., Liddle, S., Wright, C., Lyons, D., & Szarewski, A. (2013). Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *British journal of cancer*, 108(4), 908-913. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.22>
- [21] Kinney, W., Wright, T. C., Dinkelspiel, H. E., DeFrancesco, M., Thomas Cox, J., & Huh, W. (2015). Increased cervical cancer risk associated with screening at longer intervals. *Obstetrics and gynecology*, 125(2), 311-315. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000000632>
- [22] Blatt, A. J., Kennedy, R., Luff, R. D., Austin, R. M., & Rabin, D. S. (2015). Comparison of cervical cancer screening results among 256,648 women in multiple clinical practices. *Cancer cytopathology*, 123(5), 282-288. <https://doi.org/10.1002/cncy.21544>
- [23] Giorgi-Rossi, P., Arbyn, M., & Meijer, C. J. (2015). Cervical cancer screening by human papillomavirus testing followed by cytology triage. *JAMA internal medicine*, 175(6), 1068. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.0592>
- [24] Saei Ghare Naz, M., Kariman, N., Ebadi, A., Ozgoli, G., Ghasemi, V., & Rashidi Fakari, F. (2018). Educational Interventions for Cervical Cancer Screening Behavior of Women: A Systematic Review. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 19(4), 875-884. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.4.875>
- [25] Rahatgaonkar, V. G., Deshpande, A. A., & Oka, G. A. (2021). Screening for cervical cancer in HIV-infected women: A review of literature. *Indian journal of cancer*, 58(3), 317-325. https://doi.org/10.4103/ijc.IJC_888_19
- [26] Salehinyia, H., Momenimovahed, Z., Allahqoli, L., Momenimovahed, S., & Alkatout, I. (2021). Factors related to cervical cancer screening among Asian women. *European review for medical and pharmacological sciences*, 25(19), 6109-6122. https://doi.org/10.26355/eurev_202110_26889
- [27] Cho, H. W., Hong, J. H., & Lee, J. K. (2021). Human papillomavirus testing as a primary screening tool for cervical cancer. *Journal of gynecologic oncology*, 32(3), e56. <https://doi.org/10.3802/jgo.2021.32.e56>
- [28] Bruni, L., Serrano, B., Roura, E., Alemany, L., Cowan, M., Herrero, R., Poljak, M., Murillo, R., Broutet, N., Riley, L. M., & de Sanjose, S. (2022). Cervical cancer screening programmes and age-specific coverage estimates for 202 countries and territories worldwide: a review and synthetic analysis. *The Lancet. Global health*, 10(8), e1115-e1127. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(22\)00241-8](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(22)00241-8)
- [29] Gage, J. C., Schiffman, M., Katki, H. A., Castle, P. E., Fetterman, B., Wentzensen, N., Poitras, N. E., Lorey, T., Cheung, L. C., & Kinney, W. K. (2014). Reassurance against future risk of precancer and cancer conferred by a negative human papillomavirus test. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(8), dju153. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju153>
- [30] Fontham, E. T. H., Wolf, A. M. D., Church, T. R., Etzioni, R., Flowers, C. R., Herzig, A., Guerra, C. E., Oeffinger, K. C., Shih, Y. T., Walter, L. C., Kim, J. J., Andrews, K. S., DeSantis, C. E., Fedewa, S. A., Manassaram-Baptiste, D., Saslow, D., Wender, R. C., & Smith, R. A. (2020). Cervical cancer screening for individuals at average risk: 2020 guideline update from the American Cancer Society. *CA: a cancer journal for clinicians*, 70(5), 321-346. <https://doi.org/10.3322/caac.21628>
- [31] Castle, P. E., Wheeler, C. M., Campos, N. G., Sy, S., Burger, E. A., Kim, J. J., & New Mexico HPV Pap Registry Steering Committee (2018). Inefficiencies of over-screening and under-screening for cervical cancer prevention in the U.S. *Preventive medicine*, 111, 177-179. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2018.03.011>
- [32] Isaka, Y., Hori, A., Tanaka, R., & Ichikawa, M. (2021). Alleviating psychological distress associated with a positive cervical cancer screening result: a randomized control trial. *BMC women's health*, 21(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s12905-021-01207-6>
- [33] Bergeron, C., Ronco, G., Reuschenbach, M., Wentzensen, N., Arbyn, M., Stoler, M., & von Knebel Doeberitz, M. (2015). The clinical impact of using p16(INK4a) immunocytochemistry in cervical histopathology and cytology: an update of recent developments. *International journal of cancer*, 136(12), 2741-2751. <https://doi.org/10.1002/ijc.28900>
- [34] Zhao, C., Moriarty, A. T., Ghofrani, M., Husain, M., Tambouret, R. H., Laucirica, R., Laser, A., Fischer, A., Ocal, I. T., Souers, R. J., Russell, D. K., Fan, F., & Crothers, B. A. (2015). Human papillomavirus testing and reporting rates in 2012: results of a College of American Pathologists national survey. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 139(6), 757-761. <https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0393-CP>
- [35] Wentzensen, N., Fetterman, B., Castle, P. E., Schiffman, M., Wood, S. N., Stiernerling, E., Tokugawa, D., Bodelon, C., Poitras, N., Lorey, T., & Kinney, W. (2015). p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(12), djv257. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv257>
- [36] Cox, J. T., Castle, P. E., Behrens, C. M., Sharma, A., Wright, T. C., Jr, Cuzick, J., & Athena HPV Study Group (2013). Comparison of cervical cancer screening strategies incorporating different combinations of cytology, HPV testing, and genotyping for HPV 16/18: results from the ATHENA HPV study. *American journal of obstetrics and gynecology*, 208(3), 184.e1-184.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2012.11.020>
- [37] Wentzensen, N., Sun, C., Ghosh, A., Kinney, W., Mirabello, L., Wacholder, S., Shaber, R., LaMere, B., Clarke, M., Lorincz, A. T., Castle, P. E., Schiffman, M., & Burk, R. D. (2012). Methylation of HPV18, HPV31, and HPV45 genomes and cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(22), 1738-1749. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs425>
- [38] Sawaya, G. F., Smith-McCune, K., & Kuppermann, M. (2019). Cervical Cancer Screening: More Choices in 2019. *JAMA*, 321(20), 2018-2019. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.4595>
- [39] Marcus, P. M., Prorok, P. C., Miller, A. B., DeVoto, E. J., & Kramer, B. S. (2015). Conceptualizing overdiagnosis in cancer screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(4), djv014. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv014>
- [40] FDA. (2020, March 10). PMA P190024: FDA Summary of Safety and Effectiveness Data. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf19/P190024B.pdf
- [41] Darragh, T. M., Colgan, T. J., Cox, J. T., Heller, D. S., Henry, M. R., Luff, R. D., McCalmont, T., Nayar, R., Paulefsky, J. M., Stoler, M. H., Wilkinson, E. J., Zaino, R. J., Wilbur, D. C., & Members of LAST Project Work Groups (2012). The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Journal of lower genital tract disease*, 16(3), 205-242. <https://doi.org/10.1097/LGT.0b013e31825c31dd>
- [42] Nayar, R., & Wilbur, D. C. (2015). The Pap test and Bethesda 2014. *Cancer cytopathology*, 123(5), 271-281. <https://doi.org/10.1002/cncy.21521>
- [43] Nayar, R., & Wilbur, D. C. (2015). *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes* (pp. 1-321). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-11074-5>
- [44] Giorgi Rossi, P., Carozzi, F., Ronco, G., Allia, E., Bisanzio, S., Gilio-Tos, A., De Marco, L., Rizzolo, R., Gustinucci, D., Del Mistro, A., Frayle, H., Confortini, M., Iossa, A., Cesarini, E., Bulletti, S., Passamonti, B., Gori, S., Toniolo, L., Barca, A., Bonvicini, L., ... the New Technology for Cervical Cancer 2 Working Group (2021). p16/ki67 and E6/E7 mRNA Accuracy and Prognostic Value in Triage HPV DNA-Positive Women. *Journal of the National Cancer Institute*, 113(3), 292-300. <https://doi.org/10.1093/jnci/djaa105>
- [45] Clarke, M. A., Cheung, L. C., Castle, P. E., Schiffman, M., Tokugawa, D., Poitras, N., Lorey, T., Kinney, W., & Wentzensen, N. (2019). Five-Year Risk of Cervical Precancer Following p16/Ki-67 Dual-Stain Triage of HPV-Positive Women. *JAMA oncology*, 5(2), 181-186. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.4270>
- [46] Yang, D. X., Soulos, P. R., Davis, B., Gross, C. P., & Yu, J. B. (2018). Impact of Widespread Cervical Cancer Screening: Number of Cancers Prevented and Changes in Race-specific Incidence. *American journal of clinical oncology*, 41(3), 289-294. <https://doi.org/10.1097/JCO.000000000000264>
- [47] Hammer, A., & Gravitt, P. (2021). Clinical implications of transitioning from cytology to human papillomavirus-based cervical cancer screen-

- ing. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 100(3), 371-372. <https://doi.org/10.1111/aogs.14107>
- [48] Koliopoulos, G., Nyaga, V. N., Santesso, N., Bryant, A., Martin-Hirsch, P. P., Mustafa, R. A., Schünemann, H., Paraskevaidis, E., & Arbyn, M. (2017). Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population. *The Cochrane database of systematic reviews*, 8(8), CD008587. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008587.pub2>
- [49] Demarco, M., Hyun, N., Carter-Pokras, O., Raine-Bennett, T. R., Cheung, L., Chen, X., Hammer, A., Campos, N., Kinney, W., Gage, J. C., Befano, B., Perkins, R. B., He, X., Dallal, C., Chen, J., Poitras, N., Mayrand, M. H., Coutlee, F., Burk, R. D., Lorey, T., ... Schiffman, M. (2020). A study of type-specific HPV natural history and implications for contemporary cervical cancer screening programs. *EClinicalMedicine*, 22, 100293. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100293>
- [50] Guan, P., Howell-Jones, R., Li, N., Bruni, L., de Sanjosé, S., Franceschi, S., & Clifford, G. M. (2012). Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *International journal of cancer*, 131(10), 2349-2359. <https://doi.org/10.1002/ijc.27485>
- [51] Thomsen, L. T., Frederiksen, K., Munk, C., Junge, J., Castle, P. E., Iftner, T., & Kjaer, S. K. (2014). High-risk and low-risk human papillomavirus and the absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia or cancer. *Obstetrics and gynecology*, 123(1), 57-64. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000000056>
- [52] Schiffman, M., Burk, R. D., Boyle, S., Raine-Bennett, T., Katki, H. A., Gage, J. C., Wentzensen, N., Kornegay, J. R., Aldrich, C., Tam, T., Erlich, H., Apple, R., Befano, B., & Castle, P. E. (2015). A study of genotyping for management of human papillomavirus-positive, cytology-negative cervical screening results. *Journal of clinical microbiology*, 53(1), 52-59. <https://doi.org/10.1128/JCM.02116-14>
- [53] Hu, Z., & Ma, D. (2018). The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. *Cancer medicine*, 7(10), 5217-5236. <https://doi.org/10.1002/cam4.1501>
- [54] Schiffman, M., & Wentzensen, N. (2021). The Orderly Incorporation of Continuing Technologic Advances Into Cervical Cancer Screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 113(3), 231-233. <https://doi.org/10.1093/jnci/djaa106>
- [55] Wentzensen, N., Walker, J. L., Gold, M. A., Smith, K. M., Zuna, R. E., Mathews, C., Dunn, S. T., Zhang, R., Moxley, K., Bishop, E., Tenney, M., Nugent, E., Graubard, B. I., Wacholder, S., & Schiffman, M. (2015). Multiple biopsies and detection of cervical cancer precursors at colposcopy. *Journal of clinical oncology*, 33(1), 83-89. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.55.9948>
- [56] Davies, K. R., Cantor, S. B., Cox, D. D., & Follen, M. (2015). An alternative approach for estimating the accuracy of colposcopy in detecting cervical precancer. *PLoS one*, 10(5), e0126573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126573>
- [57] Gage, J. C., Katki, H. A., Schiffman, M., Castle, P. E., Fetterman, B., Poitras, N. E., Lorey, T., Cheung, L. C., Behrens, C., Sharma, A., Zhao, F. H., Cuzick, J., Yang, Z. H., & Kinney, W. K. (2014). The low risk of precancer after a screening result of human papillomavirus-negative/atypical squamous cells of undetermined significance papanicolaou and implications for clinical management. *Cancer cytopathology*, 122(11), 842-850. <https://doi.org/10.1002/cncy.21463>
- [58] Katki, H. A., Schiffman, M., Castle, P. E., Fetterman, B., Poitras, N. E., Lorey, T., Cheung, L. C., Raine-Bennett, T., Gage, J. C., & Kinney, W. K. (2013). Five-year risks of CIN 3+ and cervical cancer among women with HPV-positive and HPV-negative high-grade Pap results. *Journal of lower genital tract disease*, 17(5 Suppl 1), S50-S55. <https://doi.org/10.1097/LGT.0b013e3182854282>
- [59] Katki, H. A., Schiffman, M., Castle, P. E., Fetterman, B., Poitras, N. E., Lorey, T., Cheung, L. C., Raine-Bennett, T., Gage, J. C., & Kinney, W. K. (2013). Five-year risks of CIN 3+ and cervical cancer among women who test Pap-negative but are HPV-positive. *Journal of lower genital tract disease*, 17(5 Suppl 1), S56-S63. <https://doi.org/10.1097/LGT.0b013e318285437b>
- [60] Schiffman, M., Vaughan, L. M., Raine-Bennett, T. R., Castle, P. E., Katki, H. A., Gage, J. C., Fetterman, B., Befano, B., & Wentzensen, N. (2015). A study of HPV typing for the management of HPV-positive ASC-US cervical cytologic results. *Gynecologic oncology*, 138(3), 573-578. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.06.040>
- [61] Schiffman, M., & Wentzensen, N. (2015). Transitioning to a new era in cervical cancer screening. *Gynecologic oncology*, 136(2), 175-177. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.01.538>
- [62] Reid, J. L., Wright, T. C., Jr, Stoler, M. H., Cuzick, J., Castle, P. E., Dockter, J., Getman, D., & Giachetti, C. (2015). Human papillomavirus oncogenic mRNA testing for cervical cancer screening: baseline and longitudinal results from the CLEAR study. *American journal of clinical pathology*, 144(3), 473-483. <https://doi.org/10.1309/AJCPH-VD7MIP3FYV>
- [63] Bedell, S. L., Goldstein, L. S., Goldstein, A. R., & Goldstein, A. T. (2020). Cervical Cancer Screening: Past, Present, and Future. *Sexual medicine reviews*, 8(1), 28-37. <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2019.09.005>
- [64] Xue, P., Ng, M. T. A., & Qiao, Y. (2020). The challenges of colposcopy for cervical cancer screening in LMICs and solutions by artificial intelligence. *BMC medicine*, 18(1), 169. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01613-x>
- [65] Katki, H. A., Gage, J. C., Schiffman, M., Castle, P. E., Fetterman, B., Poitras, N. E., Lorey, T., Cheung, L. C., Raine-Bennett, T., & Kinney, W. K. (2013). Follow-up testing after colposcopy: five-year risk of CIN 2+ after a colposcopic diagnosis of CIN 1 or less. *Journal of lower genital tract disease*, 17(5 Suppl 1), S69-S77. <https://doi.org/10.1097/LGT.0b013e31828543b1>
- [66] Kaufman, H. W., Alagja, D. P., Chen, Z., Onisko, A., & Austin, R. M. (2020). Contributions of Liquid-Based (Papanicolaou) Cytology and Human Papillomavirus Testing in Cotesting for Detection of Cervical Cancer and Precancer in the United States. *American journal of clinical pathology*, 154(4), 510-516. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa074>
- [67] Perkins, R. B., Guido, R. L., Saraiya, M., Sawaya, G. F., Wentzensen, N., Schiffman, M., & Feldman, S. (2021). Summary of Current Guidelines for Cervical Cancer Screening and Management of Abnormal Test Results: 2016-2020. *Journal of women's health* (2002), 30(1), 5-13. <https://doi.org/10.1089/jwh.2020.8918>
- [68] Ronco, G., Dillner, J., Elfström, K. M., Tunesi, S., Snijders, P. J., Arbyn, M., Kitchener, H., Segnan, N., Gilham, C., Giorgi-Rossi, P., Berkhof, J., Peto, J., Meijer, C. J., & International HPV screening working group (2014). Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet*, 383(9916), 524-532. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62218-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62218-7)
- [69] World Health Organization. (2021, July 6). *WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention, Second edition*. <https://www.who.int/publications/item/9789240030824>
- [70] Arbyn, M., Smith, S. B., Temin, S., Sultana, F., Castle, P., & Collaboration on Self-Sampling and HPV Testing (2018). Detecting cervical precancer and reaching underscreened women by using HPV testing on self samples: updated meta-analyses. *BMJ (Clinical research ed.)*, 363, k4823. <https://doi.org/10.1136/bmj.k4823>
- [71] Hawkes, D., Keung, M. H. T., Huang, Y., McDermott, T. L., Romano, J., Saville, M., & Brotherton, J. M. L. (2020). Self-Collection for Cervical Screening Programs: From Research to Reality. *Cancers*, 12(4), 1053. <https://doi.org/10.3390/cancers12041053>
- [72] Song, F., Du, H., Xiao, A., Wang, C., Huang, X., Liu, Z., Zhao, M., Men, H., & Wu, R. (2020). Evaluating the performance of three different cervical cancer screening modalities in a large prospective population-based cohort. *Journal of infection and public health*, 13(11), 1780-1786. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.08.008>
- [73] Katki, H. A., Schiffman, M., Castle, P. E., Fetterman, B., Poitras, N. E., Lorey, T., Cheung, L. C., Raine-Bennett, T., Gage, J. C., & Kinney, W. K. (2013). Five-year risks of CIN 3+ and cervical cancer among women with HPV testing of ASC-US Pap results. *Journal of lower genital tract disease*, 17(5 Suppl 1), S36-S42. <https://doi.org/10.1097/LGT.0b013e3182854253>
- [74] Perkins, R. B., Guido, R. S., Castle, P. E., Chelmsow, D., Einstein, M. H., Garcia, F., Huh, W. K., Kim, J. J., Moscicki, A. B., Nayar, R., Saraiya, M., Sawaya, G. F., Wentzensen, N., Schiffman, M., & 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines Committee (2020). 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines for Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors. *Journal of lower genital tract disease*, 24(2), 102-131. <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000525>
- [75] Katki, H. A., Schiffman, M., Castle, P. E., Fetterman, B., Poitras, N. E., Lorey, T., Cheung, L. C., Raine-Bennett, T., Gage, J. C., & Kinney, W. K. (2013). Benchmarking CIN 3+ risk as the basis for incorporating HPV and Pap cotesting into cervical screening and management guidelines. *Journal of lower genital tract disease*, 17(5 Suppl 1), S28-S35. <https://doi.org/10.1097/LGT.0b013e318285423c>
- [76] Schiffman, M., & Wentzensen, N. (2021). Cervical Screening Performance. *American journal of clinical pathology*, 155(4), 616-620. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa198>
- [77] Egemen, D., Cheung, L. C., Chen, X., Demarco, M., Perkins, R. B., Kinney, W., Poitras, N., Befano, B., Locke, A., Guido, R. S., Wisner, A. L., Gage, J. C., Katki, H. A., Wentzensen, N., Castle, P. E., Schiffman, M., & Lorey, T. S. (2020). Risk Estimates Supporting the 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines. *Journal of lower genital tract disease*, 24(2), 132-143. <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000529>
- [78] Rodríguez, A. C., Solomon, D., Herrero, R., Hildesheim, A., González, P., Wacholder, S., Porras, C., Jiménez, S., Schiffman, M., & CVT Group (2013). Impact of human papillomavirus vaccination on cervical cytology screening, colposcopy, and treatment. *American journal of epidemiology*, 178(5), 752-760. <https://doi.org/10.1093/aje/kwt047>

Persistent genital arousal disorder: clinical, differential diagnostic and care aspects (clinical report)

V. V. Ogorenko ^{1,A,E,F}, A. H. Kyrychenko ^{2,A,E}, T. Y. Shusterman ^{1,A,E},
V. O. Kokashynskyi ^{1,A,B,C,D}, N. V. Tomakh ^{2,A,E}

¹Dnipro State Medical University, Ukraine, ²State Institution "Ukrainian State Research Institute of Medical and Social Disability Problems of the Ministry of Health of Ukraine", Dnipro

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

Key words:
PGAD, diagnosis, treatment, care, clinical report.

Pathologia
2023; 20 (1), 94-98

*E-mail:
Viltord.koka16@gmail.com

Persistent genital arousal disorder (PGAD) is a condition of persistent genital arousal, in the absence of a psychological component and organic pathology from the vascular, endocrine and nervous system.

The aim of the study is to examine the symptoms, clinical picture, developmental dynamics, risk factors, and treatment for PGAD.

Materials and methods. The clinical case of observation of PGAD in a 20-year-old female patient suffering from recurrent depressive disorder is presented. Methods included in clinical, psychopathological and psychodiagnostic examination have been with using the following techniques: Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9), Generalized Anxiety Disorder-7 (GAD-7), Visual Analogue Scales of pain intensity (VAS).

Results. As a result of collection of life and disease history, analysis of examination findings by related specialists and additional research methods of patient with PGAD the next diagnosis has been made according to the International Classification of Diseases 10th Revision: Recurrent depressive disorder, current episode of moderate severity with somatic symptoms (F33.11). She has been treated with a number of drugs from the Selective serotonin reuptake inhibitors group and mood stabilizers, the combination of sertraline and lamotrigine appeared the optimal treatment option. The results of the treatment have been satisfactory, the symptoms of PGAD have stopped bothering the patient, the emotional state has improved significantly.

Conclusions. The case of the PGAD is presented. Clinical picture of the case turned out to be typical in comparison with the results of other researchers. The peculiarity is the possible association of symptoms with withdrawal of escitalopram. The case confirms the data upon the high suicidal risk in this disorder. The patient's treatment requires intervention of different medical specialists to rule out organic pathology and using of multidisciplinary approach. Sertraline and lamotrigine appeared effective in the treatment of PGAD.

Ключові слова:
розлад постійного генітального збудження, діагностика, лікування, організація допомоги, клінічний випадок.

Патологія. 2023.
Т. 20, № 1(57).
С. 94-98

Розлад постійного генітального збудження: клініка, диференційна діагностика та особливості допомоги (клінічний випадок)

В. В. Огоренко, А. Г. Кириченко, Т. Й. Шустерман, В. О. Кокашинський, Н. В. Томах

Розлад постійного генітального збудження (англ. Persistent genital arousal disorder, PGAD) – стан безперервного генітального збудження без психологічного компонента збудження й органічної патології з боку судинної, ендокринної та нервової систем.

Мета роботи – вивчення симптомів, клінічної картини, динаміки розвитку, факторів ризику та методів лікування розладу постійного генітального збудження.

Матеріали та методи. Наведено клінічний випадок власного спостереження розладу постійного генітального збудження в пацієнтки віком 20 років, у котрої діагностовано на рекурентний депресивний розлад. Дослідження передбачало застосування клінічних і психопатологічних методів, здійснення психодіагностичного обстеження з використанням Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9), Generalized Anxiety Disorder-7 (GAD-7), візуальної аналогової шкали інтенсивності болю (ВАШ).

Результати. У результаті збору анамнезу життя та захворювання, аналізу висновків обстеження суміжними спеціалістами та даних додаткових методів дослідження встановили діагноз за Міжнародною класифікацією хвороб 10 перегляду: рекурентний депресивний розлад, поточний епізод помірної тяжкості з соматичними симптомами (F33.11). Пацієнтка отримувала лікування низкою препаратів із групи селективних інгібіторів зворотного захоплення серотоніну та стабілізаторами настрою; оптимальною схемою лікування виявилась комбінація сертраліну та ламотриджину. Результати лікування задовільні, симптоми розладу постійного генітального збудження перестали турбувати пацієнтку, її емоційний стан значно покращився.

Висновки. Наведено випадок доволі рідкісного в медицині розладу постійного генітального збудження, клінічна картина якого виявилась типовою порівняно з результатами досліджень інших авторів. Особливість наведеного клінічного випадку розладу постійного генітального збудження полягає в можливій асоціації симптомів зі скасуванням есциталопраму. Цей випадок підтверджує відомості про високий суїцидальний ризик при розладі постійного генітального збудження. Курація пацієнтки потребувала втручання фахівців із різних галузей медицини (неврологія, гінекологія та психіатрія) для виключення органічної патології та забезпечення мультидисциплінарного підходу. Під час лікування цього випадку розладу постійного генітального збудження ефективними виявилися такі препарати, як сертралін і ламотриджин.

Persistent genital arousal disorder (PGAD) is a condition of persistent genital arousal, in the absence of a psychological component of arousal and organic pathology from the vascular, endocrine and nervous systems. For the first time the term of PGAD has been mentioned since 2006, but until today this problem has not been deeply researched and studied, so the data were presented by case studies and expert opinions [1,2]. According to some reports, the worldwide prevalence of this disorder is 0.6–3.0 % among women, but this disorder remains largely unrecognized by medical practitioners. Given the above, nowadays, practicing clinicians encountering patients with this disorder are forced to be guided by scant information and individual recommendations, which affect the quality of care [3,4]. Most of the patients do not have access to the care they need at all. Considering the severity of the symptoms of this disorder, the level of the patients' maladjustment, the accompanying symptoms from the mental sphere, and the high risk of suicide, this subject requires coverage and study, followed by recommendations for medical practitioners.

Aim

To examine the symptoms, clinical picture, developmental dynamics, risk factors, and treatments for PGAD.

Materials and methods

The clinical case of observation of persistent genital arousal disorder in a 20-year-old female patient suffering from recurrent depressive disorder is presented.

To determine mental status of the patient we conducted clinical and psychopathological study, to assess level of symptoms of depression – Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9) [5], anxiety – Generalized Anxiety Disorder-7 (GAD-7) [6] and pain – Visual Analogue Scales of pain intensity (VAS) [7].

In accordance with the Declaration of Helsinki, written informed consent to undergo a psychiatric examination was received from the participant.

Clinical case

Patient complaints. A 20-year-old female patient asked for help complaining of unpleasant sensations in the external genital area, mainly in the clitoral area, describing them as feelings of arousal, tension and itching, which are not pleasant and not associated with sexual arousal. They occur spontaneously during the day with the maximum intensity of these symptoms observed when the patient takes sitting or horizontal position. This state of arousal was accompanied by secretion of lubrication, pulsating and undulating sensations, blood filling of the genitals, which sometimes led to spontaneous orgasms that did not bring relief, but instead increased the arousal. Touches in the external genital area were not pleasant and resembled an "electric shock". The presence of these symptoms in the patient was accompanied by an increase in the level of anxiety and feelings of guilt: "This is the worst thing that's ever happened to me in my life", "it's like a 24/7 self-rape".

At maximum symptom severity, there was pain that spread to the external genitalia and perineum, which could only be relieved by taking a warm bath.

There was a direct correlation of these symptoms with the severity of anxiety.

These symptoms completely maladjusted the patient. They were accompanied by sleeping disorders due to painful and unpleasant sensations, decreased mood, irritability, anxiety, suicidal thoughts, and a desire for surgical treatment of this problem due to unbearable feelings.

Anamnesis. The patient was born in a complete family, there is no information about mental disorders among her relatives, she grew up and developed without deviations, the family is complete and religious. At school she studied well. Currently, she is a high school student.

At the age of 15, according to the patient, there was an attempted rape, she reported: "the boyfriend on the date began to getting handsy, tried to touch her, which frightened her and she ran away", after which she no longer engaged in a relationship and was wary of men. Around the age of 16, she first sought help from a psychiatrist regarding an anxiety disorder and was prescribed standard therapy with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) antidepressant and a tranquilizer. Further, the patient periodically asked for help in connection with an aggravation of anxiety and depressive symptoms, standard therapy with antidepressants of SSRI class (fluoxetine, paroxetine) and tranquilizers was prescribed. The patient also sought help from a psychotherapist during this period of time.

For the first time, symptoms in the genital area occurred a year ago (autumn 2021) after the withdrawal of the antidepressants of the SSRI class (escitalopram). According to the patient, these symptoms began with discomfort in the urethra when urinating and were similar to those of cystitis. Further, discomfort in the clitoral area and sensation of arousal on the verge of orgasm appeared, but the patient did not inform the attending physician and psychotherapist; after 2 weeks, due to the presence of anxious-depressive symptoms, escitalopram at a dose of 10 mg was prescribed, after that the genital symptoms disappeared. However, the therapy of targeted affective symptoms was not effective enough, then a change of the treatment regimen was carried out: the patient was taking sertraline 75 mg + lamotrigine 25 mg + aripiprazole 5 mg. Given regimen allowed to keep the satisfactory affective state, however, some depressive and anxious symptoms persisted.

Subsequently, the patient began to visit a psychotherapist, who canceled this regimen and prescribed vortioxetine (March 2022), after which the patient's emotional condition worsened somewhat. Further, the psychotherapist canceled the vortioxetine (May 2022), the patient's emotional condition was stable. However, the patient did not see the effect of the visit to the therapist, so she discontinued visiting him.

This deterioration occurred in June 2022, when the above symptoms in the external genital area occurred.

During the conversation, the patient described her complaints and also reported that she had never before shown sexual interest, had no sexual desire, rated her libido at 0, and had never before experienced orgasm. She reported isolated cases of erotic dreams, after which

a feeling of guilt was present. She was scared of men, afraid of being a “toy for intimate pleasures”. During the onset of these painful sensations, she first tried masturbating, hoping that this would reduce the intensity of the feeling of tension and pain, but the orgasms she achieved brought no relief: “It only got worse afterwards, and I also felt a feeling of guilt”.

In general, the patient has a negative attitude towards the manifestation of her sexuality, explaining it by religious family traditions; she also stated that she wished this sphere in her life did not exist at all, and that she does not plan to have sexual relations in the future and to build relationships.

Based on the results of the consultation, the patient was recommended to see a neurologist and a gynecologist in order to exclude concomitant pathology. At the same time, pregabalin was prescribed at a dose of 150 mg/day, this dose of the drug allowed to almost completely eliminate the symptoms of the given disorder, however, after 3 days the symptoms returned by about 60–70 % according to the patient’s subjective sensations. In this regard, the dose of pregabalin was increased to 225 mg/day, which reduced given symptoms by 50 % and normalized sleep and got rid of spontaneous orgasms. However, painful sensations localized in the clitoral area continued to maladjust the patient. Against the background of a decrease in these painful sensations, symptoms of the affective sphere began to actualize in the form of an increase in anxiety and depression. During the examination by a neurologist and an magnetic resonance imaging (MRI) scan, coccyx subluxation and spondylarthrosis were revealed. The diagnosis was determined: coccydynia, anxious-depressive syndrome. The therapy with meloxicam and diclofenac was prescribed, which had no effect on the symptoms in the genital area.

An examination by a gynecologist revealed no organic pathology of the genitals, but urinalysis revealed conditionally pathogenic flora, for which antibacterial therapy was prescribed, which neither lead to improvement in symptoms, nor caused thrush, followed by an increase in discomfort in the genital area. Therapy with antifungal agents was prescribed, after completion of which there were no pathological changes in the genital area.

In turn, the patient underwent hormone therapy by a gynecologist for polycystic ovarian syndrome, and for a year she took ethinylestradiol 0.03 mg/day and levonorgestrel 0.05 mg/day.

As a result, in a month and a half, after excluding the connection of these symptoms with organic pathology, considering the absence of sufficient effect of pregabalin and the increase of affective symptoms, it was decided to add escitalopram to therapy. Escitalopram was prescribed at a regimen dose of 5 mg/day with an increase to 15 mg/day, the pregabalin dose was reduced to 75 mg/day. As a result, during the next 2 weeks, the genital symptoms almost disappeared, the patient considered them to be 10 % of the initial ones, which did not affect her vital activity, but there was a significant increase in depressive symptoms.

Considering the patient’s history, escitalopram and pregabalin were replaced by sertraline at a dose of 100 mg/day and lamotrigine 50 mg/day, and the patient also began using an ointment with a topical anesthetic as needed

during episodes of increased symptoms. After 2 weeks, the patient reported stable gradual improvement in her emotional state and complete absence of genital symptoms.

Mental state. The patient is well groomed outwardly. The facial expression is weakly modulated, sad. She is available for productive contact, answers questions in a detailed way, and is fixed on her painful experiences. The voice is strained. While describing the symptoms in the genital area, she is shy, feels uncomfortable, her face turns red, tries not to call the organs by their names, uses expressions such as: “there is tension there”, “it hurts in that area”. Mood is depressed, anxious, tearfulness is present. Attention is unsteady, attention span is reduced. Thinking consistently. Memory and intellect are not impaired, the knowledge stock corresponds to the education received. Reports the presence of suicidal thoughts, which she does not intend to implement. Critically assesses her condition, asks for help.

Objective data. At the beginning of treatment (June 2022), the patient completed interviews on the GAD-7 and PHQ-9 scales with a PHQ-9 score of 13 and a GAD-7 score of 19. It was also proposed to rate the symptoms on a scale of 0 to 10 (VAS). Results: genital pain – 9, sleep disturbance – 8, sleep depth disturbance – 4, sleep quality – 6, physical condition limited daily activities – 10, emotional condition limited daily activities – 6.

The patient was examined (Aug. 31, 2022) with scales with a PHQ-9 score of 24 and a GAD-7 score of 15. It was also proposed to evaluate the VAS scale for genital pain – 3, sleep disturbance – 3, sleep depth disturbance – 3, sleep quality – 8, physical condition limited daily activities – 6, emotional state limited daily activities – 6.

MRI: coccyx subluxation and spondylarthrosis.

A blood test for the level of thyroid hormones: indicators are within the normal range.

Related specialists. Neurologist: Coccydynia; Anxiety-depressive syndrome. Gynecologist: Polycystic ovarian syndrome.

Diagnosis: Recurrent depressive disorder, current episode of moderate severity with somatic symptoms. F33.11

Associated diagnosis: Polycystic ovarian syndrome; Coccydynia.

Discussion

The PGAD studies point to the need to exclude organic pathology of the external genitalia [8,9]. Our patient was under constant observation by a gynecologist for polycystic ovarian syndrome and the gynecologist also excluded pathology of the external genitalia.

Some studies indicate a correlation between the onset of PGAD symptoms and taking or stopping antidepressants including SSRIs [10,11]. In the case we described, the correlation between discontinuation of an antidepressant and the beginning of symptoms and their disappearance when the drugs of this class are re-prescribed is clearly observed.

According to the available data, the occurrence of PGAD symptoms is significantly influenced by the patient’s sexual beliefs, attitudes toward their sexual feelings and manifestations, and a sexual trauma in the

anamnesis [12, 13]. In this case, the patient had developed under strict Christian beliefs in terms of sexuality, any of her own sexual manifestations led to feelings of guilt and shame. In addition, there was an episode of attempted physical abuse during adolescence, which significantly maladjusted the patient.

Some studies point to the relationship between hyperthyroidism and sexual dysfunction in men and women [9]. Our patient was examined for thyroid hormone levels, which were within normal range.

The role of inflammatory processes (urethritis, cystitis, vaginitis, thrush) in the formation and development of PGAD symptoms is pointed out [14]. In the case of this patient, symptoms of cystitis and thrush were observed, which significantly aggravated the clinical manifestations of PGAD; however, after recovery from the inflammatory processes, PGAD symptoms decreased, but remained at a rather high level.

There is an evidence of a correlation between symptoms of PGAD and pathology of musculoskeletal system, especially the lumbosacral spine [15–18]. The patient was examined by MRI and consulted by a neurologist and a subluxation of the coccyx was detected, and treatment with NSAIDs was prescribed, which had no effect on the symptoms of PGAD.

As a differential diagnosis, we considered a variant of psychalgia associated with withdrawal of antidepressants, but in the patient the symptoms of undesirable arousal were in the foreground, and the pain component was additional and manifested in a long-term persistent arousal state.

Conclusions

1. The presented case of the PGAD disorder is quite rare in medical practice and its clinical picture turned out to be typical in comparison with the results of other researchers.

2. The peculiarity of the described clinical case of PGAD is in possible association of symptoms with withdrawal of SSRIs (escitalopram).

3. The described case of PGAD confirms the data about high suicidal risk in this disorder.

4. The patient's treatment requires inclusion of specialists from different branches of medicine (neurology, gynecology and psychiatry) to rule out organic pathology and use of a multidisciplinary approach.

5. SSRIs (sertraline) and mood stabilizers (lamotrigine) were effective in the treatment of this case of PGAD disorder.

Prospects for further research. Detection and analysis of new cases of PGAD, development of standards of diagnostics, treatment and care, taking into account the need for a multidisciplinary approach to the management of this contingent of persons. Practitioners prescribing SSRIs should consider the possible risks of PGAD in patients.

Funding

This study was conducted in the framework of the scientific research work of Dnipro State Medical University "Development of modern technologies of differentiated psychiatric care for people with non-psychotic mental disorders and their relatives and mental health professionals", state registration No. 0121U114305 (2022–2026).

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

Надійшла до редакції / Received: 22.12.2022
Після доопрацювання / Revised: 24.02.2023
Прийнято до друку / Accepted: 02.03.2023

Information about authors:

Ogorenko V. V., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Psychiatry, Narcology and Medical Psychology, Dnipro State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0003-0549-4292](https://orcid.org/0000-0003-0549-4292)

Kyryuchenko A. H., MD, PhD, DSc, Professor, Director of the State Institution "Ukrainian State Research Institute of Medical and Social Disability Problems of the Ministry of Health of Ukraine", Dnipro.

ORCID ID: [0000-0001-5095-8805](https://orcid.org/0000-0001-5095-8805)

Shusterman T. Y., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Psychiatry, Narcology and Medical Psychology, Dnipro State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0001-5422-1624](https://orcid.org/0000-0001-5422-1624)

Kokashynskiy V. O., MD, Assistant of the Department of Psychiatry, Narcology and Medical Psychology, Dnipro State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-6191-3757](https://orcid.org/0000-0002-6191-3757)

Tomakh N. V., MD, PhD, Medical Director of the State Institution "Ukrainian State Research Institute of Medical and Social Disability Problems of the Ministry of Health of Ukraine", Dnipro.

ORCID ID: [0000-0001-9144-7024](https://orcid.org/0000-0001-9144-7024)

Відомості про авторів:

Огоренко В. В., д-р мед. наук, професор, в. о. зав. каф. психіатрії, наркології і медичної психології, Дніпровський державний медичний університет, Україна.
Кириченко А. Г., д-р мед. наук, професор, директор ДУ «Український державний науково-дослідний інститут медико-соціальних проблем інвалідності МОЗ України», м. Дніпро.

Шустерман Т. Й., канд. мед. наук, доцент каф. психіатрії, наркології і медичної психології, Дніпровський державний медичний університет, м. Дніпро, Україна.

Кокашинський В. О., асистент каф. психіатрії, наркології і медичної психології, Дніпровський державний медичний університет, м. Дніпро, Україна.

Томах Н. В., канд. мед. наук, медичний директор ДУ «Український державний науково-дослідний інститут медико-соціальних проблем інвалідності МОЗ України», м. Дніпро.

References

- Leiblum, S., Seehuus, M., & Brown, C. (2007). Persistent genital arousal: disordered or normative aspect of female sexual response?. *The journal of sexual medicine*, 4(3), 680-689. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2007.00495.x>
- Aoun, F., Alkassis, M., Tayeh, G. A., Chebel, J. A., Semaan, A., Sarkis, J., Mansour, R., Mjaess, G., Albisinni, S., Absil, F., Bollens, R., & Roumeguère, T. (2021). Sexual dysfunction due to pudendal neuralgia: a systematic review. *Translational andrology and urology*, 10(6), 2500-2511. <https://doi.org/10.21037/tau-21-13>
- Jackowich, R. A., & Pukall, C. F. (2020). Prevalence of Persistent Genital Arousal Disorder in 2 North American Samples. *The journal of sexual medicine*, 17(12), 2408-2416. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2020.09.004>
- Pukall, C. F., Jackowich, R., Mooney, K., & Chamberlain, S. M. (2019). Genital Sensations in Persistent Genital Arousal Disorder: A Case for an Overarching Nosology of Genitopelvic Dysesthesias?. *Sexual medicine reviews*, 7(1), 2-12. <https://doi.org/10.1016/j.sxm.2018.08.001>
- Kroenke, K., Spitzer, R. L., & Williams, J. B. (2001). The PHQ-9: validity of a brief depression severity measure. *Journal of general internal medicine*, 16(9), 606-613. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1497.2001.016009606.x>
- Spitzer, R. L., Kroenke, K., Williams, J. B., & Löwe, B. (2006). A brief measure for assessing generalized anxiety disorder: the GAD-7. *Archives of internal medicine*, 166(10), 1092-1097. <https://doi.org/10.1001/archinte.166.10.1092>

- [7] Hawker, G. A., Mian, S., Kendzerska, T., & French, M. (2011). Measures of adult pain: Visual Analog Scale for Pain (VAS Pain), Numeric Rating Scale for Pain (NRS Pain), McGill Pain Questionnaire (MPQ), Short-Form McGill Pain Questionnaire (SF-MPQ), Chronic Pain Grade Scale (CPGS), Short Form-36 Bodily Pain Scale (SF-36 BPS), and Measure of Intermittent and Constant Osteoarthritis Pain (ICOAP). *Arthritis care & research*, 63 Suppl 11, S240-S252. <https://doi.org/10.1002/acr.20543>
- [8] Martín-Vivar, M., Villena-Moya, A., Mestre-Bach, G., Hurtado-Murillo, F., & Chiclana-Actis, C. (2022). Treatments for Persistent Genital Arousal Disorder in Women: A Scoping Review. *The journal of sexual medicine*, 19(6), 961-974. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2022.03.220>
- [9] Goldstein, I., Komisaruk, B. R., Pukall, C. F., Kim, N. N., Goldstein, A. T., Goldstein, S. W., Hartzell-Cushmanick, R., Kellogg-Spadt, S., Kim, C. W., Jackowich, R. A., Parish, S. J., Patterson, A., Peters, K. M., & Pfau, J. G. (2021). International Society for the Study of Women's Sexual Health (ISSWSH) Review of Epidemiology and Pathophysiology, and a Consensus Nomenclature and Process of Care for the Management of Persistent Genital Arousal Disorder/Genito-Pelvic Dysesthesia (PGAD/GPD). *The journal of sexual medicine*, 18(4), 665-697. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2021.01.172>
- [10] Imgart, H., Zanko, A., Lorek, S., Schlichterle, P. S., & Zeiler, M. (2022). Exploring the link between eating disorders and persistent genital arousal disorder/genito-pelvic dysesthesia: first description and a systematic review of the literature. *Journal of eating disorders*, 10(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s40337-022-00687-7>
- [11] Martín-Vivar, M., Villena-Moya, A., Mestre-Bach, G., Hurtado-Murillo, F., & Chiclana-Actis, C. (2022). Treatments for Persistent Genital Arousal Disorder in Women: A Scoping Review. *The journal of sexual medicine*, 19(6), 961-974. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2022.03.220>
- [12] Mooney, K. M., Poirier, É., & Pukall, C. F. (2022). Persistent Genital Arousal in Relationships: A Comparison of Relationship, Sexual, and Psychological Well-Being. *The journal of sexual medicine*, 19(2), 234-248. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2021.10.009>
- [13] Pease, E. R., Ziegelmann, M., Vencill, J. A., Kok, S. N., Collins, C. S., & Betcher, H. K. (2022). Persistent Genital Arousal Disorder (PGAD): A Clinical Review and Case Series in Support of Multidisciplinary Management. *Sexual medicine reviews*, 10(1), 53-70. <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2021.05.001>
- [14] Jackowich, R. A., Poirier, É., & Pukall, C. F. (2020). A Comparison of Medical Comorbidities, Psychosocial, and Sexual Well-being in an Online Cross-Sectional Sample of Women Experiencing Persistent Genital Arousal Symptoms and a Control Group. *The journal of sexual medicine*, 17(1), 69-82. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2019.09.016>
- [15] Padoa, A., McLean, L., Morin, M., & Vandyken, C. (2021). "The Overactive Pelvic Floor (OPF) and Sexual Dysfunction" Part 1: Pathophysiology of OPF and Its Impact on the Sexual Response. *Sexual medicine reviews*, 9(1), 64-75. <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2020.02.002>
- [16] Padoa, A., McLean, L., Morin, M., & Vandyken, C. (2021). The Overactive Pelvic Floor (OPF) and Sexual Dysfunction. Part 2: Evaluation and Treatment of Sexual Dysfunction in OPF Patients. *Sexual medicine reviews*, 9(1), 76-92. <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2020.04.002>
- [17] Zoorob, D., Deis, A. S., & Lindsay, K. (2019). Refractory Sexual Arousal Subsequent to Sacral Neuromodulation. *Case reports in obstetrics and gynecology*, 2019, 7519164. <https://doi.org/10.1155/2019/7519164>
- [18] Kim, C., Blevins, J., Hanley, J., Goldstein, S., Komisaruk, B., & Goldstein, I. (2019). 019 Neurogenic Persistent Genital Arousal Disorder (PGAD) Secondary to Radiculopathy of Sacral Spinal Nerve Roots (SSNR): Treatment Outcome Following Spine Surgery. *The Journal of Sexual Medicine*, 16(6), S9. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2019.03.476>