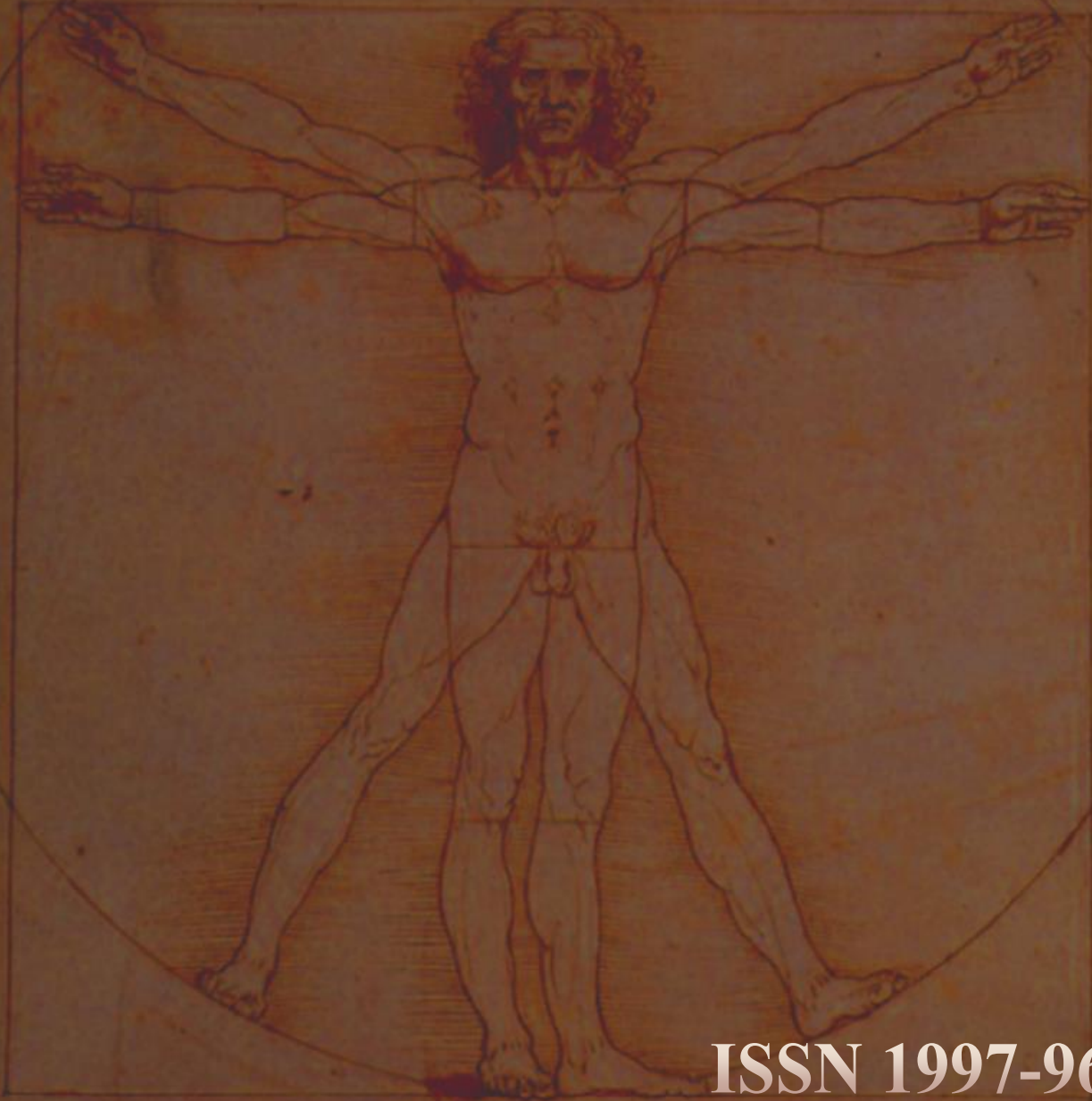


MORPHOLOGIA



ISSN 1997-9665

2023 • Том 17 • Номер 1

2023 • Volume 17 • Number 1

MORPHOLOGIA

2023 • Том 17 • Номер 1

Науковий фаховий електронний журнал Всеукраїнської громадської організації
«Наукове товариство анатомів, гістологів, ембріологів і топографоанатомів України»

Періодичність видання 4 рази на рік

Засновники:

ВГО «Наукове товариство анатомів, гістологів, ембріологів і топографоанатомів України»
Дніпровський державний медичний університет

Індексація журналу:

«NLM Catalog US National Library of Medicine» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>)

«Medical Journals Links» (<http://www.medical-journals-links.com>)

«CiteFactor Academic Scientific Journals» (<http://www.citefactor.org>)

«Google Scholar» (<https://scholar.google.com>)

«Directory of Open Access Journals» (<http://doaj.org>)

Національна бібліотека України імені В.І. Вернадського (<http://www.nbuv.gov.ua>)

Атестований як періодичне електронне наукове видання в галузі медичних наук і включений до **Переліку наукових фахових видань України (категорія «Б»)**, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора наук, кандидата наук та ступеня доктора філософії (Наказ Міністерства освіти і науки України від 17.03.2020 р. № 409).

Свідоцтво про державну реєстрацію № 26 від 25.04.2014 р.

Головний редактор

Твердохліб І.В.

Редакційна колегія

Аппельханс О.Л., Бондаренко І.М., Бондаренко О.О., Жан Зі, Інджикулян А.А., Ковальчук О.І., Луговський С.П., Луцик О.Д., Маєвський О.Є., Медведєв М.В., Мельник Н.О., Мішалов В.Д., Погорєлов М.В., Сулаєва О.М., Туманський В.О., Шпонька В.І., Шпонька І.С.

Оглядові, проблемні й оригінальні статті рецензуються. Журнал публікує наукові роботи морфологів, а також результати морфологічних досліджень фахівців інших спеціальностей.

Видається і рекомендується для вільного поширення мережею Internet згідно з рішенням вченої ради Дніпровського державного медичного університету (протокол № 12 від 20 квітня 2023 року).

Підписано до друку 20.04.2023 р. Умовн. друк. арк. 8.

Адреса редакції: 49005, м. Дніпро, вул. Севастопольська, 19, редакція журналу „Morphologia”.
Тел.: +380974584284. E-mail: morphology.ivt@gmail.com

MORPHOLOGIA

2023 • Volume 17 • Number 1

Scientific specialized electronic journal of the Ukrainian public organization
“Ukrainian scientific Society of Anatomists, Histologists, Embryologists”

Periodicity quarterly

Founders:

Ukrainian scientific Society of Anatomists, Histologists, Embryologists
Dnipro State Medical University

Indexed by:

«NLM Catalog US National Library of Medicine» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>)

«Medical Journals Links» (<http://www.medical-journals-links.com>)

«CiteFactor Academic Scientific Journals» (<http://www.citefactor.org>)

«Google Scholar» (<https://scholar.google.com>)

«Directory of Open Access Journals» (<http://doaj.org>)

Vernadsky National Library of Ukraine (<http://www.nbuv.gov.ua>)

Certificated and included in the List of scientific specialized editions in which the main results of scientific works may be published (Order of Ministry of Education and Science of Ukraine № 409 Mar 17, 2020).

Certificate of state registration № 26 Apr 25, 2014.

Editor-in-chief

Tverdokhlib I.V.

Editorial board

Appelhans O.L. (Odessa), Bondarenko I.M. (Dnipro), Bondarenko O.O. (Dnipro), Indzhukulian A.A. (Boston), Kovalchuk O.I. (Kyiv), Lugovskiy S.P. (Kyiv), Lutsyk O.D. (Lviv), Maievskiy O.Ye (Kyiv), Medvediev M.V. (Dnipro), Melnyk N.O. (Kyiv), Mishalov V.D. (Kyiv), Pogorielov M.V. (Sumy), Shponka I.S. (Dnipro), Shponka V.I. (Milwaukee), Sulaieva O.M. (Kyiv), Tumanskiy V.O. (Zaporizhzhia), Zhang Ze (Quebec City).

Reviews, critical and research articles are reviewed. Journal publishes scientific works of morphologists and also morphological works of specialists in other fields.

Published and recommended for distribution via the Internet according to the decision of the Academic Council of Dnipro State Medical University (protocol № 12 Apr 20, 2023).

Signed for publishing on Apr 20, 2023. Conventional printed pages 8.

Address: editorial office of journal “Morphologia”, 19 Sevastopolska Str., Dnipro, Ukraine, 49005.

Tel.: +380974584284. E-mail: morphology.ivt@gmail.com

ЗМІСТ

Оглядів та проблемні статті

Пастухова В.А., Кучеренко О.В.

Характер травматичного ушкодження шкіри, етапи її регенерації та особливості при мінно-вибуховій травмі

Оригінальні дослідження

Гарапко Т.В., Кочмарь М.Ю., Попович Ф.А., Росола Т.Ф., Форос А.І., Яцко С.І., Завадська М.Б.

Зміни структури лімфатичних вузлів при дії глутамату натрію та корекції

Ліскіна І.В., Загаба Л.М.

Можливості імуногістохімічного дослідження в практичній діагностиці одиночних злоякісних вогнищевих уражень легень

Пальтов Є.В.

Динаміка зміни показників оксидативного стресу на ранніх та пізніх термінах корекції експериментального опіоїдного впливу

Согомонян Є.А., Челпанова І.В., Панкевич Л.В., Амбарова Н.О.

Порівняльний аналіз експериментальних форм гіпо- та гіпертироїдних станів

Хасхачих Д.А., Потапов В. О., Пославська О.В.

Фактори резистентності до терапії прогестинами при гіперплазії ендометрія у жінок

Челпанова І.В.

Перебудови кістки нижньої щелепи після трансплантації октакальційфосфату та хітозану: гістологічні, імуногістохімічні та ультраструктурні аспекти

Юзич О.В., Дудок О.В., Твердохліб І.В., Фік В.Б.

Стромально-клітинні аспекти репаративної регенерації рогівки при травматичних ушкодженнях очного яблука

Методологія наукових досліджень

Кобеза П.А.

Гіпоксія в кардіогенезі щурів

Черкас О.А., Кобеза П.А., Марченко Д.Г.

Основні принципи будови та організації сполучної тканини

До відома авторів

CONTENTS

Reviews and topical articles

Pastukhova V.A., Kucherenko O.V.

Nature of traumatic damage to the skin, stages of its regeneration and features in mine blast injury

Research, original papers

Harapko T.V., Kochmar M.Yu., Popovych F.A., Rosola T.F., Foros A.I., Yatsko S.I., Zavadska M.B.

Changes in the structure of lymphatic nodes under the effect of monosodium glutamat and correction

Liskina I.V., Zagaba L.M.

Capabilities of immunohistochemistry in the diagnostics of malignant solitary pulmonary nodules in practice

Paltov Ye.V.

Dynamics of changes in indicators of oxidative stress in the early and late terms of correction of experimental opioid exposure

Sogomonyan Ye.A., Chelpanova I.V., Pankevych L.V., Ambarova N.A.

Comparative analysis of experimental forms of hypo- and hyperthyroid conditions

Khaskhachikh D.A., Potapov V.O., Poslavska O.V.

Factors of resistance to progestin therapy in endometrial hyperplasia in women

Chelpanova I.V.

Mandibular bone restructuring after octacalcium phosphate and chitosan transplantation: histological, immunohistochemical and ultrastructural aspects

Yuzuch O.V., Dudok O.V., Tverdokhlib I.V., Fik V.B.

Stromal-cellular aspects of corneal reparative regeneration in traumatic ocular globe injuries

Scientific research methodology

Kobeza P.A.

Hypoxia in cardiogenesis of rats

Cherkas O.A., Kobeza P.A., Marchenko D.G.

Basic principles of the structure and organization of connective tissue

Author guidelines

В.А. Пастухова
О.В. Кучеренко

Національний університет фізичного виховання і спорту України, Київ, Україна.

Надійшла: 24.01.2023

Прийнята: 15.03.2023

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.5-18>

УДК 614.8:355.337.1

ХАРАКТЕР ТРАВМАТИЧНОГО УШКОДЖЕННЯ ШКІРИ, ЕТАПИ ЇЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ ТА ОСОБЛИВОСТІ ПРИ МІННО-ВИБУХОВІЙ ТРАВМІ

Pastukhova V.A. , Kucherenko O.V. Nature of traumatic damage to the skin, stages of its regeneration and features in mine blast injury.

National University of Ukraine on Physical Education and Sport, Kyiv, Ukraine.

ABSTRACT. Mine blast trauma causes combined damage to many structures of the body and is often accompanied by direct damage to the integrity of the skin. When traumatizing soft tissues of a closed nature, a skin bruise occurs in combination with damage to many internal organs. In an emergency situation of an explosion, the main attention during the rescue of injured servicemen or civilians is directed to ensuring their survival and maintaining the vital functions of the body. At the same time, the vast majority of skin injuries are subject to the delayed attention of medical professionals. In those cases, when the general cover does not undergo direct burns or other life-threatening wound injuries, structural and functional disorders of various components of the skin may generally remain without adequate correction for a long time. Under these circumstances, it should be remembered that the skin is the largest organ of the body and performs a number of important systemic functions, the damage of which critically affects the condition of the victim after mine blast injury, including the long rehabilitation period. Today, information about the nature of structural and functional skin changes in victims of mine blast injury remains extremely limited, which does not allow adequate measures to be taken to correct them. Determining the prominent tissue and cellular rearrangements of the skin structure depending on the nature of the mine blast damage, its intensity, the age factor and gender of the victim, accompanying disorders is an urgent need today and an serious medical problem.

Key words: mine blast injury, skin, burn, wound, bruise, morphology, regeneration.

Citation:

Pastukhova VA, Kucherenko OV. [Nature of traumatic damage to the skin, stages of its regeneration and features in mine blast injury]. Morphologia. 2023;17(1):5-18. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.5-18>

 Pastukhova V.A. 0000-0002-4091-913X

 pastuhova_v@ukr.net

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Мінно-вибухова травма (МВТ) – єдиний вид травми, внаслідок якої одночасно протягом короткого проміжку часу (імпульсно) на постраждалого можуть впливати різні фактори вибуху (механічні, термічні, хімічні та інші). Ураження ударною хвилею та вибуховими речовинами з високим вивільненням енергії, коли тверда речовина або рідина швидко перетворюються на газ, можуть реалізовуватися трьома шляхами: 1) швидким горінням, але мінімальним вибухом; 2) значним вибухом; 3) детонацією [1-3]. У сучасних бойових вибухових речовинах хвиля прохо-

дить через матеріал із надзвичайною швидкістю та викликає надзвуковий вибух. У більшості випадків МВТ викликає комбіноване uszkodження багатьох структур організму і супроводжується прямим uszkodженням цілісності шкіри [2, 4, 5].

Внаслідок МВТ фізичне uszkodження включає переломи, порушення дихання, пошкодження м'яких тканин та внутрішніх органів, внутрішній та зовнішній крововилив з шоком, опіками та порушеннями чутливості, особливо слуху та зору. Описано п'ять механізмів травми від вибухової хвилі. При первинному травмуванні надзву-

кова вибухова хвиля стискає заповнені газом порожнини, які потім швидко розширюються, викликаючи зміщення та розриви, які можуть пошкодити тканини та перфорувати органи. Кров виштовхується з судинної сітки в наповнені повітрям порожнини та навколишні тканини. Ураження легень вибуховою хвилею може викликати контузію легенів, системну повітряну емболію (особливо в головному та спинному мозку) та пошкодження мікроциркуляції (тромбоз, ліпо-оксигенацію та дисеміноване внутрішньосудинне згортання); це найпоширеніша причина сповільненої смертності. Первинне ушкодження вибуховою хвилею також включає в себе баротравму в кишечнику (особливо при підводних вибухах), акустичну баротравму та травму головного мозку. Існує занепокоєння, що багато випадків ураження вибуховою хвилею нижчого рівня можуть мати сукупний шкідливий нейрокогнітивний ефект і призводити до хронічної травматичної енцефалопатії [2, 6, 7].

Вторинний механізм передбачає ушкодження тіла твердими частинками від вибуху, що викликає проникаючі або тупі травми різних ділянок тіла. До третинних механізмів належать різні ушкодження організму частками, які викидаються вибуховою хвилею у навколишнє середовище, або прямі пошкодження осколками. При четвертинному механізмі процеси не залежать від первинного, вторинного або третинного ушкодження вибуховою хвилею (наприклад, опіки, токсична інгаляція, защемлення під завалами, різке погіршення попередніх життєво небезпечних розладів). Внаслідок цього розвиваються гострий некроз скелетних м'язів із синдромом тривалого здавлювання в певній анатомічній області, травма дихальних шляхів при вдиханні токсичних речовин, приступ бронхіальної астми, стенокардія або інфаркт міокарда. Механізми п'ятого типу розглядаються як результат дії токсичних матеріалів, які потрапляють в організм внаслідок вибуху, на імунну та вегетативну нервову систему, що призводить до негайного гіперзапального стану з розвитком лихоманки, набряку, діафорезу, низького центрального венозного тиску [5, 8].

Механічні фактори в ізолюваному вигляді зумовлюють найпоширеніший вид травми – забій, тобто травмування м'яких тканин закритого характеру, яке іноді може охоплювати тільки шкірні покриви, але здебільшого спостерігається ураження багатьох внутрішніх органів і структур [2, 5-8].

Отже, ушкодження шкіри при МВТ можуть утворюватися за декількома механізмами водночас і реалізовуватися у різних клінічних формах зі складним характером подальшого відновлення.

Вивчення механізмів загоєння опікових ушкоджень привертає увагу вчених різних країн, проте залишаються відкритими питання, що сто-

суються комплексного вивчення морфофункціональних змін у ділянці травми, особливостей перебігу запального процесу та його впливу на функціональний стан імунної системи, змін мікробіологічної картини опікової поверхні в динаміці розвитку ранового загоєння у віковому аспекті [9-11].

Сучасні принципи лікування термічних ушкоджень базуються на комплексному впливі на основні етапи регенераторного процесу в ділянці опікового ураження [12-14]. Однак більшість існуючих на сьогодні заходів односпрямовано діють на певні ланки регенераторного процесу, викликають алергічні реакції та пригнічують ріст грануляційної тканини, не чинять антиоксидантної та імуностимулювальної дій, що негативно впливає на перебіг ранозагоєвального процесу, а широке використання лікарських препаратів з антибактеріальними властивостями сприяє виникненню полірезистентних штамів патогенних мікроорганізмів [15].

Останніми десятиріччями в практику впроваджені нові перев'язувальні матеріали, засоби та покриття як природного, так і синтетичного походження [16, 17]. Зросла кількість досліджень щодо використання хітозану, який є похідним природного полімеру хітину, для створення засобів медичного призначення щодо лікування ушкоджень шкіри [18, 19]. При його використанні необхідно відзначити такі позитивні моменти, як біосумісність, здатність до біодеградації з утворенням нешкідливих мономерів [20], відсутність місцевої подразнювальної, алергенної та токсичної дій, атравматичність [21, 22]. Хітозанові плівки добре моделюються на різних ділянках тіла, забезпечують нормальний парообмін у рані, сорбують надлишок ексудату [23], виявляють пролонговану антимікробну та знеболювальну дію [24], створюють вологе середовище, оптимальне для міграції фібробластів і макрофагів, що продукують фактори росту, сприяючи тим самим прискоренню ангиогенезу, фібринолізу та процесу ранового загоєння, а також запобігають утворенню рубців [25]. Багатьма дослідниками вивчався як стимулювальний вплив мембран на основі хітозану на процес регенерації *in vivo*, так і здатність хітозанових матеріалів обумовлювати проліферацію та життєздатність клітин *in vitro* [26].

Висока частота термічних уражень при МВТ, тривалий перебіг опікової травми, великий відсоток ускладнень і наявність критичних патологічних станів потребують значної уваги до ефективної корекції ушкоджень шкіри та своєчасної стимуляції репаративної регенерації ран. Постійне оновлення епідермісу забезпечує захисну функцію шкіри завдяки відторгненню з поверхні шкіри рогових лусочок відбувається її очищення від зовнішнього забруднення та мікроорганізмів [27]. Із віком клітини шкіри втра-

чають здатність швидко оновлюватися, і регенерація уповільнюється. Якщо у новонароджених клітини шкіри оновлюються кожні 72 години, то у осіб від 16 до 35 років цей процес відбувається лише раз на 28–30 днів.

Бактерицидну властивість шкіри, що надає їй здатності протистояти мікробній інвазії, обумовлено кислотою реакцією кератину, своєрідним хімічним складом шкірного сала і поту, наявністю на її поверхні захисної водно-ліпідної мантії з високою концентрацією водневих іонів (рН 3,5–6,7). Низькомолекулярні жирні кислоти шкіри, насамперед глікофосфоліпіди і вільні жирні кислоти, мають бактеріостатичний ефект, селективний для патогенних мікроорганізмів. Природна стійкість до інфекції травмованої шкіри в основному залежить від природжених факторів імунної системи, яка реагує негайно після ушкодження, стимулюючи локальні й системні запальні реакції [28].

Порушення цілісності епідермісу і дерми, що виникає на певній ділянці шкіри, відновлюється завдяки процесам репаративної регенерації, які являють собою природну захисну реакцію, що проходить з метою видалення змертвілих тканин та подальшої заміни їх новоутвореними клітинами, забезпечуючи в кінцевому підсумку закриття дефекту [29]. Регенерація вміщує один або обидва з двох процесів: коли запасні клітини виникають із недиференційованих камбіальних клітин базального шару епідермісу та процесу, при якому нові клітини виникають на основі життєздатного епітелію придатків шкіри (перидерміс клітин волосяних фолікулів) шляхом клітинного диференціювання та/або міграції [30].

Ступінь пошкодження клітин унаслідок термічного ушкодження шкіри змінюється залежно від температури й тривалості експозиції [31]. У міру зростання температури відбуваються зміни молекулярних структур і порушення міжмолекулярних зв'язків, що призводить до дисфункції клітинних мембран у вигляді руйнування іонних каналів, у результаті чого порушується споживання натрію і води. Внаслідок подальшого збільшення температури відбувається денатурація білка, звільняються кисневі радикали і в кінцевому підсумку клітини гинуть з утворенням опікового струпа [31].

Порушення структури шкіри є основною ознакою термічного ушкодження. Морфологічні зміни в опіковій рані включають: I – зону коагуляції, що вміщує змертвілі тканини, які формують опіковий струп, локалізований у центрі рани біля зони дії джерела тепла; II – зону застою, що містить тканини, прилеглі до ділянки опікового некрозу, які все ще є життєздатними, але з ризиком ішемічних ушкоджень через зниження перфузії; III – зону гіперемії з нормальною шкірою та мінімальними клітинними ушкодженнями, що має переважно судинні порушення у вигляді ва-

зодилатації та підвищення перфузії у відповідь на травму [31].

Вивченню біохімічних, морфологічних і фізіологічних аспектів проблеми репаративної регенерації шкіри присвячена дуже велика кількість експериментальних і клінічних досліджень. Ці дані частково узагальнені в ряді монографій та оглядів [32, 33]. Загоюються рани різних ділянок та органів за загальними закономірностями, але морфологічна їх характеристика варіює залежно від характеру пошкодження, розмірів дефекту, наявності інфекції і т. д. Рановий процес – складний комплекс біологічних реакцій організму у відповідь на пошкодження тканин і спрямованих на їх загоєння. Виділяють три фази перебігу ранового процесу: 1) фазу запалення, в якій виділяють періоди судинних реакцій та очищення ран від змертвілих тканин; 2) фазу регенерації, впродовж якої відбувається утворення й дозрівання сполучної тканини; 3) фазу реорганізації рубця та епітелізації [34]. Терміни проходження кожної фази визначити заздалегідь практично неможливо. Стабільною залишається послідовність зміни цих фаз, кожна з яких характеризується певними функціональними й морфологічними змінами, що відбуваються в рані та оточуючих тканинах [35].

Класичну модель загоєння ран поділяють на послідовні етапи: 1) фазу гемостазу (не виділяється деякими авторами); 2) запальну; 3) проліферативну і 4) фазу ремоделювання. Виділення окремих фаз і стадій запального процесу має умовний характер, тому що неможливо провести чітку межу між закінченням однієї стадії та початком іншої. Патогенез ранового процесу відображає фазність його перебігу, нерозривність окремих фаз і перехід однієї фази в іншу. У процесі загоєння опіків також чітко проявляється єдність запалення, регенерації та фіброзу, які є нерозривними компонентами цілісної тканинної реакції на пошкодження [36, 37].

Приблизний час різних фаз загоєння ран відрізняється залежно від розміру рани та умов загоєння. Травма тканини ініціює клітинну та судинну відповідь, в результаті чого рана звільняється від девіталізованих тканин, чужорідного матеріалу, таким чином готуючи плацдарм для загоєння та регенерації. Ранове запалення, що виникає безпосередньо після поранення, складається із судинної реакції у вигляді регіонарної вазодилатації та зростання капілярної проникності, а також міграції лейкоцитів у відповідь на специфічні хемотаксичні чинники, які генеруються в рані. Збільшення судинної проникності в зоні травми є основою для надходження різних клітинних популяцій, включаючи поліморфноядерні лейкоцити і мононуклеарні лейкоцити, які дозрівають у ранові макрофаги, а також лімфоцити [38]. Передбачається, що роль нейтрофілних гранулоцитів у перші 3 години після пора-

нення визначає перебіг раннього періоду колонізації рани бактеріями і подальшого розвитку інфекції. Активовані нейтрофіли виділяють вільні кисневі радикали і лізосомні ензими, включаючи нейтральні протеази, колагенази та еластази, які допомагають у боротьбі з інфекцією та очищенні рани [39]. У подальшому все в більшій кількості в рані починають з'являтися лімфоцити. Хоча їх роль у репаративному процесі до кінця не вивчена, вважається, що лімфоцити допомагають процесу ранового загоєння, секретуючи цитокіни, які є мітогенами і хемоатрактантами для фібробластів, й одночасно сприяючи очищенню рани від старих нейтрофілів [40].

Нейтрофільні гранулоцити мають відносно короткий період життя в гострій рані та заміщуються рановими макрофагами, що диференціюються з циркулюючих моноцитів [41]. У деяких дослідженнях висловлюється припущення, що нормальне ранове загоєння може відбуватися і за відсутності поліморфоядерних лейкоцитів, однак моноцити повинні бути представлені обов'язково [42].

Макрофаги – домінуючий тип клітин у популяції ранових лейкоцитів, вони відіграють центральну регуляторну роль у хемотаксисі фібробластів, проліферації та подальшому колагеновому синтезі. Похідні з макрофагів фактори росту, такі як PDGF (platelet-derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor beta), інтерлейкіни і фактор некрозу пухлин, мають велике значення в міграції та активації ранових фібробластів [43]. Ранній матрикс значною мірою складається з фібронектину і гіалуронатів, будучи плацдармом, на який фібробласти можуть мігрувати і фіксуватися. Джерело цих фібробластів – похідні з фіброцитів регіонарної сполучної тканини і периваскулярного адвентицію. Фібробласти продукують різноманітні субстанції, необхідні для ранового загоєння, зокрема глікозаміноглікани і колаген. Упродовж перших 2-3 діб після поранення активність фібробластів сприяє клітинній реплікації та міграції і меншою мірою – колагеновому синтезу. Через три доби після поранення зростаючі маси фібробластів починають синтезувати й продукувати значну кількість екстрацелюлярного колагену. Синтез колагену починається як внутрішньоклітинний процес, у результаті якого спочатку виробляється мономер, що активно секретується в екстрацелюлярне ранове середовище, де відбувається полімеризація в колагенові фібрили. У них потім ковалентно формуються поперечні зв'язки, внаслідок чого значно зростає міцність рани. Сигналом, що активізує продукцію колагену, є комбінація чинників зростання, стимульованих гіпоксією й продуктами анаеробного метаболізму, такими як молочна кислота [44].

На 1-му тижні після поранення активність синтезу колагену досягає максимуму, і незрілі

колагенові фібрили стають гістологічно видимими в рані. Колагенові волокна, утворені з тропоколагену, організовані у чітко визначеній послідовності. Ці колагенові волокна, у свою чергу, комбінують колагенові фібрили, що об'єднуються і формують колагенові пучки. Вміст колагену в рані регулюється балансом між продукцією і лізисом колагену за допомогою колагенази [45]. З кінця 1-го тижня після поранення починається ранова контракція. У цей час частина ранових фібробластів трансформуються в міофібробласти, що містять α -гладком'язовий актин (нормальний фібробласт містить β - і γ -актин). Оскільки міофібробласти фіксуються між собою і до країв рани, грануляційна тканина, яка прилягає, скорочується, стягуючи край рани. Одночасно синтезується колаген та утворюються поперечні зв'язки між волокнами, формуючи ригідне ранове ложе [46].

Особливим видом тканини, що утворюється в рані, є грануляційна тканина, яка складається з численних капілярів і підтримувального матриксу, багатого на фібробласти, запальні клітини, ендотеліальні клітини, перицити і міофібробласти. Із прогресуванням ранового загоєння грануляційна тканина перетворюється з високоваскуляризованої, багатої на клітинні елементи тканини на відносно аваскулярний і безклітинний матрикс колагену. Передбачається, що апоптоз – це механізм, за допомогою якого клітини, наявні в грануляційній тканині, видаляються з рани [47].

Через 3 тижні після опікової травми встановлюється рівновага між синтезом колагену та його лізисом, після чого починається ремоделювання тканин у рубці, що формується. Збільшення вмісту колагену в рані у фазі фіброплазії корелює із збільшенням міцності рани. Ангіогенез супроводжує фазу фіброплазії і є дуже важливим для процесу формування рубця, оскільки зростання нових капілярів повинно супроводжувати просування фібробластів у рану та забезпечувати їх метаболічні потреби [48, 49]. Якщо ангіогенез незадовільний, міграція фібробластів і ранове загоєння припиняються. Деякі біохімічні стимули ангіогенезу виходять від макрофагів і тромбоцитів. Ендотелій зростаючих капілярів продукує деградуючі агенти активаторів плазміногена і колагенази і, таким чином, наводнює рану ензимами деградації фібринового згортка. Цей процес триває близько 2 років, і хоча при цьому не спостерігається зростання кількості колагену, відбувається формування колагенових фібрил у більш організовані структури під впливом локальних механічних факторів. Упродовж цієї фази рубцева тканина продовжує нарощувати міцність. Тривалість фази дозрівання залежить від різних факторів, які вміщують генетичні особливості пацієнта, вік, локалізацію рани на тілі, тип травми і тривалість запального процесу [50].

Апоптоз ранових фібробластів спостерігається після того, як припиняється ранова контра-

кція. Хоча контракція має велике значення в зменшенні розмірів рани, цей процес характеризується безладним характером і може призвести до дезорганізації структурної інтеграції, втрати функції та косметичного дефекту. Після загоєння рани все більша кількість клітин виявляється на різних стадіях апоптозу. Порушення цього процесу призводить до утворення хронічної рани з великою кількістю клітинних елементів і формуванням вираженої рубцевої тканини. Подібне часто спостерігається в опікових ранах, що залишаються відкритими більше ніж три тижні, коли формується рубцева контрактура або гіпертрофічний рубець [51].

Епітелізація поверхні рани є критерієм успішного загоєння рани і складається з низки послідовних подій, що передбачають мобілізацію, міграцію, мітоз і клітинне диференціювання епітеліальних клітин [52]. Епітеліальні клітини, що безпосередньо прилягають до рани, стимулюються до початку міграції після усунення контактної інгібіції. В результаті цього їх зростання відбуваються в напрямку від прилеглих інтактних епітеліальних клітин. Епітеліальні клітини переднього краю, що просувається, починають збільшувати швидкість мітозів і продовжують покривати поверхню рани до зустрічі з епітеліальними клітинами протилежного краю рани. Із цього моменту подальша клітинна міграція припиняється завдяки феномену контактної інгібіції [53].

Кінцевий результат неускладненого процесу ранового загоєння – це нижній рубець із невеликим фіброзом, мінімальним за наявності ранової контракції, і повернення практично до нормальної структури тканини та функції органа [54, 55]. До цього часу встановлено два види розладів загоєння ран: 1) гальмування процесу ранового загоєння; 2) надмірна репарація, що характеризується утворенням гіпертрофічного рубця та келоїду [56, 57]. Найчастіше виявляються розлади ранового загоєння, які стосуються фази запалення, а саме функціональної неспроможності клітинного пулу, що забезпечує нормальний перебіг фази запалення [58]. Гіпертрофічне рубцювання й келоїдоутворення характеризуються надмірним відкладенням колагену, або вираженою продукцією колагену, протеогліканів і фібронектину, а також порушенням процесу деградації колагенового та структурного матриксу [59, 60]. Встановлено, що у всіх гіпертрофічних рубцях містяться фокуси запалення і васкуляризації. Колаген відкладається навколо цих вогнищ у вигляді спіралей і вузлів. Ступінь гіпертрофічного рубцювання залежить від тривалості часу, впродовж якого в рані зберігається фаза запалення [61]. Гладкі клітини, наявні в надмірній кількості в гіпертрофічних рубцях, також роблять внесок у процес рубцювання, ініціюючи надмірне утворення колагену внаслідок секреції гістаміну, який сприяє ва-

зодилатації та надходженню протеїнів плазми в екстрацелюлярний простір. Фібробласти гіпертрофічних рубців містять колагенази, чкф мають знижену експресію, що призводить до зменшення деградації колагену і ремоделювання рубцевої тканини [62, 63].

Коагуляційний некроз епідермісу, різних шарів дерми та оточуючих тканин, що виникає внаслідок термічного ушкодження, приводить до масивної мікробної інвазії, а ексудат опікової рани є ідеальним середовищем для розвитку мікроорганізмів [64]. Довготривале існування інфекції призводить до затримки процесу загоєння опікових ран і сприяє надмірному рубцюванню внаслідок хронічної стимуляції запальних клітин [65]. Інгібування процесу загоєння за високого вмісту бактерій у рані відбувається внаслідок дії протеаз, що секретуються мікроорганізмами. Також це може бути і внаслідок факторів вірулентності, що виділяються специфічними видами мікробів, які теж можуть блокувати ранове загоєння [66, 67].

Частота ранової інфекції у пацієнтів з опіками корелює з глибиною, площею опікової рани іта обумовлена, головним чином, пошкодженням бар'єрної й захисної функцій шкірних покривів і системною імунною супресією [68]. Хоча поверхня опікової рани є стерильною відразу після теплового ушкодження, мікроорганізми швидко її колонізують [69]. Колонізація відбувається ендогенними мікроорганізмами шкіри або в результаті контакту із забрудненим навколишнім середовищем, як правило, упродовж 48 годин після виникнення ушкодження [70]. Ендогенні грамнегативні бактерії з флори шлунково-кишкового та респіраторного трактів пацієнта також здатні швидко колонізувати поверхню опікової рани в перші кілька днів після травми. Колонізація рани дріжджами і грибами зазвичай відбувається пізніше за рахунок використання широкого спектра антибактеріальної терапії. Недостатня перфузія рани обмежує міграцію імунних клітин і доставку антимікробних агентів у ділянку ушкодження, обмежуючи тим самим ефективність системного лікування. Локальне застосування антибіотика може бути недостатнім, вимагає частішої зміни пов'язки і може призвести до бактеріальної резистентності [71]. Однак виділений із рани мікроб може виявитися не збудником інфекції, а представником мікрофлори, що колонізує рану, а це може привести до неадекватного призначення хворому антибактеріальних препаратів [72].

Морфологічні перебудови у рваних ранах починається відразу після ушкодження зі згортання крові та потраплянням у рану лейкоцитів. Нейтрофіли та макрофаги видаляють чужорідні речовини (у тому числі нежиттєздатні тканини) та бактерії. Макрофаги також стимулюють реплікацію фібробластів та неоваскуляризацію. Фіб-

робласти відкладають колаген: зазвичай накопичення починається через 48 годин і досягає максимуму приблизно через 7 днів. Накопичення колагену фактично завершується через 1 місяць, але міцність колагенових волокон зростає повільніше, у ході процесу поперечного зшивання волокон. Міцність рани на розрив на 3-му тижні складає лише приблизно 20 % від максимально можливої, на 4-му місяці — 60 %, і стає максимальною через 1 рік. При цьому слід пам'ятати, що міцність ніколи не буде еквівалентною непошкодженій тканині [2].

Невдовзі після ушкодження епітеліальні клітини з краю рани мігрують через рану. При хірургічній обробці рани (загоєння первинним натягом) вони утворюють ефективний захисний бар'єр для води та бактерій через 12–24 години та набувають схожості з нормальним епідермісом протягом 5 днів. У рані, яка не піддавалася обробці (тобто, загоюється вторинним натягом), строки епітелізації подовжуються пропорційно розміру дефекту [7].

На шкіру діють статичні сили, зумовлені її природною еластичністю й підлеглими м'язами. Оскільки рубцева тканина не така міцна, як прилегла непошкоджена шкіра, ці сили зазвичай розширюють рубці, що іноді призводить до косметично неприйняттого вигляду після явно адекватного закриття рани. Особливо імовірне розширення рубця, коли сили діють перпендикулярно до краю рани. Ця тенденція (та отримане в результаті навантаження на рану) найкраще помітна в свіжій рані — зяючі краї вказують перпендикулярний натяг, а відносно добре наближені краї вказують на сили, направлені паралельно.

Протягом приблизно 8 тижнів для рубців зазвичай характерний червоний колір та рельєфність. У процесі ремоделювання колагену шрам стає тоншим і втрачає свою еритему. Однак у деяких пацієнтів рубець гіпертрофується. Келоїди — це надлишкові рубці, які розростаються поза межі початкової рани.

Найбільш поширеними факторами, які перешкоджають загоєнню рани, є ішемія тканин, інфекція або й те й інше. Ішемія тканини підвищує сприйнятливості до розвитку інфекції. До обтяжливих факторів належать також розлади, які пригнічують імунну систему або погіршують метаболічні процеси (наприклад, хронічне захворювання нирок), недостатнє споживання білка, дефіцит специфічних поживних речовин, включаючи вітамін, розлади синтезу колагену, в тому числі при синдромі Марфана, синдромі Елерса-Данлоса [2, 6–8].

Однією з основних проблем лікування постраждалих від опіків є повнота відновлення шкірних покривів, утрачених у результаті термічної травми, від чого залежать характер перебігу та результат періоду реконвалесценції [73]. Своєчасне й патогенетично обгрунтоване лікування ві-

діграє значну роль у забезпеченні неускладненого перебігу опіків. Якщо у хворих із глибокими опіками основу місцевого лікування складають шкірно-пластичні операції, то лікування поверхневих і граничних опіків проводиться в основному з використанням консервативних методів [74, 75].

Ведення опіків проводять диференційовано залежно від глибини та локалізації ураження, стадії ранового процесу, віку постраждалого та від ряду інших факторів із послідовним використанням медикаментозних препаратів із різним механізмом дії. За сучасними уявленнями, визначальним принципом патогенетичної спрямованості лікувальних заходів є доведений факт спільності біологічних законів перебігу ранового процесу будь-якої етіології та локалізації. Згідно з цим рановий процес можна подати у вигляді таких фаз: запалення, регенерації та реорганізації рубця з епітелізацією [76]. Отже, нові досягнення в лікуванні опікових ран привели до диференційованого підходу щодо використання лікувальних засобів залежно від конкретної фази перебігу ранового процесу. Саме це, об'єктивно обгрунтоване, прагнення обумовлює створення нових препаратів, що поєднують у собі різні властивості, необхідні для лікування ран з урахуванням як глибини ураження, так і фази розвитку ранового процесу. Так, у на I стадії ранового процесу використання засобів медичного призначення повинно привести до пригнічення інфекції в рані, нормалізації місцевого гомеостазу (ліквідація гіперемії, ацидозу, надлишкового протеолізу) та активації відторгнення некротичних тканин, адсорбції токсичного ексудату рани, тобто продуктів мікробного і тканинного розпаду. На II і III стадіях препарати повинні запобігати вторинній контамінації з одночасним обмеженням зростання в ній «залишкової» мікрофлори, надавати протекторної дії щодо регенеруючих тканин від механічних пошкоджень, висушування і т. д. Обов'язковими на даних стадіях є активація обмінних процесів у тканинах та поліпшення регіонального кровотоку, а також забезпечення спрямованої стимуляції репаративних процесів у ранах [77, 78].

За останнє століття наше розуміння процесу загоєння ран зазнало значних змін. До середини 1900-х років існувало переконання, що рани загоюються швидше, якщо вони сухі й залишаються відкритими. Традиційні перев'язувальні матеріали, зокрема вата та марля, що використовувалися для поглинання виділень із рани, підтримували її сухість та запобігали вторгненню бактерій. У 1962 році G. D. Winter установив значення мікросередовища, що створюється пов'язкою, для ранового загоєння [79, 80]. У своїх дослідженнях він показав, що у вологому середовищі ранової поверхні спостерігається посилення міграції епітеліальних клітин, а також описав ідеа-

льну ранову пов'язку, яка забезпечує газообмін між рановою поверхнею та атмосферою. Таким чином, загоєння ран відбувається більш швидко й успішно, коли епітеліальні клітини можуть переміщатися без перешкоджень, якщо рана зберігається вологою, одержує адекватну циркуляцію кисню, щоб полегшити регенерацію клітин і тканин, а також залишається захищеною від бактеріальних інвазій, що було підтверджено іншими дослідниками [81]. Вологе середовище запобігає додатковій втраті тканинами вологи, сприяє активності літичних ферментів, що очищають рану від некротичних тканин на початку процесу загоєння. Міграція кератиноцитів полегшується у вологому середовищі, що забезпечує надійний епідермальний бар'єр. Оклюзія рани прискорює запальну та проліферативну фази ранового загоєння, що, ймовірно, пов'язано з модифікацією запального процесу, прискоренням ремоделювання колагену й контракції рани. Тонкий баланс кисню повинен підтримуватися для оптимального загоєння рани, хоча клітини потребують кисень для такої діяльності, як міграція і мітоз, гіпоксія насправді прискорює процес ангіогенезу. Крім того, епідермальна міграція клітин інгібується при високих рівнях кисню. Однак, необхідно відзначити, що формування рогового шару затримується під оклюзійними пов'язками як результат втрати трансепідермальної води. Доведено, що саме напівпроникні оклюзійні пов'язки здатні створити відповідне напруження кисню, щоб загоєння ран відбувалося швидко. Рідина з гострих шкірних ран містить багато ендогенних факторів, що мають вирішальне значення для процесу загоєння рани. Збереження цієї рідини у рані, утримання активних сполук на поверхні рани, а також випаровування надлишкової водяної пари приводять до пришвидшення загоєння ран унаслідок збільшення концентрацій місцевих факторів росту в рановому екссудаті та якості загоєння ран, утворення рубців є мінімальним завдяки сприянню міграції кератиноцитів [82].

Базуючись на сучасних поглядах оптимізації процесу ранового загоєння, можна виділити такі вимоги до ранових покриттів: створення оптимального мікросередовища для загоєння ран; високу абсорбційну спроможність щодо ранового екссудату; здатність запобігати проникненню мікроорганізмів; достатню проникність для газів (кисню, вуглекислоти) для забезпечення проходження репаративних процесів; проникність для парів води, але виключаючи висушування дна рани; еластичність, можливість моделювати поверхню зі складним рельєфом; відсутність пірогенної, антигенної й токсичної дій; відсутність місцевої подразнювальної та алергенної дій; наявність антимікробних властивостей і сприяння загоєнню ран [83]. Крім того, досить бажані такі характеристики, як прозорість, що обумовлює можливість спостереження за ранною; наявність

анестезуючої, гемостатичної дій та можливість бути носієм лікарських речовин; зручність застосування для медичного персоналу та хворого; технологічна доступність – вартість, складність конструкції й технології виробництва, стійкість до стерилізації [84].

Сьогодні з'явилася можливість створити покриття, що прилипають, але атравматичні, сорбуючі покриття на основі синтетичних (поліуретан, силіконовий каучук) і природних (альгінати, хітозан, желатин та колаген) полімерів [85]. Такі пов'язки не потрібно буде видаляти – полімер повністю розсмоктується з часом у результаті або повільного розчинення в екссудаті, або біодеструкції. В основі здатності покриттів до розсмоктування лежить їх водо- і плазморозчинність. Загальною властивістю перелічених матеріалів є їх гідрофільність. Причому вони надають не лише вираженого поглинального ефекту, а й фіксують мікроорганізми рани у своїй гелевій структурі, підтримують вологість і тим самим сприяють зростанню рануляцій. Завдяки пористості вони забезпечують необхідний для загоєння ран газо- та парообмін. Однак покриття цього типу не чинять прямої антимікробної дії і недостатньо механічно міцні [86].

Останніми десятиріччями зросла кількість досліджень щодо використання хітозану для створення різних засобів медичного призначення для лікування ушкоджень шкіри [87-90]. Активні аміногрупи молекули хітозану є місцями взаємодії з різним оточенням у м'яких реакційних умовах завдяки катіонним властивостям. Саме це дає можливість хітозану утворювати численні водневі зв'язки з органічними і неорганічними речовинами. Крім того, наявність аміногруп дозволяє змінювати хімічну модифікацію молекулярної будови хітозану [91]. Хітин і хітозан можуть бути легко перероблені на гідрогелі [92], мембрани [93, 94], нановолокна [95, 96, 97], мікро/наночастинки [98], скафолди [99, 100]. У літературі є відомості про культивування фіброblastів людини і ссавців на підкладках із хітину і хітозану, на хітозанових і хітозан-колагенових скафолдах, а також гібридних хітозан-полілактидних наноструктурованих матриксах [101, 102].

Одними з найважливіших показників хітозанових плівок, з огляду на застосування, є їх вологопоглинальна властивість та відповідно здатність плівок до сорбції екссудату з ран, їх водо- та газопроникність, а також транспортні властивості щодо лікарських препаратів. Вивчаючи вплив різних факторів, таких як концентрація полімеру в розчині, товщина плівки і способи модифікації, а також наявність іншого полімеру, на вологопоглинальні властивості хітозанових плівок, було встановлено, що найбільш значущими факторами, які визначають вологопоглинальну здатність плівок хітозану, є їх товщи-

на, обробка поверхнево-активними речовинами, термічна модифікація, а також додавання іншого полімеру [103].

Різні механізми були запропоновані для обґрунтування антимікробної дії хітину, хітозану та їх похідних [104]. Перший механізм – усунення бактерій з поверхні опікової рани за допомогою хітозанових плівок як механічного бар'єра між ранами та навколишнім середовищем, що дозволяє виключити можливість мікробної контамінації й сформувати оптимальне ранове мікросередовище [105]. Адсорбуючи надлишки ексудату, хітозанова мембрана може нормалізувати ранове мікросередовище та зменшити мікробне навантаження [105, 106]. На думку деяких авторів, низькомолекулярні полімери хітозану мають хемотаксичні властивості до лейкоцитів і макрофагів [107]. Вони можуть стимулювати їх міграцію до місця рани й утворювати таким чином оптимальні умови для очищення ран. Крім того, хітозан може стимулювати відтворення клітин безпосередньо у тканинах із подальшою трансформацією їх у макрофаги [104].

Досліджуючи механізми антибактеріальної властивості хітозану, встановлено, що хітозан як полікатион утворює електростатичні зв'язки з аніонними молекулами на поверхні клітини і тим самим впливає на їх проникну здатність [108, 109]. Крім того, хітозан зв'язується з негативно зарядженими групами ДНК та інгібує синтез РНК [110]. Хітозан також діє як хелатуючий агент, що селективно зв'язується з металами і, отже, пригнічує вироблення токсинів і ріст мікробів [111, 112]. Антибактеріальна активність хітозану залежить також від його фізико-хімічних властивостей (MW, гідрофільні/гідрофобні властивості, водорозчинність, густина позитивного заряду, DD, pH, а також комбінації з іншими антимікробними агентами). Більш деацетилований хітозан має вираженішу протимікробну здатність, ніж хітозан із високою часткою ацетилованих аміногруп, через підвищену розчинність та високу густина заряду [113, 114].

У серії експериментальних досліджень В.В.Корнієнко та співавторів була показана залежність репаративної регенерації опікової рани шкіри від віку тварин: з віком відбувається порушення клітинного співвідношення в ділянці опікової рани на початкових стадіях регенерації, що призводить до уповільнення формування тканин та епітелізації рани [115, 116]. Виявлений стимулювальний ефект хітозану на клітини, які забезпечують очищення рани від детриту, й на клітини фібробластичного ряду, що приводить до швидкого формування повноцінної сполучної тканини на місці травми. Доведено, що використання хітозанових плівок обумовлює синхронізацію процесів утворення та дозрівання грануляційної тканини з подальшою епітелізацією рани [117-119]. Було встановлено, що використання

хітозану сприяє повноцінному відновленню будови шкіри без формування рубцевої тканини, визначені відмінності морфофункціонального стану шкіри у тварин різних вікових груп під час застосування хітозанового покриття, що полягають у зменшенні чутливості ефекторних клітин до дії хітозану зі збільшенням віку тварин та, як наслідок, – в уповільненні процесів регенерації [120, 121]. Загалом, ці дослідження визначили комплекс вікових особливостей морфофункціонального стану шкіри тварин після опікової травми, що може бути використане як морфологічне підґрунтя під час дослідження процесів регенерації ран у хірургії, комбустіології, медицині невідкладних станів і військовій медицині.

Отже, доцільним є використання для місцевого лікування засобів, які володіють комплексним впливом на процеси загоєння ран. Переваги при цьому мають препарати, що володіють регулюючим впливом на клітинні механізми ранового процесу, створюючи оптимальне середовище для неускладненого перебігу процесу ранового загоєння, запобігаючи мікробній контамінації та розвитку інфекції в рані.

Не зважаючи на велику кількість принципів та критеріїв, що були основою уявлень про стабільність процесу загоєння, незмінними залишалися патогенетичні зміни в рані на тканинному і клітинному рівнях. Хоча з віком процес загоєння відбувається більш повільно, якісно він практично відбувається так, як і в молодому віці, послідовно минаючи фази запалення, регенерації, ремоделювання в зоні порушеної тканинної структури. Ряд змін у процесі загоєння є результатом вікових змін організму. Рівень відповіді запальної реакції, клітинна міграція, проліферація та дозрівання сповільнюються. Епітелізація і контракція відкритих ран також можуть бути уповільненими. Таким чином, у літньому віці частіше спостерігаються порушення процесу ранового загоєння, що обумовлено більшою чутливістю до зовнішніх стресових впливів і більш високою частотою супутніх захворювань. Атрофія екстрацелюлярного матриксу внаслідок вікових змін супроводжується зростанням білкової дегградації та відображається зменшенням кількості фібробластів і, як наслідок, пригніченням білкового синтезу, зокрема синтезу колагену та еластину. Здебільшого порушення загоєння ран може бути обумовлене зниженням системної та локальної перфузії органів і тканин, особливостями імунної системи, зниженням здатності боротьби з інфекцією і уразливістю старечої шкіри [122].

Значну увагу дослідженню вікових змін шкіри та їх впливу на результати хірургічних втручань було приділено в циклі робіт Макаруча О.І. з колегами [122-124]. У клінічних дослідженнях було проведено кількісну морфологічну оцінку тканинних, клітинних та ультраструктурних вікових перебудов шкіри із застосуван-

ням широкого комплексу сучасних морфологічних методів, включаючи тривимірне комп'ютерне моделювання [125]. Було показано, що структурні основи інволютивних змін шкіри полягають в ушкодженні системи мікроциркуляції, яке включає порушення структури внутрішньососочкових капілярних петель за рахунок локальних розширень гемокапілярів у внутрішньососочковому просторі та звуження початкових і кінцевих сегментів петель, дезорганізацію артеріолярних компонентів мікроциркуляторного русла у складі сосочкового і сітчастого шарів дерми, а також ушкодження дренажної ланки мікроциркуляції за рахунок змін фібрилярного каркасу мікрооточення в зоні підсосочкових венозних сплетень.

Авторами запропоновано та обґрунтовано діагностичний алгоритм кількісного визначення інволютивного статусу шкіри, який кількісно оцінювався як інтегральна характеристика, розрахована на основі морфометричних критеріїв стану кератиноцитів, елементів мікроциркуляторного русла дерми, дермальних фіброblastів, волоконного складу дерми. [126-128].

Також було доведено, що у пацієнтів з супутньою патологією є характерним істотне порушення структури мікроциркуляторного русла шкіри та інших її компонентів, що надає підстави для виділення даного контингенту хворих як групу високого інтраопераційного та післяопераційного ризику [129-131]. На ґрунті аналізу даних кількісного морфологічного дослідження, результатів динамічного клініко-інструментального обстеження, вивчення якості життя були визначені чіткі показання для проведення різних варіантів оперативних втручань, в тому числі з інтраопераційним застосуванням плазмозамінника з функцією переносу кисню перфторану для попередження ускладнень у найближчому та віддаленому післяопераційному періоді [132-134].

Отже, визначення умов успішної регенерації тканин є можливим завдяки детальнішому вивченню гістогенезу, оскільки оптимізація посттравматичної регенерації повинна проводитися з урахуванням особливостей регенерації конкретної тканини, в тому числі й її вікових аспектів. Саме вивчення цих процесів завдяки розширенню можливостей досліджень на різних структур-

них рівнях – від органного до молекулярного – дозволяє на сьогодні зрозуміти перебіг ранового процесу та процесу репаративної регенерації в цілому для оптимізації відновлення загоєння різноманітних ушкоджень шкіри та запобігання виникненню ускладнень, причому пов'язані з віком особливості мають суттєве значення для означених процесів.

Підсумок

Цілком зрозуміло, що в надзвичайно складних умовах самої ситуації вибуху головна увага під час порятунку постраждалих військовослужбовців або цивільних осіб скерована на забезпечення їх виживання та збереження життєво важливих функцій організму. При цьому переважна більшість ушкоджень шкіри підлягає відтермінованій увазі медичних працівників. У тих випадках, коли загальний покрив не зазнає безпосередніх опікових або інших ранових ушкоджень, що загрожують життю, структурно-функціональні порушення різних компонентів шкіри взагалі можуть залишатися без адекватної корекції протягом тривалого часу. За цих обставин слід пам'ятати, що шкіра є найбільшим органом організму та виконує низку важливих системних функцій, пошкодження яких критично впливає на стан постраждалого після МВТ, включаючи тривалий реабілітаційний період.

На сьогодні відомості про характер структурно-функціональних змін шкіри у постраждалих внаслідок МВТ залишаються вкрай обмеженими, що не дозволяє вжити адекватних заходів їх корекції. Визначення провідних тканинних і клітинних перебудов структури шкіри в залежності від характеру мінно-вибухового ураження, його інтенсивності, вікового фактора та статі постраждалого, супутніх розладів виступає як нагайна потреба сьогодення і актуальна медична проблема.

Перспективи подальших розробок

Визначення морфологічних змін загального покриву при МВТ дозволить обґрунтувати важливі лікувально-реабілітаційні заходи при лікуванні постраждалих.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Літературні джерела References

1. Guriev SO, Kravtsov DI, Kazachkov VE. [Mine blast injury as a result of modern combat operations on the example of an anti-terrorist operation in Eastern Ukraine. Message 1. Clinical-epidemiological characteristics of victims with mine-explosive injury at the early hospital stage of

medical care]. Trauma. 2015;16(6). Ukrainian.

2. Ngo T, Mendis P, Gupta A, Ramsay J. Blast loading and blast effects on structures – an overview. ESME. 2007;7:76-91.

3. Ramasamy A, Hill AM. Evaluating the effect of vehicle modification in reducing injuries from

landmine blasts. An analysis of 2212 incidents and its application for humanitarian purposes. *Accident Analysis and Prevention*. 2011;43:1878-86.

4. Bisyk SP, Davydovskyi LS, Shabytskyi VR. [Study of the design of a protective anti-mine screen]. *Military and technical collection*. 2015;12:110-7. Ukrainian.

5. Bisyk SP. [Criteria for injury to the human body during shock and explosive loads. Weapon systems and military equipment]. 2015;1(41):153-9. Ukrainian.

6. Summary of global armoured vehicle market report 2013. Available: http://www.defenceiq.com/armouredvehicles/articles/summary-of-global-armoured-vehicle-market-report-2&mac=DFIQ_OI_Featured_2011&utm_source=defenceiq.pdf.

7. Elsayed NM, Atkins J, editors. *Explosion and blast-related injuries: effects of explosion and blast from military operations and acts of terrorism*. Academic press is an imprint of Elsevier, 2008. 380 p.

8. Ramasamy A, Hill AM, Hepper AE, Bull AMJ, Clasper JC. Blast mines: a background for clinicians on physics, injury mechanisms and vehicle protection. *J. R. Army Med. Corps*. 2009;155:258-64.

9. Mironov VI, Gileva II. [Wound process: modern aspects of pathogenesis]. *Siberian Medical Journal*. 2009;6:20-6. Russian.

10. Tverdokhlib IV, Makarchuk OI. [Determining the stage of involutive changes of skins on the basis of morphological criteria and for the auxiliary apparatus "Light Check-up"]. *Morphologia*. 2010;4(4):57-66. Ukrainian.

11. Kramar SB, Volkov KS, Kotik AO. [Histological and histochemical changes in the urticaria of the ear in the dynamics after experimental thermal injury]. *World of Medicine and Biology*. 2014;10(4):182-5. Ukrainian.

12. Adam JS, Dagum AB. Current Management of Acute Cutaneous Wounds. *N. Engl. J. Med*. 2008;359:1037-46.

13. Fistal NM. [Treatment of optic convalescents: the current state of the problem]. *Bukovinian Medical Bulletin*. 2009;13(30):94-9. Ukrainian.

14. Netyukhaylo LG. [Relationship between ear worms in experimental opiate ailments]. *Young scientists*. 2014;3(6):144-5. Ukrainian.

15. Vyas KS, Vasconez HC. Wound Healing: Biologics, Skin Substitutes, Biomembranes and Scaffolds. *Healthcare*. 2014;2(3):356-400.

16. Moustafa MG, Fouda R, Wittke D. Use of chitosan/polyamine biopolymers based cotton as a model system to prepare antimicrobial wound dressing. *Schollmeyer International Journal of Diabetes Mellitus*. 2009;1:61-4.

17. Hnin-Ei T, Hanif ZM, Shioh-Fern A. Alginate based bilayer hydrocolloid films as potential slow-release modern wound dressing. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012;434:375-83.

18. Harish Prashanth KV, Tharanathan RN. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential. *Trends in Food Scie. Tech*. 2007;18:117-131.

19. Honarkar H, Barikani M. Applications of biopolymers I: chitosan. *Monatsh Chem*. 2009;140:1403-20.

20. Francesko A, Tzanov T. Chitin, Chitosan and Derivatives for Wound Healing and Tissue Engineering. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2011;125:1-27.

21. Chen RN, Wang GM, Chen CH. Development of N, O-(carboxymethyl) chitosan/collagen-matrixes as a wound dressing. *Biomacromolecules*. 2006;7:1058-64.

22. Watthanaphanit A, Supaphol P, Tamura H. Fabrication, structure, and properties of chitin whisker-reinforced alginate nanocomposite fibers. *J. Appl. Polym. Sci*. 2008;110:890.

23. Water absorbing and antibacterial properties of N-isopropyl acrylamide grafted and collagen/chitosan immobilized polypropylene nonwoven fabric and its application on wound healing enhancement / C. C. Wang, C. H. Su, C. C. Chen [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2008. – Vol. 84A. – P. 1006-1017.

24. Shin-Yeu O, Jian Wu, Moochhala SM. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. *Biomaterials*. 2008;29:4323-32.

25. Boucard N, Vitona C, Agayb D. The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. 2007;28:3478-88.

26. Rodrigues AP, Genari SC, Paulo NM. Evaluation of Cell Growth Characteristics on Chitosan-Alginate Membranes to Assess Their Potential Application on Highly Exuding Skin Lesions and In Vivo Evaluation in Wounded Cat. *Cells and Culture ESACT Proceedings*. 2010;4:789-94.

27. Reinke JM, Sorg H. Wound Repair and Regeneration. *Eur. Surg. Res*. 2012;49:35-43.

28. Church D, Elsayed S, Reid O. Burn Wound Infections. *Clinical microbiology reviews*. 2006;8:403-34.

29. Boateng JS, Matthews KH, Stevens NE. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(8):2892-923.

30. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2009;10(3):207-17.

31. Orgill DP. Excision and Skin Grafting of Thermal Burns. *N. Engl. J. Med*. 2009;360:893-901.

32. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Rep. Reg*. 2008;16:585-601.

33. Schmidt BA, Horsley V. Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing. *Development*. 2013;140:1517-27.

34. Arun M, Satish S, Anima P. Herbal Boon

For Wounds. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2013;5(2):1–12.

35. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453:314–21.

36. Nguyen DT, Orgill DP, Murphy GF. The Pathophysiologic Basis for Wound Healing and Cutaneous Regeneration. *Biomaterials For Treating Skin Loss*, 1st Edition: Woodhead Publishing (UK/Europe) and CRC Press (US), Cambridge/Boca Raton, 2009. – 25–57.

37. Longaker MT, Gurtner GC. Introduction: wound repair. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2012;23:945.

38. Metcalfe AD, Ferguson MWJ. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J. R. Soc. Interface*. 2007;4:413–37.

39. Schultz GS, Davidson JM, Kirsner RS. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. *Wound Repair Regen.* 2011;19(2):134–48.

40. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J. Int. Med. Res.* 2009;37(5):32–9.

41. Ingersoll MA, Platt AM, Potteaux S. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends in immunology*. 2011;32(10):470–7.

42. Ferguson MW, O’Kane S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2004;359:839–50.

43. Delavary BM, van der Veer WM, van Egmond M. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*. 2011;216(7):753–62.

44. Quan TE, Cowper SE, Bucala R. The role of circulating fibrocytes in fibrosis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2006;8:145–50.

45. Bayat A. Skin scarring. *Br. Med. J.* 2003;326:88–92.

46. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J. Invest. Dermatol.* 2007;127(3):526–37.

47. Pereira RF, Barrias CC, Granja PL. Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. *Nanomedicine (Lond)*. 2013;8(4):603–21.

48. Hojo M, Inokuchi S, Kidokoro M. Induction of vascular endothelial growth factor by fibrin as a dermal substrate for cultured skin substitute. *Plast. Reconstr. Surg.* 2003;111:1638–45.

49. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J. Dent. Res.* 2010;89(3):219–29.

50. Benest AV, Salmo AH, Wang W. VEGF and angiopoietin-1 stimulate different angiogenic phenotypes that combine to enhance functional neovascularization in adult tissue. *Microcirculation*. 2006;13:423–37.

51. Yang L, Scott PG, Dodd C. Identification of fibrocytes in postburn hypertrophic scar. *Wound*

Repair. Regen. 2005;13:398–404.

52. Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013;70:2059–81.

53. Wu M, Ben Amar M. Growth and remodeling for profound circular wounds in skin. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 2015;14:357–70.

54. Hartly M, Neff AW, King MW. Regeneration or scarring: an immunologic perspective. *Dev. Dyn.* 2003;226:268–79.

55. Ogawa R, Akaishi A, Izumi M. Histologic analysis of keloids and hypertrophic scars. *Ann. Plast. Surg.* 2009;62:104–105.

56. Butler CE, Orgill DP. Simultaneous in vivo regeneration of neodermis, epidermis, and basement membrane. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2005;94:23–41.

57. Verhaegen PD, van Zuijlen PM, Pennings NM. Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: an objective histopathological analysis. *Wound Rep. Regen.* 2009;17:649–56.

58. Shankar R, Melstrom KA, Gamelli RL. Inflammation and sepsis: past, present, and the future. *J. Burn Care Res.* 2007;28:566–71.

59. Ogawa R. Animal models of keloids and hypertrophic scars. *Chin. J. Burn Care Res.* 2008;29:1016–7.

60. Gawronska-Kozak B, Bogacki M, Rim GS. Scarless skin repair in immunodeficient mice. *Wound Repair Regen.* 2006;14:265–76.

61. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J. Invest. Dermatol.* 2007;127:514–25.

62. Sarrazy V, Billet F, Micallef L. Mechanisms of pathological scarring: Role of myofibroblasts and current developments. *Wound Rep. Reg.* 2011;19:10–5.

63. Spyrou GE, Naylor IL. The effect of basic fibroblast growth factor on scarring. *Br. J. Plast. Surg.* 2002;55:275–82.

64. Barret JP, Herndon DN. Effects of burn wound excision on bacterial colonization and invasion. *Plast. Reconstr. Surg.* 2003;111:744–50.

65. Greenhalgh DG. American Burn Association consensus conference to define sepsis and infection in burns. *J. Burn Care Res.* 2007;28(6):776–90.

66. Kirketerp-Moller K, Jensen PO, Fazli M. Distribution, organization and ecology of bacteria in chronic wounds. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46(8):2717–22.

67. Edwards R, Harding KG. Bacteria and wound healing. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2004;17(2):91–6.

68. Wibbenmeyer L. Prospective analysis of nosocomial infection rates, antibiotic use, and patterns of resistance in a burn population. *J. Burn Care Res.* 2006;27(2):152–60.

69. Zulkowski K. Skin bacteria: implications

for wound care. *Adv. Skin Wound Care*. 2013;26(5):231–6.

70. Wysocki AB. Evaluating and managing open skin wounds: colonization versus infection. *AACN Clin*. 2002;13:382–97.

71. Pangilinan R, Tice A, Tillotson G. Topical antibiotic treatment for uncomplicated skin and skin structure infections: review of the literature. *Exp. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2009;7(8):957–65.

72. Murray CK, Roop SA, Hospenthal DR. Bacteriology of war wounds at the time of injury. *Mil. Med.* 2006;171:826–9.

73. Fital EYa, Kozinets GP. [Combustiology]. Donetsk, 2006:236 p. Ukrainian.

74. Saffle JR. Closure of the excised burn wound: temporary skin substitutes. *Clinics In Plastic Surgery*. 2009;36:627–41.

75. Schaum KD. Should it be coded as a dressing or as a dermal/epidermal (substitute) tissue? *Adv. Skin Wound Care*. 2008;21(7):317–21.

76. Singer AJ, Dagum AB. Current management of acute cutaneous wounds. *The New England Journal of Medicine*. 2008;359:1037–46.

77. Hermans MH. Results of an internet survey on the treatment of partial thickness burns, full thickness burns, and donor sites. *Journal of Burn Care and Rehabilitation*. 2007;28:835–47.

78. Sweeney IR, Mirafteb M, Collyer GA. Critical review of modern and emerging absorbent dressings used to treat exuding wound. *Int. Wound J.* 2012;9:601–12.

79. Winter GD. Formation of the scab and the rate of epithelialization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature*. 1962;193:293–4.

80. Winter GD, Scales GT. The effect of air drying and dressings on the surface of a wound. *Nature*. 1963;197:91–4.

81. McColl D, Carlidge B, Connolly P. Real-time monitoring of moisture levels in wound dressings in vitro: An experimental study. *International Journal of Surgery*. 2007;5:316–22.

82. Okan D, Woo K, Ayello E. The Role of Moisture Balance in Wound Healing. *Adv. Skin Wound Care*. 2007;20(1):39–53.

83. Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar RT. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*. 2011;29:322–37.

84. Fouda MG, R. Wittke, Knittel et al D. Use of chitosan/polyamine biopolymers based cotton as a model system to prepare antimicrobial wound dressing. *International Journal of Diabetes Mellitus*. 2009;1:61–4.

85. Hnin-Ei Thu, Mohd Hanif Zulfakar, Shiow-Fern Ng. Alginate based bilayer hydrocolloid films as potential slow-release modern wound dressing. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012;434:375–83.

86. Drago H, Marin GH, Sturla F. The next

generation of burns treatment: intelligent films and matrix, controlled enzymatic debridement, and adult stem cells. *Transplantation Proceedings*. 2010;42(1):345–9.

87. Kaur S, Dhillon GS. The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications. *Critical reviews in microbiology*. 2014;40(2):155–75.

88. Ribeiro MP, Morgado PI, Miguel SP. Dextran-based hydrogel containing chitosan microparticles loaded with growth factors to be used in wound healing. *Materials science & engineering C-materials for biological applications*. 2013;33(5):2958–66.

89. Nacer KA, Mohamed M, Djamel T. Evaluation of healing activity of PVA/chitosan hydrogels on deep second degree burn: Pharmacological and toxicological tests. *Burns*. 2013;39(1):98–104.

90. Azuma K, Izumi R, Osaki T. Chitin, Chitosan, and Its Derivatives for Wound Healing: Old and New Materials. *J. Funct. Biomater.* 2015;6(1):104–42.

91. Kurita K. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Marine Biotechnology*. 2006;8:203–26.

92. Alsarra IA. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2009;45(1):16–21.

93. Madhumathi K, Binulal NS, Nagahama H. Preparation and characterization of novel α -chitin-hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2009;44:1–5.

94. Nagahama H, Kashiki T, Nwe N. Preparation of biodegradable chitin/gelatin membranes with GlcNAc for tissue engineering applications. *Carbohydr. Polym.* 2008;73:456–63.

95. Shalumon KT, Binulal NS, Selvamurugan N. Electrospinning of carboxymethylchitin/poly(vinylalcohol) nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydr. Polym.* 2009;77:863–9.

96. Shalumon KT, Anulekha KH, Girish CM. Single step electrospinning of chitosan/poly(caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture. *Carbohydr. Polym.* 2010;80:413–9.

97. Jayakumar R, Menon D, Manzoor K. Bio-medical applications of chitin and chitosan nanomaterials – a short review. *Carbohydr. Polym.* 2010;82:227–32.

98. Dev A, Mohan JC, Sreeja V. Novel carboxymethyl chitin nanoparticles for cancer drug delivery applications. *Carbohydr. Polym.* 2010;79:273–9.

99. Prabakaran M, Jayakumar R. Chitosan-graft- β -cyclodextrin scaffolds with controlled drug release capability for tissue engineering applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2009;44:320–5.

100. Madhumathi K, Sudheesh Kumar PT, Abilash S. Development of novel chitin/nanosilver

composite scaffolds for wound dressing applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2010;21:807–13.

101. Seda Tigli R, Karakeçili A, Gumusdere-lioglu M. In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree. *J. Mater. Sci.: mater. med.* 2007;18:1665–74.

102. Duan B, Wu L, Yuan X. Hybrid nanofibrous membranes of PLGA/chitosan fabricated via an electrospinning array. *J. Biomed. Mater. Res.* 2007;83A:868–78.

103. A study on the in vitro degradation of poly(L-lactide)/chitosan microspheres scaffolds / Zhu N, Cooper D, Chen XB. *Front. Mater. Sci.* 2013;7(1):76–82.

104. Pereda M, Ponce AG, Marcovich NE. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids.* 2011;25(5):1372–81.

105. Liza G. Ovington Advances in wound dressings. 2007;25:33–8.

106. Chung YC, Chen CY. Antibacterial characteristics and activity of acid soluble chitosan. *Bioresource Technology.* 2008;99(8):2806–14.

107. Chum-Mei D, Lang-Zhen H, Ming Z. Biological properties of the chitosan-gelatin sponge wound dressing. *Carbohydrate Polymers.* 2007;69:583–9.

108. Anitha A, Divya Rani VV, Krishna R. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* 2009;78:672–7.

109. Je JY, Kim SK. Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2006;54(18):6629–33.

110. Moussa SH, Tayel AA, Al-Turki AI. Evaluation of fungal chitosan as a biocontrol and antibacterial agent using fluorescence-labeling. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2013;54:204–8.

111. Thomas V, Yallapu W, Mohan SB. Fabrication, characterization of chitosan/nanosilver film and its potential antibacterial application. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition.* 2009;20(14):2129–44.

112. Dong Y, Liu HZ, Xu L. A novel CHS/ALG bi-layer composite membrane with sustained antimicrobial efficacy used as wound dressing. *Chin. Chem. Lett.* 2010;2:1011–4.

113. Zheng LY, Zhu JF. Study of antimicrobial activity of chitosan with different molecular weight. *Carbohydrate Polymers.* 2003;54(4):527–30.

114. Kingkaew J, Kirdponpattara S, Sanchavanakit N. Effect of Molecular Weight of Chitosan on Antimicrobial Properties and Tissue Compatibility of Chitosan-impregnated Bacterial Cellulose Films. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 2014;19:534–44.

115. Oleshko AN, Kornienko VV, Tkachenko

YuA, Kurganskaya VA. [Modeling of skin defects in experimental animals]. *Georgian Medical News.* 2015;2(239):103–8. Russian.

116. Kornienko VV, Kalinkevich OV, Deyneka VM, Pogorelov MV. [Peculiarities of the cytological picture of the surface of the opium wound with vicarious chitosan slicks]. *Ukrainian Medical Almanac.* 2013;16(3):65–9. Ukrainian.

117. Kornienko VV, Kalinkevich OV, Pogorelov MV, Oleshko OM. [Planimetric and morphometric indicators of the dynamics of the process of engorgement of the modeled opium during the stagnation of chitosan membranes in animals of different age groups]. *Morphologia.* 2013;7(4):42–50. Ukrainian.

118. Kornienko VV. [Peculiarities of regenerative processes in the optic wound of young animals with vicarious chitosan spits]. *World of Medicine and Biology.* 2014;4(46):107–13. Ukrainian.

119. Kornienko VV, Oleshko OM. [Peculiarities of the morphogenesis of the opium wound during stagnation of chitosan spits in the creatures of the old century]. *Bulletin of problems of biology and medicine.* 2014;1(113):275–8. Ukrainian.

120. Pogorelov MV, Kornienko VV. [Planimetric and morphometric indicators of the dynamics of the process of engulfment of the modeled opium during stagnation of chitosan membranes in creatures of different age groups]. *Morphologia.* 2015;9(2):58–61. Ukrainian.

121. Kornienko VV. [Planimetry of the surface of the opioid wound with vicarious chitosan membranes]. *Journal of clinical and experimental medical research.* 2013;1(4):8–18. Ukrainian.

122. Makarchuk OI. [Results of surgical correction of involutive changes in the skin of the middle zone of the face]. *Ukrainian Medical Almanac.* 2010;13(3):127–30. Ukrainian.

123. Makarchuk OI. [General properties and heterogeneity of subpopulations of skin fibroblasts]. *Morphologia.* 2007;1(3):12–20. Ukrainian.

124. Makarchuk OI, Naumenko LY. [Structural and functional characteristics of the skin of the temporal region in different age categories of women with concomitant pathology]. *Ukrainian Medical Almanac.* 2010;13(2):139–142. Ukrainian.

125. Makarchuk OI. [Spatial reconstruction of hemocapillaries of the skin of the face]. *Morphologia.* 2010;4(1):22–5. Ukrainian.

126. Makarchuk OI. [Structural and functional changes of the skin of the face and neck in women of different age groups]. *Morphologia.* 2008;2(1):62–73. Ukrainian.

127. Makarchuk OI. [Diagnosis of the degree of involutive changes of the skin of the face on the basis of morphological criteria and with the help of the "Light check-up" device]. *Morphologia.* 2008;2(2):20–9. Ukrainian.

128. Makarchuk OI. [Pathomorphology of facial skin in different age categories of women with

concomitant internal pathology]. *Morphologia*. 2009;3(4):41-5. Ukrainian.

129. Makarchuk OI. [Morphology of the skin of the temporal region in different age categories of women with concomitant pathology]. *Morphologia*. 2010;4(2):28-38. Ukrainian.

130. Makarchuk OI. [Morphological characteristics of age-related changes in the composition of the microcirculatory channel of the skin of the face and neck]. *Morphologia*. 2007;1(4):59-62. Ukrainian.

131. Tverdokhlebov IV, Naumenko LY, Makarchuk AI. [Quantitative characteristics of the elements of the microcirculatory channel of the skin of the upper region in various age categories of women with concomitant pathology]. *Russian Medical and Biological Bulletin named after I.P. Pavlov*. 2010;2:8-12. Russian.

132. Usenko LV, Makarchuk OI. [Instrumental assessment of skin condition after composite facelift using perftoran in patients with a high risk of developing intraoperative and postoperative complications]. *Ukrainian journal of surgery*. 2010;1:53-8. Ukrainian.

133. Usenko LV, Makarchuk OI. [Postoperative dynamics of skin changes after performing various types of front lifting with intraoperative use of perftoran in risk group patients]. *Bulletin of Vinnytsia National Medical University*. 2010;14(2):301-5. Ukrainian.

134. Usenko LV, Makarchuk OI. [Dynamics of skin changes after open and endoscopic facelift using perftoran in patients with concomitant pathology]. *World of medicine and biology*. 2010;3:42-7. Ukrainian.

Пастухова В.А., Кучеренко О.В. Характер травматичного ушкодження шкіри, етапи її регенерації та особливості при мінно-вибуховій травмі.

РЕФЕРАТ. Мінно-вибухова травма викликає комбіноване ушкодження багатьох структур організму і часто супроводжується прямим ушкодженням цілісності шкіри. При травмуванні м'яких тканин закритого характеру виникає забій шкіри в поєднанні з ураженням багатьох внутрішніх органів. У надзвичайній ситуації вибуху головна увага під час порятунку постраждалих військовослужбовців або цивільних осіб скерована на забезпечення їх виживання та підтримання життєво важливих функцій організму. При цьому переважна більшість ушкоджень шкіри підлягає відтермінованій увазі медичних працівників. У тих випадках, коли загальний покрив не зазнає безпосередніх опікових або інших ранових ушкоджень, що загрожують життю, структурно-функціональні порушення різних компонентів шкіри взагалі можуть залишатися без адекватної корекції протягом тривалого часу. За цих обставин слід пам'ятати, що шкіра є найбільшим органом організму та виконує низку важливих системних функцій, пошкодження яких критично впливає на стан постраждалого після мінно-вибухової травми, включаючи тривалий реабілітаційний період. На сьогодні відомості про характер структурно-функціональних змін шкіри у постраждалих внаслідок мінно-вибухової травми залишаються вкрай обмеженими, що не дозволяє вжити адекватних заходів їх корекції. Визначення провідних тканинних і клітинних перебудов структури шкіри в залежності від характеру мінно-вибухового ураження, його інтенсивності, вікового фактора та статі постраждалого, супутніх розладів виступає як нагальна потреба сьогодення і актуальна медична проблема.

Ключові слова: мінно-вибухова травма, шкіра, опік, рана, забій, морфологія, регенерація.

Т.В. Гарапко, М.Ю. Кочмарь,
Ф.А. Попович, Т.Ф. Росола,
А.І. Форос, С.І. Яцко,
М.Б. Завадська

ДВНЗ «Ужгородський національний
університет», Ужгород, Україна

Надійшла: 24.01.2023

Прийнята: 17.03.2023

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.19-28>

УДК 611.018.53.428:616- 056.257

ЗМІНИ СТРУКТУРИ ЛІМФАТИЧ- НИХ ВУЗЛІВ ПРИ ДІЇ ГЛУТАМАТУ НАТРІЮ ТА КОРЕКЦІЇ

Harapko T.V. , Kochmar M.Yu. , Popovych F.A. , Rosola T.F. , Foros A.I. , Yatsko S.I. ,
Zavadska M.B.  Changes in the structure of lymphatic nodes under the effect of monosodium glutamat and correction.

Uzhhorod National University, Uzhhorod, Ukraine.

ABSTRACT. Background. The use of food additives in the food industry is widespread, but their effect on the organs of the lymphoid system has not been studied enough. The purpose of the study was to study the changes in the structure of the parenchyma of the lymph nodes of rats under the conditions of the action of monosodium glutamate and correction with melatonin. **Methods.** The study was conducted on 42 white male and female rats of reproductive age. Experimental animals were on a high-calorie diet for six weeks (first group), followed by two weeks of melatonin correction (second group). A high-calorie diet was achieved by adding monosodium glutamate to the diet of animals at a dose of 0.07 g/kg of rat body weight. The dose of melatonin was 10 mg/kg of rat body weight. **Results.** It was investigated that after six weeks of exposure to monosodium glutamate, destructive and degenerative changes occur, in particular, in the parenchyma of the nodes, there are many lymphocytes at various stages of apoptosis, many macrophages, the cytoplasm of which contains numerous phagosomes, primary and secondary lysosomes, fragments of damaged lymphocytes, and other osmiophilic inclusions. It was found that after six weeks of exposure to monosodium glutamate followed by two weeks of melatonin, the relative area of the cortical substance of the node, lymphoid nodules, and mantle zone increases, but remains significantly smaller than that of the intact group of animals. The number of secondary lymphoid follicles decreases, the intercellular space is expanded, there are signs of perivascular edema, a large number of osmiophilic inclusions. **Conclusion.** After six weeks of exposure to monosodium glutamate followed by two weeks of melatonin, structural changes in mesenteric lymph nodes were less pronounced than in the group of animals that received monosodium glutamate for six weeks.

Key words: lymph node, monosodium glutamate, melatonin, lymphocytes, blood capillary.

Citation:

Harapko TV, Kochmar MYu, Popovych FA, Rosola TF, Foros AI, Yatsko SI, Zavadska MB. [Changes in the structure of lymphatic nodes under the effect of monosodium glutamat and correction]. Morphologia. 2023;17(1):19-28. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.19-28>

 Harapko T.V. 0000-0003-0596-9622,  Kochmar M.Yu. 0000-0002-0219-0552,
 Popovych F.A. 0000-0002-2829-8940,  Rosola T.F. 0000-0001-5323-8678,
 Foros A.I. 0000-0003-0824-6702,  Yatsko S.I. 0000-0003-3131-0477,
 Zavadska M.B. 0000-0003-3206-8491

✉ garapkotv@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Використання харчових добавок в харчовій промисловості в теперішній час є широко розповсюдженим та загальновідомим [1]. Однією з них

є глутамат натрію, що належить до групи підсилювачів смаку [2]. Ще одним ефектом даної добавки є маскування смаку, покращення органолептичних властивостей харчових продуктів [3].

Актуальним завданням для морфологів є вивчення можливостей його впливу на органи та тканини.

Лімфатичні вузли належать до вторинних лімфоїдних (імунних) органів [4]. Головною їх функцією є забезпечення антигензалежної проліферації та диференціації Т- та В-лімфоцитів. Становлять приблизно 1 % маси тіла людини і є «біологічними фільтрами», в яких осідають чужорідні антигени [5]. Від функціонального стану даних органів прямо залежить захисна спроможність організму в цілому.

Не менш актуальним завданням є вивчення можливостей корекції викликаних змін. Мелатонін є біогенним аміном, гормоном епіфізу [6]. Він бере участь в метаболізмі жирової тканини шляхом взаємодії з лептином («гормоном голоду»). Останній синтезується в адипоцитах, бере безпосередню участь в регуляції енергетичного обміну організму, а також маси тіла. Мелатонін сприяє зменшенню споживання їжі, збільшує витрати енергії, запобігає надмірному набору маси тіла [7]. Дуже важливим є те, що імунні органи та імунокомпетентні клітини містять специфічні рецептори мелатоніну, а це означає, що його дія на останні є прямою [8].

Мета дослідження: вивчити зміни структури паренхіми лімфатичних вузлів щурів за умови дії глютамату натрію та корекції мелатоніном.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на 42 білих щурах-самцях і самках репродуктивного віку (3,0-5,0-місячних) масою 125-230 г.

Будову структурних компонентів брижових лімфатичних вузлів білих щурів-самців і самок за умов норми досліджували на 10 інтактних тваринах. Експериментальних тварин поділено на 2 групи: перша група (10 особин) – тварини, які упродовж шести тижнів перебували на висококалорійній дієті (ВКД); друга (10 особин) – тварини, які перебували на ВКД впродовж шести тижнів, після чого два тижні корекції мелатоніном та стандартний харчовий раціон віварію. Кожна група включала 5 щурів-самців та 5 щурів-самок. ВКД досягали шляхом додавання в харчовий раціон тварин глютамату натрію в дозі 0,07 г/кг маси тіла щура. Його вводили за допомогою піпетки один раз на добу (10 година ранку) з подальшим вільним доступом до їжі протягом доби. Доза мелатоніну з метою корекції змін становила 10 мг/кг маси тіла щура, яку вводили щодня перорально в другій половині дня (17 година). Контроль включав 12 білих щурів, які перебували на стандартному харчовому раціоні віварію впродовж шести та восьми тижнів.

Усіх піддослідних тварин утримували в умовах віварію Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Перед забором матеріалу тварин знечулювали ефірним наркозом. Брижові лімфатичні вузли

поміщали у фіксуючу рідину, залишали при температурі 19-20° протягом 12-24 годин. Виготовлення гістологічних препаратів відбувалось за загальноприйнятою методикою.

Морфометричні дослідження проводили у визначені терміни досліду на гістологічних препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозином та азаном за допомогою програм ВидеоТест-5.0, КААРА Image Base, Stepanizer та Microsoft Excel на персональному комп'ютері. Для всіх показників вираховували значення середньої арифметичної (М) і похибки середньої арифметичної (m). Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали при нормальному розподілі за t-критерієм Стюдента. Достовірними вважаються відмінності при $p < 0,05$.

Для електронно-мікроскопічного дослідження фіксацію шматочків брижових лімфатичних вузлів проводили 1,5 % розчином чотириоксиду осмія в 0,2 М розчині какодилату натрію при рН 7,2 протягом 2-2,5 годин на холоді. Для дегідратації та підготовки до просякнення водонерозчинними смолами, відмиті від залишків фіксаторів тканинні блоки проводили через спирти висхідної концентрації та абсолютний ацетон. Зрізи виготовляли на ультрамікротомі LKB 2188 Ultratome NOVA (Швеція) з допомогою алмазного ножа (DIATOM) та проводили подвійне контрастування за Рейнольдсом та уранілацетатом. Досліджували зрізи брижових лімфатичних вузлів за допомогою електронного трансмісійного мікроскопа Tesla BS-500 (Чехія). Фотодокументували досліджуваний матеріал за допомогою цифрової камери SONY H9.

Дослідження проводили згідно положень Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Директивам Ради Європи 86/609/EEC (1986), Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001).

Результати та їх обговорення

Отримані результати дослідження у тварин інтактною та контрольної групи свідчать про те, що будова брижових лімфатичних вузлів відповідає видовій нормі. Зовні лімфатичні вузли оточені сполучнотканинною капсулою, від якої всередину паренхіми вузла відходять численні кіркові та мозкові перекладки (трабекули). У трабекулах проходять судини і нерви. На ввігнутій частині вузла розташовані ворота. Паренхіма складається з кіркової речовини вузла, що розташована ближче до капсули і займає його периферійну частину, та з мозкової речовини, яка знаходиться ближче до воріт і займає більш центральну частину вузла (Рис. 1).

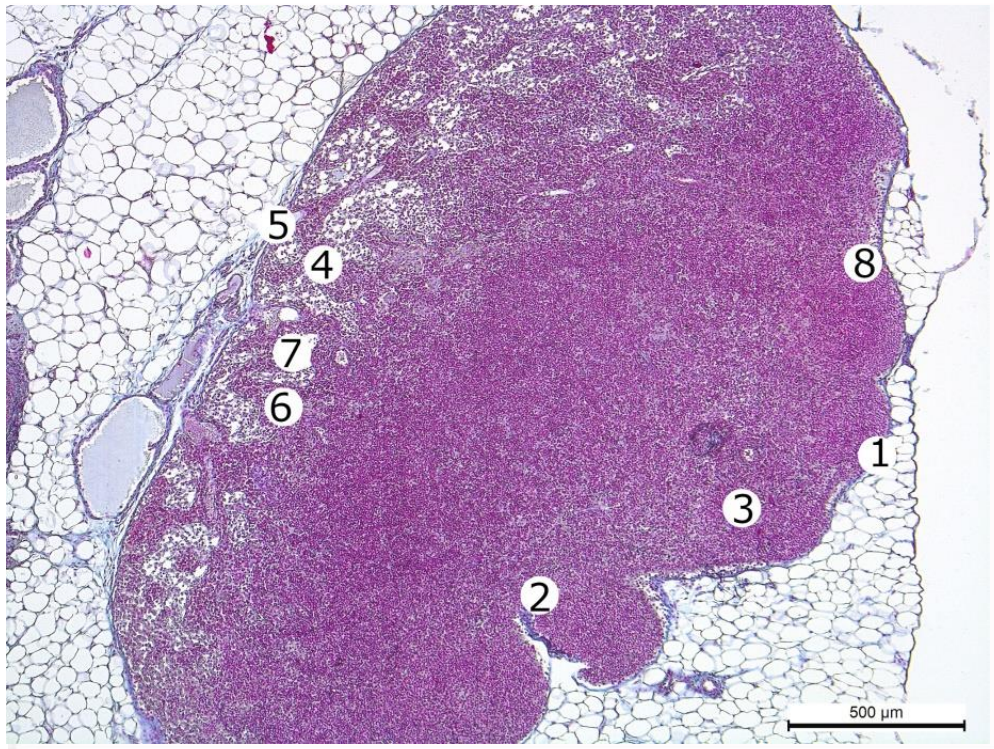


Рис. 1. Брижовий лімфатичний вузол інтактного білого щура-самця. 1 – капсула, 2 – трабекула, 3 – кіркова речовина, 4 – мозкова речовина, 5 – ворота вузла, 6 – мозковий тяж, 7 – мозкова проміжна лімфатична пазуха, 8 – крайова пазуха. Забарвлення азаном. $\times 50$.

Кіркова речовина містить первинні та вторинні лімфоїдні вузлики, що відділені від капсули крайовою пазухою, та кіркові проміжні лімфатичні пазухи. Ділянка переходу кіркової речовини в мозкову – прикіркова ділянка – утворена переважно малими субпопуляціями Т-лімфоцитів тобто є Т-залежною зоною. Містить закапілярні венули з високим ендотелієм, де відбувається міграція лімфоцитів з крові в тканину органа.

Лімфоїдна тканина вузла представлена малими, середніми та великими лімфоцитами, а також макрофагами, плазмочитами. Каркас органа утворений ретикулярними клітинами та тканиною. Електронно-мікроскопічно встановлено, що малі, середні та великі лімфоцити мають характерну будову (Рис. 2).

Через шість тижнів дії глютаму натрію як у щурів-самців так і в щурів-самок зростає кількість вторинних лімфоїдних вузликів у кірковій речовині, їх зародковий центр просвітлений, гіпертрофований. Навколо вузлів зростає кількість жирової тканини, артерії з потовщеною стінкою, повнокровні, вени деформовані, розширені та повнокровні. Перекладки, що відходять від капсули, чітко виражені, потовщені, мозкові проміжні лімфатичні пазухи розширені, звивисті. В капсулі велика кількість вакуолоподібних структур. Відносна площа прикіркової ділянки зменшується, крайова пазуха деформується. Це свідчить про збільшення відносної площі В-залежної

зони. Подібні зміни можуть призвести до перерозподілу активності в бік гуморальної імунної відповіді. Спостерігається зменшення щільності розташування В-лімфоцитів у мозкових тяжках та збільшення кількості ретикулярної сполучної тканини у мозкових проміжних лімфатичних пазухах (Рис. 3).

Морфометричним методом встановлено, що відносна площа кіркової речовини вузла через шість тижнів експерименту зменшується ($p < 0,05$) на 11,95 % у щурів-самців та на 9,31 % у щурів-самок у порівнянні з показниками інтактної групи тварин. Відносна площа мозкової речовини збільшується на 18,76 % та 14,7 % відповідно ($p < 0,001$). Кірково-мозковий індекс на 26,11 % та 20,89 % достовірно менше ($p < 0,001$) показника інтактної групи тварин. Відносна площа лімфоїдних вузликів зменшується на 16,5 % у щурів-самців та на 13,05 % у щурів-самок, відносна площа зародкового центру зменшується ($p < 0,001$) на 26,88 % та 29,45 %, плащова зона зменшується ($p < 0,001$) на 25,96 % та 22,35 %. Відносна площа крайової лімфатичної пазухи, кіркових проміжних лімфатичних пазух, прикіркової ділянки достовірно не змінюється. Відносна площа мозкових проміжних лімфатичних пазух збільшується ($p < 0,05$) у щурів-самців на 11,95 % та у щурів-самок на 8,15 %, відносна площа мозкових тяжів збільшується ($p < 0,001$) на 24,91 % та на 21,77 % (Табл. 1, 2).

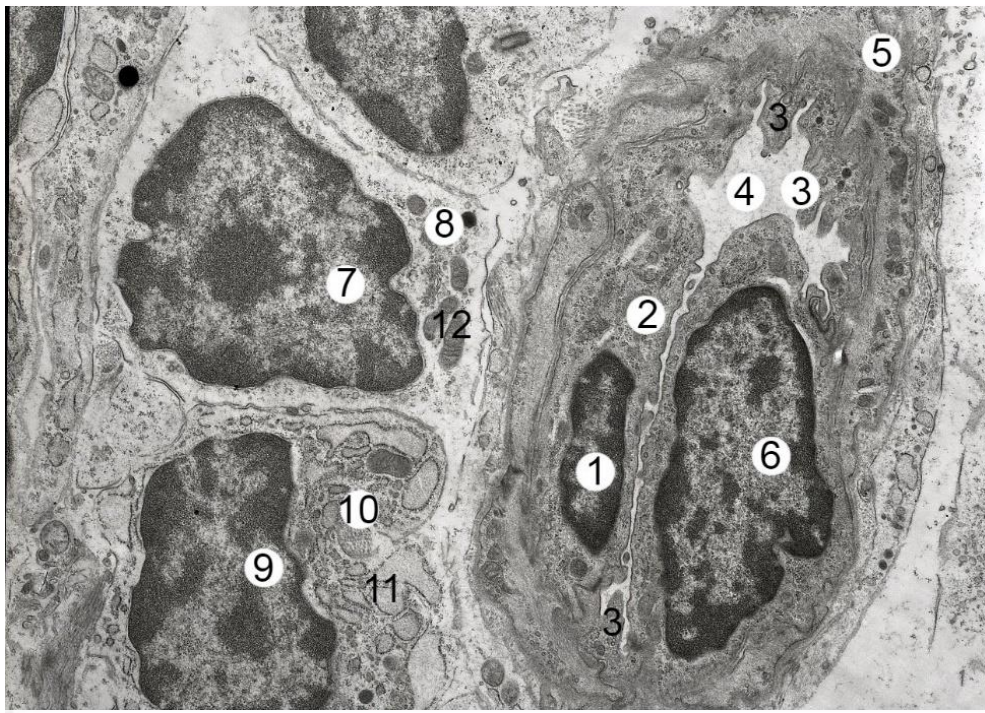


Рис. 2. Ультраструктурна організація приріркової ділянки брижового лімфатичного вузла білого щура-самця інтактної групи. 1 – ядро ендотеліюцита в стінці венули, 2 – цитоплазма, 3 – люменальна поверхня цитоплазматичної мембрани утворює поодинокі мікроворсинки, як спрямовані в просвіт венули, 4 – просвіт венули, 5 – базальна мембрана, 6 – ядро лімфоцита, перед міграцією через стінку венули, 7 – ядро лімфоцита, 8 – цитоплазма лімфоцита, 9 – ядро плазмацита, 10 – цитоплазма плазмацита, 11 – гранулярна ендоплазматична сітка, 12 – мітохондрії. Електронна мікрофотографія. $\times 6000$.

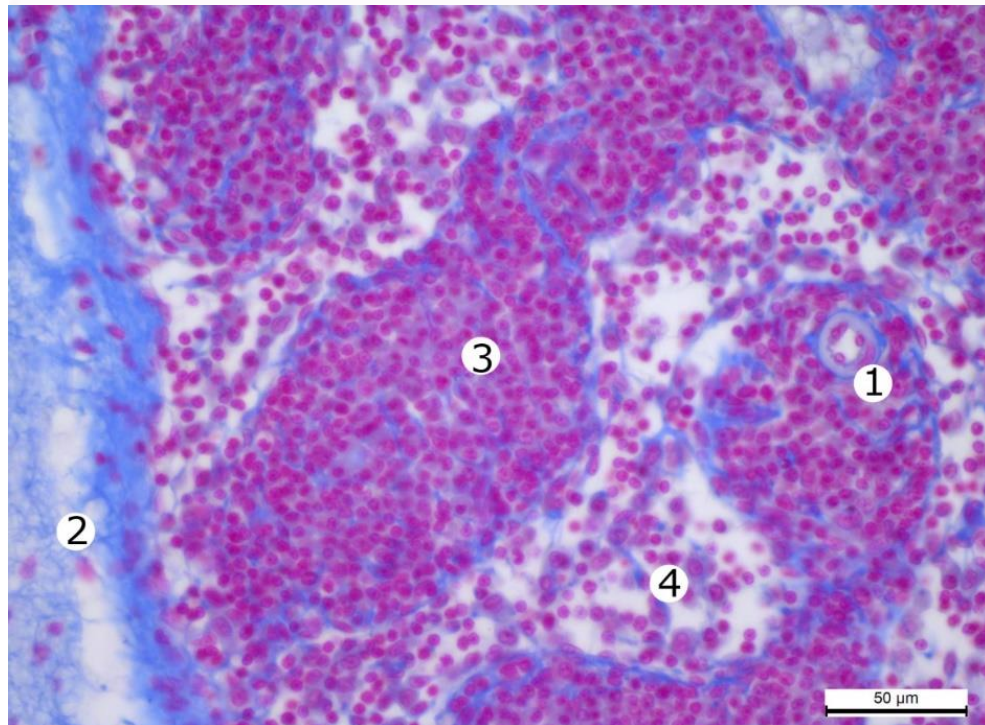


Рис. 3. Деформовані мозкові проміжні лімфатичні пазухи брижового лімфатичного вузла білого щура-самки через шість тижнів дії глютаму натрію. 1 – поперечний переріз артеріоли в мозковому тяжі, 2 – капсула, 3 – мозковий тяж, 4 – розширена, деформована мозкова проміжна лімфатична пазуха. Забарвлення азаном. $\times 400$.

Таблиця 1

Морфометричні параметри структурних компонентів лімфатичних вузлів досліджуваних щурів-самців
($M \pm m$)

Параметр, одиниці вимірювання	Досліджувана група тварин		
	Інтактна	Перша	Друга
Відносна площа кіркової речовини брижового лімфатичного вузла, %:	61,08 $\pm$ 1,56	53,78 $\pm$ 1,38*	56,05 $\pm$ 1,21*
- лімфоїдний вузлик:	45,28 $\pm$ 1,19	37,81 $\pm$ 1,22**	40,16 $\pm$ 1,02*
- зародковий центр	8,11 $\pm$ 0,13	10,29 $\pm$ 0,24**	9,04 $\pm$ 0,33*
- плащова зона	37,17 $\pm$ 0,97	27,52 $\pm$ 0,87**	31,12 $\pm$ 0,74**
- крайова лімфатична пазуха	4,39 $\pm$ 0,22	4,36 $\pm$ 0,14	4,37 $\pm$ 0,09
- кіркова проміжна лімфатична пазуха	4,03 $\pm$ 0,16	3,92 $\pm$ 0,13	3,95 $\pm$ 0,11
- прикіркова ділянка	7,38 $\pm$ 0,29	7,69 $\pm$ 0,28	7,57 $\pm$ 0,35
Відносна площа мозкової речовини брижового лімфатичного вузла, %:	38,92 $\pm$ 0,78	46,22 $\pm$ 0,7**	43,95 $\pm$ 0,76*
- мозковий тяж	18,71 $\pm$ 1,01	23,37 $\pm$ 0,69**	21,81 $\pm$ 0,49**
- мозкова проміжна лімфатична пазуха	20,41 $\pm$ 1,15	22,85 $\pm$ 0,73*	22,14 $\pm$ 0,65*
Кірково-мозковий індекс	1,57 $\pm$ 0,11	1,16 $\pm$ 0,13**	1,28 $\pm$ 0,12**

Примітки: * – величини, які статистично достовірно відрізняються від показників інтактної групи тварин ($p < 0,05$), ** – величини, які статистично достовірно відрізняються від показників інтактної групи тварин ($p < 0,001$).

Таблиця 2

Морфометричні параметри структурних компонентів лімфатичних вузлів досліджуваних щурів-самок
($M \pm m$)

Параметр, одиниці вимірювання	Досліджувана група тварин		
	Інтактна	Перша	Друга
Відносна площа кіркової речовини брижового лімфатичного вузла, %:	61,23 $\pm$ 1,7	55,53 $\pm$ 1,29*	57,75 $\pm$ 1,45*
- лімфоїдний вузлик:	45,37 $\pm$ 1,22	39,45 $\pm$ 1,16**	41,73 $\pm$ 1,11*
- зародковий центр	8,15 $\pm$ 0,11	10,55 $\pm$ 0,31**	9,23 $\pm$ 0,32*
- плащова зона	37,22 $\pm$ 0,89	28,9 $\pm$ 0,91**	32,5 $\pm$ 0,71*
- крайова лімфатична пазуха	4,41 $\pm$ 0,19	4,39 $\pm$ 0,12	4,4 $\pm$ 0,11
- кіркова проміжна лімфатична пазуха	4,04 $\pm$ 0,13	3,98 $\pm$ 0,14	4,01 $\pm$ 0,1
- прикіркова ділянка	7,41 $\pm$ 0,27	7,71 $\pm$ 0,25	7,61 $\pm$ 0,34
Відносна площа мозкової речовини брижового лімфатичного вузла, %:	38,77 $\pm$ 0,76	44,47 $\pm$ 0,71**	42,25 $\pm$ 0,71*
- мозковий тяж	18,65 $\pm$ 1,05	22,71 $\pm$ 0,74**	20,93 $\pm$ 0,61**
- мозкова проміжна лімфатична пазуха	20,12 $\pm$ 1,04	21,76 $\pm$ 0,81*	21,32 $\pm$ 0,58*
Кірково-мозковий індекс	1,58 $\pm$ 0,11	1,25 $\pm$ 0,2**	1,37 $\pm$ 0,15**

Примітки: * – величини, які статистично достовірно відрізняються від показників інтактної групи тварин ($p < 0,05$), ** – величини, які статистично достовірно відрізняються від показників інтактної групи тварин ($p < 0,001$).

Субмікроскопічно через шість тижнів дії глутамату натрію в паренхімі вузлів багато макрофагів, цитоплазма яких містить численні фагосоми, первинні та вторинні лізосоми, фрагменти пошкоджених лімфоцитів та інші осміофільні вclusions. Ядра ретикулоендотеліоцитів збільшені, деформовані, цитоплазма містить пошкоджені органели (Рис. 4). Багато лімфоцитів на різних стадіях апоптозу. Частина лімфоцитів, в яких немає ознак апоптозу, мають глибокі інвазії ядерної оболонки, в ядрі відсутні ядерця,

цитоплазма просвітлена, органели мають ознаки пошкодження. Канальці гранулярної ендоплазматичної сітки в клітинах з ознаками набряку, розширені. Мітохондріальні гребені набряклі, пошкоджені, з просвітленим матриксом. В просвіті та у стінці закапілярних венул з високим ендотелієм велика кількість лімфоцитів, що може свідчити про посилення процесів міграції лімфоцитів у паренхіму лімфатичного вузла із крові. Базальна мембрана кровоносних капілярів набрякла, потовщена, ядра ендотеліоцитів дефо-

рмовані, люменальна поверхня плазматичної мембрани містить численні мікроворсинки, які зменшують просвіт судини. Збільшується частка колагенових волокон та мікрофібрил в паренхімі вузла. Стінка артерій та артеріол склерозована,

потовщена, просвіт заповнений форменими елементами крові, ядра ендотеліальних клітин великих розмірів. Спостерігаються наскрізні дефекти в стінці капілярів, венозне повнокрів'я. Вени та вени з розширеним повнокровним просвітом.

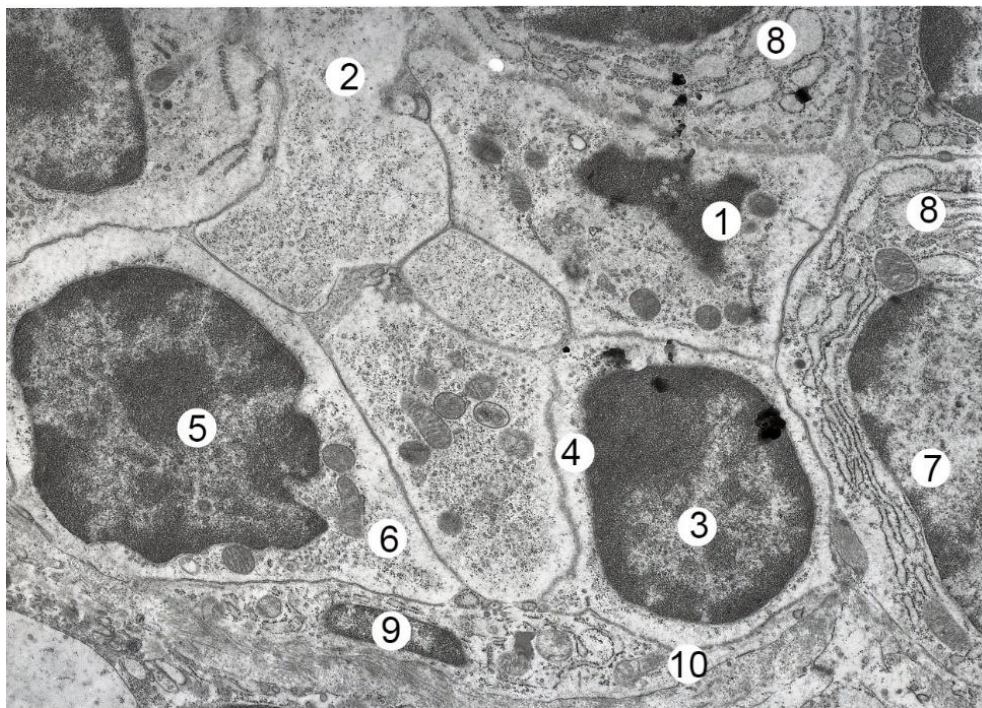


Рис. 4. Збільшення кількості апоптично змінених клітин в кірковій речовині брижового лімфатичного вузла білого щура-самки через шість тижнів дії глутамату натрію. 1 – каріолізис лімфоцита, 2 – деструктивна ділянка, 3 – ядро малого В-лімфоцита, 4 – цитоплазма малого В-лімфоцита, 5 – ядро середнього В-лімфоцита, 6 – цитоплазма середнього В-лімфоцита, 7 – ядро лімфобласта, 8 – вакуолізована цитоплазма; 9 – деформоване ядро ретикулоендотеліоцита, 10 – стоншені відростки ретикулоендотеліоцита. Електронна мікрофотографія. $\times 6000$.

Гістологічно у паренхімі брижових лімфатичних вузлів білих щурів-самців і самок через шість тижнів ВКД з наступним двотижневим застосуванням мелатоніну виявлено, що кількість вторинних лімфоїдних вузликів зменшується порівняно з групою тварин, що перебували шість тижнів на ВКД, зменшується частка жирової тканини навколо органу. У мозкових тяжках щільно розташовані В-лімфоцити, плазмоцити та макрофаги. Перекладки та капсула потовщені, крайова пазуха та кіркові проміжні лімфатичні пазухи не розширені. Мозкові проміжні лімфатичні пазухи помірно розширені, звивисті. Як кіркова, так і мозкова речовини містять осміофільні включення. Кількість апоптично змінених клітин з осміофільними включеннями висока. Ядра лімфоцитів з нерівною ядерною оболонкою, ядерця чітко диференціюються. Є ознаки набряку тканини вузла. Просвіт судин повнокровний, крім гемокапілярів (Рис. 5).

Морфометричним методом встановлено, що відносна площа кіркової речовини вузла через шість тижнів ВКД з наступним двотижневим застосуванням мелатоніну збільшується порівня-

но з групою тварин, що перебували шість тижнів на ВКД, на 4,22 % у щурів-самців та на 4,0 % у щурів-самок, що на 8,24 % та 5,68 % достовірно менше ($p < 0,05$) показників інтактної групи тварин. Відносна площа мозкової речовини брижового вузла зменшується порівняно з групою тварин, що перебували шість тижнів на ВКД, на 4,91 % у щурів-самців та на 4,99 % у щурів-самок, що на 12,92 % та 8,98 % достовірно більше ($p < 0,05$) параметрів інтактної групи тварин. Кірково-мозковий індекс становить відповідно на 18,47 % та 13,29 % достовірно менше ($p < 0,001$) показника інтактної групи тварин (Табл. 1, 2).

Відносна площа лімфоїдних вузликів збільшується порівняно з групою тварин, що перебували шість тижнів на ВКД, на 6,22 % у щурів-самців та на 5,78 % у щурів-самок та становить на 11,31 % та 8,02 % менше ($p < 0,05$) параметрів інтактної групи тварин. Відповідно відносна площа зародкового центру зменшується порівняно з групою тварин, що перебували шість тижнів на ВКД, на 12,15 % та 12,51 % і становить на 11,47 % та 13,25 % відповідно достовірно більше

($p < 0,05$) показника інтактної групи тварин. Плащова зона збільшується порівняно з групою тварин, що перебували шість тижнів на ВКД, на 13,08 % у щурів-самців та на 12,46 % у щурів-

самок, що на 16,28 % та 12,68 % відповідно достовірно менше показника інтактної групи тварин (Табл. 1, 2).

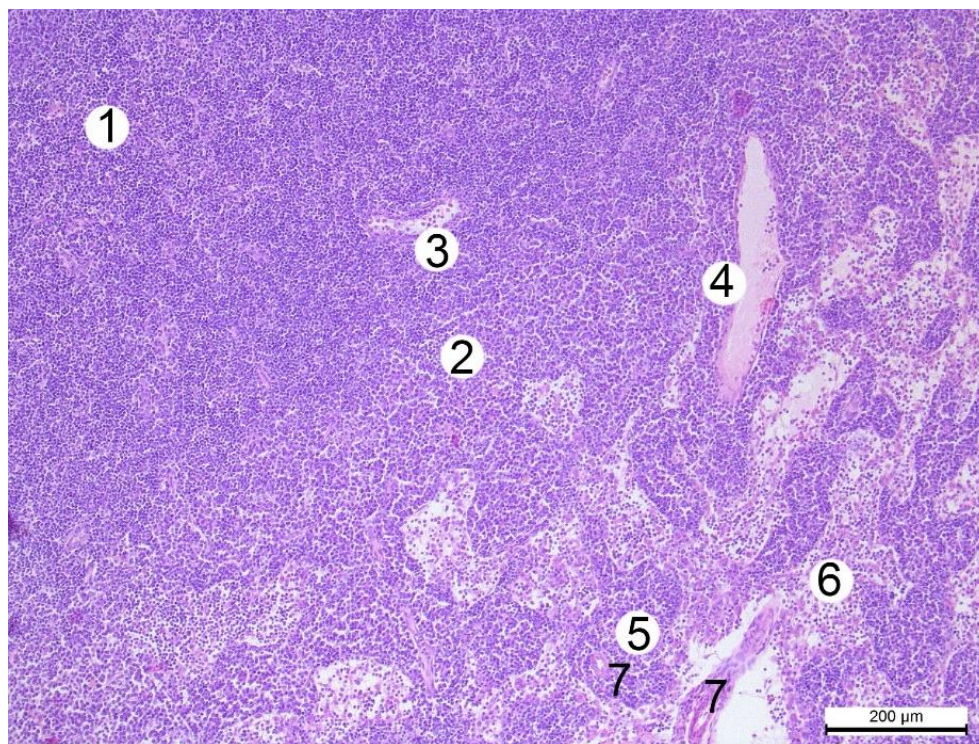


Рис. 5. Повнокрів'я венул у прикріковій ділянці брижового лімфатичного вузла білого щура-самки через шість тижнів дії глютамату натрію з наступним двотижневим застосуванням мелатоніну. 1 – кіркова речовина, 2 – прикрікова ділянка, 3 – поздовжній зріз гемокапіляра, 4 – повнокровна венула, 5 – мозковий тяж, 6 – мозкова проміжна лімфатична пазуха, 7 – «порожні» гемокапіляри в мозкових тяжках. Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 100$.

Відносна площа крайової лімфатичної пазухи, кіркових проміжних лімфатичних пазух та прикрікової ділянки достовірно не змінюється. Відносна площа мозкових проміжних лімфатичних пазух зменшується порівняно з групою тварин, що перебували шість тижнів на ВКД, на 3,11 % у щурів-самців та на 2,02 % у щурів-самок та становить відповідно на 8,48 % та 5,96 % більше ($p < 0,05$) параметрів інтактної групи тварин. Відносна площа мозкових тяжів зменшується порівняно з групою тварин, що перебували шість тижнів на ВКД, на 6,68 % та на 7,84 % та становить відповідно на 16,57 % та на 12,23 % достовірно більше ($p < 0,001$) параметрів інтактної групи тварин (Табл. 1, 2).

Електронно-мікроскопічна частка клітинного складу паренхіми лімфатичного вузла, яку займають апоптично змінені лімфоцити, макрофаги та плазмоцити зменшується в порівнянні з групою тварин, що перебували шість тижнів на ВКД. Міжклітинний простір розширений, є ознаки навколосудинного набряку, велика кількість осміофільних (жирових) включень знаходиться як у міжклітинному просторі, так і в цитоплазмі

макрофагів і плазмоцитів (Рис. 6). Мозкові проміжні лімфатичні пазухи дещо розширені, велика кількість колагенових волокон та мікрофібрил в паренхімі вузла у порівнянні з інтактною групою тварин. Через численні випини цитолемі ендотеліоцитів просвіт гемокапілярів звужений. Ознаки навколосудинного набряку менш виражені. Ядра епітеліоретикулярних клітин видовжені, плазматичні відростки не стоншені.

Схожі до отриманих нами змін описано авторами в лімфатичних вузлах при дії на організм опію до налбуфіну. Особливо що стосується змін в судинах гомомікроциркуляторного русла, що підтверджує думку про те, що зміни в судинах лімфатичних вузлів при дії різних патогенів є неспецифічними [9].

Встановлено, що збільшення маси тіла має лінійну негативну кореляцію з функцією лімфатичних органів. Також ожиріння призводить до зниження щільності лімфатичних судин та зменшення наповнення судин. Крім того, збільшення маси тіла та ступеню ожиріння призводять до прогресування навколосудинного накопичення клітин запалення [10].

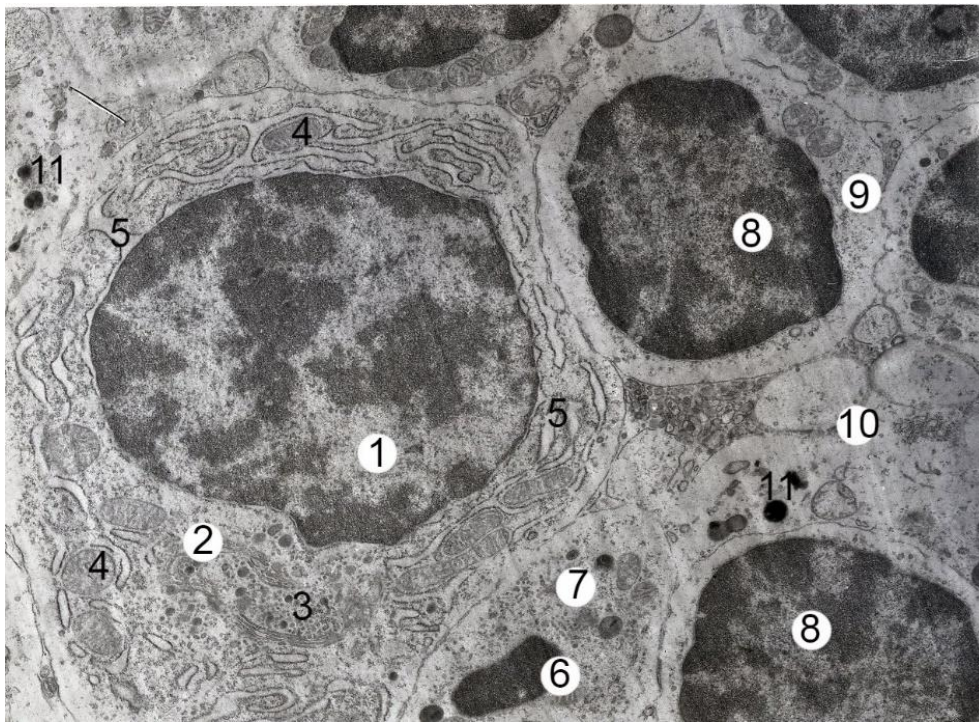


Рис. 6. Апоптоз лімфоцита в кірковій речовині брижового лімфатичного вузла білого щура-самця через шість тижнів впливу глутамату натрію з наступним двотижневим застосуванням мелатоніну. 1 – ядро плазмоцита, 2 – цитоплазма плазмоцита, 3 – первинні лізосоми, 4 – набряклі мітохондрії, 5 – розширена гранулярна ендоплазматична сітка, 6 – каріолізис ядра, 7 – цитоплазма апоптично зміненого лімфоцита, 8 – ядро малого лімфоцита з нерівним контуром каріолеми, 9 – цитоплазма малого лімфоцита, 10 – вакуолеподібні структури в міжклітинному просторі, 11 – осміофільні (жирові) включення. Електронна мікрофотографія. $\times 6000$.

Описано, що мелатонін має здатність підтримувати оптимальний мітохондріальний мембранний потенціал та зберігати мітохондріальні функції. Це пов'язано з тим, що мелатонін регулює мітохондріальний біогенез та його динаміку. Коливальний характер динаміки мітохондріальних функцій відповідає циркадному ритму секреції мелатоніну пінеалоцитами шишкоподібної залози, а можливо навіть іншими клітинами [11].

У наукових дослідженнях останніх п'яти років все частіше йде мова про нейропротективну дію мелатоніну. Це обумовлено тим, що мелатонін впливає на проліферацію та диференціювання нервових стовбурових клітин, чим в свою чергу збільшує вміст мієліну та олігодендроцитів [12].

Терапевтичний потенціал мелатоніну завдяки хронобіотичному цитозахисному ефекту є вагомим при протидії наслідкам інфекцій COVID-19. Через свій ефект як антиоксидантної, протизапальної та імуномодуючої сполуки мелатонін може бути унікальним препаратом для зменшення наслідків інфекції SARS-CoV-2. Описані непрямі докази, які вказують на можливу противірусну дію мелатоніну, впливаючи на взаємозв'язок

SARS-CoV-2/ангіотензин-перетворюючий фермент 2. Мелатонін також є ефективним хронобіотичним засобом для подолання циркадних порушень соціальної ізоляції та

боротьби з делірієм у важко уражених пацієнтів. Як цитопротектор, мелатонін служить для боротьби з кількома супутніми захворюваннями, такими як цукровий діабет, метаболічний синдром, а також ішемічні та неішемічні серцево-судинні захворювання, які ускладнюють перебіги COVID-19 [13].

Висновки

В результаті дослідження, проведеного на щурах самцях та самках, виявлено, що через шість тижнів впливу глутамату натрію виникають деструктивно-дегенеративні зміни, зокрема в паренхімі вузлів багато лімфоцитів на різних стадіях апоптозу, багато макрофагів, цитоплазма яких містить численні фагосоми, первинні та вторинні лізосоми, фрагменти пошкоджених лімфоцитів та інші осміофільні включення, відносна площа кіркової речовини брижового лімфатичного вузла достовірно менше показника інтактних тварин.

Через шість тижнів впливу глутамату натрію з наступним двотижневим застосуванням мелатоніну виявлено, що всі структурні зміни брижових лімфатичних вузлів менш виражені, ніж в групі тварин, які отримували глутамат натрію впродовж шести тижнів – відносна площа кіркової речовини вузла, лімфоїдних вузликів, плащової зони збільшується, проте залишається достовірно меншою показника інтактної групи тварин, зародкового центру, мозкових проміж-

них лімфатичних пазух та мозкових тяжів зменшується, проте залишається достовірно більшою. Зменшується кількість вторинних лімфоїдних вузликів, міжклітинний простір розширений, є ознаки навколосудинного набряку, велика кількість осміофільних (жирових) включень.

Перспективи подальших розробок пов'язані з вивченням мікроскопічних та субмікроскопічних змін структурних компонентів інших лімфоїдних органів щурів за умов дії глутамату натрію та корекції мелатоніном.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної теми «Морфологічна характеристика внутрішніх органів та судинного русла в онтогенезі у нормі та закономірності їх перебудови при ожирінні та дії на організм фізичних чинників» (номер державної реєстрації 0119U102059).

Літературні джерела References

1. Bhandari U. Effect of Embelin in Monosodium Glutamate Induced Obesity in Male Neonatal Wistar Rats. *Atheroscler. Suppl.* 2018;32:138. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.04.423>.
2. Bautista RJH, Mahmoud AM, Konigsberg M, Guerrero NELD. Obesity: Pathophysiology, monosodium glutamate-induced model and anti-obesity medicinal plants. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019;111:503-16. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.108>
3. Zandirescu A, Cristea AN, Nitulescu GM, Velescu BS, Gradinaru D. Chronic Monosodium Glutamate Administration Induced Hyperalgesia in Mice. *Nutrients.* 2018;10:1. <https://doi.org/10.3390/nu10010001>.
4. Streich K, Smoczek M, Hegermann J, Dittich-Breiholz O, Bornemann M, Siebert A, et al. Dietary lipids accumulate in macrophages and stromal cells and change the microarchitecture of mesenteric lymph nodes. *Journal of Advanced Research.* 2020;24:291-300. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.04.020>.
5. Demchenko GA, Abdreshov SN, Nurmakhanova BA. Contractile Activity of Lymph Nodes in Young, Middle-Aged, and Old Rats. *Bull Exp Biol Med.* 2019;67:194-7. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04489-x>.
6. Baburina YL, Odinkova IV, Krestinina OV. The proapoptotic effect of melatonin on the functioning of the nonspecific mitochondrial pore (mptp) in rat mitochondria. *Neurochem J.* 2019;13:156-63. <https://doi.org/10.1134/S1819712419020028>.
7. Bibik EY, Shipilova NV, Demenko AV. Melatonin as an effective pharmacocorrector of ali-

mentary obesity resulting from a long-term excessive of intake of palm oil. *Research Result: Pharmacology and Clinical Pharmacology.* 2018;4(1):51-8.

8. Amaral FGD, Andrade-Silva J, Kuwabara W, Cipolla-Neto J. New insights into the function of melatonin and its role in metabolic disturbances. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism.* 2019;14(4):299-303. <https://doi.org/10.1080/17446651.2019.1631158>.

9. Holovatskyi AS, Valko OO, Volkov KS, Kramar SB. [Submicroscopic changes of iliac lymph nodes in the dynamics of chronic opioid exposure]. *Klinichna anatomii ta operativna khirurgiia.* 2018;17(1):35-42. Ukrainian.

10. Nitti MD, Hespe GE, Kataru RP, Nores GD, Savetsky IL, Torrisi JS, et al. Obesity-induced lymphatic dysfunction is reversible with weight loss. *J Physiol.* 2016;594(23):7073-87. <https://doi.org/10.1113/JP273061>

11. Tan D, Manchester L, Qin L, Reiter R. Melatonin: A Mitochondrial Targeting Molecule Involving Mitochondrial Protection and Dynamics. *International Journal of Molecular Sciences.* 2016;17(12):2124. <https://doi.org/10.3390/ijms17122124>

12. Yu X, Li Z, Zheng H, Ho J, Chan M, Wu W. Protective roles of melatonin in central nervous system diseases by regulation of neural stem cells. *Cell Proliferation.* 2017;50(2):12323. <https://doi.org/10.1111/cpr.12323>.

13. Cardinali DP, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Can Melatonin Be a Potential "Silver Bullet" in Treating COVID-19 Patients? *Diseases.* 2020;8(4):44. <https://doi.org/10.3390/diseases8040044>.

Гаранко Т.В., Кочмарь М.Ю., Попович Ф.А., Росола Т.Ф., Форос А.І., Яцко С.І., Завадська М.Б. Зміни структури лімфатичних вузлів при дії глутамату натрію та корекції.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Використання харчових добавок в харчовій промисловості є широко розповсюдженим, проте їх вплив на органи лімфоїдної системи досліджено не достатньо. Мета дослідження – вивчити зміни структури паренхіми лімфатичних вузлів щурів за умови дії глутамату натрію та корекції мелатоніном. **Методи.** Дослідження проводилося на 42 білих щурах-самцях та самках

репродуктивного віку. Експериментальні тварини перебували на висококалорійній дієті впродовж шести тижнів (перша група), після чого два тижні корекції мелатоніном (друга група). Висококалорійну дієту досягали шляхом додавання в харчовий раціон тварин глютамату натрію в дозі 0,07 г/кг маси тіла щура. Доза мелатоніну становила 10 мг/кг маси тіла щура. **Результати.** Було досліджено, що через шість тижнів впливу глютамату натрію виникають деструктивно-дегенеративні зміни, зокрема в паренхімі вузлів багато лімфоцитів на різних стадіях апоптозу, багато макрофагів, цитоплазма яких містить численні фагосоми, первинні та вторинні лізосоми, фрагменти пошкоджених лімфоцитів та інші осміофільні включення. Було виявлено, що через шість тижнів впливу глютамату натрію з наступним двотижневим застосуванням мелатоніну відносна площа кіркової речовини вузла, лімфоїдних вузликів, плащової зони збільшується, проте залишається достовірно меншою показника інтактної групи тварин. Зменшується кількість вторинних лімфоїдних вузликів, міжклітинний простір розширений, є ознаки навколосудинного набряку, велика кількість осміофільних включень. **Підсумок.** Через шість тижнів впливу глютамату натрію з наступним двотижневим застосуванням мелатоніну структурні зміни брижових лімфатичних вузлів менш виражені, ніж в групі тварин, які отримували глютамат натрію впродовж шести тижнів.

Ключові слова: лімфатичний вузол, глютамат натрію, мелатонін, лімфоцити, кровоносний капіляр.

**І.В. Ліскіна
Л.М. Загаба**

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України», Київ, Україна.

Надійшла: 24.01.2023

Прийнята: 28.02.2023

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.29-41>

УДК: 616.24-006.04-091.8

МОЖЛИВОСТІ ІМУНОГІСТОХІМІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ В ПРАКТИЧНІЙ ДІАГНОСТИЦІ ОДИНОЧНИХ ЗЛОЯКІСНИХ ВОГНИЩЕВИХ УРАЖЕНЬ ЛЕГЕНЬ

Liskina I.V. , Zagaba L.M.  ✉ Capabilities of immunohistochemistry in the diagnostics of malignant solitary pulmonary nodules in practice.
SO «National institute of phthisiology and pulmonology named after F. G. Yanovsky NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine.

ABSTRACT. Background. At present morphological diagnostics with immunohistochemistry (IHC) examination offers to objectively establish the histological type of malignant solitary pulmonary nodules (SPN). **The aim** is to present our own experience and evaluate the possibilities of immunohistochemistry in diagnostics of solitary malignant focal lung lesions in clinical practice. **Methods.** A retrospective cohort study was conducted, which included 56 cases of primary malignant SPNs that were surgically removed. Conventional histological examination was performed in all cases followed by IHC study according to a standard protocol. The antigen reaction was assessed as diffuse (≥ 60 % of stained tumors cells), focal (10–59 % of stained tumors cells) and negative (less than 10 % of stained tumors cells). **Results.** Lung adenocarcinomas of various histological subtypes were diagnosed by conventional morphological examination in 34 (60,7 %) cases. Squamous cell carcinoma, large cell carcinoma and neuroendocrine tumour were diagnosed (6 cases, 10,7 %, respectively) less frequently. In 3 (5,4 %) cases salivary gland-type lung tumors were diagnosed, and in 1 (1,8 %) case, the need for differential diagnosis of a precancerous process and a true tumor arose. The IHC study made it possible to identify lung adenocarcinomas of various histological structure in 36 cases. A positive reaction with TTF-1, Napsin A and CK7 was detected in all cases of their use. In 2 cases mucinous adenocarcinoma (positive reaction with CK20) and in 2 cases fetal adenocarcinoma (positive reaction with Synaptophysin and/or Chromogranin A) were confirmed. In the case of squamous cell lung carcinoma, diffuse expression of p40 and/or p63 was observed, with diffuse and focal expression of CK5/6 in all cases of their use. In adenosquamous carcinoma, diffuse and focal positive reaction with CK7, TTF-1, Napsin A, p63 and CK5/6 was detected. In the case of large cell carcinoma, a diffuse positive reaction with CK7, CK8 and TTF-1 was observed, with a negative reaction with Napsin A, CK5/6, p40, p63, Synaptophysin and CD56. In cases of previously diagnosed lung carcinoids, staining with Synaptophysin and CD56 showed a diffuse positive reaction, with a focal reaction with Chromogranin A, TTF-1, CK7, CK8 and CK18 in all cases of their use. The proliferation index (Ki-67) was in the range of 5–20 %. In the case of large cell neuroendocrine carcinoma, a diffuse positive reaction was observed with Synaptophysin, TTF-1 and CD56 when use, and in one case with Chromogranin A and CK7. The proliferation index (Ki-67) was 40–80 %. In cases of salivary gland-type lung tumors, the panel of IHC markers was selected individually, and included a relatively large number of antibodies. Comparison of conventional histological examination and the results of the IHC study confirmed the previously determined histological type/subtype of lung tumor in 47 (83,9 %) cases. In 9 (16,1 %) cases, the determined immunoprofile led to a change in the histological type of lung tumor, which is crucial important for the further medical management of such patients. **Conclusion.** Today morphological diagnostics using immunohistochemistry has leading value for the most accurate determination of the histological type and clarification of malignancy degree of malignant solitary pulmonary nodules. The marker panels that are appropriate for use in IHC study in cases of the most common primary lung tumors have been proposed.

Key words: solitary malignant pulmonary nodule, diagnostics, immunohistochemistry.

Citation:

Liskina IV, Zagaba LM. [Capabilities of immunohistochemistry in the diagnostics of malignant solitary pulmonary nodules in practice]. Morphologia. 2023;17(1):29-41. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.29-41>

 Liskina I.V. 0000-0001-8879-2345

 Zagaba L.M. 0000-0002-2593-8893

✉ morphol@ifp.kiev.ua

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Солітарні вогнищеві легеневі утвори або утворення (СЛУ) є досить розповсюдженою клінічною проблемою, оскільки вони можуть виникати не тільки при багатьох захворюваннях легень, але й при системній патології, інфекційних хворобах. Загальноприйняте наступне визначення СЛУ – це утворення не більше за 3 см, відносно округлої форми, з досить чіткими межами, та яке не поєднане з ателектазом, лімфаденопатією межистиння та плевральним випотом [1, 2].

Ймовірні причини розвитку легневих вузлів охоплюють багато як доброякісних, так і злоякісних процесів. Принциповим та першочерговим завданням при виявленні СЛУ є диференціальна діагностика саме його доброякісного або злоякісного характеру. Злоякісні утвори можуть мати первинну або вторинну природу, тобто бути одиночними метастазами пухлин позалегенової локалізації. Точна ідентифікація та характеристика злоякісних вузлів з визначенням їх гістологічного типу, розробка чіткого та адекватного алгоритму медичного ведення таких пацієнтів дозволяє досягнути успішного лікування ранньої стадії раку легень, оскільки великі розміри пухлини та пізня стадія хвороби пов'язані з вкрай несприятливим прогнозом життя [1].

Відомо, що серед різних органів і систем організму за частотою метастатичного ураження у разі злоякісних новоутворень різної позалегенової локалізації легені займають одне з перших місць. Причому далеко не завжди за даними анамнезу хвороби діагностовано первинну пухлину [3], першим проявом просунутого пухлинного процесу можуть бути саме виявлені вузли в легенях.

За даними літератури [2, 4], хірургічна резекція СЛУ залишається «золотим стандартом» як діагностичних, так і лікувальних заходів, зокрема, у випадках клініко-рентгенологічних ознак високого ризику злоякісності вузла. Дискусійним питанням залишається тип хірургічного лікування таких пацієнтів, оскільки первинні пухлини легень з характеристиками СЛУ вважаються початковою вибірковою стадією розвитку злоякісного процесу. В джерелах літератури наводяться різні погляди щодо проведення лобектомії або резекції легені, але, як правило, перевага віддається лобектомії. За даними низки сучасних досліджень з'ясовано, що виживаність при резекціях легень зазвичай нижча, ніж при лобектомії [5–7].

Враховуючи сучасний медичний менеджмент раку легень, принципове значення має морфологічна характеристика пухлини за традиційним дослідженням з гематоксиліном і еозиним. Наступним кроком об'єктивізації гістологічного типу та/або підтипу пухлини вважається імуногістохімічне (ІГХ) дослідження.

Імуногістохімія – це метод виявлення наяв-

ності та локалізації антигенів (білків) у певних тканинних компонентах, клітинах різного типу та клітинних структурах [8]. В останні роки ІГХ метод набув широкого впровадження в медичній практиці та перестав бути методом суто наукових досліджень. ІГХ дослідження наразі широко застосовують не тільки в діагностиці доброякісних та злоякісних новоутворень легень [9, 10], але й при різних неопластичних процесах. У випадках пухлинного процесу ІГХ метод дозволяє визначати гістогенез, ступінь злоякісності та проліферативної активності пухлинних клітин, прогнозувати подальший розвиток захворювання та слугує основою для вибору подальшого молекулярного-генетичного дослідження за потреби, та найбільш раціональних та ефективних методів лікування.

Наразі існує та постійно збільшується кількість комерційних антитіл (маркерів), які застосовують при ІГХ дослідженні. В умовах клінічної практики слід враховувати, що ІГХ дослідження дотепер залишається досить дороговартісним, технологічно складним у виконанні (багатокроковий метод) та потребує досить тривалого часу. Тому при підборі панелі маркерів в кожному випадку пухлинного процесу важливо мінімізувати їх кількість, спираючись на результати традиційного гістологічного дослідження.

Принципове значення має аналітичний етап ІГХ дослідження, а саме – інтерпретація отриманих результатів експресії окремих антигенів в пухлинних клітинах. Розповсюджена наступна загальна оцінка експресії антигену – дифузна, фокальна (вогнищева) та негативна. Також нерідко застосовують інший підхід оцінювання реакції, а саме метод напівкількісного аналізу з підрахуванням відношення позитивно забарвлених клітин пухлини до загальної кількості пухлинних клітин, що визначається у відсотках. Виділяють 4 градації за величиною відсотку: 0, < 1 %; 1+, 1 – 33 %; 2+, 34 – 66 %; 3+, > 66 % за аналізом зображень у декількох полях зору мікроскопу. Додатково враховують інтенсивність забарвлення клітин: негативне, слабе, помірне та інтенсивне [11–13].

Натепер у практичній діяльності оптимальним вважається застосування 1–4 маркерів для уточнення або встановлення гістологічного типу пухлини легені [14]. Правильно підібрана панель ІГХ маркерів в подальшому може зберегти кошти щодо проведення додаткових, більш дороговартісних діагностичних процедур, значно звужує набір відомих генних мутацій різних підтипів пухлин легень, що пов'язано з подальшим вибором таргетної терапії.

В практичній медицині ІГХ дослідження вимагає глибокого розуміння сутності даного методу, його переваг та обмежень, навичок та виваженого вибору найбільш адекватної панелі маркерів з метою уникнення хибних висновків за

результатами дослідження.

В процесі діагностики злоякісних утворів, у тому числі і пухлин легень, зростає значущість молекулярно-генетичних досліджень та FISH-методу. Не дивлячись на те, що ці методи дослідження є дороговартісними та трудомісткими [15], їх принципове значення полягає у можливості адекватного вибору таргетної терапії в кожному випадку пухлинного враження.

Сучасна класифікація пухлин легень базується на результатах традиційного морфологічного дослідження з подальшим підтвердженням типу/підтипу пухлини при необхідності за додатковим ІГХ дослідженням та з урахуванням генно-молекулярних порушень. Згідно до останнього перегляду ВООЗ класифікації пухлин легень (2021 р.) [16] новоутворення поділяють на пухлини епітеліального типу, нейроендокринні пухлини, пухлини з ектопічних тканин, мезенхімальні пухлини, специфічні для легень, пухлини типу слинних залоз та пухлини гематолімфатичної системи.

З практичного досвіду відомо, що найбільшу групу злоякісних пухлин легень складають пухлини епітеліального типу, серед них переважають аденокарциноми різних гістологічних підтипів, плоскоклітинна та крупноклітинна карциноми. За даними різних авторів частота різних підтипів аденокарциноми легень складає біля 40–50 % випадків пухлин легень, плоскоклітинної карциноми – 25–30 % та великоклітинної карциноми – 5–10 % випадків [14, 17, 18].

Мета – представити власний досвід та оцінити можливість імуногістохімічної діагностики солітарних злоякісних вогнищевих уражень легень в умовах клінічної практики.

Матеріали та методи

Проведено ретроспективне когортне дослідження, до якого увійшли 56 пацієнтів зі злоякісними СЛУ, які отримали лікування в стаціонарі клініки ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України» впродовж 2017–2021 рр. Серед них було 39 (69,6 %) жінок та 17 (30,4 %) чоловіків. Середній вік жінок склав $54,8 \pm 9,7$ р. (діапазон 29–69 років), чоловіків – $59,0 \pm 13,2$ р. (діапазон 16–76 років).

В усіх випадках на час госпіталізації пацієнтам було проведено рентгенологічне дослідження та/або комп'ютерна томографія органів грудної порожнини. В 47 (84,0 %) випадках за рентгенологічними даними не було визначено природу утвору, попередній клінічний діагноз був – «новоутворення легень невідомої етіології». В 5 (8,9 %) випадках була запідозрена злоякісна пухлина легень за характеристиками утворення на томограмах, ще у 4 (7,1 %) випадках діагностовано інші патологічні процеси (ателектаз легень, постзапальний фіброз, ретенційна кіста, вогнищева пневмонія). У кожного з пацієнтів було

виявлено 1–2 вогнищевих утвори в легенях, причому максимальні розміри кожного вузла не перевищували 3 см. У групу дослідження були включені лише пацієнти із первинними пухлинами легень. Пацієнти з одиночними метастазами в легені були виключені з дослідження.

В усіх випадках було здійснено хірургічне видалення злоякісних вогнищевих легеневиких утворів. В 31 (55,4 %) випадку виконано лобектомію, в 22 (39,3 %) випадках – атипичну або сегментарну резекцію легень, в 2-х (3,6 %) випадках – здійснена енуклеація утвору та в 1-му (1,7 %) випадку – пульмонектомія. У випадку пульмонектомії інтраопераційно було встановлено, що утвір, основний об'єм якого був розташований у верхній частці лівої легені, вросав у нижню частку. В ході операції консиліумом хірургів прийнято рішення про недоцільність виконання комбінованої резекції легень через ризик виникнення важких післяопераційних ускладнень.

При надходженні операційного матеріалу в патогістологічну лабораторію проводили традиційну вирізку матеріалу – вирізали шматочки тканини з пухлинним ростом на межі з візуально незміненою легеневою тканиною та в центральних ділянках пухлини, орієнтовними середніми розмірами $1,0 \times 1,0 \times 0,4$ см. Шматочки фіксували у 10,0 % розчині забуференого (нейтрального) формаліну впродовж 24–48 годин, потім піддавали стандартній проводці у висхідних розчинах спиртів, остаточно зневоднювали у хлороформі та заливали в парафінові блоки. З парафінових блоків виготовляли серійні зрізи тканини товщиною 4–5 мкм. Традиційне морфологічне дослідження проводили із застосуванням рутинного забарвлення зразків гематоксиліном та еозином [19]. Мікроскопічне дослідження здійснювали на мікроскопі Olympus BX41, робочі збільшення $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$. Імуногістохімічне дослідження проводили згідно до стандартного протоколу, який рекомендується країною-виробником анти-тіл. Для ідентифікації реакцій використовували високочутливу систему візуалізації DAB Quanto, з нанесенням в якості хромогену 3-діамінобензидин тетрагідрохлорид (Thermo Scientific, США). В роботі використані моноклональні антитіла виробництва Master Diagnostica (Іспанія) та Thermo Scientific (США).

Були застосовані наступні маркери (табл. 1).

В гістологічній діагностиці первинних злоякісних вузлів легень керувалися класифікацією ВООЗ пухлин легень останнього перегляду [16].

Результати реакції в гістологічному зразку при ІГХ дослідженні оцінювали наступним чином: дифузна позитивна – ≥ 60 % забарвлених клітин пухлини; фокальна позитивна (вогнищева) – 10–59 % забарвлених клітин пухлини та негативна – менше 10 % забарвлених клітин пухлини [20, 21].

Таблиця 1

Імуногістохімічні маркери для діагностики злоякісних вогнищевих уражень легень

Антитіло	Клон	Розведення	Особливості забарвлення
Thyroid transcription factor-1 (TTF-1)	SPT24	RTU	ядро
Napsin A	BS10	RTU	цитоплазма
Cytokeratin AE1-AE3 (Pan-CK)	AE1/AE3	RTU	цитоплазма, мембрана
Cytokeratin 5/6 (CK5/6)	EP67+EP24	RTU	цитоплазма
Cytokeratin 7 (CK7)	OVTL 12/30	RTU	цитоплазма
Cytokeratin 8 (CK8)	EP17	RTU	цитоплазма, мембрана
Cytokeratin 18 (CK18)	DC-10	RTU	цитоплазма
Cytokeratin 20 (CK20)	Ks20.8	RTU	цитоплазма
CD56	123C3	RTU	цитоплазма, мембрана
Synaptophysin	EP158	RTU	цитоплазма
Chromogranin A	LK2H102	RTU	цитоплазма
p40	ZR8	RTU	ядро
p63	4A4	RTU	ядро
Ki-67	SP6	1:200	ядро
Vimentin	SP20	RTU	цитоплазма, ядро
S100	4 C4.9	RTU	цитоплазма, ядро
Smooth Muscle Actin (SMA)	1A4	RTU	цитоплазма
SOX-10	EP268	RTU	ядро
Epithelial membrane antigen (EMA)	E29	RTU	мембрана
CD34	QB-End/10	RTU	мембрана
Ракowo-ембріональний антиген (CEA)	COL-1	RTU	цитоплазма
CD117 (c-Kit)	Ab-1	RTU	цитоплазма, мембрана

Таблиця 2

Результати рутинної морфологічної діагностики одиночних злоякісних вогнищевих уражень легень

Гістологічний висновок	Кількість випадків	
	абс.	%
Аденокарцинома легень	34	60,7
Плоскоклітинна карцинома	6	10,7
Нейроендокринні пухлини	6	10,7
Великоклітинна карцинома, в тому числі з нейроендокринним компонентом	6	10,7
Пухлини типу слинних залоз	3	5,4
Диференційна діагностика між атиповою аденоматозною гіперплазією та аденокарциномою in situ	1	1,7
Загалом	56	100,0

Результати та їх обговорення

За результатами традиційного гістологічного дослідження були отримані наступні висновки, результати наведені в таблиці 2.

Найбільш часто було діагностовано аденокарциноми легень (34 випадки, 60,7 %), причому в 41,2 % випадків визначені аденокарциноми змішаної гістологічної будови, без муциноутворення. Більш рідко діагностували плоскоклітинну, великоклітинну карциному та нейроендокринну пухлину – по 6 (10,7 %) випадків відповідно. Наші дані узгоджуються з результатами подібних досліджень, в яких аденокарциноми легень, за традиційним гістологічним дослідженням, переважали серед інших гістологічних типів пухлин, а саме визначалися у 50–60 % випадків. На другому та третьому місці за частотою діагностували плоскоклітинну та великоклітинну карциному – 20–30 % та 7–10 % випадків відпо-

відно [18, 22, 23].

З метою уточнення гістологічного типу злоякісної пухлини та для визначення подальшої медичної тактики в усіх випадках було проведено ІГХ дослідження, яке базувалося на попередньому гістологічному висновку. Отримані нами результати застосування різних антитіл у разі злоякісних СЛУ наведено в таблицях 3–4.

Основними широкоживаними діагностичними маркерами у випадках розвитку аденокарциноми легень є TTF-1, Napsin A та CK7 [22, 24–26]. За результатами нашого дослідження (табл. 3), в усіх випадках їх застосування вищезгадані маркери продемонстрували дифузну позитивну реакцію, незалежно від гістологічного підтипу пухлини. Napsin A представляє собою фермент, який відноситься до аспарагінових протеїназ, та є високоспецифічним маркером саме в діагностиці аденокарцином легень. Як правило, позитив-

Таблиця 3

Позитивні реакції основної панелі антитіл в одиночних злоякісних вогнищевих утворах легень

Тип пухлини, абс.	Діагностичні маркери: кількість позитивних реакцій/загальна кількість проведених реакцій (%)									
	CK7	TTF-1	Napsin A	CK20	CK5/6	p40	p63	Chromogranin A	Synaptophysin	CD56
Аденокарцинома легені (n=36)	34/34 (100)	36/36 (100)	36/36 (100)	2/20 (10,0)	1/5 (20,0)	0/2	0/3	1/5 (20,0)	2/4 (50,0)	0/1
Плоскоклітинна карцинома легені (n=6)	0/6	0/2	0/2		6/6 (100)	4/4 (100)	5/5 (100)	0/3	0/2	0/1
Аденосквамозна карцинома (n=2)	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)		2/2 (100)		2/2 (100)			
Нейроендокринна пухлина (карциноїд) (n=5)	1/1 (100)	4/4 (100)			0/1			5/5 (100)	4/4 (100)	2/2 (100)
Великоклітинна карцинома (n=1)	1/1 (100)	1/1 (100)	0/1		0/1	0/1	0/1		0/1	0/1
Великоклітинна нейроендокринна карцинома (n=3)	1/3 (33,3)	2/2 (100)	0/1		0/2		0/1	1/3 (33,3)	3/3 (100)	1/1 (100)
Пухлини типу слинних залоз (n=3)	2/2 (100)	0/2	1/1 (100)		2/2 (100)	0/1	1/1 (100)	0/1	0/2	

Таблиця 4

Позитивні реакції додаткової панелі антитіл в одиночних злоякісних вогнищевих утворах легень

Тип пухлини, абс.	Діагностичні маркери: кількість позитивних реакцій/загальна кількість проведених реакцій (%)									
	Pan-CK	CK8	CK18	Vimentin	S100	SMA	CD34	CEA	CD117	Ki-67
Аденокарцинома легені (n=36)	1/1 (100)	2/2 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)						
Плоскоклітинна карцинома легені (n=6)			0/1		0/1					2/2 (100)
Аденосквамозна карцинома (n=2)		1/1 (100)		1/1 (100)						
Нейроендокринна пухлина (карциноїд) (n=5)		2/2 (100)	2/2 (100)	0/2	0/1	0/1	0/1			5/5 (100)
Великоклітинна карцинома (n=1)		1/1 (100)								
Великоклітинна нейроендокринна карцинома (n=3)				1/2 (50,0)						3/3 (100)
Пухлини типу слинних залоз (n=3)	1/1 (100)	1/1 (100)		1/2 (50,0)	1/2 (50,0)	1/1 (100)		1/1 (100)	0/1	1/1 (100)

В одиночних випадках аденокарцином легень були застосовані маркери, більш специфічні та чутливі для плоскоклітинної карциноми та пухлин з нейроендокринним компонентом. Лише в одному випадку спостерігали дифузну позитивну реакцію з CK5/6, яка може визначатися у 10–50 % випадків аденокарцином легень [24, 27]. Експресію p63 та p40 спостерігали тільки в залишкових структурах нормальної легеневої паренхіми. В окремих випадках, з метою уточнення гістологічного підтипу аденокарциноми легені, а саме – фетального, застосовані нейроендокринні маркери. В одному випадку чітка вогнищева експресія була визначена з Synaptophysin та Chromogranin A, в іншому – тільки з Synaptophysin, при негативній реакції з Chromogranin A, що підтвердило їх належність до відповідного гістологічного підтипу [24, 25]. У 2-х випадках отримано дифузну позитивну реакцію з CK20, який є специфічним маркером аденокарцином легені зі слизоутворенням [24, 25].

Можна зауважити, що згідно сучасним керівництвам у випадках підозри на аденокарциному легені зі слизоутворенням та за відсутності скупчень слизових мас позаклітинно і негативної реакції з CK20, рекомендується застосовувати ШИК-реакцію з діастазою [16, 24, 25].

В одиночних випадках спостерігали дифуз-

ну позитивну реакцію з Рап-СК, CK8 та CK18, але ці маркери не мали вирішального діагностичного значення у визначенні підтипу аденокарциноми, оскільки вони підтверджують лише належність до пухлин епітеліального типу.

В 3-х випадках з попереднім гістологічним діагнозом «аденокарцинома легені», з метою виключення метастатичного ураження, були застосовані маркери, специфічні при пухлинах кишечника, молочної залози та жіночих статевих органів (Wilms Tumor, CDX-2, SATB-2, GATA3, PDX-1). Результати реакції з відповідними маркерами були негативними.

За визначеними імунoproфілями первинної аденокарциноми легень, яка за радіологічним описом відповідала солітарному вогнищевому (вузловому) ураженню легені розмірами до 3 см, отримані наступні результати:

- аденокарцинома легені різної гістологічної будови – 32 (88,8 %) випадки;
- аденокарцинома легені фетального типу – 2 (5,6 %) випадки;
- аденокарцинома легені муцинозного типу – 2 (5,6 %) випадки.

Таким чином, основна панель маркерів у випадках аденокарцином легень, діагностованих за гематоксилін-еозином, включає TTF-1, Napsin A та CK7 (рис. 1 (A–D)).

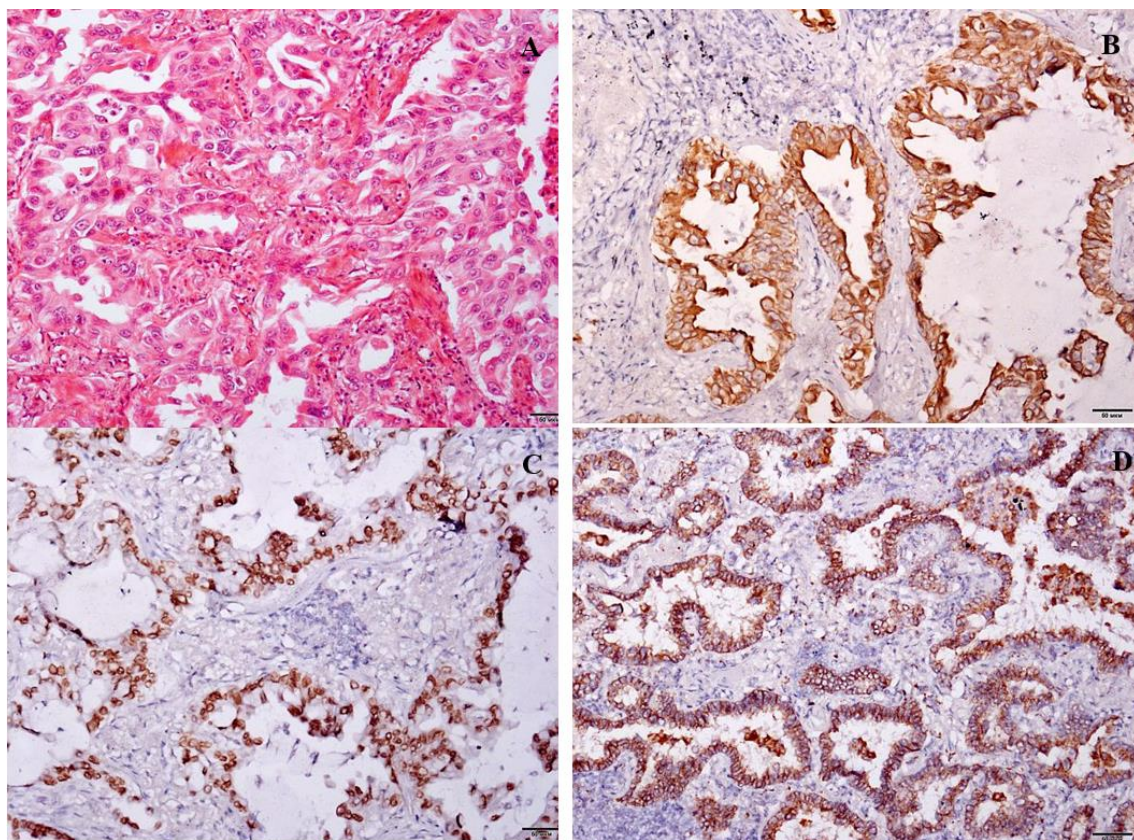


Рис. 1. А. Аденокарцинома легені. Забарвлення гематоксиліном і еозином. В. Експресія CK7, клон OVTL 12/30. С. Експресія TTF-1, клон SPT24. D. Експресія Napsin A, клон BS10. $\times 100$.

Корисні додаткові маркери – CK20 та Chromogranin A (та/або Synaptophysin) (рис. 2.) для уточнення окремих підтипів аденокарциноми.

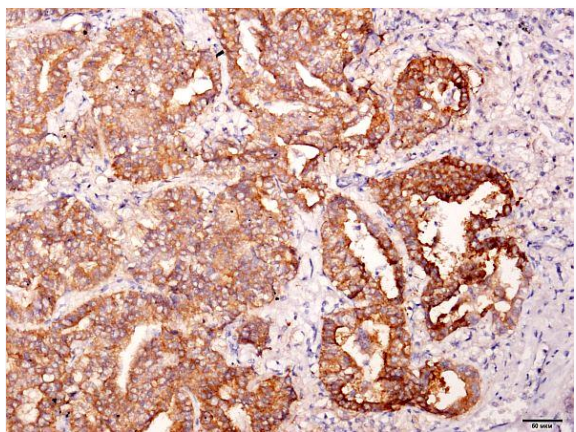


Рис. 2. Аденокарцинома легень фетального типу. Експресія Synaptophysin, клон EP158. $\times 100$.

На сьогоднішній день з'ясовано, що високочутливими та специфічними маркерами плоскоклітинної карциноми легень є наступні антитіла – p40, p63 та CK5/6 [28]. Вважається, що p40 є більш специфічним маркером плоскоклітинної карциноми порівняно з p63, оскільки останній може вказувати вогнищеве позитивне забарвлення у випадках деяких аденокарцином легень [11, 14]. З інших джерел літератури відомо, що специфічність p63 підвищується в комбінації з CK5/6 [10]. У нашому дослідженні дифузна позитивна реакція з основними маркерами плоскоклітинної карциноми (p40, p63 та CK5/6) спостерігалася в 3-х випадках. Ще в 2-х випадках застосовано маркери p63 та CK5/6, при цьому експресія з p63 мала дифузний характер, а позитивна реакція з CK5/6 визначалась як дифузна та вогнищева. Та в одному випадку застосували маркери p40 та CK5/6, дифузну позитивну реакцію спостерігали з обома маркерами. Використання в одиночних випадках підозри на можливість нейроендокринного компоненту пухлини 1–2 додаткових маркерів (Chromogranin A, Synaptophysin та CD56) продемонструвало негативну реакцію. В 2-х випадках було застосовано маркер Ki-67. Проліферативна активність клітин пухлини в одному випадку склала 65 %, в іншому – 70–80 %, що є характерною ознакою злоякісних пухлин. За даними літератури, у випадках плоскоклітинної карциноми високий індекс проліферації (Ki-67) вказує на агресивний характер пухлини та може застосовуватися як показник прогнозу ризику рецидиву пухлини [26, 29].

Таким чином, основними корисними діагностичними маркерами плоскоклітинної карциноми за результатами нашого дослідження виявилися p40, p63 та CK5/6 (рис. 3 (А–С)).

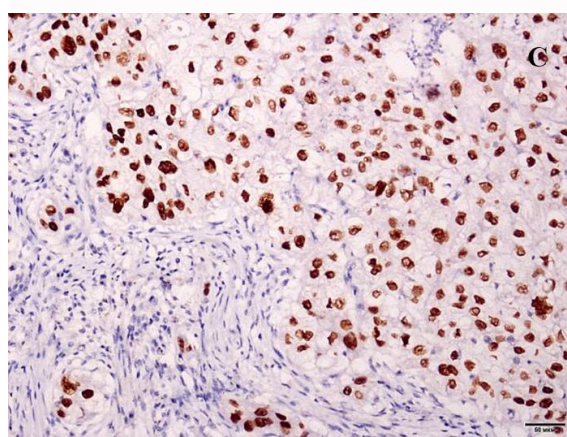
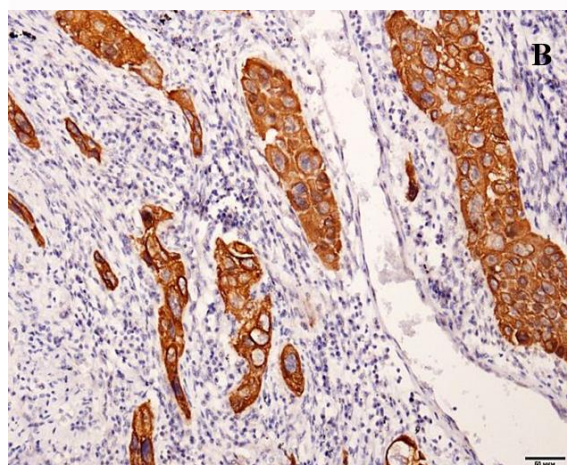
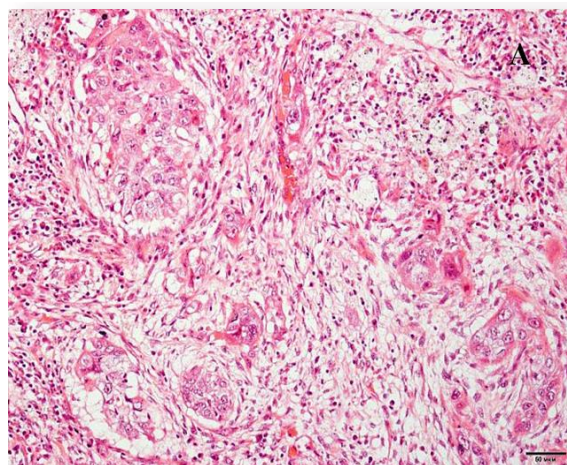


Рис. 3. А. Плоскоклітинна карцинома легень. Забарвлення гематоксиліном і еозином. В. Експресія CK5/6, клон EP67+EP24. С. Експресія p63, клон 4A4. $\times 100$.

Аденосквамозна карцинома, яка знову увійшла до класифікації пухлин легень у вигляді окремої одиниці [16], є рідкісним гістологічним типом серед злоякісних пухлин легень [30–32], та за традиційним гістологічним дослідженням представлена елементами як аденокарциноми, так і плоскоклітинної карциноми, причому частка кожного з компонентів пухлини має складати не менше 10 % [31–33]. В цих випадках нами визначено дифузну та вогнищеву позитивну реакцію.

кцію з CK7, TTF-1, Napsin A, p63 та CK5/6. В одному випадку спостерігали вогнищеву позитивну реакцію з CK8 та Vimentin.

Тобто, у випадках аденосквамозної карциноми, за нашими результатами, панель основних діагностичних маркерів складалася з CK7, TTF-1, Napsin A, p63 та CK5/6.

У випадку великоклітинної карциноми легень дифузна позитивна реакція спостерігалася з CK7, CK8 та TTF-1, при негативній реакції з Napsin A. Позитивна реакція з CK5/6, p40, p63, Synaptophysin та CD56 визначена в одиночних клітинах пухлини, що, на нашу думку, було пов'язано із залишковими бронхіальними структурами, таку реакцію розцінювали як негативну. Тобто, у випадках великоклітинної карциноми, попередньо так діагностованої за гематоксилін-еозином, позитивні діагностичні маркери були наступні – CK7, CK8 та TTF-1 у поєднанні з негативною експресією Napsin A, p40 (p63) та маркерів нейроендокринного диференціювання.

Класичними маркерами діагностики нейроендокринних пухлин легень вважаються Synaptophysin (та/або Chromogranin A) та CD56 [34, 35]. Відомо, що Synaptophysin є більш чутливим маркером порівняно до Chromogranin A, проте специфічність останнього вища. Експресія цих двох маркерів відображає функціональний стан секреторних гранул всередині клітин пухлини. Проте в деяких нейроендокринних пухлинах позитивна реакція спостерігається тільки з одним із антитіл, тому доцільно застосувати обидва маркери, оскільки часто вони доповнюють один одного [25, 36].

При нейроендокринних пухлинах (карциномах) застосування Synaptophysin та CD56 виказало дифузну позитивну реакцію в усіх випадках їх застосування. Спостерігалася вогнищева позитивна реакція з Chromogranin A, TTF-1, CK7, CK8 та CK18, при негативній реакції з CK5/6, S100, SMA, CD34 та Vimentin. В усіх випадках визначено проліферативну активність клітин пухлини (Ki-67), вона була в межах 5–20 %.

У випадках діагностики великоклітинної нейроендокринної карциноми легень була визначена дифузна експресія Synaptophysin та CD56 в усіх випадках їх застосування, а Chromogranin A – лише в одному випадку. Наші результати узгоджуються з подібними дослідженнями, в яких встановлено, що може визначатися експресія лише одного чи одразу декількох нейроендокринних маркерів [35, 37]. В 2-х випадках спостерігали дифузну позитивну реакцію з TTF-1, що за даними літератури може визначатися у 40–50 % випадків великоклітинної нейроендокринної карциноми легень [24, 35, 38], та виключило можливість метастатичного враження легень. В одному випадку виявлено дифузну позитивну реакцію з CK7. Вогнищеву експресію з Vimentin спостерігали також в одному випадку, а реакція з

p63, Napsin A та CK5/6 була негативною. В 2 із 3-х випадків діагноз великоклітинної нейроендокринної карциноми був підтверджений в спеціалізованих онкологічних установах, з урахуванням отриманого нами ІГХ профілю пухлини.

Широковживаним маркером проліферації є антитіло Ki-67, що представляє білковий комплекс, який з'являється в цитоплазмі клітин в синтетичну фазу клітинного циклу після виходу клітин із стану спокою та переходу до фази підготовки до мітозу. Він дозволяє визначити кількість клітин, які вступають в мітотичний цикл, і, таким чином, характеризує проліферативний потенціал досліджуваної пухлини [39]. Рівень експресії Ki-67 тісно пов'язаний зі ступенем злоякісності пухлин, особливо у випадках нейроендокринних та великоклітинних нейроендокринних пухлин [24, 40]. В усіх випадках великоклітинної нейроендокринної карциноми визначено високий рівень проліферативної активності. В одному випадку від становив 80 %, в інших двох – 40–50 %, що характерно цьому типу злоякісних пухлин легень [24].

Таким чином, панель основних діагностичних маркерів у випадках нейроендокринних пухлин легень різного ступеня злоякісності – Synaptophysin (та/або Chromogranin A), CD56, CK7, TTF-1 та Ki-67.

Досить непростим завданням є правильний підбір панелі ІГХ-маркерів у випадках пухлин легень типу слинних залоз, оскільки існує значна кількість різних гістологічних типів цих утворень, причому як доброякісних, так і злоякісних [16, 41, 42]. Слід намагатися отримати максимальну інформацію ще на етапі традиційного гістологічного дослідження зразків тканини пухлини. Нами було детально проаналізовано макроскопічні характеристики (особливості розташування злоякісного СЛУ, особлива увага надавалася наявності зв'язку зі структурами бронхів), особливості гістологічної будови (клітинний склад пухлини, її гістологічний паттерн, ядерні та цитоплазматичні особливості окремих типів клітин пухлини), оскільки усі зазначені чинники впливають на остаточний вибір панелі антитіл, і такий підхід наразі є загальноприйнятим [41, 42].

В одному випадку при традиційному гістологічному дослідженні клітини пухлини формували залозисті структури, внутрішній шар яких був представлений клітинами епітеліального типу, а зовнішній – клітинами міоепітеліального типу. Просвіт залозистих структур був вивупнений щільними еозинофільними масами. Попередній висновок: ймовірно, пухлина легень типу слинних залоз та було рекомендовано проводити диференційну діагностику між епітеліально-міоепітеліальною карциномою та плеоморфною аденомою за додатковим ІГХ дослідженням. При ІГХ визначена дифузна позитивна реакція з Pan-CK та SMA, реакція з S100 та CEA мала вогни-

щевий характер. Реакція з CD117 та TTF-1 була негативною. Позитивна реакція з Pan-CK свідчила про епітеліальну природу клітин пухлини, а реакція з SMA та S100 дозволила ідентифікувати міоепітеліальні клітини [24, 41–43]. Враховуючи результат ІГХ дослідження, імунопрофіль пухлини відповідав епітеліально-міоепітеліальній карциномі.

В іншому випадку за традиційним гістологічним дослідженням клітини пухлини формували фолікулярні та кріброзні структури. Клітини пухлини були помірно поліморфні, середніх розмірів. Некротичні зміни були відсутні. В результаті була запідозрена аденоїд-кістозна карцинома із групи пухлин легень типу слинних залоз. У цьому випадку за результатами ІГХ дослідження визначена дифузна позитивна реакція з CK7, CK5/6, p63 та Vimentin. Реакція з Synaptophysin була негативною. Показник проліферативної активності з маркером Ki-67 склав біля 20 %, що дало змогу верифікувати гістологічний тип пухлини, а саме – аденоїд-кістозну карциному із групи пухлин саліваторного типу.

У третьому випадку при традиційному гістологічному дослідженні виявлено, що клітини пухлини формували так звані «кісти» (залозистоподібні структури), серед крупних вузлуватих розростань сполучної тканини та масивних осередків некрозу. Клітинний склад пухлинних роз-

ростань був представлений різними клітинами – епідермоїдного типу, клітинами зі слиноутворенням та епітеліальними клітинами проміжного типу. Висновок – ймовірний розвиток мукоепідермоїдної карциноми, додатково слід виключити розвиток аденокарциноми фетального типу. ІГХ дослідження визначило дифузну позитивну реакцію з CK8, а реакція CK7, CK5/6 та Napsin A була вогнищевою. Експресія Synaptophysin, Vimentin та TTF-1 була визначена в поодиноких клітинах, загалом до 5 % усіх клітин пухлини, реакція була розцінена як негативна. Експресія p40, Chromogranin A та S100 була негативною. В цьому випадку імунофенотип пухлини найбільш відповідав мукоепідермоїдній карциномі. За даними зарубіжних джерел літератури саме в мукоепідермоїдній карциномі може визначитися позитивна реакція з CK7, CK8, CK5/6 та p63, при варіабельній експресії Napsin A, TTF-1, S100 та Vimentin [42, 44].

Усі випадки пухлин легень типу слинних залоз були консультовані в профільних установах та встановлений нами гістологічний тип пухлини на основі ІГХ профілю було підтверджено.

Проведено співставлення гістологічного висновку за традиційним забарвленням та заключних гістологічних висновків за результатами ІГХ дослідження (табл. 5).

Таблиця 5
Попередній та заключний гістологічні висновки у випадках первинних злоякісних легневих вузлів

Попередній гістологічний висновок	Кількість випадків, абс.	Заключний гістологічний висновок	Кількість випадків, абс.
Диференційна діагностика між атиповою аденоматозною гіперплазією та аденокарциномою in situ	1	аденокарцинома легені	1
Аденокарцинома легені	34	аденокарцинома легені	33
		аденосквамозна карцинома	1
		плоскоклітинна карцинома	4
Плоскоклітинна карцинома	6	великоклітинна карцинома з нейроендокринним компонентом	2
Нейроендокринна пухлина (карциноїд)	6	нейроендокринна пухлина (карциноїд)	5
		плоскоклітинна карцинома	1
		аденокарцинома легені	2
		плоскоклітинна карцинома	1
Великоклітинна карцинома, в тому числі з нейроендокринним компонентом	6	великоклітинна карцинома	1
		великоклітинна карцинома з нейроендокринним компонентом	1
		аденосквамозна карцинома	1
Пухлини типу слинних залоз	3	пухлини типу слинних залоз	3

Зіставлення отриманого гістологічного висновку при рутинному забарвленні та результатів ІГХ дослідження (див. табл. 5) показало, що в 47 (83,9 %) випадків було підтверджено попередньо встановлений гістологічний тип/підтип пухлини

легені. У 9 (16,1 %) випадках застосування ІГХ дослідження із визначенням імунопрофілю пухлин призвело до зміни гістологічного підтипу пухлини легені, що, як вище згадувалося, принципово важливо для подальшого медичного ве-

дення таких пацієнтів.

Таким чином, результати ІГХ дослідження дозволяють уточнити гістологічний тип/підтип пухлини, ступінь її злоякісності та визначити подальшу тактику лікування пацієнтів і прогноз захворювання. Комплекс таких медичних заходів має метою підвищити якість подальшого життя пацієнтів та знизити рівень смертності від онкологічних захворювань.

Висновки

Морфологічна діагностика з імуногістохімічним дослідженням наразі має провідне значення для найбільш точного та об'єктивного визначення гістологічного типу та уточнення ступеня злоякісності солітарних пухлинних вогнищевих уражень легень в практичній медицині.

За результатами нашого дослідження встановлено доцільні діагностичні маркери та їх комбінації (панелі) у випадках найбільш розповсюджених первинних пухлин легень невеликих розмірів, попередньо діагностованих як солітарні вогнищеві ураження легень неясної природи.

У випадках розвитку аденокарцином легень найбільш доцільне застосування 3-х маркерів: TTF-1, Napsin A та CK7. З метою уточнення окремих підтипів пухлини використовують додаткові маркери – CK20, Chromogranin A (та/або Synaptophysin).

У разі плоскоклітинної карциноми легень можливо обмежитися панеллю з маркерів p40, p63 та CK5/6. При наявності чітких гістологічних ознак плоскоклітинної карциноми при традиційному забарвленні гематоксиліном і еозином імуногістохімічне дослідження проводиться лише за потреби.

У випадках аденосквамозної карциноми найбільше діагностичне значення мають маркери: CK7, TTF-1, Napsin A, CK5/6 та p63.

У випадках нейроендокринних пухлин ле-

гень різного ступеня злоякісності діагностична панель традиційно включає 1-2 маркери нейроендокринного диференціювання – Synaptophysin (та/або Chromogranin A), CD56, а також TTF-1, Ki-67 та один з маркерів низькомолекулярних цитокератинів (CK7, CK8, CK18, CK19).

При попередньому висновку про розвиток великоклітинної карциноми легень діагностична панель має обов'язково враховувати як позитивні, так і негативні реакції панелі маркерів, зокрема, позитивні CK7, CK8 та TTF-1 та негативні Napsin A, p40 (p63).

При попередньому гістологічному висновку за традиційним дослідженням щодо пухлини легень типу слинних залоз панель ІГХ-маркерів має індивідуалізований характер та включає досить велику кількість антитіл.

Перспективи подальших досліджень

Подальше накопичення досвіду застосування ІГХ дослідження в практичній медицині дозволить більш раціонально підбирати панель маркерів у кожному випадку первинних пухлин легень, аналізувати реальні сучасні дані щодо поширеності окремих гістологічних типів та підтипів пухлин легень серед населення України. Безперервна розробка нових, більш специфічних та чутливих маркерів у випадках різних гістологічних типів пухлин легень також дозволить покращити якість та результативність власне ІГХ дослідження.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної теми «Удосконалити морфологічну діагностику вогнищевих уражень легень» (номер державної реєстрації 0122U000553).

Літературні джерела References

1. Ost DE, Gould MK. Decision making in patients with pulmonary nodules. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(4):363–72. doi: 10.1164/rccm.201104-0679CI.
2. Khan T, Usman Y, Abdo T, Chaudry F, Keddissi JI, Youness HA. Diagnosis and management of peripheral lung nodule. *Ann Transl Med*. 2019 Aug;7(15):348. doi: 10.21037/atm.2019.03.59.
3. Bororov LV, Semivolos AV, Kobzev OI, Sovenko VM, Borisyuk BO, Shevchenko AI, Klapchuk OG. [Treatment of patients with malignancies of various localizations spread into the lungs]. *Oncology*. 2009;11:286–287. <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/19707>. Ukrainian.
4. Raad RA, Suh J, Harari S, Naidich DP, Shiau M, Ko JP. Nodule characterization: subsolid nodules. *Radiol Clin North Am*. 2014 Jan;52(1):47–67. doi: 10.1016/j.rcl.2013.08.011.
5. Bertolaccini L, Batirel H, Brunelli A, Gonzalez-Rivas D, Ismail M, Ucar AM, Ng CSH, Scarci M, Sihoe ADL, Ugalde PA, Akar FA, Bedetti B, Nadal SB, Brandolini J, Crucitti P, Enyedi A, Fernando HC, Furak J, Gallego-Poveda J, Galvez-Munos C, Hanke I, Hernandez-Arenas LA, Janik M, Juhos P, Libretti L, Lucciarini P, Macri P, Margaritora S, Mahoozi HR, Nachira D, Pardolesi A, Pischik V, Sagan D, Schreurs H, Sekhniaidze D, Socci L, Tosi D, Turna A, Vannucci F, Zielinski M, Rocco G. Corrigendum to 'Uniportal video-assisted thoracic surgery lobectomy: a consensus report from the Uniportal VATS Interest Group (UVIG) of the Eu-

- ropean Society of Thoracic Surgeons (ESTS). *Eur J Cardiothorac Surg.* 2019;56(3): 628-629. doi: 10.1093/ejcts/ezz229.
6. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res.* 2016;5(3):288-300. doi:10.21037/tlcr.2016.06.07.
7. Zhu F, Liu Z, Hou Y, He D, Ge X, Bai C, Jiang L, Li S. Primary salivary gland-type lung cancer: clinicopathological analysis of 88 cases from China. *J Thorac Oncol.* 2013 Dec;8(12):1578-84. doi: 10.1097/JTO.0b013e3182a7d272.
8. Petrov SV, Raikhlin NT. [Manual on immunohistochemical diagnostics of human tumors]. 4th, revised and extended edition. Kazan, 2012, 623 p. Russian.
9. Gurda GT, Zhang L, Wang Y, Chen L, Geddes S, Cho WC, Askin F, Gabrielson E, Li QK. Utility of five commonly used immunohistochemical markers TTF-1, Napsin A, CK7, CK5/6 and P63 in primary and metastatic adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: a retrospective study of 246 fine needle aspiration cases. *Clin Transl Med.* 2015 Apr 21;4:16. doi: 10.1186/s40169-015-0057-2.
10. Umakanthan S, Chalapathi Rao AV, Mohammed W. Role of immunohistochemistry markers in neoplastic lung lesions. *J Cancer Res Ther.* 2021 Oct-Dec;17(6):1382-1388. doi: 10.4103/jcrt.JCRT_187_19.
11. Argon A, Nart D, Veral A. The Value of Cytokeratin 5/6, p63 and Thyroid Transcription Factor-1 in adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and non-small-cell lung cancer of the lung. *Türk Patoloji Derg.* 2015;31(2):81-8. doi: 10.5146/tjpath.2015.01302.
12. Rekhtman N, Ang DC, Sima CS, Travis WD, Moreira AL. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol.* 2011 Oct;24(10):1348-59. doi: 10.1038/modpathol.2011.92.
13. Walia R, Jain D, Madan K, Sharma MC, Mathur SR, Mohan A, Iyer VK, Kumar L. p40 & thyroid transcription factor-1 immunohistochemistry: a useful panel to characterize non-small cell lung carcinoma-not otherwise specified (NSCLC-NOS) category. *Indian J Med Res.* 2017 Jul;146(1):42-48. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_1221_15.
14. Carney JM, Kraynie AM, Roggli VL. Immunostaining in lung cancer for the clinician. Commonly used markers for differentiating primary and metastatic pulmonary tumors. *Ann Am Thorac Soc.* 2015 Mar;12(3):429-35. doi: 10.1513/AnnalsATS.201501-004FR.
15. Hofman P. ALK in non-small cell lung cancer (NSCLC) pathobiology, epidemiology, detection from tumor tissue and algorithm diagnosis in a daily practice. *Cancers (Basel).* 2017 Aug 12;9(8):107. doi: 10.3390/cancers9080107.
16. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, Dacic S, Jain D, Kerr KM, Lantuejoul S, Noguchi M, Papotti M, Rekhtman N, Scagliotti G, van Schil P, Sholl L, Yatabe Y, Yoshida A, Travis WD. The 2021 WHO classification of lung tumors: impact of advances since 2015. *J Thorac Oncol.* 2022 Mar;17(3):362-387. doi: 10.1016/j.jtho.2021.11.003.
17. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-small cell lung cancer: epidemiology, screening, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2019 Aug;94(8):1623-1640. doi: 10.1016/j.mayocp.2019.01.013.
18. Yang L, Zhang Q, Bai L, Li TY, He C, Ma QL, Li LS, Huang XQ, Qian GS. Assessment of the cancer risk factors of solitary pulmonary nodules. *Oncotarget.* 2017 Apr 25;8(17):29318-29327. doi: 10.18632/oncotarget.16426.
19. Korzhevskiy DE, Gilyarov AV. [Basics of histological technique]. SPb(Rus): SpetsLit, 2010. 63-64 p. Russian.
20. Fedchenko N, Reifnath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. *Diagn Pathol.* 2014 Nov 29;9:221. doi: 10.1186/s13000-014-0221-9.
21. Fletcher CDM. Diagnostic histopathology of tumors. 4th ed. PA: Elsevier; 2013. 1148 p.
22. Brunnström H, Johansson L, Jirstrom K, Jönsson M, Jönsson P, Planck M. Immunohistochemistry in the differential diagnostics of primary lung cancer: an investigation within the Southern Swedish Lung Cancer Study. *Am J Clin Pathol.* 2013 Jul;140(1):37-46. doi: 10.1309/AJCP50RDXSCSBTBO.
23. Neumann JM, Freitag H, Hartmann JS, Niehaus K, Galanis M, Griesshammer M, Kellner U, Bednarz H. Subtyping non-small cell lung cancer by histology-guided spatial metabolomics. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2022 Feb;148(2):351-360. doi: 10.1007/s00432-021-03834-w.
24. Tuffaha SAM, Gichka S, Guski H, Christiansen G. [Immunohistochemistry in the diagnosis of tumors]. 2018. 316 p. Russian.
25. Rekhtman N, Braine MK, Bishop JA. [Quick reference handbook for surgical pathologists]; per. from english. Ed. Krivolapova YuA. 2021. 300 p. Russian.
26. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, Warth A, Russell PA, Lantuejoul S, Beasley MB, Thunnissen E, Pelosi G, Rekhtman N, Bubendorf L, Mino-Kenudson M, Yoshida A, Geisinger KR, Noguchi M, Chirieac LR, Bolting J, Chung JH, Chou TY, Chen G, Poleri C, Lopez-Rios F, Papotti M, Sholl LM, Roden AC, Travis WD, Hirsch FR, Kerr KM, Tsao MS, Nicholson AG, Wistuba I, Moreira AL. Best practices recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2019 Mar;14(3):377-407. doi:

10.1016/j.jtho.2018.12.005.

27. Völkel C, De Wispelaere N, Weidemann S, Gorbokon N, Lennartz M, Luebke AM, Hube-Magg C, Kluth M, Fraune C, Möller K, Bernreuther C, Lebok P, Clauditz TS, Jacobsen F, Sauter G, Uhlig R, Wilczak W, Steurer S, Minner S, Krech RH, Dum D, Krech T, Marx AH, Simon R, Burandt E, Menz A. Cytokeratin 5 and cytokeratin 6 expressions are unconnected in normal and cancerous tissues and have separate diagnostic implications. *Virchows Arch.* 2022 Feb;480(2):433-447. doi: 10.1007/s00428-021-03204-4.

28. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MS, Wistuba I, WHO Panel. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol.* 2015 Sep;10(9):1243-1260.

29. Masuda D, Masuda R, Matsuzaki T, Imamura N, Aruga N, Tanaka M, Inokuchi S, Kijima H, Iwazaki M. Ki-67 labeling index affects tumor infiltration patterns of lung squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep.* 2015 Nov;12(5):7303-9. doi: 10.3892/mmr.2015.4354.

30. Li C, Lu H. Adenosquamous carcinoma of the lung. *Onco Targets Ther.* 2018 Aug 14;11:4829-4835. doi: 10.2147/OTT.S164574.

31. Li C, Zheng X, Li P, Wang H, Hu J, Wu L, Wang Z, Guo H, Wu F, Zhong W, Zhou C, Chu Q, Zhao J, Zheng X, Xiao W, Zhu W, Zhang L, Li Q, Jiang K, Miao Q, Wu B, Xu Y, Wu S, Wang H, Yang S, Li Y, Xia X, Yi X, Huang C, Zhu B, Lin G. Heterogeneity of tumor immune microenvironment and real-world analysis of immunotherapy efficacy in lung adenosquamous carcinoma. *Front Immunol.* 2022 Aug 12;13:944812. doi: 10.3389/fimmu.2022.944812.

32. Rao N. Adenosquamous carcinoma. *Semin Diagn Pathol.* 2014 Jul;31(4):271-7. doi: 10.1053/j.semdp.2014.06.004.

33. Borczuk AC. Uncommon types of lung carcinoma with mixed histology: sarcomatoid carcinoma, adenosquamous carcinoma, and mucoepidermoid carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2018 Aug;142(8):914-921. doi: 10.5858/arpa.2017-0584-RA. PMID: 30040455.

34. Metovic J, Barella M, Bianchi F, Hofman P, Hofman V, Remmelink M, Kern I, Carvalho L, Pattini L, Sonzogni A, Veronesi G, Harari S, Forest F, Papotti M, Pelosi G. Morphologic and molecular classification of lung neuroendocrine neoplasms. *Virchows Arch.* 2021 Jan;478(1):5-19. doi: 10.1007/s00428-020-03015-z.

35. Andrini E, Marchese PV, De Biase D, Mosconi C, Siepe G, Panzuto F, Ardizzoni A, Campana D, Lamberti G. Large cell neuroendocrine carcinoma of the lung: current understanding and challenges. *J Clin Med.* 2022 Mar 7;11(5):1461. doi: 10.3390/jcm11051461.

36. Modlin I. M., Gustafsson B. I., Moss S. F. et al. Chromogranin A – biological function and clinical utility in neuroendocrine tumor disease. *Ann Surg Oncol* 2010;17 (9):2427–43. doi: 10.1245/s10434-010-1006-3.

37. Hayoune A, Mahfoud I, Thouil A, Kouismi H. Large cell neuroendocrine carcinoma of the lung: a case series of 14 cases. *Cureus.* 2022 Aug 1;14(8):e27559. doi: 10.7759/cureus.27559.

38. Lindsay CR, Shaw EC, Moore DA, Rassl D, Jamal-Hanjani M, Steele N, Naheed S, Dick C, Taylor F, Adderley H, Black F, Summers Y, Evans M, Rice A, Fabre A, Wallace WA, Nicholson S, Haragan A, Taniere P, Nicholson AG, Laing G, Cave J, Forster MD, Blackhall F, Gosney J, Popat S, Kerr KM. Large cell neuroendocrine lung carcinoma: consensus statement from The British Thoracic Oncology Group and the Association of Pulmonary Pathologists. *Br J Cancer.* 2021 Oct;125(9):1210-1216. doi: 10.1038/s41416-021-01407-9.

39. Finkova EP. [The results of immunohistochemical study of signaling pathways' markers of proliferation in uterine leiomyoma in women using hormonal contraception]. *Morphologia.* 2021;15(1):67-72. doi: https://doi.org/10.26641/1997-9665.2021.1.67-72. Ukrainian.

40. Ramirez RA, Beyer DT, Diebold AE, Voros BA, Chester MM, Wang YZ, Boudreaux JP, Woltering EA, Uhlhorn AP, Ryan P, Campeau RJ, Anthony LB. Prognostic factors in typical and atypical pulmonary carcinoids. *Ochsner J.* 2017 Winter;17(4):335-340.

41. Falk N, Weissferdt A, Kalhor N, Moran CA. Primary pulmonary salivary gland-type tumors: A Review and Update. *Adv Anat Pathol.* 2016 Jan;23(1):13-23. doi: 10.1097/PAP.0000000000000099.

42. Wang M, Gilani S, Xu H, Cai G. Salivary gland-type tumors of the lung. *Arch Pathol Lab Med.* 2021 Nov 1;145(11):1379-1386. doi: 10.5858/arpa.2021-0093-RA.

43. Weissferdt A., Kalhor N., Moran C. A. Primary pulmonary salivary gland-type tumors: a review and update. *Adv Anat Pathol* 2016;23:13–23.

44. Limaïem F, Lekkala MR, Sharma S. Mucoepidermoid lung tumor. 2023 Jan 1. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. PMID: 30725962. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537277/.

Ліскіна І.В., Загаба Л.М. Можливості імуногістохімічного дослідження в практичній діагностиці одиночних злоякісних вогнищевих уражень легень.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Натепер морфологічна діагностика з імуногістохімічним (ІГХ) дослідженням дозволяє об'єктивно установити гістологічну належність злоякісних солітарних легеневиخ утворів (СЛУ). **Мета** – представити власний досвід та оцінити можливості імуногістохімічної діагностики солітарних злоякісних вогнищевих уражень легень в умовах клінічної практики. **Методи.** Проведено ретроспективне когортне дослідження, до якого увійшло 56 випадків первинних злоякісних СЛУ, які було видалено при хірургічному втручанні. Всі новоутворення підлягали традиційному гістологічному дослідженню, в подальшому проводили ІГХ дослідження згідно до стандартного протоколу. Реакцію антигенів оцінювали як дифузну ($\geq 60\%$ забарвлених клітин пухлини), фокальну ($10\text{--}59\%$ забарвлених клітин пухлини) та негативну (менше 10% забарвлених клітин пухлини). **Результати.** В 34 ($60,7\%$) випадках за традиційним морфологічним дослідженням діагностували аденокарциноми легень різних гістологічних підтипів. Рідше – плоскоклітинну, великоклітинну карциному та нейроендокринну пухлину (по 6 випадків, $10,7\%$ відповідно). В 3 ($5,4\%$) випадках діагностували пухлини легень саліваторного типу і в 1 ($1,8\%$) випадку виникла необхідність диференційної діагностики передракового процесу та істинної пухлини. Проведене ІГХ дослідження дозволило в 36 випадках визначити аденокарциноми легень різної гістологічної будови. Позитивна реакція з TTF-1, Napsin A та CK7 була в усіх випадках їх застосування. У 2-х випадках встановлено аденокарциному муцинозного (позитивна реакція з CK20) та в 2-х – аденокарциному фетального типу (позитивна реакція з Synaptophysin та/або Chromogranin A). У разі плоскоклітинної карциноми легень спостерігали дифузну експресію p40 та/або p63, при дифузній та вогнищевій експресії CK5/6 в усіх випадках їх застосування. При аденосквамозній карциномі визначено дифузну та вогнищеву позитивну реакцію з CK7, TTF-1, Napsin A, p63 та CK5/6. У випадку великоклітинної карциноми спостерігали дифузну позитивну реакцію з CK7, CK8 та TTF-1, при негативній реакції з Napsin A, CK5/6, p40, p63, Synaptophysin та CD56. За попередньо діагностованими карциномами легень забарвлення з Synaptophysin та CD56 виказало дифузну позитивну реакцію, при вогнищевій реакції з Chromogranin A, TTF-1, CK7, CK8 та CK18 в усіх випадках їх застосування. Індекс проліферації (Ki-67) був у межах $5\text{--}20\%$. У разі великоклітинної нейроендокринної карциноми дифузна позитивна реакція спостерігалась з Synaptophysin, TTF-1 та CD56 в усіх випадках їх застосування, та в одному випадку з Chromogranin A та CK7. Індекс проліферації (Ki-67) склав $40\text{--}80\%$. У випадках пухлин легень типу слинних залоз панель ІГХ маркерів підбирали індивідуально, до неї включали відносно велику кількість антитіл. Зіставлення гістологічного висновку за традиційним дослідженням та результатів ІГХ підтвердило попередньо визначений гістологічний тип/підтип пухлини легень в 47 ($83,9\%$) випадках. У 9 ($16,1\%$) випадках визначений імунопрофіль призвів до зміни гістологічного типу пухлини легень, що принципово важливо для подальшого медичного ведення таких пацієнтів. **Підсумок.** Морфологічна діагностика із застосуванням імуногістохімічного дослідження наразі має провідне значення для найбільш точного встановлення гістологічного типу та уточнення ступеня злоякісності солітарних пухлинних вогнищевих уражень легень. Визначено доцільні для застосування панелі маркерів при ІГХ дослідженні у випадках найбільш розповсюджених первинних пухлин легень.

Ключові слова: солітарний злоякісний легеневий вузол, діагностика, імуногістохімія.

Є.В. Пальтов

Львівський національний
медичний університет імені
Данила Галицького, Львів,
Україна.

Надійшла: 24.01.2023

Прийнята: 28.02.2023

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.42-48>

УДК:611.018.5.612.014.1:615.212.7

ДИНАМІКА ЗМІНИ ПОКАЗНИКІВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ НА РАННІХ ТА ПІЗНІХ ТЕРМІНАХ КОРЕКЦІЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПОЇДНОГО ВПЛИВУ

Paltov Ye.V.  Dynamics of changes in indicators of oxidative stress in the early and late terms of correction of experimental opioid exposure.

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine.

ABSTRACT. The purpose of the study is to investigate changes of oxidative stress indicators during subchronic and chronic periods of opioid exposure when corrected with pentoxifylline. In order to achieve the set goal, we have studied the sources of scientific medical domestic and world literature. **The results.** As a result of the correction carried out by us during weeks 3,4,5 and 6 of opioid exposure, the value of the blood malonaldehyde index at week 6 was the maximum in the “nalbuphine + pentoxifylline” subgroup and was $6,39 \pm 0,41$, which was 35,33% greater value of the control group, thus approaching the relative difference to the group of animals that were administered nalbuphine for 10 weeks. In the withdrawal subgroup, the indicator had no significant difference compared to the 6-week group, and in the “withdrawal + pentoxifylline” subgroup – it had positive dynamics only in comparison with the “nalbuphine + pentoxifylline” subgroup. The value of the index of diene conjugates of the “withdrawal + pentoxifylline” subgroup had larger fluctuations compared to malondialdehyde – the average value was $41,52 \pm 1,36$, which was actually on the same level as the value of control group – $41,06 \pm 1,63$. In the “cancellation” subgroup, the index of diene conjugates did not have a significant difference compared to the 6-week group, and in the “nalbuphine + pentoxifylline” subgroup it was greater than the value of this indicator in the 6-week group and was $46,46 \pm 1,59$ (control $40,47 \pm 2,57$, $p < 0,005$). At the same time, in the “withdrawal + pentoxifylline” subgroup, the value of ceruloplasmin increased to the $287,50 \pm 8,05$, which was close to that in the group of control animals – $294,28 \pm 9,13$ ($p = 0,61$) and was not statistically significant difference when compared. As a result of the correction carried out by us in the interval of 7, 8, 9 and 10 weeks of opioid exposure, the value of the blood malondialdehyde index at week 10 in all subgroups of the correction was less than that in the group at week 10, which was $6,24 \pm 0,45$. Malonaldehyde values were the lowest in the “withdrawal + pentoxifylline” subgroup compared to the 10-week group. However, despite the fact that this indicator had positive dynamics in comparison with the 10-week group and other correction subgroups, it remained significantly higher than the indicator of the control group, which was $4,88 \pm 0,19$ ($p < 0,05$), this difference was 13,74%. In the “cancellation” subgroup, the index of diene conjugates did not have a significant difference compared to the 10-week group, and in the “nalbuphine + pentoxifylline” subgroup it was greater than the value of this indicator in the 10-week group and was $46,80 \pm 1,12$, which was 4,41% more than the indicator of the 10th week group and 12,49% more than the indicator of the control group (control $41,60 \pm 3,02$, $p < 0,05$). The dynamics of changes in ceruloplasmin in subgroups of week 10 correction was similar to that of diene conjugates. Thus, in the “withdrawal + pentoxifylline” subgroup, the value of ceruloplasmin increased to $278,60 \pm 4,30$, however, despite such positive dynamics, this indicator remained 4,43% lower than that in the control group – $291,51 \pm 5,85$, and this difference remained statistically significant ($p < 0,05$). **Conclusion.** The greatest positive dynamics in the subgroups of week 6 correction was observed in the “withdrawal + pentoxifylline” subgroup, while the dynamics of diene conjugates and ceruloplasmin indicators were equal to those in the control group. The greatest positive dynamics in the 10-week correction subgroups was observed in the “withdrawal + pentoxifylline” subgroups, however, despite the positive dynamics, especially in the indicators of diene conjugates and ceruloplasmin, it was not possible to reach the level of such indicators in the control group.

Key words. Oxidative stress, opioid, correction, rat.

Citation:

Paltov YeV. [Dynamics of changes in indicators of oxidative stress in the early and late terms of correction of experimental opioid exposure]. Morphologia. 2023;17(1):42-8. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.42-48>

 Paltov Y. 0000-0002-2622-4753

✉ evgenpaltov@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Велика кількість зовнішніх токсичних чинників сприяє виникненню порушення біохімічного статусу організму. Відомо, що вільно радикальне окиснення відіграє важливу роль у підтримці транспорту електронів у дихальному ланцюзі, індукції утворення пор у мітохондріальній мембрані, які регулюють спряження дихання з окисним фосфорилуванням і лежить в основі окисних процесів у мітохондріях. Окисні процеси за участю активованих кисневих метаболітів це невід’ємна частина існування вищих форм живих організмів. [1,3]. Встановлено, що при екстремальних впливах в організмі активуються окисно-відновні процеси, які ведуть до утворення ліпо - і гідропероксидів, подальше розкладання яких сприяє утворенню ендogenousного кисню, необхідного для життєдіяльності. [2,3]. Супероксид є одним із основних прооксидантів у клітині, тому супероксиддисмутаза відіграє ключову роль у антиоксидантному захисті організму. Функція каталази полягає у руйнуванні токсичного пероксиду водню, який утворюється в процесі різних окисних реакцій в організмі [4]. Досі залишається відкритим ряд питань, що стосуються співставлення патоморфологічних проявів ангіоретинопатії зі зміною показників оксидативного стресу в нормі на різних термінах експериментального опіювального впливу та корекція цих змін у субхронічний та хронічний періоди.

Саме тому **метою** нашого дослідження стало вивчення змін вільнорадикального окислення та антиоксидантного захисту та їх вплив на шари сітківки та ланки її гемомікроциркуляторного русла ока щура при експериментальному опіювальному впливі та корекція цих змін у субхронічний та хронічний періоди експериментального опіювального впливу.

Враховуючи вищезазначене, вважаємо, що дане дослідження є актуальним як з точки зору експериментальної морфології, так і з точки зору практичної офтальмології.

Матеріали та методи

Матеріалом дослідження слугували статевозрілі, безпородні щури – самці в кількості 112 - ть тварин, масою 160 - 270 г, віком 4,5 – 7,5 місяців. Тваринам проводили ін’єкції препарату налбуфін внутрішньо м’язово, щоденно 1 раз на добу в одному проміжку часу (10–11 година ранку) впродовж 70 діб. Початкова доза налбуфіну впродовж перших 2 – х тижнів становила 0,212 мг/кг, наступних 2 – х (II – IV тижня) – 0,225 мг/кг, наступна (IV – VI тижня) – 0,252 мг/кг, наступна (VI – VIII тижня) – 0,260 мг/кг, а впродовж (VIII – X тижня) – 0,283 мг/кг. Таким чином, створювали умови хронічного опіювального впливу [5].

Тварини поділені на 8 груп. 1- а група тварин отримувала налбуфін впродовж 70 діб з наступним забором матеріалу дослідження

(кінець 10 тижня експериментального опіювального впливу); 2- а група контрольна, яка впродовж 70 діб отримувала ін’єкції фізіологічного розчину внутрішньо м’язово в одному проміжку часу (10 – 11 година ранку); 3- я група (2 тижні введення налбуфіну з подальшою його відміною на 4 тижні); 4- а група (2 тижнів введення налбуфіну з приєднанням на 4 тижні пентоксифіліну); 5- а група (2 тижні введення опіювального з відміною та з подальшим 4 тижневим введенням пентоксифіліну); 6- а група (6 тижнів введення налбуфіну з подальшою відміною на 4 тижні); 7- а група (6 тижнів введення налбуфіну з приєднанням на 4 тижні пентоксифіліну); 8- а група (6 тижнів введення опіювального з відміною та з подальшим 4 тижневим введенням пентоксифіліну). Корекція проводилась на ранніх та пізніх термінах де доза пентоксифіліну становила 2,857 мг/кг.

Усі тварини знаходились в умовах віварію і робота, що стосувалася питань утримання, догляду, маркування та всі інші маніпуляції проводилися із дотриманням положень “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей ” [Стразбург, 1985], “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики [Київ, 2001]. Комісією з біоетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького встановлено, що проведені наукові дослідження відповідають етичним вимогам згідно наказу МОЗ України № 231 від 01. 11. 2000 року (протокол № 10 від 26.12. 2011 року). Забір крові та проведення дослідження біохімічних показників крові (малоновий діальдегід, дієнові кон’югати, церулоплазмін) проводили за загальноприйнятими методиками [6, 7, 8].

Всі отримані результати статистичних досліджень біохімічних показників оксидативного стресу крові щурів проходили перевірку на нормальність розподілу за допомогою критерію Шапіро - Уїлка та із використанням графічних методів (аналіз бокс - плотів та Q-Q діаграм у випадку значенню р критерію Шапіро -Уїлка < 0,05). Так як всі дані пройшли перевірку на нормальність розподілу, то для представлення результатів було використано формат $M \pm SD$, де M – середнє значення, SD – стандартне відхилення. Для графічного представлення – лінійні діаграми із планками похибки, де точки лінії – значення середнього у групі, планка похибки – розмах стандартного відхилення. Для виявлення значущості різниці між двома групами було використано t - критерій для непом’язаних груп. Для виявлення значущості різниці між трьома та більше групами було використано однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA, при подальшому використанні апостеріорного тесту Тьюкі у

випадку достовірності дисперсійного аналізу. Для перевірки правомірності застосування однофакторного дисперсійного аналізу дані проходили перевірку на рівність дисперсій у групах за допомогою критерію Левене. Рівень значущості для t - критерію та дисперсійного аналізу встановлений на рівні $p < 0,05$, для критерію Левене – на рівні $p < 0,01$.

Всі статистичні обрахунки було проведено із використанням програмного забезпечення RStudio v.1.4.1106 на базі R v.4.1.0 [9, 10, 11]. Для оформлення графіків та таблиць було використано електронні таблиці Excel з пакету MS Office 2010.

Результати та їх обговорення

На основі проведеного біохімічного дослідження крові показників оксидативного стресу (малонового діальдегіду, дієнові кон'югати та церулоплазміну), дослідити їх зміни у субхронічний та хронічний періоди опіоїдного впливу та при корекції пентоксифіліном.

В результаті проведеної нами корекції в проміжок 3, 4, 5 та 6 тижні опіоїдного впливу значення показника крові малонового альдегіду на **6 тижні** було максимальним у підгрупі «налбуфін + пентоксифілін» і становило $6,39 \pm 0,41$ що було на 35,33 % більше значення контрольної групи, наближаючись таким чином за відносною різницею до групи тварин, яким 10 тижнів вводили налбуфін. У підгрупі відміни показник не

мав суттєвої різниці у порівнянні із групою 6 тижня, так і у підгрупі «відміна + пентоксифілін» - мав позитивну динаміку лише в порівнянні із підгрупою «налбуфін + пентоксифілін».

Значення показника дієнових кон'югатів підгрупи «відміна + пентоксифілін» мали більші коливання у порівнянні із малоновим діальдегідом – середнє значення становило $41,52 \pm 1,36$, що було фактично на рівні значення контрольної групи - $41,06 \pm 1,63$. У підгрупі «відміна» показник дієнових кон'югатів не мав значної різниці у порівнянні із групою 6 тижня, а у підгрупі «налбуфін + пентоксифілін» був більшим за значення цього показника у групі 6 тижня і становив $46,46 \pm 1,59$ (контроль $40,47 \pm 2,57$, $p < 0,05$).

Найменше значення середнього показника у церулоплазміну спостерігалося у підгрупі «налбуфін + пентоксифілін» - $256,00 \pm 4,06$, це становило 14,02 % різниці у порівнянні із контрольною групою та 9,30 % у порівнянні із групою 6 тижня. В той же час у підгрупі «відміна + пентоксифілін» значення церулоплазміну зросло до $287,50 \pm 8,05$, що наблизилося до такого у групі контрольних тварин - $294,28 \pm 9,13$ ($p = 0,61$) і не мало статистично достовірної різниці при порівнянні. Дані значень цих показників опрацьовано статистично і подано в таблицях Отримані данні обраховано статистично та висвітлено в таблиці (1), та рисунках (1, 2, 3).

Таблиця 1
Описова статистика біохімічних показників після 6-х тижнів введення налбуфіну при корекції

Група	Показник		
	Малоновий діальдегід	Дієнові кон'югати	Церулоплазмін
Інтактні	$4,82 \pm 0,18$	$41,45 \pm 0,03$	$297,30 \pm 10,51$
6-й тиждень	$5,57 \pm 0,26$	$43,69 \pm 1,68$	$275,30 \pm 3,95$
6-й т. KB	$5,80 \pm 0,31$	$44,28 \pm 2,98$	$275,70 \pm 5,64$
6-й т. КП	$6,39 \pm 0,41$	$46,46 \pm 1,59$	$256,00 \pm 4,06$
6-й т. KBП	$5,70 \pm 0,36$	$41,52 \pm 1,36$	$287,50 \pm 8,05$

Примітки: 6-й тиждень – група із 6-ти тижневим введенням налбуфіну, 6-й т. KB – група із 2-тижневим введенням опіоїду з подальшою відміною на 4 тижні, 6-й т. КП – група із 2-тижневим введенням опіоїду з подальшим приєднанням пентоксифіліну на 4- тижні, 6-й т. KBП – група із 2-тижневим введенням опіоїду з подальшою відміною та приєднанням пентоксифіліну на 4 тижні.

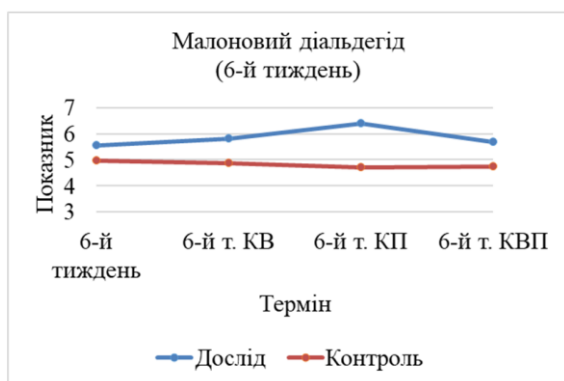


Рис. 1. Лінійна діаграма зміни показника малонового діальдегіду крові щурів дослідної та контрольної груп протягом експерименту при корекції. 6-й тиждень – група із 6-ти тижневим введенням налбуфіну, 6-й т. KB – група із 2-тижневим введенням опіоїду з подальшою відміною на 4 тижні, 6-й т. КП – група із 2-тижневим введенням опіоїду з подальшим приєднанням пентоксифіліну на 4 тижні, 6-й т. KBП – група із 2-тижневим введенням опіоїду з подальшою відміною та приєднанням пентоксифіліну на 4 тижні.

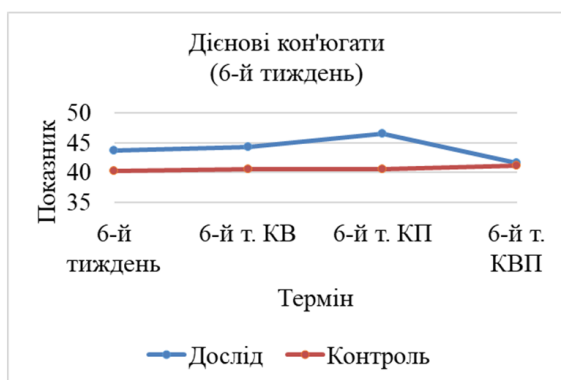


Рис. 2. Лінійна діаграма зміни показника дієнових кон'югатів крові щурів дослідної та контрольної груп протягом експерименту при корекції. 6-й тиждень – група із 6-ти тижневим введенням налбуфіну, 6-й т. КВ – група із 2-тижневим введенням опіюїду з подальшою відміною на 4 тижні, 6-й т. КП – група із введенням опіюїду з подальшим приєднанням пентоксифіліну на 4-му тижні, 6-й т. КВП – група із 2-тижневим введенням опіюїду з подальшою відміною та приєднанням пентоксифіліну.

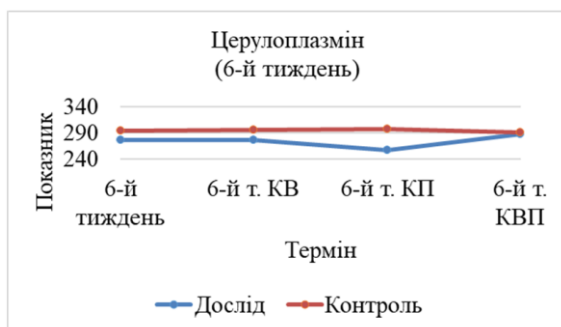


Рис. 3. Лінійна діаграма зміни показника церулоплазміну крові щурів дослідної та контрольної груп протягом експерименту при корекції. 6-й тиждень – група із 6-ти тижневим введенням налбуфіну, 6-й т. КВ – група із 2-тижневим введенням опіюїду з подальшою відміною на 4 тижні, 6-й т. КП – група із 2-тижневим введенням опіюїду з подальшим приєднанням пентоксифіліну на 4-му тижні, 6-й т. КВП – група із 2-тижневим введенням опіюїду з подальшою відміною та приєднанням пентоксифіліну на 4 тижні.

На основі біохімічних досліджень показників оксидативного стресу та ступеня оксигенації крові щурів на пізніх термінах корекції експериментального опіюїдного впливу встановлено динаміку зміни показників рівня (малонового діальдегіду, дієнові кон'югати та церулоплазміну). В результаті проведеної нами корекції в проміжок 7, 8, 9 та 10 тижнів опіюїдного впливу значення показника крові малонового діальдегіду на 10 тижні у всіх підгрупах корекції було менше за таке у групі 10 тижня, що становило $6,24 \pm 0,45$. Найменшим у порівнянні із групою 10 тижня були показники малонового альдегіду у підгрупі « відміна + пентоксифілін ». Однак, попри те що цей показник мав позитивну динаміку у порівнянні із групою 10 тижня та іншими підгрупами корекції, він лишався достовірно більшим за показник контрольної групи, що становив $4,88 \pm 0,19$ ($p < 0,05$), ця різниця становила 13,74 %. Як і у підгрупах корекції на 10 тижні, значення показника дієнових кон'югатів підгрупи « відміна + пентоксифілін » мали більшу позитивну динаміку у порівнянні із малоновим діальдегідом – середнє значення становило $44,07 \pm 0,70$, перевищуючи контроль на 5,93 %. У підгрупі « відміна » показник дієнових кон'югатів не мав значної різниці у порівнянні із групою 10 тижня, а у підгрупі « налбуфін + пентоксифілін » був більшим за значення цього показника у групі 10 тижня і становив $46,80 \pm 1,12$, що було на 4,14 % більше за показник групи 10 тижня та на 12,49 % - за показник контрольної групи (контроль $41,60 \pm 3,02$, $p < 0,05$).

Динаміка змін церулоплазміну у підгрупах корекції 10 тижня була подібною до такої у показників дієнових кон'югатів. Так у підгрупі « відміна + пентоксифілін » значення церулоплазміну зросло до $278,60 \pm 4,30$, однак, попри таку позитивну динаміку цей показник залишався на 4,43 % меншим за такий у контрольній групі - $291,51 \pm 5,85$, і ця різниця залишалась статистично достовірною ($p < 0,05$). Отримані дані висвітлено в таблиці (2), та рисунках (4, 5, 6).

Таблиця 2
Описова статистика біохімічних показників після 10-х тижнів введення налбуфіну при корекції

Група	Показник		
	Малоновий діальдегід	Дієнові кон'югати	Церулоплазмін
Інтактні	$4,82 \pm 0,18$	$41,45 \pm 0,03$	$297,30 \pm 10,51$
10-й тиждень	$6,63 \pm 0,28$	$44,94 \pm 2,17$	$262,40 \pm 8,04$
10-й т. КВ	$6,24 \pm 0,45$	$45,57 \pm 1,53$	$269,80 \pm 4,44$
10-й т. КП	$5,61 \pm 0,56$	$46,80 \pm 1,12$	$276,00 \pm 5,44$
10-й т. КВП	$5,55 \pm 0,30$	$44,07 \pm 0,70$	$278,60 \pm 4,30$

Примітки: 10-й тиждень – група із 10-ти тижневим введенням налбуфіну, 10-й т. КВ – група із 6-тижневим введенням опіюїду з подальшою відміною на 4 тижні, 10-й т. КП – група із 6-тижневим введенням опіюїду з подальшим приєднанням пентоксифіліну на 4 тижні, 10-й т. КВП – група із 6-тижневим введенням опіюїду з подальшою відміною та приєднанням пентоксифіліну на 4 тижні.

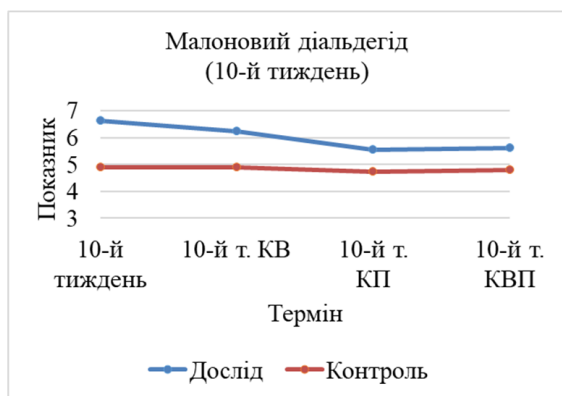


Рис. 4. Лінійна діаграма зміни показника малонового діальдегіду крові щурів дослідної та контрольної груп протягом експерименту при корекції. 10-й тиждень – група із 10-ти тижневим введенням опію з подальшою відміною на 4 тижні, 10-й т. KB – група із 6-тижневим введенням опію з подальшою відміною на 4 тижні, 10-й т. КП – група із 6-тижневим введенням опію з подальшим приєднанням пентоксифіліну на 4 тижні, 10-й т. KBП – група із 6-тижневим введенням опію з подальшою відміною та приєднанням пентоксифіліну на 4 тижні.

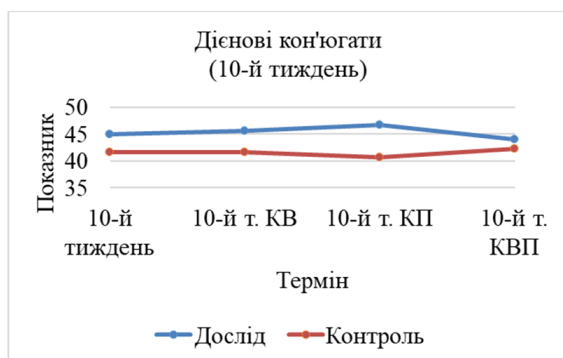


Рис. 5. Лінійна діаграма зміни показника дієнових кон'югатів крові щурів дослідної та контрольної груп протягом експерименту при корекції. 10-й тиждень – група із 10-ти тижневим введенням опію з подальшою відміною на 4 тижні, 10-й т. KB – група із 6-тижневим введенням опію з подальшою відміною на 4 тижні, 10-й т. КП – група із 6-тижневим введенням опію з подальшим приєднанням пентоксифіліну на 4 тижні, 10-й т. KBП – група із 6-тижневим введенням опію з подальшою відміною та приєднанням пентоксифіліну на 4 тижні.

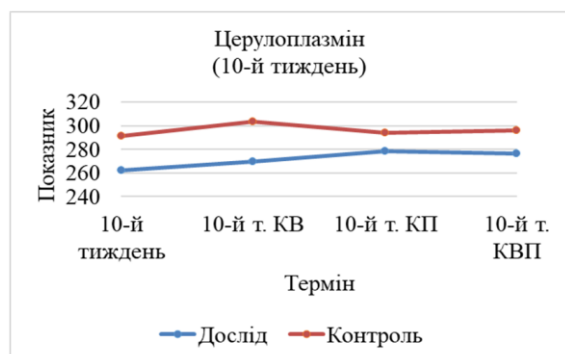


Рис. 6. Лінійна діаграма зміни показника церулоплазміну крові щурів дослідної та контрольної груп протягом експерименту при корекції. 10-й тиждень – група із

10-ти тижневим введенням опію з подальшою відміною на 4 тижні, 10-й т. KB – група із 6-тижневим введенням опію з подальшою відміною на 4 тижні, 10-й т. КП – група із 6-тижневим введенням опію з подальшим приєднанням пентоксифіліну на 4 тижні, 10-й т. KBП – група із 6-тижневим введенням опію з подальшою відміною та приєднанням пентоксифіліну на 4 тижні.

Висновки

1. Найбільша позитивна динаміка у підгрупах корекції 6 тижня спостерігалася у підгрупі «відміна + пентоксифілін», при чому за динамікою показники дієнових кон'югатів та церулоплазміну прирівнялися до таких у контрольній групі.

2. Більш позитивна динаміка у підгрупах корекції 10 тижня спостерігалася у підгрупі «відміна + пентоксифілін», однак, попри позитивну динаміку, особливо у показників дієнових кон'югатів та церулоплазміну, досягти рівня таких показників у контрольній групі не вдалося.

Перспективи подальших досліджень

Корекція біохімічних змін показників оксидативного стресу крові на ранніх та пізніх термінах експериментального опію з подальшою відміною, що дасть можливість створити патоморфологічне та патобіохімічне підґрунтя для встановлення оптимальних з точки зору морфології термінів проведення медикаментозної корекції змін у шарах сітківки у субхронічний та хронічний терміни впливу терапевтичних доз опію з подальшою відміною та приєднанням пентоксифіліну на 4 тижні.

Отримані нами результати в подальшому можуть бути використані з метою проведення порівняльної характеристики, що стосується динаміки патобіохімічних змін у шарах сітківки у субхронічний та хронічний періоди впливу терапевтичних доз опію з подальшою відміною та приєднанням пентоксифіліну на 4 тижні. Це надасть нам можливість встановити найбільш оптимальний період проведення корекції з метою стабілізації проявів опію з подальшою відміною та приєднанням пентоксифіліну на 4 тижні.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної теми «Морфофункціональні особливості органів у пре- та постнатальному періодах онтогенезу, при впливі опію з подальшою відміною та приєднанням пентоксифіліну на 4 тижні» (номер державної реєстрації 0120U002129).

Літературні джерела References

1. Prykhodko OO. [The influence of heavy metal salts on the biochemical parameters of the blood of male sheep of different age groups]. *Visnyk SumDU. Seriya Medytsyna*. 2010;2:42-7. Ukrainian.
2. Bohutskyi VS. [The state of lipid peroxidation processes, the antioxidant defense system, and the effectiveness of a new complex anti-anemic drug for rats]. *Ternopil*. 2006;32-7. Ukrainian.
3. Belenychev IF, Levytskyi YE, Hubskey YU, Kovalenko CI, Marchenko OM. [Antioxidant defense system of the body (review). *Modern problems of toxicology*]. *Sovr. probl. toksykol*. 2002;3:24-31. Ukrainian.
4. Gnid RM. [The results of the study of the activity of enzymes of antioxidant protection of oral fluid in patients with periodontitis who live in the territory polluted by sulfur]. *Visnyk problem biolohiy i medytsyny*. 2016;2(127):224-7. Ukrainian.
5. Paltov YeV, Fik VB, Vilhova IV, Onisko RM, Fitkalo OS, Kryvko YuYa; Pat. №76565 U Ukraine, MPK G 09 B 23/28 A method of modeling chronic opioid exposure. [Metodyka modelyuvannya khronichnoho opioyidnoho vplyvu]. Patentovlasnik: L'viv's'kyi natsional'nyi medychnyi universytet imeni Danyla Halyts'koho. №u201207126; zayavl. 12.06.2012; opubl. 10.01.2013, Byul. №1. Ukrainian.
6. Timirbulatov RA, Seleznev EI. [Method for increasing the intensity of free radical oxidation of lipid-containing blood components and its diagnostic value]. *Lab. delo*. 1981;4:209-11. Russian.
7. Gavrilov VB, Mishkorudnaya MI. [Method for increasing the intensity of free radical oxidation of lipid-containing blood components and its diagnostic value]. *Laboratornaya diagnostika ishemicheskoy bolezni serdca*. K.: Zdorov'e; 1989:170-1. Russian.
8. Kolb VG, Kamyshnikov VS. [determination of ceruloplasmin activity in the blood]. *Spravochnik po klinicheskoy himii*. Minsk. 1982:290-1. Russian.
9. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2020. Available from: <https://www.R-project.org/>
10. Van der Loo MP. Learning RStudio for R statistical computing [Internet]. Packt Publishing Ltd; 2012. 126 p. Available from: <https://www.packtpub.com/product/learning-rstudio-for-r-statistical-computing/9781782160601>
11. R Studio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R [Internet]. Boston, MA: RStudio, PBC; 2021. Available from: <http://www.rstudio.com/>

Пальтов Є.В. Динаміка зміни показників оксидативного стресу на ранніх та пізніх термінах корекції експериментального опіоїдного впливу.

РЕФЕРАТ. Мета дослідження – дослідити зміни показників оксидативного стресу у субхронічний та хронічний періоди опіоїдного впливу при корекції пентоксифіліном. Для досягнення поставленої мети нами було опрацьовано джерела наукової медичної вітчизняної та світової літератури. **Результати.** В результаті проведеної нами корекції в проміжок 3, 4, 5 та 6 тижні опіоїдного впливу значення показника крові малонового альдегіду на 6 тижні було максимальним у підгрупі «налбуфін + пентоксифілін» і становило $6,39 \pm 0,41$ що було на 35,33 % більше значення контрольної групи, наближаючись таким чином за відносною різницею до групи тварин, яким 10 тижнів вводили налбуфін. У підгрупі відміни показник не мав суттєвої різниці у порівнянні із групою 6 тижня, так і у підгрупі «відміна + пентоксифілін» - мав позитивну динаміку лише в порівнянні із підгрупою «налбуфін + пентоксифілін». Значення показника дієнових кон'югатів підгрупи «відміна + пентоксифілін» мали більші коливання у порівнянні із малоновим діальдегідом – середнє значення становило $41,52 \pm 1,36$, що було фактично на рівні значення контрольної групи - $41,06 \pm 1,63$. У підгрупі «відміна» показник дієнових кон'югатів не мав значної різниці у порівнянні із групою 6 тижня, а у підгрупі «налбуфін + пентоксифілін» був більшим за значення цього показника у групі 6 тижня і становив $46,46 \pm 1,59$ (контроль $40,47 \pm 2,57$, $p < 0,05$). Найменше значення середнього показника у церулоплазміну спостерігалось у підгрупі «налбуфін + пентоксифілін» - $256,00 \pm 4,06$, це становило 14,02 % різниці у порівнянні із контрольною групою та 9,30 % у порівнянні із групою 6 тижня. В той же час у підгрупі «відміна + пентоксифілін» значення церулоплазміну зросло до $287,50 \pm 8,05$, що наблизилось до такого у групі контрольних тварин - $294,28 \pm 9,13$ ($p = 0,61$) і не мало статистично достовірної різниці при порівнянні. В результаті проведеної нами корекції в проміжок 7, 8, 9 та 10 тижнів опіоїдного впливу значення показника крові малонового діальдегіду на 10 тижні у всіх підгрупах корекції було менше за таке у групі 10 тижня, що становило $6,24 \pm 0,45$. Найменшим у порівнянні із групою 10 тижня були показники малонового альдегіду у підгрупі «відміна + пентоксифілін». Однак, попри те що цей показник мав позитивну динаміку у порівнянні із групою 10 тижня та іншими підгрупами корекції, він лишався достовірно більшим за показник контрольної групи, що становив $4,88 \pm 0,19$ ($p < 0,05$), ця різниця становила 13,74 %.. Як і у підгрупах корекції на 10 тижні, значення показника дієнових кон'югатів підгрупи «відміна + пентоксифілін» мали більшу позитивну динаміку у порівнянні із мало-

новим діальдегідом – середнє значення становило $44,07 \pm 0,70$, однак такої динаміки на цьому терміні було недостатньо, щоб зрівнятися із показником контрольної групи $41,60 \pm 3,02$ ($p < 0,05$) і різниця становила 5,93 %. У підгрупі «відміна» показник дієнових кон'югатів не мав значної різниці у порівнянні із групою 10 тижня, а у підгрупі «налбуфін + пентоксифілін» був більшим за значення цього показника у групі 10 тижня і становив $46,80 \pm 1,12$, що було на 4,14 % більше за показник групи 10 тижня та на 12,49 % - за показник контрольної групи (контроль $41,60 \pm 3,02$, $p < 0,05$). Динаміка змін церулоплазміну у підгрупах корекції 10 тижня була подібною до такої у показників дієнових кон'югатів. Так у підгрупі «відміна + пентоксифілін» значення церулоплазміну зросло до $278,60 \pm 4,30$, однак, попри таку позитивну динаміку цей показник залишався на 4,43 % меншим за такий у контрольній групі - $291,51 \pm 5,85$, і ця різниця залишалась статистично достовірною ($p < 0,05$). **Підсумок.** Найбільша позитивна динаміка у підгрупах корекції 6 тижня спостерігалася у підгрупі «відміна + пентоксифілін», при чому за динамікою показники дієнових кон'югатів та церулоплазміну прирівнялися до таких у контрольній групі. Найбільша позитивна динаміка у підгрупах корекції 10 тижня спостерігалася у підгрупі «відміна + пентоксифілін», однак, попри позитивну динаміку, особливо у показників дієнових кон'югатів та церулоплазміну, досягти рівня таких показників у контрольній групі не вдалося.

Ключові слова: оксидативний стрес, опіоїд, корекція, щур.

Є.А. Согомонян
І.В. Челпанова
Л.В. Панкевич
Н.О. Амбарова

Львівський національний
медичний університет імені
Данила Галицького, Львів,
Україна.

Надійшла: 24.01.2023

Прийнята: 14.03.2023

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.49-55>

УДК 616.441-008.61/.64-092.9

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЕКСПЕРИ- МЕНТАЛЬНИХ ФОРМ ГІПО- ТА ГІПЕР- ТИРОЇДНИХ СТАНІВ

Sogomonyan Ye.A. , Chelpanova I.V. , Pankevych L.V. , Ambarova N.A.  Comparative analysis of experimental forms of hypo- and hyperthyroid conditions.

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine.

ABSTRACT. The relevance. Modeling of hypo- and hyperthyroidism in laboratory animals is widely used in modern experimental biology and medicine to study the pathogenetic mechanisms of the development of thyroid gland diseases, the problems of its treatment, as well as the study of the impact of thyroid hormone imbalance on various organs and systems of the body. The most popular method of creating a model of experimental hypothyroidism is the entry of chemicals capable of blocking the function of the thyroid gland into the body of laboratory animals. The most widely used pharmacopoeial thyrostatic is mercazolil, which is used both in clinic for the treatment of thyroid gland diseases which accompanied by hyperthyroidism, as well as in practical experimental studies. Modeling of hyperthyroidism is carried out by entry thyroid hormone preparations into the body of experimental animals. **The aim** of the work was to determine the optimal doses of drugs, which are necessary to achieve stable hyperthyroid or hypothyroid states, as well as its correction in the experiment. **Methods.** The experiment was carried out on 65 sexually mature female white rats Wistar line, weighing 200-250 g. All animals were divided into 5 groups: control, hypo- and hyperthyroidism (15 animals in each group), as well as 2 groups with correction of hypothyroidism (10 animals in each group, Table 2.1). The hypothyroid state was modeled with Mercazolil (Zdorovya, Kharkiv) in a daily dose of 10 mg/kg; hyperthyroidism was induced by L-thyroxine (Farmak, Kyiv) in a daily dose of 100 µg/kg body weight of animals. In all experimental groups, mercazolil and thyroxine, in the powder form, were daily added to the food for two weeks, after which the animals were euthanized by an overdose of diethyl ether. The structure of thyroid glands was studied on histological slides stained with hematoxylin and eosin by the traditional method. **Results.** During the analysis of the micromorphology of the thyroid glands of animals treated with mercazolil, the presence of a goitrogenic reaction was established, which served as evidence of the hypothyroid state induced in this group of animals. A study of the thyroid glands of rats who received thyroxine together with mercazolil at a dose of 1.6 µg/kg of weight (the first correction group) showed that their morphology, both macro- and microscopic, didn't differ from the group that received only mercazolil, i.e. goitrogenic reaction was present. This indicates an insufficient dose of thyroxine. When using a replacement dose of thyroxine of 30 µg/kg of body weight (the second group of correction), the goitrogenic reaction did not develop - the structure of the thyroid glands corresponded to the norm. Thus, it was this dose of thyroxine that compensated for the antithyroid effect of mercazolil. When studying the structure of the thyroid glands of rats treated with thyroxine at a dose of 100 µg/kg, we found signs of their atrophic state. Thus, the macro- and micromorphology of the thyroid glands of rats in this group indicated that the used dose of thyroxine was sufficient to simulate persistent hyperthyroidism.

Key words: thyroid gland, hypothyroidism, hyperthyroidism, mercazolil, thyroxine.

Citation:

Sogomonyan YeA, Chelpanova IV, Pankevych LV, Ambarova NA. [Comparative analysis of experimental forms of hypo- and hyperthyroid conditions]. Morphologia. 2023;17(1):49-55. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.49-55>

 Sogomonyan Ye.A. 0000-0001-5339-8321

 Chelpanova I.V. 0000-0001-5215-814X

 Pankevych L.V. 0000-0001-8687-7628

 Ambarova N.A. 0000-0002-6867-6803

✉ Sogomonyanlviv@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Моделювання гіпо- та гіпертироїдизму в лабораторних тварин широко застосовується у сучасній експериментальній біології та медицині для вивчення патогенетичних механізмів розвитку захворювань щитоподібної залози, проблем її лікування, а також дослідження впливу дисбалансу тиреоїдних гормонів на різні органи та системи організму. В сучасних умовах використовуються наступні моделі гіпотиреоїдизму: 1) хірургічне видалення щитоподібної залози (тотальна або субтотальна тиреоїдектомія); 2) блокування тиреоїдної функції шляхом введення експериментальним тваринам спеціальних хімічних речовин – так званих тиростатичних препаратів; 3) виключення функції щитоподібної залози дією великих доз радіонуклідів J^{131} [1].

Кожен із цих трьох методів має як переваги, так і недоліки. Безумовною перевагою тиреоїдектомії є отримання гіпотиреоїдизму в “чистому” вигляді, тоді як за умов введення в організм тиростатичних речовин теоретично можна очікувати, крім гіпотиреоїдного ефекту, різних побічних впливів, які можуть слугувати причиною отримання хибних результатів [2, 3].

До недоліків цієї моделі (хірургічного видалення залози) слід віднести достатню складність процедури, значне травмування експериментальних тварин (наркоз, оперативне втручання), а також розвиток паратиропривної тетанії внаслідок видалення разом з щитоподібною прищитоподібних залоз [4]. Використання високих доз радіоїоду J^{131} для виключення функції щитоподібної залози фактично викликає руйнацію органа, тому цей метод можна назвати радіоізотопною тиреоїдектомією. Складності цього методу є зрозумілими, враховуючи необхідність лабораторії, спеціально обладнаної для роботи з радіоактивними речовинами.

Найбільш поширеним сучасним методом створення моделі експериментального гіпотиреоїдизму є введення в організм лабораторних тварин хімічних речовин, здатних блокувати функцію щитоподібної залози. Перевагами цього методу є його відносна простота, можливість одночасного отримання достатньої кількості гіпотиреоїдних тварин, а також можливість відновлення функції залози після відміни препарату. Недоліком моделі гіпотиреоїдного стану, базованій на застосуванні тиростатичних препаратів, є можливі побічні ефекти цих речовин, результатом ігнорування яких може бути хибне трактування отриманих даних. Убезпечення від цих похибок полягає у паралельному проведенні тиреоїдектомії і/або корекції гіпотиреоїдизму замісними дозами гормону щитоподібної залози [2, 3, 5].

Найбільш уживаним фармакопейним тиростатиком є мерказоліл, активною речовиною якого є 1-метил-2-меркаптоїмідазол, що знижує утворення активної форми йоду та блокує йоду-

вання тирозину. Дефіцит йоду та порушення синтезу тиреоїдних гормонів призводять до зниження їх концентрації в крові тварин, внаслідок чого за механізмом зворотнього зв'язку посилюється тиротропна функція гіпофіза. Тривалий надлишок тиротропного гормону, у свою чергу, активує вивільнення цілої низки ростових факторів, які викликають посилення проліферації клітин щитоподібної залози, результатом якого є гіперплазія залози (струмогенний ефект).

Мерказоліл застосовують як у клініці для лікування захворювань щитоподібної залози, що супроводжуються гіпертироїдизмом, так і в практиці експериментальних досліджень [6-8].

Для отримання ефекту стійкого гіпотиреоїдизму в експериментах на щурах зазвичай застосовують мерказоліл у дозах від 5 до 10 мг/кг маси тварини на добу протягом 2-3 тижнів [9-13].

Моделювання гіпертироїдизму здійснюють шляхом введення в організм піддослідних тварин препаратів тиреоїдних гормонів (трийодтиронін, L-тироксин, Тиреокс, Еутирокс 100, Тріакана). Усі зазначені препарати застосовують у клінічній практиці для замісної терапії гіпотиреоїдних станів [14-17]. При розрахунку дози гормонального препарату для індукції гіпертироїдизму слід враховувати його добову продукцію в нормі. Для щурів, наприклад, вона складає 30 мкг L-тироксину/кг маси тіла [3], у той час як у людини нормальна продукція Т3 складає 6 мкг/добу [18]. Таким чином, оптимальна добова доза L-тироксину для досягнення стану стійкого гіпертироїдизму у щурів за даними багатьох авторів [2, 3] становить 100-150 мкг/кг маси.

Оцінку ефективності моделювання як гіпо-, так і гіпертироїдизму проводять шляхом визначення в крові тварин рівня ТТГ, Т3, Т4. При цьому основним показником, який дозволяє оцінити адекватність моделі, є рівень ТТГ, який змінюється відповідно до ступеня зниження або зростання рівнів тиреоїдних гормонів. На змінах рівня ТТГ базується і суто морфологічний спосіб оцінки ефективності моделювання описуваних станів, а саме, шляхом вивчення макро- та мікроморфології щитоподібних залоз, наявності ознак струмогенної реакції при гіпотиреоїдизмі та атрофічних ознак при гіпертироїдизмі.

Мета: визначити оптимальні дози препаратів, необхідні для досягнення стійкого гіпертироїдного або гіпотиреоїдного станів а також корекції останнього в експериментальних щурах.

Матеріали та методи

Дослід поставлено на 65 статевозрілих самках білих щурів лінії Wistar масою 200-250 г. Усі тварини були поділені на 5 груп: контроль, гіпота гіпертироїдизм (по 15 тварин у групі), а також 2 групи з корекцією гіпотиреоїдизму (по 10 тварин у групі, табл. 2.1). Гіпотиреоїдний стан моделювали за допомогою мерказолілу (“Здоров’я”, Харків) у добовій дозі 10 мг/кг; гіпертироїдизм

викликали L-тироксинам (“Фармак”, Київ) у добовій дозі 100 мкг/кг маси тіла тварин.

Корекцію гіпотиреоїдизму проводили тироксинам у так званій фізіологічній дозі, яку вводили одночасно із мерказолілом. У першій групі з корекцією гіпотиреоїдизму ця доза тироксину становила 1,6 мкг/кг маси тіла (згідно рекомендацій [18]). Як виявилось, така доза тироксину була недостатньою для компенсації гіпотиреоїдизму у щурів, тому була утворена друга група з корекцією, у якій замісна доза тироксину дорівнювала 30 мкг/кг маси тіла тварин. Згідно даних Є.С.Детюк [2], така доза відповідає добовій продукції тироксину в щурів.

Таблиця 1
Характеристика груп тварин

Групи тварин	Число щурів
(I) Інтактні тварини (контроль)	15
(II) Щурі з модельованим гіпотиреоїдизмом (мерказоліл)	15
(III) Щурі з модельованим гіпертиреоїдизмом (тироксин)	15
(IV) Гіпотиреоїдизм з корекцією тироксинам (1,6 мкг/кг)	10
(V) Гіпотиреоїдизм з корекцією тироксинам (30 мкг/кг)	10
Разом	65

В усіх дослідних групах мерказоліл і тироксин у вигляді порошку додавали в їжу щоденно

протягом двох тижнів, внаслідок чого досягався стан стійкого гіпо- або гіпертиреоїдизму.

Тварин піддавали евтаназії передозуванням діетилового ефіру. Під час розтину у тварин забирали щитоподібні залози (з обох боків) і фіксували в суміші Буена. Після зневоднення матеріал заливали у парафін за стандартною методикою. Утримання тварин та маніпуляції з ними проводились у відповідності до положень “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах” (Київ, 2001).

Результати та їх обговорення

Контроль ефективності моделювання гіпо- та гіпертиреоїдизму, а також корекції гіпотиреоїдизму, проводили шляхом вивчення макро- та мікоморфології щитоподібних залоз, враховуючи наявність “струмогенної” реакції при введенні мерказолілу, її відсутність при корекції замісними дозами тироксину, та морфологічні ознаки зниження функції залози при введенні гіпертироїдних доз тироксину.

Макроскопічно щитоподібні залози тварин, які знаходилися під впливом мерказолілу, були значно більших розмірів (приблизно у 3 рази), ніж у контрольній групі, з ознаками інтенсивної гіперемії (темно-червоного кольору). Мікроскопічно зміни, що виникали у щурів цієї групи зводилися до наступного: фолікули набували неправильної складчастої форми, їхні порожнини були вільні від колоїду, тироїдний епітелій, кубічний у контролі, ставав циліндричним, виявлялися гіперплазія тироцитів та різка гіперемія (рис. 1, 2).

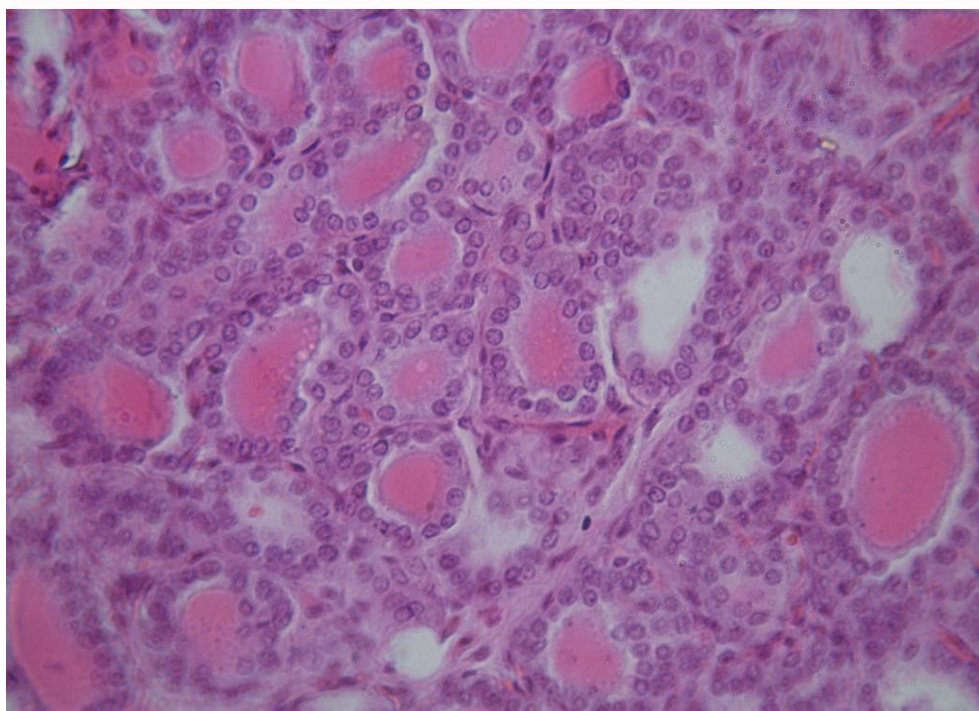


Рис. 1. Мікоморфологія нормальної щитоподібної залози щура (контроль): тироцити кубічної форми, у фолікулах помірна кількість колоїду, помітні зони резорбції. Гематоксилін і еозин. $\times 400$.

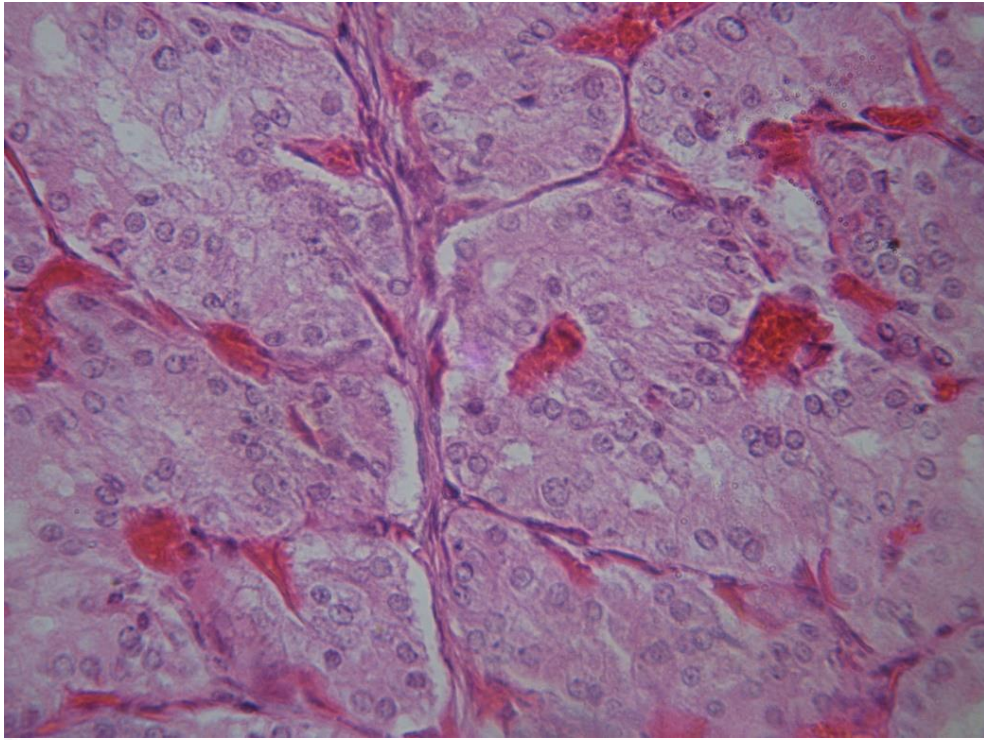


Рис. 2. Щитоподібна залоза гіпотиреоїдного щура: тироцити циліндричної форми, у просвіті фолікулів незначна кількість або повна відсутність колоїду. Гематоксилін і еозиню $\times 400$.

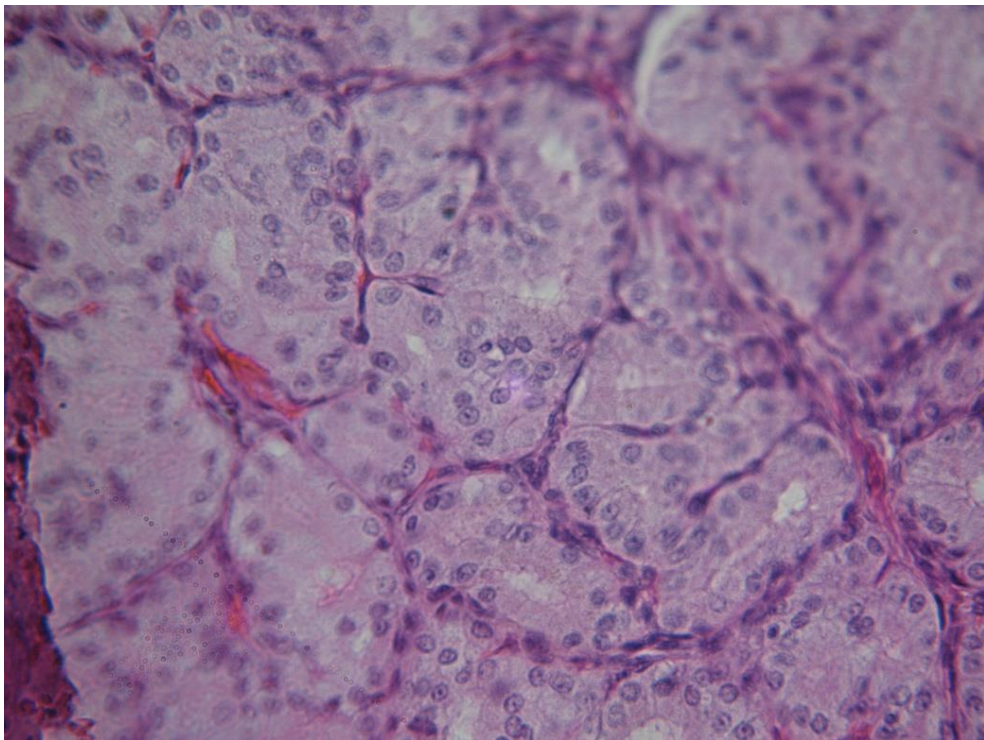


Рис. 3. Щитоподібна залоза щура, який разом із мерказолілом отримувач тироксин у дозі 1,6 мг/кг (перша група корекції): виражена струмогенна реакція. Гематоксилін і еозин. $\times 400$.

Усі вищеописані явища вкладалися в картину відомої струмогенної реакції, яка пов'язана з підвищенням рівня ТТГ гіпофіза за умов зни-

ження рівня тироксину в крові, блокованого мерказолілом. Наявність струмогенної реакції слугувала доказом гіпотиреоїдного стану, індукова-

ного у цій групі тварин.

Дослідження щитоподібних залоз щурів, яким разом із мерказолілом вводили тироксин у дозі 1,6 мкг/кг маси (перша група корекції), показало, що їх морфологія, як макро-, так і мікроскопічна, не відрізнялася від групи, що отримувала лише мерказоліл, тобто була наявною струмогенна реакція (рис. 3). Це було свідченням

недостатньої дози тироксину. При використанні замісної дози тироксину 30 мкг/кг маси тіла (друга група корекції) струмогенна реакція не розвивалася – будова щитоподібних залоз відповідала нормі (рис. 4). Таким чином, саме ця доза тироксину компенсувала антитироїдну дію мерказолілу.

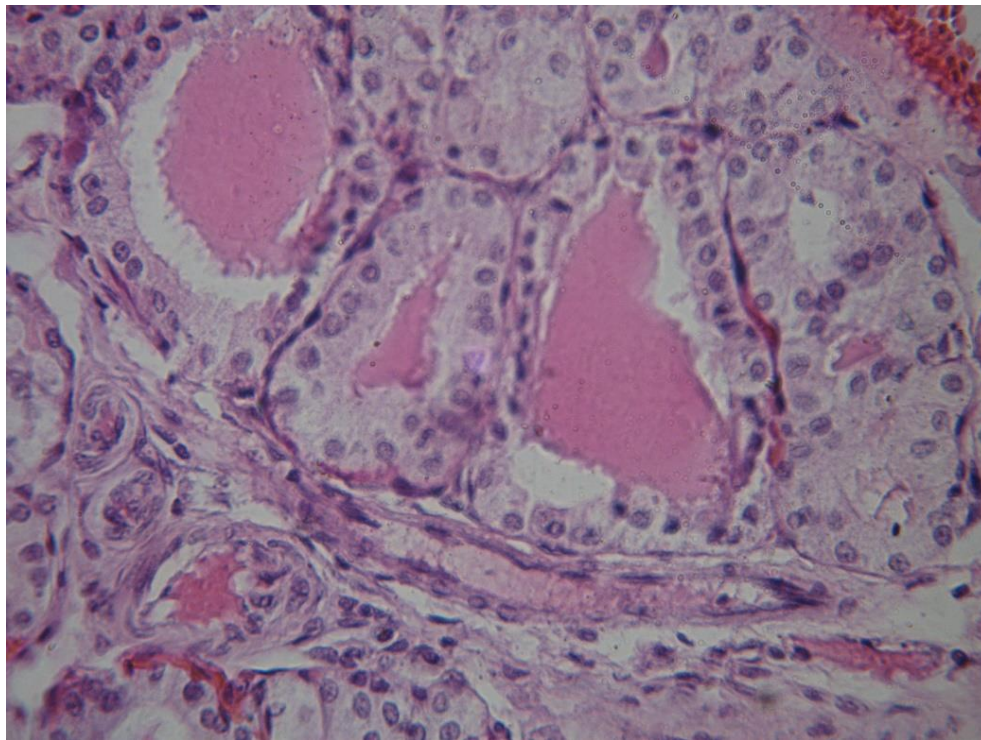


Рис. 4. Щитоподібна залоза щура, який разом із мерказолілом отримував тироксин у дозі 30 мкг/кг (друга група корекції): мікроморфологія фолікулів наближена до контрольних показників. Гематоксилін і еозин $\times 400$.

Будова щитоподібних залоз щурів, які отримували тироксин у дозах 100 мкг/кг маси тіла свідчила про їхній загальмований стан. Макроскопічно залози були менших розмірів у порівнянні з контролем, бліді, атрофовані. Мікроскопічно виявлялися великі фолікули зі щільним колоїдом та низькими тироцитами (рис. 5).

Таким чином, були отримані всі ознаки того, що в організмі тварин, які отримували тироксин, у результаті підвищення рівня тироїдних гормонів гальмувалася секреція ТТГ гіпофіза, а як наслідок, і функція щитоподібної залози. Отже, макро- та мікроморфологія щитоподібних залоз щурів цієї групи свідчили, що використана доза тироксину була достатньою для моделювання стійкого гіпертироїдизму.

Висновки

1. Оптимальною добовою дозою мерказоліла для досягнення стійкого гіпотироїдного стану впродовж двох тижнів в експериментальних щурів є доза у 10 мг/кг маси.

2. Добова доза тироксину в 1,6 мкг/кг маси тіла є недостатньою для компенсації гіпотироїдного стану в експериментальних щурів.

3. Оптимальною добовою дозою тироксину для корекції гіпотироїдного стану, викликаного мерказолілом, є 30 мкг/кг маси тіла експериментального щура.

4. Для моделювання стійкого гіпертироїдного стану в експериментальних щурів достатньою добовою дозою тироксину є 100 мкг/кг маси тіла тварини.

Перспективи подальших розробок

пов'язані з вивченням структурних змін щитоподібної залози для визначення доз препаратів, необхідних для досягнення стійкого гіпертироїдного або гіпотироїдного станів.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної теми «Морфофункціональні та імуногістохімічні особливості тканин і органів в нормі та при патологічних станах» (номер державної реєстрації 0132U000168).

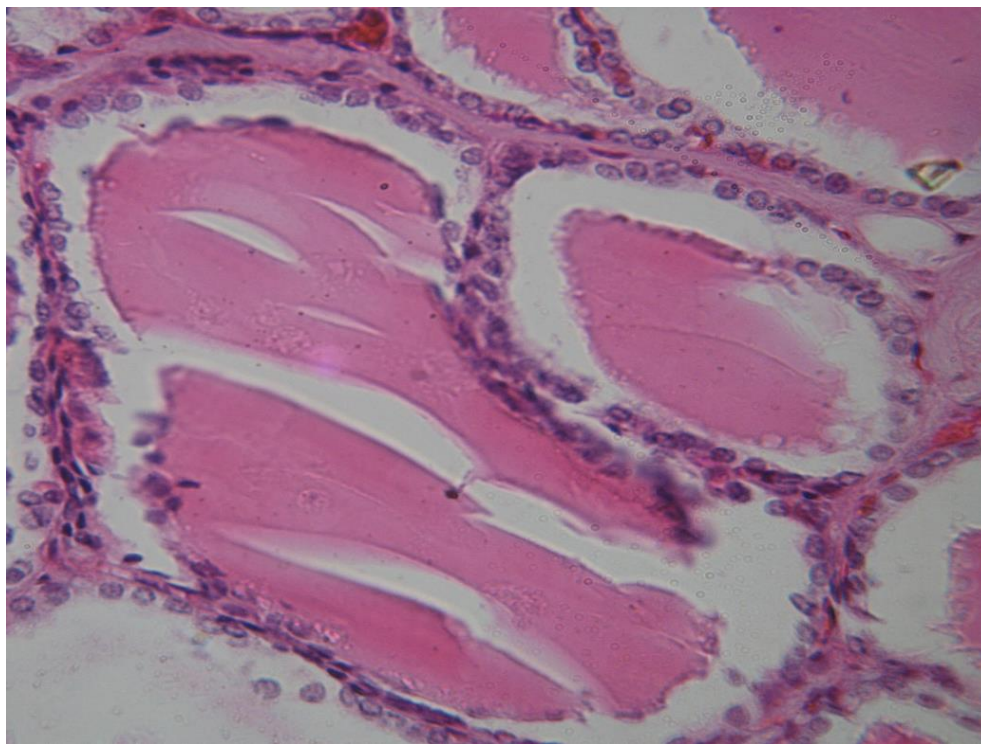


Рис. 5. Щитоподібна залоза щура з модельованим гіпертироїдизмом: тироцити плоскої форми, фолікули надмір розтягнуті щільним нерезорбованим колоїдом. Гематоксилін і еозиню ×400.

Літературні джерела

References

1. Boiko NV, Krivtsova MV, Fabri ZJ. [The use of a biological preparation from bacilli for the correction of the immune response and functional disorders of the thyroid status of the body under conditions of experimental hypothyroidism]. *Endokrynolohiya*. 2004;9(2):243-248. Ukrainian.
2. Detyuk ES. [Perinatal period of ontogenesis in case of experimental dysfunction of the thyroid gland in the mother]. *Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii*. 1976;76(11):100-104. Russian.
3. Ivanova AI. [Decidual reaction in experimental hypo- and hyperthyroidism]. *Uzbekskiy biologicheskii zhurnal*. 1965;5:39-44. Russian.
4. Eskin IA. [Fundamentals of the physiology of the endocrine glands]. Moskva: Vyschaya shkola; 1975. 304 p. Russian.
5. Myshunina TM, Bohdanova TI, Kalinichenko OV, Pil'kevych LI. [Characteristics of experimental models of goiter in rats]. *Endokrynolohiya*. 2005;10(2):194-200. Ukrainian.
6. Pan'kiv VI. [Prevalence of thyroid pathology in iodine-deficient areas of western Ukraine]. *Endokrynolohiya*. 2006;11(1):134-137. Ukrainian.
7. Bondarenko LO, Hubina-Vakulyk HI, Chagovets' OM, Gargin VV, inventors; Institute of Problems of Endocrine Pathology Academy of Medical Sciences of Ukraine, assignee. Method of modeling experimental hypothyroidism. Ukrainian patent UA 63695. 2004 jan 15. Int. cl 7G09B23/28A . Ukrainian.
8. Ukrayinets' IV, Dmytriyevs'kyi DI, Kravchenko VM, Voronina LM, inventors; National Pharmaceutical University, assignee. Means for the treatment of diseases associated with hyperfunction of the thyroid gland. Ukrainian patent UA 65914. 2004 apr 15 Int. cl 7A61K31/47, A61K9/20. Ukrainian.
9. Jazaerly MS, Davydov VV. [Age-related features of the action of Mercazolil on free radical processes in the liver]. *Problemy endokrynnoi patolohiyi*. 2006;3:29-33. Ukrainian.
10. Luksha LS, Bagel' IM, Lobanok LM. [Contractile and endothelium-dependent dilatory reactions of the aorta in hyperthyroidism]. *Problemy endokrinologii*. 2000;6:38-41. Russian.
11. Nadol'nik LI, Yemel'yanov NV, Paster IP, Vinogradov VV. [Corticosteroid-binding globulin in experimental hypothyroidism in male and female rats]. *Problemy endokrinologii*. 2000;5:35-39. Russian.
12. Hzhchots'kyi MR, Chupashko OI, Terlets'ka OI. [Experimental hypothyroidism and features of oxidative metabolism in blood and myocardial tissue of rats]. *Bukovyns'kyi medychny visnyk*. 2003;7(1):25-27. Ukrainian.
13. Sato E, Jiang JP. Follicular development and

ovulation in hypothyroid rdw rats . Ital.J.Anat.Embryol. 2001;106(2):249-256.

14. Cheren'ko MP, Ihnatovs'ky YuV, Antoniv VR, Cheren'ko SM. [About the dynamics and treatment of patients with thyroid disease in the Kyiv region after the explosion at the Chernobyl nuclear power plant]. In: [Radiobiological congress of Ukraine; 1995 may 21-25; Dnipropetrovs'k – Kyiv, Ukraine]. Nauka; 1995. p. 35-37. Ukrainian.

15. Glinoer D, De Nayer P, Bourdoux P. Regulation of maternal thyroid during pregnancy. J.Clin.Endocrinol.Metab. 1990;71:276-287.

16. Jiang JY, Miyabayashi K, Nottola SA, Umezu M. Thyroxine treatment stimulated ovarian

follicular angiogenesis in immature hypothyroid rats. Histol.Histopathol. 2008;23(11):1387-1398.

17. Stechenko LO, Kuftyreva TP, Kuzyan VR, Motulyak AP, Lavrynenko DO. [Morphological aspects of the course of the luteal phase of the ovarian cycle of rats with postoperative hypothyroidism and under the conditions of its pharmacological correction]. Visnyk morfolohiyi. 2008; 14(1):193-198. Ukrainian.

18. Morgunova TB, Fadeyev VV. [Thyroid hormone replacement therapy for hypothyroidism - one hormone or two?]. Problemy endokrinologii. 2005;1:53-56. Russian.

Согомонян С.А., Челпанова І.В., Панкевич Л.В., Амбарова Н.О. Порівняльний аналіз експериментальних форм гіпо- та гіпертироїдних станів.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Моделювання гіпо- та гіпертироїдизму в лабораторних тварин широко застосовується у сучасній експериментальній біології та медицині для вивчення патогенетичних механізмів розвитку захворювань щитоподібної залози, проблем її лікування, а також дослідження впливу дисбалансу тироїдних гормонів на різні органи та системи організму. Найбільш поширеним сучасним методом створення моделі експериментального гіпотирозидизму є введення в організм лабораторних тварин хімічних речовин, здатних блокувати функцію щитоподібної залози. Найбільш уживаним фармакопейним тиростатиком є мерказоліл, який застосовують як у клініці для лікування захворювань щитоподібної залози, що супроводжуються гіпертироїдизмом, так і в практиці експериментальних досліджень. Моделювання гіпертироїдизму здійснюють шляхом введення в організм піддослідних тварин препаратів тироїдних гормонів. **Мета** роботи - визначення оптимальних доз препаратів, необхідних для досягнення стійкого гіпертироїдного або гіпотирозидного станів а також корекції останнього в експериментальних щурів. **Методи.** Дослід поставлено на 65 статевозрілих самках білих щурів лінії Wistar масою 200-250 г. Усі тварини були поділені на 5 груп: контроль, гіпо- та гіпертироїдизм (по 15 тварин у групі), а також 2 групи з корекцією гіпотирозидизму (по 10 тварин у групі, табл. 2.1). Гіпотирозидний стан моделювали за допомогою мерказолілу ("Здоров'я", Харків) у добовій дозі 10 мг/кг; гіпертироїдизм викликали L-тироксинам ("Фармак", Київ) у добовій дозі 100 мкг/кг маси тіла тварин. В усіх дослідних групах мерказоліл і тироксин у вигляді порошку додавали в їжу щоденно протягом двох тижнів, після чого тварин піддавали евтаназії передозуванням діетилового ефіру. Структуру щитоподібних залоз вивчали на гістологічних препаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином традиційним методом. **Результати та висновки.** Під час аналізу мікроморфології щитоподібних залоз тварин, що отримували мерказоліл, була встановлена наявність струмогенної реакції слугувала доказом гіпотирозидного стану, індукованого у цій групі тварин. Дослідження щитоподібних залоз щурів, яким разом із мерказолілом вводили тироксин у дозі 1,6 мкг/кг маси (перша група корекції), показало, що їх морфологія, як макро-, так і мікроскопічна, не відрізнялася від групи, що отримувала лише мерказоліл, тобто була наявною струмогенна реакція. Це було свідченням недостатньої дози тироксину. При використанні замісної дози тироксину 30 мкг/кг маси тіла (друга група корекції) струмогенна реакція не розвивалася – будова щитоподібних залоз відповідала нормі. Таким чином, саме ця доза тироксину компенсувала антигіпотирозидну дію мерказолілу. При дослідженні будови щитоподібних залоз щурів, які отримували тироксин у дозах 100 мкг/кг, були отримані ознаки їх атрофічного стану. Таким чином, макро- та мікроморфологія щитоподібних залоз щурів цієї групи свідчили, що використана доза тироксину була достатньою для моделювання стійкого гіпертироїдизму.

Ключові слова: щитоподібна залоза, гіпотирозидизм, гіпертироїдизм, мерказоліл, тироксин.

D.A. Khaskhachikh
V.O. Potapov
O.V. Poslavska

Dnipro State Medical
University, Dnipro, Ukraine.

Надійшла: 24.01.2023

Прийнята: 15.03.2023

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.56-62>

UDC 616007.61:618.14:615.357:577.171.6:612.63.03

FACTORS OF RESISTANCE TO PROGESTIN THERAPY IN ENDOMETRIAL HYPERPLASIA IN WOMEN

Khaskhachikh D.A.  , Potapov V.O. , Poslavska O.V.  Factors of resistance to progestin therapy in endometrial hyperplasia in women.

Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. Background. The article discusses endometrial hyperplasia (EH), a condition in which there is excessive proliferation of glandular and stromal components in the endometrium. EH is divided into atypical EH (simple or complex) and atypical EH (endometrioid intraepithelial neoplasia) based on the binary scoring system of WHO (2014). The risk of developing endometrial cancer (EC) in women with EH depends on several factors, including the type of EH, age, obesity, diabetes, and recurrent abnormal uterine bleeding. Currently, long-term cyclic progesterone therapy is an effective treatment for atypical EH, but ineffectiveness has been reported in some cases, and the reasons for this are not well understood. **Objective.** The purpose of the article is to investigate the possible causes of resistance of endometrial cells in its hyperplasia to progestin therapy and predict the effectiveness of therapy. **Methods.** The research uses methods of information-search, bibliographic and comparative analysis. **Results.** Elucidated causes and mechanisms of progesterone resistance in women with EH, such as genetic factors, hormonal factors, and epigenetic factors. The article emphasizes the need for additional research to understand the main mechanisms of resistance to progesterone therapy in EH. **Conclusion.** Resistance of endometrial hyperplasia to progestin therapy can be caused by various factors, such as hormone imbalance, abnormal expression of hormone receptors, gene mutations, dysfunction of the immune system, and others. Hormone receptors such as ER, PR and Ki-67 may play an important role in predicting endometrial resistance to progestins and in determining treatment approaches. Studies also show that abnormal expression of factors that control apoptosis, such as Caspase-3 and BAX, may be associated with endometrial resistance to progestins. In addition, disruption of E-cadherin expression can affect the development of endometrial hyperplasia and resistance to progestins. Therefore, the resistance of endometrial hyperplasia to progestin therapy is a complex problem, and more research is needed to understand the role of various factors in the development of this problem and to develop more effective treatment approaches.

Key words: endometrial hyperplasia, immunohistochemistry, resistance to progesterone, receptors.

Citation:

Khaskhachikh DA, Potapov VO, Poslavska OV. Factors of resistance to progestin therapy in endometrial hyperplasia in women. Morphologia. 2023;17(1):56-62.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.56-62>

 Khaskhachikh D.A. 0000-0001-5097-6667

 Potapov V.O. 0000-0001-7498-7416

 Poslavska O.V. 0000-0002-3133-8413

 docdhas@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Introduction

Endometrial hyperplasia (EH) is a condition of the endometrium in which excessive proliferation of the glandular and stromal component is observed, which abnormal uterine bleeding most often clinically manifests. In 2014, the World Health Organization (WHO) revised the classification of EH and suggested using a binary accounting system in which EH is divided into non-atypical EH (NEH) and atypical EH (AEH) or endometrial intraepithelial neo-

plasia without previous simple and complex subtypes [1, 2].

Of course, the most important issue that worries patients and doctors is the risk of endometrial cancer in women with EH. In many studies conducted in different years, it has been proven that the risk of endometrial cancer (EC) depends on many factors, the main of which are the form of NEH or AEH, age, obesity, diabetes and recurrence of abnormal uterine bleeding [3,4]. In a retrospective

study in which 170 women with EH were followed for an average of 13.4 years (range, 1 to 26.7 years), progression to EC occurred in 1.6% and 23% of women with NEH and AEH, respectively [5,6]. In a case-control study, the cumulative risk of EC progression at 4, 9, and 19 years after diagnosis of EH was 1.2%, 1.9%, and 4.6%, respectively, in women with NEH and 8.2% and 27.5 % in women with AEH [7, 8].

EH has clinical significance, especially in women of reproductive age, and reversion of hyperplasia to normal endometrium is a key goal of conservative treatment, which is important to prevent recurrence of EH and progression to adenocarcinoma. Currently, cyclic progestin therapy in a prolonged regimen is an effective method of treatment for NEH, which significantly improves the effectiveness of endometrial reversion compared to expectant tactics. Progesterone therapy targets inhibition of estrogen receptors, growth factor receptors, and signaling pathways and represents the optimal approach for the treatment of EH. However, definitive standards for the treatment of NHE remain to be established. This is because there are increasingly reports of a certain percentage of failure of NEH treatment using pathogenically determined therapy using progestins. Such a percentage can exceed 20%, which leads to relapses or even to the progression of the disease [9, 10]. An unsolved question now is why sometimes-prescribed pathogenic therapy for NHE is not effective.

The aim of the study

Investigation of possible causes of progesterone signaling disturbances and cellular responses to progesterone leading to resistance to progesterone therapy.

Materials and methods

References and materials of patent search are used. Methods used: information retrieval, bibliographic, comparative analysis.

Results

Many scientific works were devoted to the study of endometrial resistance to progestin therapy, in which scientists investigated the causes and mechanisms of resistance to progesterone in women with EH. Thus, researchers summarizing this issue concluded that resistance to progestin therapy could be associated with various factors, such as:

1. Genetic factors: some gene mutations can affect the interaction of progesterone with its receptors in endometrial cells. For example, mutations of genes encoding progesterone receptors, which can reduce the sensitivity of endometrial cells to progesterone and contribute to the development of resistance.

2. Hyperestrogenia: High levels of estrogens can cause a decrease in the effectiveness of progesterone, which can lead to the development of resistance. This can happen due to a decrease in the number of progesterone receptors in the cells of the

endometrium.

3. Violation of the expression of sex hormone receptors, stimulation of proliferation, suppression of apoptosis and changes in the expression of factors of intercellular interaction.

4. Concomitant diseases: some diseases, such as diabetes and other metabolic disorders, can lead to the development of resistance to progesterone by reducing the number of progesterone receptors in the endometrial cells.

5. Incorrect use of therapy: Incorrect use of progesterone therapy, such as incorrect dose or duration of administration, can also contribute to the development of resistance. [11-15]

Research suggests that mutations in genes that encode components involved in the progesterone-signaling pathway may be responsible for resistance to progestins in women with NHE. One such mutation, which has been found in many patients with NHE, refers to the PTEN (phosphatase and tensin-like protein) gene, which plays an important role in regulating cell growth [16, 17].

Mutations in the PTEN gene, which normally acts as a cancer suppressor gene, can lead to decreased expression and activity of the PTEN protein, which causes activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. This signaling pathway may contribute to the progression of NEH and resistance to progestins.[18]

Studies also indicate the presence of mutations in the genes that code for the progesterone receptor, such as PROGINS (polymorphism in the progesterone receptor gene), which can affect the interaction of progesterone with its receptor and reduce the effectiveness of progestins in the treatment of NHE. [19, 20]

Therefore, gene mutations may affect the effectiveness of progestin treatment in women with HGE, as they may affect the regulation of the progesterone-signaling pathway and the interaction of progesterone with its receptor.

Hyperestrogeny is also one of the reasons for the development of atypical hyperplasia of the endometrium and can cause a decrease in the effectiveness of progestin therapy. A high level of estrogens can lead to a decrease in the number of progesterone receptors in endometrial cells, which reduces their sensitivity to the action of exogenous progesterone.

Recent studies confirm this mechanism of development of resistance to progesterone. For example, a study published in the journal "Gynecological Endocrinology" in 2019 found that high estrogen levels could lead to a decrease in the expression of progesterone receptors in the endometrium [21]. In a study published in the "International Journal of Molecular Sciences" in 2020, the authors found that hyperestrogeny could reduce the effectiveness of progesterone in the treatment of endometrial hyperplasia, which is reflected by the lack of changes in

the structure and functions of the endometrium. [22]

Resistance to progesterone in the endometrium can be caused not only by endometrial hyperplasia, but also by other factors, such as concomitant diseases (diabetes, hypofunction of the thyroid gland, and other metabolic disorders associated with an increase in the body mass index above 30 kg/m²

Diabetes and other metabolic disorders can cause resistance to progesterone by reducing the number of progesterone receptors in endometrial cells. In women with diabetes, the regulation of hormones may be disturbed, which can lead to a decrease in the level of progesterone in the body. Moreover, hypotheses regarding the relationship between insulin resistance and resistance to progesterone are considered. [23]

However, the details of these processes are not well understood and additional research is needed to determine the exact mechanisms of interaction between various factors and the development of resistance to progesterone in the endometrium.

One of the mechanisms explaining the relationship between increased BMI of more than 35 kg/cm² and resistance to progesterone is related to the level of inflammatory mediators in the body. Studies have shown that obese people have higher levels of inflammatory mediators such as cytokines and interleukins, which may contribute to the development of progesterone resistance. Some of the cytokines and interleukins that are elevated in obesity, such as IL-1 β and IL-6, may influence the development of endometrial resistance to progesterone. [24, 25]

For example, IL-1 β can reduce the expression of progesterone receptors in endometrial cells, which reduces their sensitivity to progesterone. In addition, IL-6 can contribute to the development of the inflammatory process in the endometrium, which can also affect the sensitivity of the endometrium to progesterone and contribute to the development of resistance. [26-28]

Therefore, increased levels of cytokines and interleukins in obesity may affect the development of endometrial resistance to progesterone, which may have consequences for women's reproductive health.

In addition, some studies indicate that an increased BMI can cause a decrease in the level of progesterone receptors in the endometrium, which can reduce the effectiveness of progestin therapy. In addition, obesity can affect the function of mitochondria, which can lead to a decrease in the efficiency of the energy metabolism of cells, including endometrial cells. [29, 30]

Finally, an important factor explaining the association between increased BMI and resistance to progesterone may be hormonal imbalance. Obese

women may have high levels of estrogen in their bodies, which can cause a decrease in the number of progesterone receptors in the endometrium. This can reduce the effectiveness of progesterone and lead to the development of resistance to progestin therapy. [31-33]

In general, elevated BMI may have many different mechanisms that contribute to the development of resistance to progestin therapy in women with endometrial hyperplasia.

Mainly, the treatment of EH should be aimed at controlling such symptoms as heavy bleeding and associated anemia, prevention of relapses and prevention of further development of EC [34]. However, the risk factors predicting the recurrence and progression of PE in women with EH have been insufficiently studied. Thus, this study was aimed at studying the molecular markers and factors influencing the recurrence of EH and the progression of EH in EC. Some studies have reported that the expression of sex hormone receptors and molecular markers of intercellular interaction can be used to predict the recurrence of EH and the development of PE. [35, 36]

For the treatment of NEH, LNG-IUD provides higher rates of therapeutic effect and lower rates of hysterectomy than oral progestins and should be offered as an alternative to oral progestins in these cases.

In fact, most NHEs are benign proliferations due to continuous estrogen exposure, whereas AGEs and ECs are neoplastic lesions characterized by specific underlying mutations. [37, 38] Considering these pathogenic factors in the development of EH, it is reasonable to expect that progestogens are more effective in women with NEH than in women with AEH or EC. Mechanisms of resistance may differ in these two conditions, as may the association of immunohistochemically markers with response to progestin therapy.

For this reason, in recent years there has been a growing interest in the study of clinical, imaging, histological and molecular factors that can influence the outcome of therapy.

Immunohistochemistry, which is the most widely used tool for evaluating tissue markers for the diagnosis, prognosis, and treatment of a large number of diseases, has played an important role in this field. Although a large number of immunohistochemically markers have been evaluated, their utility in some cases has been sufficiently investigated, but the interaction between these receptors is still unclear. In the table, 1 presents the most common cell markers that are expressed in the endometrium and that are most studied in EH.

Table 1

The value of receptors for predicting the effectiveness of progestins for the treatment of EH

№	Receptors	Meaning	Impact on the effectiveness of therapy
1	PR (progesterone receptor)	A protein present in endometrial cells that interacts with the hormone progesterone.	A high level of PR expression is associated with higher efficacy of progestin treatment. Low PR can indicate endometrial resistance to treatment.
2	ER (estrogen receptor)	A protein that interacts with estrogen and is present in endometrial cells.	High levels of ER expression are associated with higher efficacy of progestin treatment. Low ER may indicate endometrial resistance to progestin treatment.
3	p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor protein that regulates cell cycle and cell division.	High levels of p21 expression have been linked to progestin treatment resistance.
4	dcl-2	A protein that regulates the process of apoptosis, that is, programmed cell death.	Low dcl-2 expression is associated with progestin resistance.
5	KI-67	A protein that indicates the rate of cell growth.	High expression of KI-67 is associated with a risk of recurrence after progestin treatment.
6	eNOS (endothelial nitric oxide synthase)	A protein that generates nitric oxide in the vascular endothelium.	High eNOS expression is associated with progestin resistance.
7	dcl-2 (DNA damage-inducible transcript 2)	Protein that regulates cell growth and differentiation, and protects DNA from damage.	Reduced expression of dcl-2 'progestin resistance, and a decrease in its levels, cause insulin resistance and adversely affect the metabolic profile.
8	KI-67	Bilec is a marker of cell division and is used to determine cell proliferation.	High expression of KI-67 is associated with an increased risk of recurrence and worsening of the disease.
9	eNOS (endothelial nitric oxide synthase)	The protein is important for the vascular endothelium, and its expression may indicate the functional state of the endothelium.	Reduced expression of eNOS is associated with the risk of developing metabolic diseases such as diabetes and cardiovascular disease.
10	cyclin-D1	Protein regulates the cell cycle and cell proliferation.	High expression of cyclin-D1 is associated with cancer risk and worsening of the disease.
11	BAX	A protein is a gene that encodes a protein that regulates apoptosis.	High expression of BAX is associated with decreased cell proliferation and increased apoptosis.
12	E-cadherin	Cell membrane glycoprotein, which plays an important role in maintaining cellular adhesion and epithelial differentiation in the endometrium.	Decreased expression E-cadherin is often seen in malignant tumors, including endometrial cancer. Thus, a decrease in the expression of E-cadherin may indicate the development of endometrial cancer and be a predictor of endometrial resistance to progestin treatment.
13	Caspase 3	A protease involved in programmed cell death, or apoptosis.	Studying the expression of Caspase 3 in the endometrium may be useful in predicting the effectiveness of progestin treatment, as progestins may promote programmed cell death and reduce endometrial cell proliferation. Reduced expression of Caspase 3 may indicate the development of endometrial resistance to progestin treatment.
14	b-catenin	Protein regulates cellular adhesion and interaction between cells.	High expression of b-catenin is associated with cancer risk and worsening of the disease.

Receptor expression for some markers usually varies with different forms of AEH/EC, compared with NEH. [39, 40] Studies of receptor expression for PR, ER, p21, dcl-2, KI-67, eNOS, cycl-D1, BAX, b-catenin, E-cadherin and Caspase3 have been studied mainly in women with neoplastic endometrial lesions (AEH and EC) and may be interesting and more significant in women with NEH, to predict the risk of progression and predict relapse in the next 5 years. [41-42]

Conclusion

The resistance of endometrial hyperplasia to progestin therapy can be due to various factors, such as hormone imbalances, abnormal expression of hormone receptors, gene mutations, immune system dysfunction, and others. Hormone receptors such as PR, and Ki-67 may play an important role in predicting endometrial progestin resistance as well as determining treatment approaches.

Studies also suggest that abnormal expression

of factors controlling apoptosis, such as Caspase-3 and BAX, may be associated with endometrial progestin resistance. In addition, impaired expression of E-cadherin may affect the development of endometrial hyperplasia and progestin resistance.

Therefore, the resistance of endometrial hyperplasia to progestin therapy is a complex problem, and more research is needed to address it to understand the role of various factors in causing this problem and to develop more effective treatment approaches.

Prospects for further research

Further research into the molecular mechanisms of resistance of endometrial hyperplasia in women to progestagen therapy will help to develop a differential approach to its diagnosis and therapy.

Information on conflict of interest

There are no potential or apparent conflicts of interest related to this manuscript at the time of publication and are not anticipated.

References

1. Tavassoli FA, Devilee P, editors. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. IARC Press; 2003.
2. Trimble CL, Kauderer J, Zaino R, Silverberg S, Lim PC, Burke JJ, Alberts DS, Barakat RR. Concurrent endometrial carcinoma in women with a biopsy diagnosis of atypical endometrial hyperplasia: A Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*. 2006;106(4):812-819. doi: 10.1002/cncr.21632
3. Khaskhachikh DA, Potapov VO, Kukina GO. A differentiated approach to the treatment of endometrial hyperplasia without atypia in women of reproductive age. *Curr Issues Pediatr Obstet Gynecol*. 2019;2(24):149-154. doi: 10.11603/24116-4944.2019.2.10170
4. Khaskhachikh DA, Potapov VO, Kukina GO, Gaponova OV. The value of progesterone receptor (PR-A and PR-B) expression as predictors of endometrial hyperplasia recurrence after progestin therapy. *Curr Issues Pediatr Obstet Gynecol*. 2020;2(46):71-75. doi: 10.11603/24116-4944.2020.2.11714
5. Gromova OL, Potapov VO, Khaskhachikh DA, Finkova OP, Gaponova OV, Kukina GO, Penner KV. Epigenetic profile of endometrial proliferation in the different morphotypes of endometrial hyperplasia. *Reprod Endocrinol*. 2021;1(57):73-78. doi: 10.18370/2309-4117.2021.73-78
6. Gao J, Liang X, Li H, et al. A pilot study of treatment of atypical endometrial hyperplasia with megestrol acetate. *Gynecol Obstet Invest*. 2013;75(3):185-190. doi: 10.1159/000346408
7. Gallos ID, Yap J, Rajkhowa M, Luesley DM, Coomarasamy A, Gupta JK. Regression, relapse, and live birth rates with fertility-sparing therapy for endometrial cancer and atypical complex endometrial hyperplasia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;207(4):266.e1-12. doi: 10.1016/j.ajog.2012.06.047
8. Matsuo K, Yabuno A, Hom MS, et al. Heterogeneity of risk for pelvic lymph node metastasis in endometrial cancer. *J Obstet Gynaecol Res*. 2018;44(5):931-941. doi: 10.1111/jog.13595
9. Lacey JV Jr, Sherman ME, Rush BB, et al. Absolute risk of endometrial carcinoma during 20-year follow-up among women with endometrial hyperplasia. *J Clin Oncol*. 2010;28(5):788-792. doi: 10.1200/JCO.2009.23.1577
10. Fu M, Feng Y, Fang H, Zhang J, Wang X. Relationship between progesterone resistance and endometrial abnormalities. *J Med Res Pract*. 2018;3(2):31-36. doi: 10.1016/j.jmrp.2017.08.003
11. Kim J, Cho K, Lee Y, Kim J, Kim Y. Endometrial hyperplasia: molecular pathogenesis and new therapeutic opportunities. *Korean J Med Sci*. 2020;35(4):e37. doi: 10.3346/jkms.2020.35.e37
12. Sakai K, Yoshida T. Mechanisms of progesterone resistance in endometrial hyperplasia and their impact on pathogenesis and treatment. *Biomed Pharmacother*. 2020;1(3):44-53. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109204
13. Xu L, Hu C, Qiu C, Yang Z, Xu Q. Progesterone resistance and endometrial hyperplasia: latest research and treatment prospects. *J Med Sci*. 2021;41(2):41-47. doi: 10.3779/j.issn.1009-6574.2021.02.01
14. Zhang Y, Guo H, Cui X, Song X, Wang Y. Molecular mechanisms of progesterone resistance and their clinical significance in endometrial hyperplasia. *J Gynecol Obstet*. 2022;1(1):15-22. doi: 10.31083/j.jgo.2022.01.003

15. Carneiro MM, Pereira RM, Costa LM, Lemos TA, Reis FM. Genetic mutations and endometrial hyperplasia: unlocking the secret. *Int J Gynecol Cancer*. 2019;29(6):1106-1113. doi: 10.1136/ijgc-2019-000474
16. Dong Y, Lu J, Zhang Y, Zhang H, Wang L. Genetic mutations and endometrial hyperplasia: a review of the current advances. *J Ovarian Res*. 2020;13(1):31. doi: 10.1186/s13048-020-00629-4
17. Guo F, Wang H. Molecular mechanism and targeted therapy of endometrial hyperplasia. *J Oncol*. 2020;2020:7282609. doi: 10.1155/2020/7282609
18. Fu M, Feng Y, Fang H, Zhang J, Wang X. Relationship between progesterone resistance and endometrial abnormalities. *J Med Res Pract*. 2018;3(2):31-36. doi: 10.1016/j.jmrp.2017.08.003
19. Kim J, Cho K, Lee Y, Kim J, Kim Y. Endometrial hyperplasia: molecular pathogenesis and new therapeutic opportunities. *Korean J Med Sci*. 2020;35(4):e37. doi: 10.3346/jkms.2020.35.e37
20. Sakai K, Yoshida T. Mechanisms of progesterone resistance in endometrial hyperplasia and their impact on pathogenesis and treatment. *Biomed Pharmacother*. 2020;1(3):44-53. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109204
21. Xu L, Hu C, Qiu C, Yang Z, Xu Q. Progesterone resistance and endometrial hyperplasia: latest research and treatment prospects. *J Med Sci*. 2021;41(2):41-47. doi: 10.3779/j.issn.1009-6574.2021.02.01
22. Zhang Y, Guo H, Cui X, Song X, Wang Y. Molecular mechanisms of progesterone resistance and their clinical significance in endometrial hyperplasia. *J Gynecol Obstet*. 2022;1(1):15-22. doi: 10.31083/j.jgo.2022.01.003
23. Carneiro MM, Pereira RM, Costa LM, Lemos TA, Reis FM. Genetic mutations and endometrial hyperplasia: unlocking the secret. *Int J Gynecol Cancer*. 2019;29(6):1106-1113. doi: 10.1136/ijgc-2019-000474
24. Dong Y, Lu J, Zhang Y, Zhang H, Wang L. Genetic mutations and endometrial hyperplasia: a review of the current advances. *J Ovarian Res*. 2020;13(1):31. doi: 10.1186/s13048-020-00629-4
25. Guo F, Wang H. Molecular mechanism and targeted therapy of endometrial hyperplasia. *J Oncol*. 2020;2020:7282609. doi: 10.1155/2020/7282609
26. Fu M, Feng Y, Fang H, Zhang J, Wang X. Relationship between progesterone resistance and endometrial abnormalities. *J Med Res Pract*. 2018;3(2):31-36. doi: 10.1016/j.jmrp.2017.08.003
27. Kim J, Cho K, Lee Y, Kim J, Kim Y. Endometrial hyperplasia: molecular pathogenesis and new therapeutic opportunities. *Korean J Med Sci*. 2020;35(4):e37. doi: 10.3346/jkms.2020.35.e37
28. Sakai K, Yoshida T. Mechanisms of progesterone resistance in endometrial hyperplasia and their impact on pathogenesis and treatment. *Biomed Pharmacother*. 2020;1(3):44-53. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109204
29. Xu L, Hu C, Qiu C, Yang Z, Xu Q. Progesterone resistance and endometrial hyperplasia: latest research and treatment prospects. *J Med Sci*. 2021;41(2):41-47. doi: 10.3779/j.issn.1009-6574.2021.02.01
30. Zhang Y, Guo H, Cui X, Song X, Wang Y. Molecular mechanisms of progesterone resistance and their clinical significance in endometrial hyperplasia. *J Gynecol Obstet*. 2022;1(1):15-22. doi: 10.31083/j.jgo.2022.01.003
31. Carneiro MM, Pereira RM, Costa LM, Lemos TA, Reis FM. Genetic mutations and endometrial hyperplasia: unlocking the secret. *Int J Gynecol Cancer*. 2019;29(6):1106-1113. doi: 10.1136/ijgc-2019-000474
32. Dong Y, Lu J, Zhang Y, Zhang H, Wang L. Genetic mutations and endometrial hyperplasia: a review of the current advances. *J Ovarian Res*. 2020;13(1):31. doi: 10.1186/s13048-020-00629-4
33. Guo F, Wang H. Molecular mechanism and targeted therapy of endometrial hyperplasia. *J Oncol*. 2020;2020:7282609. doi: 10.1155/2020/7282609
34. Fu M, Feng Y, Fang H, Zhang J, Wang X. Relationship between progesterone resistance and endometrial abnormalities. *J Med Res Pract*. 2018;3(2):31-36. doi: 10.1016/j.jmrp.2017.08.003
35. Kim J, Cho K, Lee Y, Kim J, Kim Y. Endometrial hyperplasia: molecular pathogenesis and new therapeutic opportunities. *Korean J Med Sci*. 2020;35(4):e37. doi: 10.3346/jkms.2020.35.e37
36. Sakai K, Yoshida T. Mechanisms of progesterone resistance in endometrial hyperplasia and their impact on pathogenesis and treatment. *Biomed Pharmacother*. 2020;1(3):44-53. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109204
37. Xu L, Hu C, Qiu C, Yang Z, Xu Q. Progesterone resistance and endometrial hyperplasia: latest research and treatment prospects. *J Med Sci*. 2021;41(2):41-47. doi: 10.3779/j.issn.1009-6574.2021.02.01
38. Zhang Y, Guo H, Cui X, Song X, Wang Y. Molecular mechanisms of progesterone resistance and their clinical significance in endometrial hyperplasia. *J Gynecol Obstet*. 2022;1(1):15-22. doi: 10.31083/j.jgo.2022.01.003
39. Carneiro MM, Pereira RM, Costa LM, Lemos TA, Reis FM. Genetic mutations and endometrial hyperplasia: unlocking the secret. *Int J Gynecol Cancer*. 2019;29(6):1106-1113. doi: 10.1136/ijgc-2019-000474
40. Dong Y, Lu J, Zhang Y, Zhang H, Wang L. Genetic mutations and endometrial hyperplasia: a review of the current advances. *J Ovarian Res*. 2020;13(1):31. doi: 10.1186/s13048-020-00629-4
41. Guo F, Wang H. Molecular mechanism and targeted therapy of endometrial hyperplasia. *J Oncol*. 2020;2020:7282609. doi: 10.1155/2020/7282609

Хасхачих Д.А., Потапов В. О., Пославська О.В. Фактори резистентності до терапії прогестинами при гіперплазії ендометрія у жінок.

РЕФЕРАТ. Актуальність. У статті обговорюється гіперплазія ендометрія (ГЕ), стан, при якому в ендометрії спостерігається надмірна проліферація залозистих і стромальних компонентів. ГЕ поділяється на неатипову ГЕ (просту або складну) та атипову ГЕ (ендометріоїдна інтраепітеліальна неоплазія) на основі бінарної системи обліку ВООЗ (2014). Ризик розвитку раку ендометрію (РЕ) у жінок з ГЕ залежить від багатьох факторів, включаючи тип ГЕ, вік, ожиріння, діабет, рецидив аномальної маткової кровотечі й інші. В даний час циклічна терапія прогестероном у пролонгованій схемі є ефективним методом лікування нетипової ГЕ, але є повідомлення про неефективність у деяких випадках, і причини цього недостатньо вивчені. **Мета.** Метою статті є дослідження можливих причин резистентності клітин ендометрія при його гіперплазії до терапії прогестинами та прогнозування ефективності терапії. **Методи.** У дослідженні використовуються методи інформаційно-пошукового, бібліографічного та порівняльного аналізу. **Результати.** Виствітлені причини та механізми резистентності до прогестерону у жінок з ГЕ, такі як генетичні фактори, гормональні фактори та епігенетичні фактори. Стаття підкреслює необхідність додаткових досліджень для розуміння основних механізмів резистентності до терапії прогестероном при ГЕ. **Висновки.** Резистентність гіперплазії ендометрія до терапії прогестинами може бути зумовлена різними факторами, такими як дисбаланс гормонів, аномальна експресія рецепторів гормонів, мутації генів, дисфункція імунної системи та інші. Рецептори до гормонів, такі як ER, PR та Ki-67, можуть відігравати важливу роль у прогнозуванні резистентності ендометрія до прогестинів, а також у визначенні підходів до лікування. Дослідження також показують, що аномальна експресія факторів, які контролюють апоптоз, таких як Caspase-3 та BAX, можуть бути пов'язані з резистентністю ендометрія до прогестинів. Крім того, порушення експресії E-кадгерину може впливати на розвиток гіперплазії ендометрія та резистентність до прогестинів. Отже, резистентність гіперплазії ендометрія до терапії прогестинами є складною проблемою, і для її розв'язання необхідно провести більше досліджень, щоб розуміти роль різних факторів у виникненні цієї проблеми та розробити більш ефективні підходи до лікування.

Ключові слова: гіперплазія ендометрія, імуногістохімія, резистентність до прогестерону, рецептори.

І.В. Челпанова

Львівський національний
медичний університет
імені Данила Галицького
Львів, Україна

Надійшла: 07.01.2023

Прийнята: 15.02.2023

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.63-77>

УДК: 616.714-089.843-073.7-018.1

ПЕРЕБУДОВИ КІСТКИ НИЖНЬОЇ ЩЕ- ЛЕПИ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ОК- ТАКАЛЬЦІЙФОСФАТУ ТА ХІТОЗАНУ: ГІСТОЛОГІЧНІ, ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРНІ АСПЕКТИ

Chelpanova I.V.  ✉ Mandibular bone restructuring after octacalcium phosphate and chitosan transplantation: histological, immunohistochemical and ultrastructural aspects.

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine.

ABSTRACT. This article presents the research results of the histological, immunohistochemical, and ultrastructural characteristics of bone-ceramic regenerate after octacalcium phosphate and chitosan transplantation into an experimental defect in the rabbit mandible, since complete and high-quality regeneration of maxillofacial bones, its mechanisms and dynamics remain not fully understood, need clarification and detailing. **Aim.** To study in an experiment the dynamics of histological, immunohistochemical, and ultrastructural changes in the lower jaw bone after its traumatic injury with subsequent replacement of the defect with octacalcium phosphate and activated chitosan. **Methods.** Experiments were conducted on 89 male rabbits aged 6-7 months, weighing 2.5-3.0 kg. 20 animals constituted the control group, and 64 the two experimental groups. Another 5 intact animals were used to study the normal structure of the bone tissue of the studied area of the mandible. The control group included animals with a bone tissue defect that healed under a blood clot. The first experimental group consisted of 32 rabbits where the bone defect was filled with modified natural octacalcium phosphate with a mix of chitosan and ampicillin (OCP-N-Chitosan-Ampicillin). The second experimental group consisted of 32 rabbits where the bone defect was filled with activated chitosan (Chitosan-A). Post-traumatic bone tissue status within the defect area was monitored for 84 days using the following methods: bone defect modeling, light-optical assessment of the histostructure of decalcified bone sections, immunohistochemical determination of the expression of markers CD34, Calcitonin, Ki-67, transmission electron microscopy. Relief changes were studied by scanning electron microscopy. **Results and conclusion.** Layered implantation of the OCP-N-Chitosan-Ampicillin material (the outer segment of the graft is a complex of chitosan and ampicillin, the inner segment is modified natural octacalcium phosphate granules) creates conditions for the realization of a secondary osteoinduction effect. Specifically, one week post-implantation, a hypoxic zone forms under the dense chitosan coating. This induces intensive periosteal regeneration and activates neovascularization, accompanied by migration and cytodifferentiation of osteoprogenitor cells from two directions: 1) from the microvessels of the regenerated periosteum and 2) from the damaged trabeculae of the native bone at the edges of the experimental defect. During weeks 2-3, the pores of the inner implant segment containing modified octacalcium phosphate ensure complete vascularization of the bone-ceramic regenerate, filling it with islands of desmal osteogenesis. This is followed by the formation of woven bone trabeculae and a wave-like spread of bone tissue remodeling processes from the periphery of the regenerate towards its deeper zone. The application of Chitosan-A resulted in limited growth of the relative volume of bone tissue in the regenerate over the study period. This growth rate was significantly lower than the dynamic changes observed in the control group. Eight weeks post-implantation of activated chitosan, against a background of limited osteointegration in the peripheral regions of the regenerate, slow diffuse remodeling of loosely arranged trabeculae occurs with the formation of primitive bone lamellae. Signs of compaction of the newly formed bone near the periosteum appear only after 12 weeks of the experiment. Osteons with deformed geometry contain predominantly immature osteocytes, and the orientation of collagen fiber bundles within the bone lamellae shows limited spatial organization against a background of a significant proportion of amorphous osteomatrix. At the end of the experiment, the deep zone of the regenerate contains heteromorphic connective tissue areas and loosely arranged bone trabeculae with signs of incomplete remodeling.

Key words: lower jaw/mandible, dentoalveolar system, bone tissue, regeneration, octacalcium phosphate, chitosan, histostructure, immunohistochemistry, ultrastructure.

Citation:

Chelpanova IV. [Mandibular bone restructuring after octacalcium phosphate and chitosan transplantation: histological, immunohistochemical and ultrastructural aspects]. Morphologia. 2023;17(1):63-77. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.63-77>

 Chelpanova I.V. 0000-0001-5215-814X

✉ ilona.med75@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Актуальним питанням сучасної медицини є остеорегенерація в галузі щелепно-лицевої та реконструктивної хірургії. Важливим напрямком є пошук ефективних методів пришивдшення загоєння кісток та уникнення різноманітних ускладнень. Природні механізми регенерації кістки не завжди призводять до успішного загоєння. У випадку великих посттравматичних дефектів, інфікуванні значно погіршуються темпи регенерації та виникає низка ускладнень, що негативно впливає на повне та якісне ремоделювання [1, 2].

Одним із найпопулярніших матеріалів для заповнення кісткових дефектів є октакальційфосфат. Він швидко резорбується в організмі, а його структура легко замінюється природною кістковою тканиною [3]. У таких випадках необхідне хірургічне лікування із застосуванням синтетичних остеопластичних матеріалів, часто збагачених антибактеріальними компонентами. Одним із таких матеріалів є хітозан – похідна сполука хітину. Хітозан – природний біополімер, що має високу біосумісність, відсутність імуногенності та токсичності, а його хімічний склад суттєво не відрізняється від складу позаклітинного матриксу кісткової тканини [4, 5]. Поєднання органічних властивостей хітозану та сполук кальцію мінерального матриксу стало основою створення якісно нового остеопластичного матеріалу, який з успіхом застосовується сьогодні у стоматологічній практиці. Дослідники повинні зосередитися на поєднанні хітозану з іншими біоматеріалами або біоактивними молекулами, щоб підвищити їхній регенеративний потенціал. Крім того, необхідні клінічні випробування, щоб дослідити ефективність і безпеку біоматеріалів на основі хітозану, які можуть стати важливим доповненням до сфери відновлення мінералізованих тканин [6].

Клітинні та тканинні перебудови, що відбуваються під час загоєння експериментальних кісткових дефектів привернули значну увагу дослідників, в тому числі після використання остеотропних матеріалів [7]. Дослідження, що стосуються ультраструктурних перебудов міжклітинного матриксу, фібробластів, остеобластів та остеоцитів під час остеорегенерації змодельованих кісткових дефектів заслуговують особливої уваги [8]. Дослідження щодо визначення імуногістохімічних характеристик клітинного, волокнистого та мікроциркуляторного компонентів під час регенераторних перетворень кісткової тканини та при її взаємодії з остеотропними матеріалами останнім часом набули особливого значення [9, 10].

Мета дослідження – визначити динаміку гістологічних, імуногістохімічних та ультраструктурних змін у кістці нижньої щелепи кролика після її травматичного ушкодження із наступним заміщенням дефекту остеопластичним матеріа-

лом ОКФ-Н і активованим хітозаном.

Матеріали та методи

Дослідження було проведено на 89 статевозрілих кроликах-самцях віком 6-7 місяців, вагою 2,5-3 кг. Тварини були розділені на контрольну (20 тварин) та дві експериментальні групи (по 32 тварини кожна). Ще 5 інтактних тварин було використано для вивчення нормальної структури кісткової тканини досліджуваної ділянки нижньої щелепи. Тваринам контрольної та експериментальних груп під загальним наркозом, шляхом внутрішньоочеревинного введення Тіопенату («Брофарма», Україна), з розрахунку 25 мг/кг маси тіла тварини на рівні міжзубної ділянки коміркової частини нижньої щелепи за допомогою стоматологічного бора створювали кістковий дефект розміром 4х3 мм.

До контрольної групи увійшли тварини з дефектом кісткової тканини, який загоювався під кров'яним згустком.

Першу експериментальну групу складали кролики, у яких кістковий дефект заповнювали остеотропним матеріалом Compact BoneB («Dentegris», Німеччина), який містить натуральний октакальційфосфат, а також комплексом хітозан ацетату з ампіциліном (Київмедпрепарат, Україна) (ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін). Другу експериментальну групу складали кролики, у яких кістковий дефект заповнювали хітозаном, активованим оцтовою кислотою (ChitopharmTMM; Product no.44202; Norway) (Хітозан-А). Дослідження стану кісткової тканини в ділянці нанесеного дефекту здійснювали через 1, 7, 14, 21, 28, 35, 56 та 84 доби після нанесення травми. В усі вказані терміни проводили світлооптичну оцінку гістоструктури декальцинованої кістки, імуногістохімічне визначення експресії маркерів CD34, Calcitonin, Ki-67, морфометрію, а також вивчення рельєфних змін шляхом скануючої електронної мікроскопії та ультраструктурний аналіз з використанням трансмісійної електронної мікроскопії.

Для гістологічного дослідження фрагменти кістки нижньої щелепи в зоні експериментального дефекту фіксували у 10%-ному розчині формаліну, демінералізували у 10%-ному водному розчині азотної кислоти, проводили у спиртах висхідної концентрації з подальшою заливкою у парафін. Отримані з блоків зрізи товщиною 5-7 мкм депарафінували та забарвлювали гематоксиліном і еозином [11, 12].

Імуногістохімічне дослідження проводилось згідно протоколів компанії TermoScientific (США). Після депарафінізації, регідратації, температурного демаскування антигенів та пригнічення активності ендогенної пероксидази проводили інкубацію зрізів з первинними моноклональними кролячими антитілами CD34 (QBEnd/10; 1:250), Calcitonin (SP17; Ready to use), Ki-67 (SP6; 1:250) у вологих камерах при температурі

23-25°C протягом 30 хвилин. Використовували систему візуалізації UltraVision Quanto (LabVision). Для ідентифікації реакції наносився розчин хромогену 3-діамінобензидин тетрахло-риду (DAB) (Quanto, LabVision) під контролем мікроскопу протягом від 20 секунд до 3 хвилин, з проявом у вигляді коричневого забарвлення. Далі додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра протягом 1-3 хвилини з наступною дегідратацією та закріпленням бальзамом за стандартною процедурою [13, 14].

Для ультраструктурного дослідження демінералізовані зразки нижньої щелепи фіксували при температурі +2°C протягом 3-4 годин у 2,5%-ному розчині глутарового альдегіду в 0,2М фосфатному буфері (pH=7,4) з наступною постфіксацією протягом 1 години в 1%-ному забуференому (pH=7,4) розчині чотириокису осмію («SPI», США), дегідратацією в спиртах і пропіленоксиді та виготовленням епоксидних блоків з використанням епон-аральдитової композиції. Ультратонкі зрізи розміщали на мідних сітках і здійснювали подвійне контрастування за методом Рейнольдса [15]. Дослідження проводили на трансмісійному електронному мікроскопі ПЕМ-100-01 («SELMi», Україна) при прискорювальній напрузі 75 кВ і первинних збільшеннях від 1500 до 25000 за стандартною схемою [16].

Рельєфні особливості кісткової тканини в зоні експериментального дефекту вивчали методом скануючої електронної мікроскопії, виконаної на растровому електронному мікроскопі JEOL T220A. Зразки фіксували в 2,0%-му розчині глутаральдегіду, проводили процедуру сублімаційного сушіння та металізували термічним напыленням шару міді (до 20 нм). Для фотографування використовували напругу прискорення 20 кВ [17].

Для визначення змін складу регенерату використовували підрахунок відносного об'єму 1) кісткової тканини, 2) остеопластичного матеріалу, 3) сполучної тканини в регенераті, що були визначені на цифрових мікрофотографіях демінералізованих гістологічних зрізів фрагментів нижньої щелепи, забарвлених гематоксиліном та еозином, з використанням програмного пакету ImageJ 1.47v за рекомендаціями [18].

Для визначення підпорядкування отриманих даних нормальному закону розподілу використовували аналіз гістограми розподілу, показники коефіцієнтів асиметрії та екстинкції, критерій Шапіро-Уїлка. Результати кожної групи в різні моменти часу підпорядковувались нормальному закону розподілу, їх подано у вигляді $M \pm m$, де M – середнє арифметичне, m – стандартне відхилення середнього. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми значеннями показників у різні терміни експерименту, а також для порівняння даних групи контролю з експериментальною групою в однакові строки спостережен-

ня використовували t-критерій Стьюдента. Різницю між групами вважали достовірною при $p < 0,05$. Для проведення статистичних обрахунків та створення графіків було використано програмне забезпечення RStudio v1.2.5042. Для оформлення графіків та таблиць було використано електронні таблиці Excel з пакету MS Office 2010 із застосуванням ліцензійної програми STATISTICA (версія 6.1; серійний номер AGAR 909 E415822FA). Послідовність статистичних процедур проводили відповідно до рекомендацій [19].

Всі процедури, що стосувалися питань утримання, догляду, маркування тварин та всі інші маніпуляції проводилися із дотриманням положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), Закону України № 3447 – IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» згідно з директивою Ради ЄС 2010/63/EU про дотримання постанов, законів, адміністративних положень Держав ЄС з питань захисту тварин, які використовуються з науковою метою [20, 21].

Результати та їх обговорення

Гістологічне вивчення демінералізованої нижньої щелепи через одну добу після нанесення експериментального дефекту та пошарової імплантації матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін (зовнішній сегмент трансплантату – комплекс хітозану з ампіциліном, внутрішній сегмент – гранули модифікованого натурального октакальційфосфату) показало наявність масованого тромбоутворення у просвітах зруйнованих мікросудин та численних дрібних крововиливів. Спостерігались виразний периваскулярний та інтерстиційний набряк періосту і м'яких тканин поблизу механічної остеодеструкції, екстравазальні скупчення еритроцитів і поліморфноядерних. По краях експериментальної шахти у материнській кістковій тканині визначались дрібні скупчення фібринових мас і гемосидеринові накопичення. Остеони поблизу дефекту містили численні резорбційні лакуни і гомогенізовані пластинки. На електронограмах спостерігались поодинокі активовані остеокласти, що свідчило про незначну резорбцію ушкоджених кісткових пластинок та підтверджувалось негативним імуногістохімічним забарвленням парафінових зрізів Calcitonin-SP17-клональними антитілами. Гомогенізація кісткового матриксу супроводжувалась інтрацелюлярним набряком остеоцитів і деструкцією пучків колагенових фібрил. У складі періосту навколо хітозанового сегменту трансплантату виявлялись ознаки активного неоваскулогенезу без проявів фіброзування або проліферації фібробластів. Визначення маркера Ki-67 виявило незначну проліферативну активність клітин різ-

них диферонів у даній локалізації, за виключенням ендотеліоцитів. На поверхні ушкоджених кісткових трабекул на межі з імплантованим матеріалом поблизу ендосту спостерігались примітивні гемокапіляри та ендотеліальні тяжі у формі паростків в супроводі фібробластів, що свідчило про утворення грануляційної тканини по краях експериментального дефекту та підтверджувалось інтенсивним імуногістохімічним забарвленням в реакції з маркером проліферації Ki-67 у ядрах фібробластів і ендотеліальних клітин ендосту.

Через один тиждень після експериментальної травми та імплантації матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін поряд із незначними ознаками травматичного запалення навколо зони дефекту спостерігалась істотна дезорганізація і деструкція материнської пластинчастої кістки, гомогенізація кісткового матриксу. У порівнянні зі станом на першу добу зростала площа резорбційних порожнин з тканинним детритом, фібриноідом або гемосидериновими депозитами. Травмовані остеони і кісткові трабекули по краях дефекту набували горбистих контурів внаслідок утворення численних остеοїдних випинань на їх поверхні. У цих ділянках навколо гемокапілярів спостерігались поодинокі остеокласти, значна кількість відокремлених один від одного остеобластів, які імуногістохімічно при вивченні маркера Ki-67 інтенсивно накопичували імуногістохімічну мітку. При ультраструктурному дослідженні навколо остеобластів виявлялись хаотично угруповані колагенові волокна, занурені у гомогенний матрикс.

Наприкінці першого тижня експерименту спостерігалось активне відновлення періосту на поверхні зовнішнього хітозанового покриття імплантованого матеріалу з активним вrostанням новоутворених примітивних гемокапілярів або ендотеліальних паростків від поверхні у глибину трансплантату. Неоваскулогенез у даній центральній ділянці регенерату супроводжувався значною міграцією остеопрогеніторних клітин, частка яких набувала ультраструктурних ознак остеобластів. На відміну від групи контролю, в периферичних ділянках регенерату поблизу межі з материнською губчастою кісткою виявлялась велика кількість острівців десмального остеогенезу зі щільним вмістом новоутворених примітивних мікросудин і гетероморфних клітин – фібробластів, остеобластів та їх недиференційованих попередників. Інтенсивне накопичення маркера Ki-67 в ядрах означених клітин свідчило про їхню високу проліферативну активність на периферії регенерату. Значна щільність CD34-позитивних структур (гемокапілярів або ендотеліальних тяжів) вказувала на активний неоваскулогенез в даній локалізації. Гематогенні клітини навколо гемокапілярів зустрічались рідко, остеокласти не виявлялись. На електронограмах поб-

лизу остеобластів в остеогенних острівцях спостерігались поодинокі невпорядковані колагенові волокна або їхні пучки з ознаками незрілості. У складі остеοїду острівців десмального остеогенезу аморфний компонент за площею суттєво переважав над колагеновими волокнами (рис. 1).

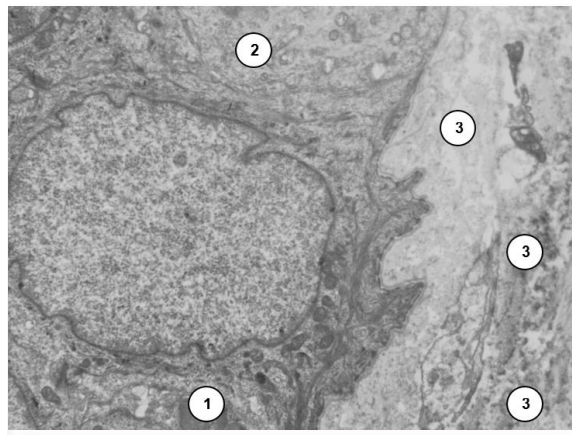


Рис. 1. Електронна трансмісійна мікрофотографія глибокої ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 1 тиждень після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін. 1 – фрагмент цитоплазми остеобласта; 2 – малодиференційована остеогенна клітина; 3 – неструктурований остеοїд. $\times 3000$.

Протягом 2-3-го тижнів після імплантації матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін запально-інфільтративні прояви у твердих і м'яких тканинах навколо зони дефекту майже не виявлялись. На поверхні зовнішнього (хітозанового) сегменту імплантованого матеріалу спостерігались ознаки активного відновлення клітинного, волокнистого і мікросудинного компонентів періосту. Дезорганізація кісткової тканини та гомогенізація кісткового матриксу навколо зони травми спостерігались рідко. Резорбційні порожнини розташовувались на значній відстані одна від одної. Численні остеοїдні вирости по краях ушкодженої материнської кістки на поверхні травмованих остеонів і кісткових трабекул були занурені у товщу репаративного регенерату між острівцями десмального остеогенезу або анастомозували з ними. Вирости трабекул материнської кістки містили повнокровні гемокапіляри в оточенні незначної кількості остеокластів та сполучались з мікросудинами відновленого ендосту. Активовані остеокласти по краях відновлених трабекул материнської кістки в тих ділянках, що занурювались у глибину регенерату, свідчили про об'єднання материнських трабекул з новоутвореними трабекулами регенерату. Серед клітинних субпопуляцій чисельно переважали остеобласти, які розташовувались поодинокі в товщі органічного матриксу остеοїдних виростів на поверхні трабекул материнської кістки. Експресія маркера проліферації Ki-67 була найвищою в ядрах остеобластів у порівнянні з іншими клі-

тинними диферонами. При вивченні Calcitonin-SP17-клональних антитіл не спостерігалось суттєвої резорбційної активності остеокластів в основі материнських трабекул, проте на верхівках відновлених трабекул і спікул їхня активність була високою. Вивчення експресії маркера CD34 показало помірний ступінь васкуляризації материнської губчастої кістки. При ультраструктурному дослідженні остеїд на поверхні відновлених трабекул містив незначну кількість слабко орієнтованих пучків колагенових волокон навколо остеобластів з ознаками незначної синтетичної активності.

На периферії кісткового регенерату протягом 2-3-го тижнів після імплантації матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін кількість і щільність острівців перетинчастого остеогенезу значно перевищували показник контрольної групи тварин. Остеогенні острівці анастомозували з утворенням трабекул, а також об'єднувались з горбистими кістковими трабекулами материнської губчастої кістки. В їх складі візуалізувались численні мікросудини різного ступеня морфологічної зрілості в оточенні остеобластів, які часто утворювали групи. У міжтрабекулярних просторах зосереджувались поодинокі фібробласти та численні недиференційовані клітини остеогенного диферону. При ультраструктурному дослідженні остеїд новоутворених трабекул містив колагенові волокна різного ступеня зрілості та їх варіативні за розміром пучки з невпорядкованою орієнтацією. Ультраструктура остеобластів всередині керамічно-кісткового регенерату, які містили розвинений комплекс Гольджі та численні елементи гранулярної ендоплазматичної сітки, вказувала на їх високу синтетичну активність. При імуногістохімічному дослідженні маркер Ki-67 інтенсивно накопичувався в ядрах клітин-попередниць остеобластів; маркер CD34 – у мембранах і цитоплазмі ендотеліальних клітин по всьому об'єму кістково-керамічного регенерату, Calcitonin-SP17-позитивні остеокласти з пригніченою резорбтивною активністю не виявлялися. Навпаки, переважали активовані остеокласти з розвинутою гофрованою облямівкою (рис. 2).

Глибока зона кістково-керамічного регенерату містила значну кількість мікросудин і ендотеліальних паростків, що свідчило про інтенсивний неоваскулогенез. На відміну від групи контролю, навколо функціонуючих гемокапілярів утворювались численні острівці перетинчастого остеогенезу, в той час як осередки хрящового матриксу не виявлялись. Поодинокі осередки фіброзування в площині зони регенерату були невеликими за площею.

Через 4-5 тижнів після експериментальної травми та імплантації матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін виявлялись радіально орієнтовані новоутворені з боку материнської кістки трабекули.

Вони анастомозували з грубоволокнистими новоутвореними трабекулами остеорегенерату, утворюючи безперервний ендост. У ділянках компактної материнської кістки з ознаками посттравматичної дезорганізації та гомогенізації кісткового матриксу навколо мікросудин зосереджувались активні остеокласти, що імуногістохімічно підтверджувалось при застосуванні Calcitonin-SP17-клональних антитіл. Наявність лакун Гаушипа вказували на інтенсивне відновлення ушкоджених унаслідок травми кісткових пластинок материнської кістки. На поверхні зовнішнього сегменту імплантованого матеріалу виявлялась відновлена гістоструктура періосту зі значним вмістом як остеопрогеніторних клітин, так і остеобластів. Поблизу ендосту материнської губчастої кістки спостерігались численні остеобласти, які розташовувались ізольовано або групами в товщі органічного матриксу відновлених трабекул. Чисельно серед клітин трабекул у внутрішніх ділянках остеорегенерату переважали остеобласти. Вони інтенсивно накопичували імуногістохімічну мітку Ki-67, що вказувало на їх високу проліферативну активність, на відміну від інших клітин. На відміну від контрольної групи, при електронній мікроскопії виявлялась висока синтетична активність остеобластів, причому фіброгенез суттєво переважав над секрецією аморфного компоненту остеїду.

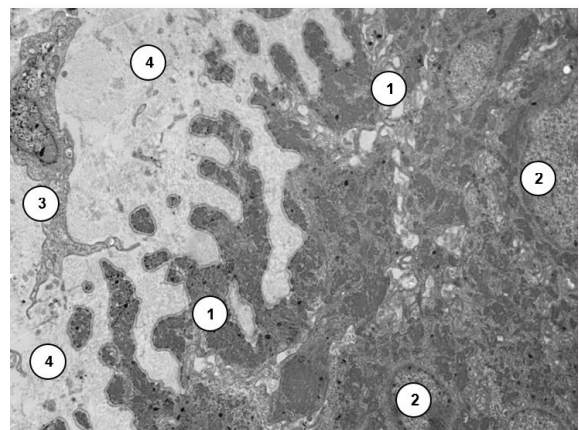


Рис. 2. Електронна трансмісійна мікрофотографія периферичної ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 3 тижні після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін. 1 – гофрована облямівка остеокласта; 2 – ядра остеокласта; 3 – незрілий остеоцит; 4 – остеїд. $\times 3000$.

Губчата структура кістково-керамічного регенерату складалася з поліморфних трабекул, утворених за рахунок відновлення травмованих трабекул материнської кістки, а також за рахунок попереднього розповсюдження осередків десмального остеогенезу. В грубоволокнистих трабекулах кількісно переважали остеобласти з ультраструктурними ознаками високої секреторної активності. Кількість остеокластів суттєво зростала у порівнянні з попереднім терміном експе-

рименту. Переважна частина остеокластів була активованою, що підтверджувалось при ультраструктурному дослідженні та при імуногістохімічному визначенні розподілу Calcitonin-SP17-клональних антитіл. Ці ознаки свідчили про ініціацію ремоделювання грубоволокнистих трабекул через 4 тижні на межі регенерату з кістковими пластинками материнської кістки, а також при переході відновлених трабекул материнської губчастої кістки в новоутворені грубоволокнисті трабекули регенерату. Ультраструктурно при ремоделюванні утворювалися щільні пучки паралельно орієнтованих колагенових волокон з формуванням гетероморфних кісткових пластинок. Серед остеоцитів переважали ультраструктурно незрілі клітини, проте на 4-му тижні зростала частка зрілих остеоцитів у тих периферичних ділянках регенерату, які анастомозували з мінералізованим матриксом відновлених материнських трабекул. Також зрілі остеоцити визначались у складі новоутворених трабекул у внутрішніх зонах остеорегенерату в місцях межування з гранулами імплантованого матеріалу, що вказувало на ініціацію дозрівання остеогенних клітин з боку екзогенного октакальційфосфату незалежно від розповсюдження хвилі ремоделювання від материнської кістки.

Протягом 4-5-го тижнів експерименту глибока зона кістково-керамічного регенерату, на відміну від групи контролю, містила острівці перетинчастого остеогенезу поряд із численними примітивними грубоволокнистими кістковими трабекулами. В окремих трабекулах спостерігались ознаки ремоделювання, хоча кількість остеокластів і остеоцитів в глибокій зоні регенерату була значно меншою, ніж на його периферії. В ядрах остеобластів спостерігалась інтенсивна експресія маркера проліферації Ki-67. Трансмісійна електронна мікроскопія показала високу синтетичну активність остеобластів, навколо яких утворювалися неупорядковані пучки колагенових волокон. Імуногістохімічний розподіл маркера CD34 вказував на значну васкуляризацію глибокої зони кістково-керамічного регенерату, що пояснювало обмежене у порівнянні з контролем фіброзування даної зони і відсутність острівців хрящового остеогенезу.

Через 8 тижнів експерименту спостерігалось формування остеоцитарної лакуно-каналцевої системи у складі материнської кістки навколо експериментального дефекту. Гістоархітектура і розподіл клітинних субпопуляцій, імуногістохімічні і ультраструктурні характеристики материнської кістки навколо нанесеної експериментальної травми після остеопластики матеріалом ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін відповідали інтактній будові.

Периферичні трабекули кістково-керамічного регенерату складалися з пластинчастої кісткової тканини. Кісткові пластинки ново-

утворених остеонів мали типову будову. Переважна частина остеокластів інтенсивно накопичувала Calcitonin-SP17-мітку, що вказувало на гальмування їх резорбтивної активності та з урахуванням незначної кількості резорбційних лакун свідчило про стабілізацію гістоархітектури відновленої пластинчастої кістки. Поблизу відновленого періосту спостерігались компактизовані кісткові пластинки, які містили зрілі остеоцити з розвинутими відростками. Також зрілі остеоцити переважали в пластинчастій кістковій тканині новоутворених трабекул, що складали губчасту структуру периферичних і внутрішніх ділянок регенерату. Загальна структура лакуно-каналцевої системи на периферії кістково-керамічного регенерату виглядала помірно розвиненою і в цілому сформованою, геометрія остеонів на світлооптичному рівні наближалася до інтактної. У міжтрабекулярних просторах новоутвореної губчастої кістки визначались незначні за площею ділянки мієлоїдної тканини. Поверхня репаративного регенерату була повністю інтегрована з материнською кісткою, межа між новоутвореними трабекулами і материнською губчастою кісткою не візуалізувалась.

В окремих трабекулах глибокої зони спостерігались ознаки ремоделювання грубоволокнистої кісткової тканини. В ділянках формування кісткових пластинок численні остеобласти розташовувались поблизу гетероморфних зон остеоду, в яких пучки щільно упакованих паралельних колагенових волокон межували з осередками неупорядкованих фібрил та аморфним матеріалом низької електронної щільності. Остеобласти мали ознаки значної синтетичної і секреторної активності. У порівнянні з попереднім терміном кількість остеобластів помітно зменшувалась, в той час як щільність остеоцитів ставала більшою. Остеоцити між новоутвореними пластинками мали ознаки структурно-функціональної незрілості, в той час як на поверхні гранул імплантату локалізувались переважно зрілі форми клітин, що свідчило про стимулюючий вплив екзогенного октакальційфосфату на дозрівання остеоцитів.

Через 12 тижнів після імплантації матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін спостерігалась повна остеointegraція кістково-керамічного регенерату як з компактною, так і з губчастою материнською кісткою. На відміну від групи контролю, остеоцитарна лакуно-каналцева система мала ознаки типової будови у зоні зовнішньої кісткової пластинки, повністю відновлений періост, осередки незавершеного остеогенезу або неповного ремоделювання не виявлялись. Мікроархітектура та форма остеонів регенерату не відрізнялись від будови остеонів материнської кістки та від структури інтактних остеонів. При ультраструктурному дослідженні між пучками паралельно орієнтованих зрілих колагенових волокон сусідніх пластинок розташовувались рівномірні

за шириною прошарки аморфного матеріалу, що свідчило про завершений характер упорядкування кісткового матриксу. У порівнянні з попереднім терміном кількість остеогенних клітин була помітно меншою. Низька інтенсивність імуногістохімічної мітки проліферативного маркера Ki-67, а також невелика кількість остеокластів і остеобластів поряд із переважанням зрілих остеоцитів свідчили про завершений характер ремоделювання. Кісткові трабекули в периферичних і внутрішніх ділянках регенерату містили розвинену гемокапілярну сітку. При імуногістохімічному вивченні експресії маркера CD34 спостерігалось рівномірне розповсюдження зрілих гемокапілярів по всьому об'єму кістково-керамічного регенерату. Утворення мієлоїдної тканини у міжтрабекулярних просторах спостерігалось лише на периферії репаративного регенерату.

Глибока зона регенерату містила помірно розгалужені трабекули, які склалися з кісткових пластинок, переважна частина яких мала інтактну будову. Трансмісійна електронна мікроскопія виявила щільно упаковані паралельні фібрили з незначною часткою аморфного матеріалу новоутвореного остеїду. Більшість остеоцитів між кістковими пластинками була представлена зрілими формами (рис. 3).

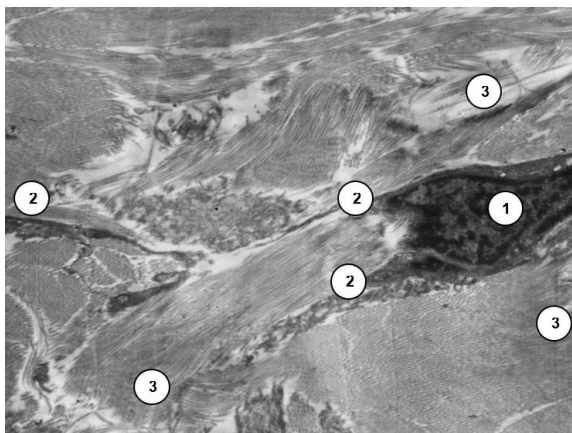


Рис. 3. Електронна трансмісійна мікрофотографія глибокої ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 8 тижнів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін. 1 – фрагмент цитоплазми остеоцита; 2 – відростки остеоцита; 3 – пучки колагенових волокон кісткових пластинок. $\times 3000$.

В окремих глибоких ділянках регенерату зберігались дрібні осередки грубоволокнистої кісткової тканини без залишків імплантованого матеріалу, які містили помірну кількість активних остеокластів. На відміну від спостережень у контрольній групі, обмежена кількість активних остеокластів з низькою Calcitonin-SP17-реактивністю виявлялася лише у ділянках геометричної модифікації кісткових пластинок новоутворених кісткових трабекул після завершення

ремоделювання. Аналіз розподілу експресії маркера Ki-67 виявив низьку проліферативну активність механоцитів і обмежений проліферативний потенціал ендотеліоцитів у трабекулах глибокої зони регенерату, що поряд із помірною кількістю CD34-позитивних ендотеліальних елементів свідчило про завершений характер ремоделювання кісткової тканини в глибокій зоні регенерату. Прояви фіброзування глибокої зони регенерату суттєво редукувалися у порівнянні з попереднім терміном дослідження. Сполучнотканинні ділянки навколо мікросудин зустрічалися в незначній кількості та мали вигляд тонких прошарків, збагачених на варіативно орієнтовані пучки колагенових волокон.

Дослідження особливостей мікрорельєфу кісткової поверхні за допомогою сканувальної електронної мікроскопії в ділянці експериментального кісткового дефекту нижньої щелепи кроликів після імплантації в його порожнину матеріалу Хітозан-А виявило істотні відмінності від результатів ультраструктурного дослідження в контрольній групі. Через одну добу після імплантації на відносно гладкому рельєфі поверхні шахти на рівні компактної кортикальної пластинки спостерігалися травмовані кровоносні мікросудини із тромбованими просвітами в оточенні дрібних крововиливів. Між ушкодженими кістковими трабекулами та спікулами губчастої кістки коміркового відростка по краях шахти виявлялися хаотично розташовані мікроскопічні рештки зруйнованих трабекул (рис. 4).

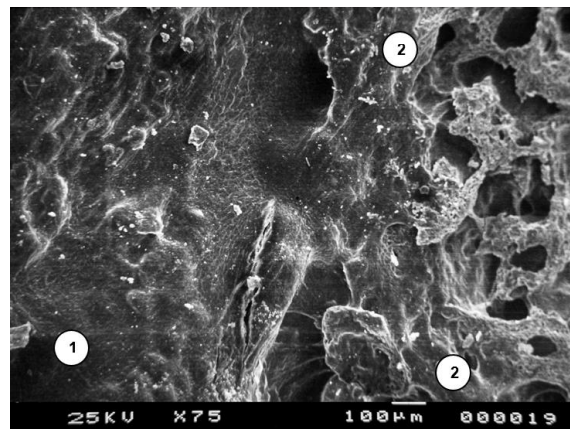


Рис. 4. Електронна сканограма зони кісткового дефекту нижньої щелепи кролика через 1 добу після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом Хітозан-А. 1 – ушкоджена поверхня зовнішньої кісткової пластинки бічної стінки шахти; 2 – ушкоджені трабекули губчастої кістки міжзубної ділянки коміркової частини. $\times 75$.

У зоні безпосереднього механічного дефекту після застосування матеріалу Хітозан-А, на відміну від контрольної групи, спостерігалися обмежені за виразністю прояви периваскулярного набряку, незначні за об'ємом навколосудинні скупчення еритроцитів та поліморфноядерних

лейкоцитів. Ознаки стазу зустрічалися в просвіті поодиноких мікросудин. На периферії імплантованого матеріалу Хітозан-А виявлялися ділянки посттравматичної ексудації.

Через 1 тиждень експерименту на поверхні ушкоджених остеонів і кісткових трабекул спостерігали дуже обмежене формування остеїдних острівців і випинань. Через 2 і 3 тижні ознаки остеогенезу ставали виразнішими, що проявлялося в утворенні на поверхні ушкоджених трабекул чіткої горбистості. Новоутворені острівці та випинання варіювали за розміром та формою і вкривали значну за площею поверхню трабекул (рис. 5). Ознаки запалення в ділянці експериментального кісткового дефекту (периваскулярний набряк, лейкоцитарна інфільтрація, судинний стаз) протягом 2-го тижня прогресивно зменшувалися; через 3 тижні після імплантації матеріалу Хітозан-А вони не виявлялися. Характерною особливістю регенераторного процесу в цей період було активне утворення сполучнотканинних трабекул і спікул на периферії регенерату, в той час як у його глибоких зонах осередки перетинчастого остеогенезу зустрічалися в поодиноких випадках, причому кількість кровоносних мікросудин у даній локалізації була значно меншою, ніж у тварин контрольної групи.

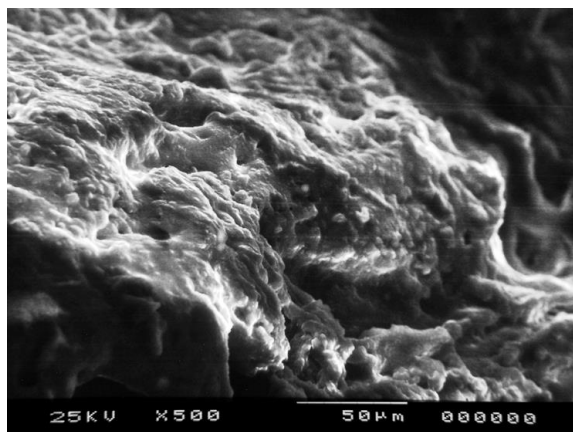


Рис. 5. Електронна сканограма зони кісткового дефекту нижньої щелепи кролика через 3 тиж після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом Хітозан-А. Мікрорельєф поверхні новоутвореної трабекули. $\times 500$.

Через 4 і 5 тижнів після імплантації матеріалу Хітозан-А у периферичних відділах регенерату виявлялася невелика кількість новоутворених остеїдних трабекул з радіальною орієнтацією та обмеженим анастомозуванням. Поряд із ними залишалися значні за об'ємом маси остеотропного матеріалу. У глибоких зонах експериментального дефекту візуально визначалися окремі невеликі осередки десмального остеогенезу. На відміну від контрольної групи, новоутворені мікросудини не формували характерної сітки; примітивні гемокапіляри зустрічалися переважно поб-

лізу периферично розташованих осередків десмального остеогенезу з переважанням клітин фіброblastного ряду. Остеогенні клітини поодиночки визначалися на периферії регенерату поблизу материнської кістки. На межі регенерату з пластинчастою кістковою тканиною кортикальної пластинки материнської кістки також зустрічалися поодинокі остеокласти.

Через 8 тижнів після імплантації визначалася межа щільного прилягання грубоволокнистої тканини новоутворених трабекул на периферії регенерату до остеонного компонента кортикальної пластинки материнської кістки. На поверхні кісткових трабекул, а також поблизу частинок імплантованого матеріалу виявлялися активовані остеокласти, що свідчило про початок остеолітичного процесу у поверхневих ділянках регенерату. В глибині штучного дефекту залишалися значні маси нерезорбованого остеопластичного матеріалу, між якими зосереджувалися зони остеогенезу. Структурна організація регенерату в цих зонах була представлена неоднорідною губчастою структурою грубоволокнистої тканини з щільною сіткою новоутворених мікросудин, які були оточені масивними прошарками колагенових волокон. Кількість остеогенних клітин та остеокластів була значно нижчою, ніж у тварин групи контролю.

Через 12 тижнів після нанесення експериментальної травми та імплантації матеріалу Хітозан-А у периферичних ділянках регенерату, поблизу неушкодженої травмою материнської губчастої кістки, мікрорельєф поверхні більшості трабекул був чіткий, гладкий, без ознак новоутворення остеїду (рис. 6).

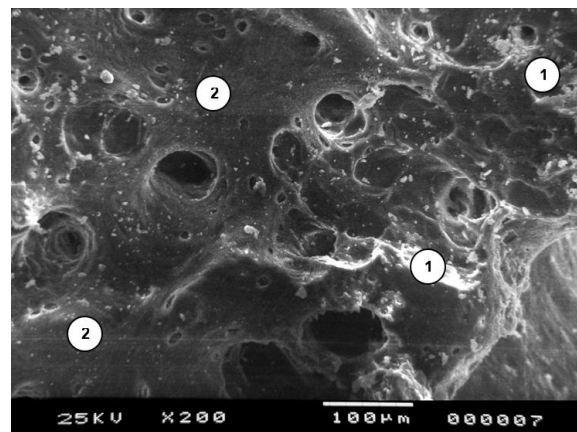


Рис. 6. Електронна сканограма зони кісткового дефекту нижньої щелепи кролика через 12 тиж після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом Хітозан-А. 1 – мікрорельєф поверхні новоутворених трабекул; 2 – ділянка з'єднання з материнською кісткою. $\times 200$.

Навпроти, в глибоких зонах регенерату переважно зустрічалися осередки фіброзної та грубоволокнистої кісткової тканини, кількість остеогенних клітин та активованих остеокластів була

значно вищою, ніж у контрольній групі. Залишки імплантованого матеріалу у великій кількості зустрічалися між новоутвореними трабекулами. На відміну від спостережень у контрольній групі тварин, такі зміни свідчили про продовження процесів ремоделювання трабекулярних структур регенерату.

Остеоцитарна лакуно-канальцева система у регенераті виявлялася лише поблизу материнської кістки коміркового відростка нижньої щелепи та не була характерною для більшої частини регенерату, що вказувало на незавершений або неповноцінний остеогенез в експериментальній групі тварин через 12 тижнів після імплантації матеріалу Хітозан-А.

При морфометричному вивченні динаміки змін відносного об'єму кісткової тканини в реге-

нераті експериментального дефекту в контрольній групі визначалося активне зростання параметра від першого до п'ятого тижня після нанесення дефекту (табл. 1). Зокрема, відносний вміст кісткової тканини в регенераті через 2 тижні експерименту в 2,75 рази ($p < 0,05$) перевищував значення 1-го тижня; через 3 тижні параметр зростав на 60,4 % ($p < 0,05$) відносно рівня попереднього терміну; через 4 і 5 тижнів – на 68,0 % ($p < 0,05$) і 32,0 % ($p < 0,05$) відповідно. У період від 5-го до 8-го тижня підвищення відносного об'єму кісткової тканини в регенераті, що формувалася під кров'яним згустком, становило 24,5 % ($p < 0,05$). У подальшому, до 12-го тижня експерименту, зміни показника не мали статистичної значущості у порівнянні з величиною 8-го тижня, стабілізуючись на рівні $(70,3 \pm 4,8) \%$.

Таблиця 1

Динаміка змін відносного об'єму кісткової тканини, остеопластичного матеріалу та сполучної тканини в регенераті (%), $M \pm m$

Термін	Кісткова тканина		Матеріал	Сполучна тканина	
	Контроль	Хітозан-А	Хітозан-А	Контроль	Хітозан-А
1 доба	$3,7 \pm 0,6$	$4,1 \pm 0,8$	$82,7 \pm 6,3$	$6,9 \pm 0,4$	$7,8 \pm 0,5$
7 діб	$5,6 \pm 0,8 \#$	$6,3 \pm 0,9$	$79,1 \pm 6,6$	$14,7 \pm 1,1 \#$	$13,2 \pm 1,5 \#$
14 діб	$15,4 \pm 1,2 \#$	$10,7 \pm 0,8 \#$	$80,5 \pm 6,8$	$30,5 \pm 2,4 \#$	$7,5 \pm 0,9 \#$
21 доба	$24,7 \pm 1,8 \#$	$16,2 \pm 1,8 \#$	$76,3 \pm 5,9$	$56,1 \pm 3,5 \#$	$7,1 \pm 1,3 \#$
28 діб	$41,5 \pm 3,4 \#$	$23,9 \pm 2,4 \#$	$59,8 \pm 4,7 \#$	$41,8 \pm 3,1 \#$	$14,7 \pm 1,8 \#$
35 діб	$54,8 \pm 3,7 \#$	$26,5 \pm 2,1 \#$	$52,4 \pm 4,2 \#$	$34,2 \pm 2,3 \#$	$18,6 \pm 2,5 \#$
56 діб	$68,2 \pm 4,5 \#$	$25,3 \pm 3,2 \#$	$50,1 \pm 4,0$	$20,7 \pm 1,7 \#$	$23,1 \pm 2,5$
84 доби	$70,3 \pm 4,8$	$26,6 \pm 3,8 \#$	$43,7 \pm 3,7 \#$	$24,5 \pm 2,0$	$27,1 \pm 3,2$

* – різниця статистично значуща при порівнянні з контрольною групою; #: різниця статистично значуща при порівнянні з попереднім терміном експерименту.

За результатами морфометричного аналізу динаміки відносного об'єму кісткової тканини в регенераті виявилось, що за умов застосування матеріалу Хітозан-А відбувалося обмежене зростання параметра протягом досліджуваного періоду, яке за інтенсивністю змін значно поступалося динаміці у тварин контрольної групи. Через 1 тиждень після травми значення параметра не перевищувало у статистично вагомому ступені показник першої доби та не відрізнялось істотно від контрольного рівня. Через 2 тижні після імплантації матеріалу Хітозан-А зростання параметра становило 69,8 % ($p < 0,05$) відносно величини 1-го тижня, проте його рівень на 30,5 % ($p < 0,05$) поступався контрольному. Через 3 тижні після імплантації спостерігалось підвищення вмісту кісткової тканини в регенераті на 88,8 % ($p < 0,05$) відносно попереднього терміну, але це зростання було на 34,4 % ($p < 0,05$) нижчим, ніж у тварин контрольної групи. Через 4 тижні експерименту зростання параметра становило 47,5 % ($p < 0,05$) відносно величини 3-го тижня, проте його рівень на 42,4 % ($p < 0,05$) поступався контрольному. У період від 5-го до 8-го тижня після

імплантації матеріалу Хітозан-А відносний об'єм кісткової тканини в регенераті варіював у межах 25-27 % та не відрізнявся у статистично вагомому ступені від величини 4-го тижня. При цьому параметр експериментальної групи істотно поступався відповідним за термінами контрольним показникам: через 5 тижнів – на 51,6 % ($p < 0,05$), через 8 тижнів – на 62,9 % ($p < 0,05$), через 12 тижнів – на 62,2 % ($p < 0,05$).

В експериментальній групі тварин, у яких пластику дефекту проводили з використанням матеріалу Хітозан-А, у перші три тижні не спостерігались будь-які ознаки біорезорбції. Через 4 тижні після остеопластики відносний об'єм імплантованого матеріалу в регенераті зменшувався на 21,6 % ($p < 0,05$) відносно значення третього тижня; через 5 тижнів експерименту параметр поступався попередньому терміну на 12,4 % ($p < 0,05$). Показник, що встановлено через 8 тижнів після імплантації, не відрізнявся істотно від значення 5-го тижня. Через 12 тижнів експерименту відносний об'єм матеріалу Хітозан-А становив $(43,7 \pm 3,7) \%$ від загального об'єму регенерату, що на 12,8 % ($p < 0,05$) поступалося рівню 8-го

тижня спостережень.

Вивчення відносного об'єму сполучної тканини в регенераті експериментального дефекту в контрольній групі дозволило встановити фазовий характер динаміки змін параметра. У перші три тижні експерименту спостерігалось активне зростання вмісту сполучнотканинного компонента у складі регенерату. Зокрема, через 1 тиждень після нанесення травми параметр зростав у 2,1 рази ($p < 0,05$) відносно значення через 1 добу; через 2 тижні експерименту – на 107,5 % ($p < 0,05$) у порівнянні з величиною 1-го тижня; через 3 тижні параметр підвищувався на 83,9 % ($p < 0,05$) відносно рівня попереднього терміну та сягав найвищого значення ($56,1 \pm 3,5$) %. У подальшій динаміці змін вмісту сполучної тканини спостерігалось поступове зниження показника: через 4 тижні – на 25,5 % ($p < 0,05$) відносно пікового значення 3-го тижня; через 5 і 8 тижнів – на 18,2 % ($p < 0,05$) і 39,5 % ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з попереднім терміном дослідження. У період від 8-го до 12-го тижня відносний об'єм сполучної тканини в регенераті, що формувався під кров'яним згустком, не змінювався у статистично вагомому ступені та стабілізувався на рівні ($24,5 \pm 2,0$) %.

Морфометричний аналіз в експериментальній групі тварин, у яких застосовували Хітозан-А, динаміка змін відносного об'єму сполучної тканини в регенераті суттєво відрізнялась за напрямком та інтенсивністю від тієї, що встановлена в контрольній групі. Після обмеженого зростання параметра впродовж першого тижня експерименту спостерігалось різке падіння вмісту сполучнотканинного компонента регенерату. Зокрема, через 2 тижні після травми значення показника у експериментальних тварин зменшувалось на 43,2 % ($p < 0,05$) у порівнянні з величиною першого тижня, що в 4,1 рази поступалося контрольному рівню відповідного терміну експерименту. Через 3 тижні після імплантації матеріалу відносний об'єм сполучної тканини в регенераті залишався на рівні ($7,1 \pm 1,3$)%, що було в 7,9 рази нижчим за контрольну величину. На відміну від контрольної групи, починаючи з 4-го тижня спостерігалось поступове збільшення досліджуваного параметра в експериментальній групі. Через 4 тижні параметр після імплантації матеріалу Хітозан-А зростав відносно 3-го тижня на 107,0 % ($p < 0,05$), при цьому поступаючи відповідному за терміном значенню контролю на 64,8 % ($p < 0,05$). Через 5 тижнів параметр в експериментальній групі перевищував значення 4-го тижня на 26,5 % ($p < 0,05$), проте поступався значенню контролю на 45,6 % ($p < 0,05$). У терміни 8 і 12 тижнів після імплантації матеріалу Хітозан-А вміст сполучної тканини в регенераті мав тенденцію до збільшення та в статистично значущому ступені не відрізнявся від відповідних за терміном контрольних значень.

При гістологічному дослідженні демінералізованих фрагментів коміркової частини нижньої щелепи через одну добу після імплантації активованого хітозану виявлялись численні дрібні осередки крововиливів та тромбоутворення внаслідок руйнування стінок мікросудин. Значний периваскулярний та інтерстиційний набряк істотно пошкоджував загальну гістоархітектуру періосту. Лейкоцитарна інфільтрація мала обмежену виразність. По краях шахти у материнській кістці спостерігались дрібні скупчення фібринових мас і осередки гемосидерозу. У просвітах мікросудин компактної кортикальної пластинки визначались ознаки стазу та складування еритроцитів. Прояви дезорганізації та гомогенізації пластинок остеонів материнської кістки супроводжувались появою численних резорбційних лакун. Електронномікроскопічно виявлялись поодинокі активні остеокласти, що підтверджувалось негативним імуногістохімічним забарвленням зрізів Calcitonin-SP17-клональними антитілами. Остецити містили набряклу цитоплазму, навколо них спостерігався інтерстиційний набряк та деструкція пучків колагенових фібрил. Зі сторони періосту навколо дефекту не виявлялись будь-які ознаки неоваскулогенезу, фіброзування або проліферації фібробластів. Визначення проліферативного маркера виявило обмежену кількість Ki-67-позитивних клітин у даній локалізації. Поблизу ендосту ушкоджених кісткових трабекул на межі з імплантованим матеріалом спостерігались гемокапіляри та ендотеліальні тяжі в супроводі фібробластів, що вказувало на утворення прошарку грануляційної тканини по краях експериментального дефекту. Це підтверджувалось активним накопиченням імуногістохімічної мітки маркера Ki-67 у ядрах фібробластів і ендотеліоцитів ендосту.

Через один тиждень після нанесення експериментальної травми прояви набряку та інші ознаки травматичного запалення навколо зони дефекту зберігались і в окремих ділянках навіть зростали у порівнянні з попереднім терміном експерименту. Прояви дезорганізації материнської кістки посилювалися, спостерігалась гомогенізація кісткового матриксу та зростала площа резорбційних порожнин, заповнених детритом, фібриноідом або гемосидериновими депозитами. На поверхні хітозанового імплантату спостерігались ознаки періостальної реакції, що супроводжувалось активним вrostанням мікросудин у товщу регенерату, проте міграція малодиференційованих клітин не відбувалась. Травмовані остеони і кісткові трабекули материнської кістки по краях дефекту мали горбисту поверхню внаслідок утворення дрібних остеоїдних виростів. У складі таких виростів поряд із поодинокими остеокластами навколо гемокапілярів спостерігалась значна кількість остеобластів, які розташовувались поодинокі та при імуногістохімічно-

му вивченні експресії маркера Ki-67 інтенсивно накопичували мітку проліферації. При ультраструктурному дослідженні навколо остеобластів виявлялись окремі неупорядковані пучки колагенових волокон, проте переважав гомогенний органічний матрикс.

Наприкінці першого тижня експерименту в периферичних ділянках регенерату між фрагментами імплантованого матеріалу спостерігалась значна щільність CD34-позитивних структур у вигляді примітивних гемокапілярів і ендотеліальних паростків, що вказувало на активний неоваскулогенез. Навколо гемокапілярів зустрічались численні остеопрогеніторні клітини. Звертала на себе увагу та обставина, що попри щільну васкуляризацію поверхневих ділянок імплантату кількість осередків десмального остеогенезу значно поступалася контрольній групі. Помірне накопичення імуногістохімічної мітки маркера Ki-67 в ядрах фібробластів, остеобластів та їх низькодиференційованих попередників свідчило про обмежену проліферацію на периферії регенерату. На електроннограмах навколо фібробластів і остеобластів в поодиноких острівцях десмального остеогенезу розташовувались неупорядковані колагенові волокна з ознаками незрілості, які не утворювали організованих пучків. В остеїді цих острівців аморфний компонент низької електронної щільності значно переважав над колагеновими волокнами.

Протягом 2-го і 3-го тижнів після імплантації спостерігалась суттєва активізація відновлення періостальних структур разом із інтенсивним репаративним остеогенезом на внутрішній поверхні ушкодженої материнської кістки. Численні новоутворені остеїдні випинання вкривали переважну частину поверхні трабекул. Запально-інфільтративні прояви в ділянці експериментального кісткового дефекту поступово редукувались.

У периферичних ділянках регенерату на тлі активного неоваскулогенезу спостерігалось накопичення дрібних острівців десмального остеогенезу та їх об'єднання з утворенням тонких грубоволокнистих трабекул. Значна кількість остеопрогеніторних клітин навколо мікросудин вказувала на їх активну міграцію у внутрішні ділянки імплантованої маси хітозану, проте утворення остеогенних острівців, на відміну від групи контролю, залишалось обмеженим, а їх вміст з обмеженою кількістю колагенових пучків виглядав слабо структурованим (рис. 7). Також була незначною проліферативна активність фібробластів, остеобластів та їх низькодиференційованих попередників, що підтверджувалось результатами імуногістохімічного визначення експресії маркера Ki-67.

У глибокій зоні остеорегенерату осередки перетинчастого остеогенезу зустрічались рідко, не анастомозували один з одним, ступінь васку-

ляризації був значно меншим, ніж у тварин контрольної групи. Між поодинокими остеогенними острівцями на тлі значної маси імплантованого матеріалу візуалізувались дрібні прошарки пухкої сполучної тканини. При трансмісійній електронній мікроскопії в даній локалізації гетероморфні остеобласти розташовувались поодинокі та мали ультраструктурні ознаки помірної синтетичної активності.

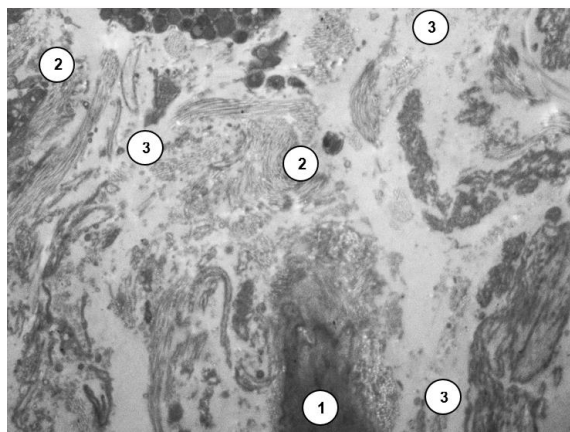


Рис. 7. Електронна трансмісійна мікрофотографія периферичної ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 2 тижні після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом Хітозан-А. 1 – фрагмент остеобласта з ознаками незрілості; 2 – пучки колагенових волокон; 3 – аморфний матрикс. $\times 2000$.

Через 4 і 5 тижнів після імплантації матеріалу Хітозан-А у периферичних ділянках регенерату виявлялась невелика кількість тонких грубоволокнистих трабекул з переважно радіальною орієнтацією, які анастомозували між собою, а також з відновленими трабекулами материнської кістки. Компактна материнська кістка зберігала залишкові ознаки посттравматичної дезорганізації та гомогенізації кісткового матриксу, навколо гемокапілярів спостерігалась поява активних остеокластів, що підтверджувалось при імуногістохімічному дослідженні розподілу Calcitonin-SP17-клональних антитіл. Через 5 тижнів невелика кількість остеокластів розташовувалась у складі новоутворених трабекул регенерату, що свідчило про початок ремоделювання ретикулофіброзної тканини периферичних ділянок з формуванням примітивних кісткових пластинок. При трансмісійній електронній мікроскопії у складі пластинок щільно упаковані колагенові волокна утворювали переважно паралельні пучки, хоча взаємна орієнтація пучків між собою була слабо впорядкованою (рис. 8). У тих трабекулах, що заглиблювались у товщу регенерату, кількісно переважали остеобласти з ультраструктурними ознаками помірної синтетичної активності. Остеїд поблизу остеобластів містив пухко угруповані колагенові волокна з варіативною орієнтацією їх пучків. На відміну від контрольної групи, в ядрах остеобластів і їх клітин-

попередниць спостерігалась невисока експресія маркера проліферації Ki-67, що свідчило про обмеження проліферативної активності остеогенного диферону.

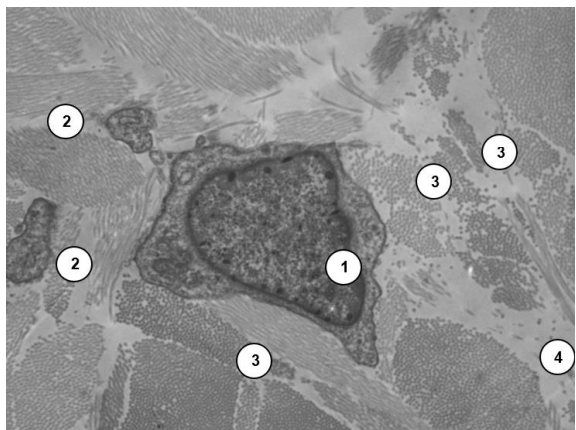


Рис. 8. Електронна трансмісійна мікрофотографія периферичної ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 5 тижнів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом Хітозан-А. 1 – незрілий остеокит; 2 – відросток остеокита; 3 – пучки колагенових волокон; 4 – аморфний матрикс. $\times 4000$.

Глибока зона дефекту у цей період містила невелику кількість дрібних острівців перетинчастого остеогенезу і поодинокі грубоволокнисті кісткові трабекули. На відміну від контрольної групи, візуалізувалась обмежена кількість гетероморфних поодинокі розташованих остеобластів з помірною синтетичною активністю. Трансмісійна електронна мікроскопія виявила розвинуті елементи комплексу Гольджі та гранулярного ендоплазматичного ретикулуму в цитоплазмі остеобластів, а також невелику кількість хаотично розташованих колагенових фібрил на тлі аморфного матриксу остеїду з низькою електронною щільністю. При імуногістохімічному аналізі розподілу маркера CD34 виявилось, що новоутворені гемокапіляри не формували характерної сітки, щільність судин була незначною, часто мікросудини не мали просвіту і виглядали як капілярні паростки. Експресія маркера проліферації Ki-67 в ядрах ендотеліоцитів мала високу інтенсивність, в той час як інші клітинні диферони виявляли невисоку проліферативну активність. У широких міжтрабекулярних просторах переважала пухка сполучна тканина з незначною васкуляризацією й ознаками помірного фіброзування.

Через 8 тижнів після імплантації активованого хітозану під відновленим періостом поблизу компактної материнської кістки і на периферії регенерату, що прилягав до губчастої материнської кістки, візуалізувалась пухка сітка новоутворених трабекул, які значно поступалися контрольній групі за ступенем анастомозування. Ті трабекули, що межували з материнською кісткою, містили примітивні кісткові пластинки з чисель-

ним переважанням незрілих форм остеокитів. У внутрішніх трабекулах виявлялись ознаки обмеженого за активністю ремоделювання. Зокрема, частина остеокластів навколо гемокапілярів мала ультраструктурні ознаки активації, хоча спостерігались також незрілі компактні клітини овоїдної форми з 3-5 ядрами, що не контактували з пучками колагенових волокон. У складі грубоволокнистої тканини поряд із відокремленими остеобластами переважали незрілі відносно великі остеокити, в той час як між кістковими пластинками зустрічались поодинокі остеокити з відростками та редукованою цитоплазмою. Новоутворені кісткові пластинки значно варіювали за розмірами, конфігурацією, щільністю пучків колагенових фібрил і їх просторовим упорядкуванням.

Через 12 тижнів після застосування активованого хітозану поблизу періосту регенерат містив компактнізовані кісткові пластинки із завершеним ремоделюванням, проте новоутворені остеони мали деформовану геометрію, яка значно відрізнялась від прилеглої материнської компактної кістки. Остеоцитарна лакуно-каналцева система регенерату на його периферії мала ознаки незавершеного відновлення. Остеокити між пластинками були представлені переважно незрілими формами (рис. 9).

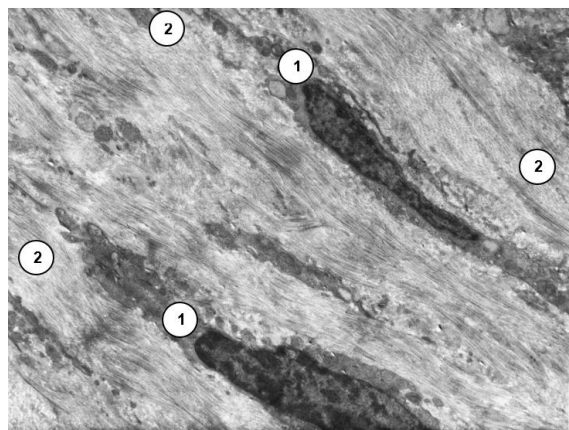


Рис. 9. Електронна трансмісійна мікрофотографія периферичної ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 12 тижнів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом Хітозан-А. 1 – остеокит з ознаками незрілості; 2 – пучки колагенових волокон. $\times 4000$.

При трансмісійній електронній мікроскопії орієнтація пучків колагенових волокон у складі кісткових пластинок мала обмежену просторову впорядкованість на тлі аморфного остеомаатриксу. Кількість остеокластів навколо мікросудин значно перевищувала рівень контрольної групи, проте їх активність була невисокою. Новоутворені трабекули із завершеним ремоделюванням мали гладку поверхню та містили розвинуте гемокапілярне русло, що підтверджувалось при визначенні експресії ендотеліального маркера

CD34. Результати імуногістохімічного дослідження показали невисокий вміст Ki-67-позитивних ядер клітин переважної більшості трабекул, що свідчило про обмеження морфогенетичних перебудов на периферії остеорегенерату.

Наприкінці експерименту глибока зона регенерату містила гетероморфні сполучнотканинні ділянки і пухко розташовані кісткові трабекули з ознаками незавершеного ремоделювання. Крім того, візуалізувались поодинокі дрібні осередки десмального остеогенезу. Губчаста структура переважно грубоволокнистої тканини глибокої зони містила щільну сітку новоутворених мікросудин, які були оточені прошарками колагенових волокон. Кількість остеогенних клітин та остеокластів була значно нижчою, ніж у тварин групи контролю, проте визначались численні ознаки ремоделювання більшості трабекул.

Висновки

1. Пошарова імплантація матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін (зовнішній сегмент трансплантату – комплекс хітозану з ампіциліном, внутрішній сегмент – гранули модифікованого натурального октакальційфосфату) створює умови для реалізації ефекту вторинної остеоіндукції. Зокрема, через 1 тиждень після імплантації під щільним хітозановим покриттям утворюється зона гіпоксії, яка індукує інтенсивне відновлення періосту та активує неоваскулогенез із супровідною міграцією і цитодиференціюванням остеопрогеніторних клітин з двох напрямів: 1) від мікросудин відновленого періосту та 2) від ушкоджених трабекул материнської кістки по краях експериментального дефекту. Впродовж 2-3-го тижнів пори внутрішнього сегменту імплантату з модифікованим октакальційфосфатом забезпечують повну васкуляризацію кістково-керамічного регенерату, насичення його острівцями десмального остеогенезу з наступним утворенням грубоволокнистих трабекул і хвилеподібним розповсюдженням процесів ремоделювання кісткової тканини від периферії регенерату в напрямку його глибокої зони.

2. Поява зрілих остеоцитів на 4-му тижні індукується мінералізованим матриксом відновлених материнських трабекул на периферії імплантату, а також гранулами екзогенного октакальційфосфату по всьому об'єму остеорегенерату за умов кисневого дефіциту його внутрішніх ділянок. Через 8 тижнів імплантація ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін забезпечує завершення ремоделювання периферичних трабекул і компактизацію відновленої пластинчастої тканини поблизу періосту з утворенням повноцінної остеоцитарної лакуно-каналцевої системи. Поширення хвилі ремоделювання у глибоку зону кістково-керамічного регенерату через 12 тижнів обумовлює формування остеонів з наближеною до інтактної гістоархітектурою, обмеження проліфера-

тивної та синтетичної активності остеобластів і редукцію фібротичних змін. Імплантація даного матеріалу завершується повною остеоінтеграцією кістково-керамічного регенерату як з компактною, так і з губчастою материнською кісткою.

3. За умов застосування матеріалу Хітозан-А відбувається обмежене зростання відносного об'єму кісткової тканини в регенераті, яке за інтенсивністю змін значно поступається динаміці у тварин контрольної групи. Встановлено фазовий характер динаміки змін сполучнотканинного компонента у складі регенерату. Після обмеженого зростання параметра впродовж першого тижня експерименту спостерігається різке його падіння на другому тижні, що в 4,1 рази поступається контрольному рівню. Наприкінці експерименту залишки імплантованого матеріалу у великій кількості зустрічаються між новоутвореними трабекулами, що свідчить про продовження процесів ремоделювання трабекулярних структур регенерату.

4. Імплантація активованого хітозану створює умови для інтенсивного відновлення періосту і стимулює утворення остеоїдних виростів на поверхні ушкоджених кісткових трабекул за рахунок проліферації та синтетичної діяльності остеобластів впродовж перших трьох тижнів експерименту. В цей період на тлі активного неоваскулогенезу, на відміну від контрольної групи, відбувається гальмування утворення острівців перетинчастого остеогенезу та їх об'єднання в трабекули, не дивлячись на активну міграцію остеопрогеніторних клітин. Через 5 тижнів у периферичних ділянках регенерату утворюється примітивна губчаста структура стоншених новоутворених трабекул і спікул з обмеженим анастомозуванням і ознаками ремоделювання грубоволокнистого матриксу в примітивні кісткові пластинки. У цей період глибока зона регенерату складається з поодиноких грубоволокнистих кісткових трабекул, містить обмежену кількість гетероморфних поодинокі розташованих остеобластів з помірною синтетичною активністю, у широких міжтрабекулярних просторах переважає пухка сполучна тканина з ознаками помірного фіброзування.

5. Через 8 тижнів після імплантації активованого хітозану на тлі обмеженої остеоінтеграції в периферичних ділянках регенерату відбувається повільне дифузне ремоделювання пухко розташованих трабекул з утворенням примітивних кісткових пластинок. Ознаки компактизації новоутвореної кістки поблизу періосту з'являються лише через 12 тижнів експерименту. Остеони з деформованою геометрією містять переважно незрілі форми остеоцитів, причому орієнтація пучків колагенових волокон у складі кісткових пластинок має обмежену просторову впорядкованість на тлі значної частки аморфного остеоматриксу. Наприкінці експерименту глибока зо-

на регенерату містить гетероморфні сполучнотканинні ділянки і пухко розташовані кісткові трабекули з ознаками незавершеного ремоделювання.

Перспективи подальших досліджень пов'язані з порівняльним аналізом тканинних, клітинних і ультраструктурних характеристик процесів регенерації нижньої щелепи після її травматичного ушкодження із наступною імплантацією ризних остеопластичних матеріалів.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної теми «Морфофункціональні та імуногістохімічні особливості тканин і органів в нормі та при патологічних станах» (номер державної реєстрації 0122U000168).

Літературні джерела References

1. Campana V, Milano G, Pagano E, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(10):2445-2461. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5240-2>
2. Valtanen RS, Yang YP, Gurtner GC, Maloney WJ, Lowenberg, DW. Synthetic and Bone tissue engineering graft substitutes: What is the future?. *Injury*. 2021;52(2):S72-S77. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2020.07.040>
3. Kovrlja I, Locs J, Loca D. Octacalcium phosphate: Innovative vehicle for the local biologically active substance delivery in bone regeneration. *Acta Biomater*. 2021;135:27-47. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.08.021>
4. Aguilar A, Zein N, Harmouch E, Hafdi B, Bornert F, Offner D, et al. Application of chitosan in bone and dental engineering. *Molecules*. 2019;24(16):3009. <https://doi.org/10.3390/molecules24163009>
5. Doderio A, Scarfi S, Mirata S, Sionkowska A, Vicini S, Alloisio M, et al. Effect of crosslinking type on the physical-chemical properties and biocompatibility of chitosan-based electrospun membranes. *Polymers (Basel)*. 2021;13(5):831. <https://doi.org/10.3390/polym13050831>
6. Sukpaita T, Chirachanchai S, Pimkhaokham A, Ampornaramveth RS. Chitosan-Based Scaffold for Mineralized Tissues Regeneration. *Mar Drugs*. 2021;19(10):551. <https://doi.org/10.3390/md19100551>
7. Winkler T, Sass FA, Duda GN, Schmidt-Bleek K. A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. *Bone Joint Res*. 2018;7(3):232-243. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.73.BJR-2017-0270.R1>
8. Everts V, Niehof A, Tigchelaar-Gutter W, Beertsen W. Transmission Electron Microscopy of Bone. *Methods Mol Biol*. 2019;1914:617-629. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8997-3_32
9. Niikura T, Oda T, Jimbo N, et al. Immunohistochemical analysis revealed the expression of bone morphogenetic proteins-4, 6, 7, and 9 in human induced membrane samples treated with the Masquelet technique. *J Orthop Surg Res*. 2022;17(1):29. <https://doi.org/10.1186/s13018-022-02922-y>
10. Xue N, Ding X, Huang R, Jiang R, Huang H, Pan X, et al. Bone tissue engineering in the treatment of bone defects. *Pharmaceuticals*. 2022;15:879. <https://doi.org/10.3390/ph15070879>
11. Mulish M, Welsh U. (Eds.). *Romeis Mikroskopische technic*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010. 551 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2254-5>
12. Suvarna SK, Layton C, Bancroft GD. (Eds.). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, 8th Edition. Elsevier; 2019. 558 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6864-5.00008-6>
13. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:289-98. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25
14. Nguyen T. *Immunohistochemistry: A Technical Guide to Current Practices*. Cambridge: Cambridge University Press; 2022. 272 p.
15. Glauert AM. Recent advances of high voltage electron microscopy in biology. *J Microsc*. 1979;117(1):93-101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1979.tb00233.x>
16. Hayat MA. *Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications* [4th ed.]. Cambridge : Cambridge University Press; 2000. 543 p.
17. Goldstein JI, Newbury DE, Michael JR, Ritchie NWM, Scott JHJ, Joy DC. *Scanning electron microscopy and X-Ray microanalysis*. New York, NY: Springer New York; 2017. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6676-9>
18. Poslavska OV. [Determination of linear dimensions and square surfaces areas of morphological objects on micrographs using ImageJ software]. *Morphologia*. 2016;10(3):377-81. Ukrainian.
19. Hruziova TS, Lekhan VM, Ohniov VA, Haliienko LI, Kriachkova LV, Palamar BI, et al. [Biostatistics]. Vinnytsia: New Book; 2020. 384 p.

Ukrainian.

20. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe. 1986;123:52.

21. 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. Off J Eur Union. 2010;53(L276):33-79.

Челпанова І.В. Перебудови кістки нижньої щелепи після трансплантації октакальційфосфату та хітозану: гістологічні, імуногістохімічні та ультраструктурні аспекти.

РЕФЕРАТ. У статті представлені результати дослідження гістологічних, імуногістохімічних та ультраструктурних характеристик кістково-керамічного регенерату після трансплантації октакальційфосфату (ОКФ-Н) і хітозану в експериментальний дефект нижньої щелепи кролика, оскільки повна та якісна регенерація кісток щелепно-лицевої ділянки, її механізми та динаміка залишаються не до кінця вивченими, потребують уточнення і деталізації. **Мета** дослідження – визначити динаміку гістологічних, імуногістохімічних та ультраструктурних змін у кістці нижньої щелепи кролика після її травматичного ушкодження із наступним заміщенням дефекту остеопластичним матеріалом ОКФ-Н і активованим хітозаном. **Методи.** Досліди виконано на 89 кроликах-самцях віком 6-7 міс, масою 2,5-3,0 кг. 20 тварин становили контрольну групу, 64 – дві експериментальні, по 32 в кожній. Ще 5 інтактних тварин було використано для вивчення нормальної структури кісткової тканини досліджуваної ділянки нижньої щелепи. До контрольної групи увійшли тварини з дефектом кісткової тканини, який загоювався під кров'яним згустком. Першу експериментальну групу складали 32 кролики, у яких кістковий дефект заповнювали модифікованим натуральним октакальційфосфатом з сумішшю хітозану та ампіциліну (ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін). Другу експериментальну групу складали 32 кролики, у яких кістковий дефект заповнювали активованим хітозаном (Хітозан-А). Контроль посттравматичного стану кісткової тканини в ділянці дефекту здійснювали впродовж 84 діб з використанням наступних методик: моделювання кісткового дефекту, світлооптична оцінка гістоструктури декальцинованої кістки, імуногістохімічне визначення експресії маркерів CD34, Calcitonin, Ki-67, трансмісійна електронна мікроскопія. Рельєфні зміни вивчали шляхом скануючої електронної мікроскопії. **Результати та підсумок.** Пошарова імплантація матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін (зовнішній сегмент трансплантату – комплекс хітозану з ампіциліном, внутрішній сегмент – гранули модифікованого натурального октакальційфосфату) створює умови для реалізації ефекту вторинної остеоіндукції. Зокрема, через 1 тиждень після імплантації під щільним хітозановим покриттям утворюється зона гіпоксії, яка індукує інтенсивне відновлення періосту та активує неоваскулогенез із супровідною міграцією і цитодиференціюванням остеопрогеніторних клітин з двох напрямів: 1) від мікросудин відновленого періосту та 2) від ушкоджених трабекул материнської кістки по краях експериментального дефекту. Впродовж 2-3-го тижнів пори внутрішнього сегменту імплантату з модифікованим октакальційфосфатом забезпечують повну васкуляризацію кістково-керамічного регенерату, насичення його острівцями десмального остеогенезу з наступним утворенням грубоволокнистих трабекул і хвилеподібним розповсюдженням процесів ремоделювання кісткової тканини від периферії регенерату в напрямку його глибокої зони. За умов застосування матеріалу Хітозан-А відбувалося обмежене зростання параметра відносного об'єму кісткової тканини в регенераті протягом досліджуваного періоду, яке за інтенсивністю змін значно поступалося динаміці у тварин контрольної групи. Імплантація активованого хітозану створює умови для інтенсивного відновлення періосту і стимулює утворення остеοїдних виростів на поверхні ушкоджених кісткових трабекул за рахунок проліферації та синтетичної діяльності остеобластів впродовж перших трьох тижнів експерименту. Через 5 тижнів у периферичних ділянках регенерату утворюється примітивна губчаста структура стоншених новоутворених трабекул і спікул з обмеженим анастомозуванням і ознаками ремоделювання грубоволокнистого матриксу в примітивні кісткові пластинки. Через 8 тижнів після імплантації активованого хітозану на тлі обмеженої остеοінтеграції в периферичних ділянках регенерату відбувається повільне дифузне ремоделювання пухко розташованих трабекул з утворенням примітивних кісткових пластинок. Ознаки компактизації новоутвореної кістки поблизу періосту з'являються лише через 12 тижнів експерименту. Остеони з деформованою геометрією містять переважно незрілі форми остеοцитів, причому орієнтація пучків колагенових волокон у складі кісткових пластинок має обмежену просторову впорядкованість на тлі значної частки аморфного остеοматриксу. Наприкінці експерименту глибока зона регенерату містить гетероморфні сполучнотканинні ділянки і пухко розташовані кісткові трабекули з ознаками незавершеного ремоделювання.

Ключові слова: нижня щелепа, зубощелепний апарат, регенерація кісткової тканини, октакальційфосфат, хітозан, гістоструктура, імуногістохімія, ультраструктура.

О.В. Юзич¹
О.В. Дудок¹
І.В. Твердохліб²
В.Б. Фік¹

¹ Львівський національний
медичний університет імені
Данила Галицького
Львів

² Дніпровський державний
медичний університет Дніп-
ро, Україна

Надійшла: 19.02.2023

Прийнята: 15.03.2023

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.78-83>

УДК:611.84:611.16/.018.7.019

СТРОМАЛЬНО-КЛІТИННІ АСПЕКТИ РЕПАРАТИВНОЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ РОГІ- ВКИ ПРИ ТРАВМАТИЧНИХ УШКОД- ЖЕННЯХ ОЧНОГО ЯБЛУКА

Yuzuch O.V. , Dudok O.V. , Tverdokhlib I.V.  ✉, Fik V.B.  Stromal-cellular aspects of corneal reparative regeneration in traumatic ocular globe injuries.

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv; Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. Background. The cornea is a crucial component of the eye's refractive apparatus. Its unique structure ensures perfect transparency and provides its light-refracting properties. Addressing the challenges of reconstructing the eye following traumatic injuries of various origins is a pressing concern in contemporary theoretical and practical medicine. Among these injuries, penetrating traumas and damage to the ocular globe often require reconstructive surgery to maximize the restoration of affected structures, including the cornea. However, a frequent complication following postoperative reparative regeneration of the cornea is the formation of a connective tissue scar, which significantly reduces its optical properties and overall visual acuity. **Objective.** This study aimed to investigate the micro- and submicroscopic structural organization of corneal scars following penetrating mechanical trauma to the eye. **Methods.** Samples of corneas exhibiting scarring were obtained from 19 patients 12 months after the occurrence of penetrating trauma. Light microscopy was employed to examine transverse sections of the cornea, and electron microscopy was utilized for ultrastructural analysis. Quantitative analysis of corneal thickness changes in the paracscar and scar zones was conducted over time. **Results and conclusion.** The morphologic investigation of the corneal state following penetrating injuries revealed epithelial ingrowth and proliferation into the corneal stroma at sites of anterior limiting membrane rupture, accompanied by hypertrophy of the membrane at the defect margins. Beyond keratocytes, the cellular composition of the scar included fibroblasts, atypical for normal corneal tissue, responsible for the synthesis of fibrous elements and proteoglycans, as well as myofibroblasts, whose contractile properties contribute to maximal scar compaction. Thus, corneal repair is accompanied by challenges in the form of reduced transparency, linked to stromal disorganization, and the emergence of optical aberrations induced by the contraction of fibrous tissue during its remodeling within the scar site.

Key words: eye, ocular tunics, penetrating eye injury, ocular trauma, pathology, cornea, regeneration, scar.

Citation:

Yuzuch OV, Dudok OV, Tverdokhlib IV, Fik VB. [Stromal-cellular aspects of corneal reparative regeneration in traumatic ocular globe injuries]. Morphologia. 2023;17(1):78-83. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.78-83>

 Yuzuch O.V. 0000-0002-9552-1874;  Dudok O.V. 0000-0001-9513-3460;

 Tverdokhlib I.V. 0000-0002-8672-3773;  Fik V.B. 0000-0002-2284-4488

✉ ivt@dmu.edu.ua

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Рогівка є важливим компонентом діоптричного апарату ока. Її унікальна структура забезпечує ідеальну прозорість та надає їй світлозаломлювальних властивостей. На сьогоднішній день актуальними проблемами теоретичної та практи-

чної медицини є опрацювання методів реконструкції ока при його травматичних ушкодженнях різного генезу. Серед останніх чільне місце займають проникаючі травми очного яблука, які вимагають проведення реконструктивної хірургії [1, 2] з метою максимального відновлення ура-

жених структур в тому числі і рогівки. Проте, частим ускладненням післяопераційної репаративної регенерації рогівки є формування у ній сполучнотканинного рубця, що значно знижує її оптичні властивості і якість бачення в цілому.

Механізми загоєння рогівки є складними і є, по суті, каскадом опосередкованих цитокінами взаємодій між клітинними та стромальними елементами її будови [3-5], а, отже, їхнє розуміння має визначальне значення для адекватного лікування. У розрізі сучасних уявлень речовина рогівки утворена 5-ма шарами різних структур: поверхневого епітелію, мембрани Боумена, власної речовини (стромального елемента), мембрани Десцемета та ендотелію (різновиду епітелію). Поверхневий епітелій виконує захисну і чутливу функції, має високу здатність до самообновлення завдяки присутності стовбурових клітин, локалізованих у ділянці лімба (місці переходу склери у рогівку) [6]. Мембрана Боумена і Десцемета утворені безладно упакованими колагеновими фібрилами [7-9] та виконують в основному опорну функцію, зберігаючи кривизну рогівки. 90% загальної товщини рогівки становить її стромальний компонент (власна речовина). Саме стромальний шар, в основному, є відповідальним за прозорість для світла, заломлювання та фокусування світла на сітківку. Основним складником стромального компонента є тонкі колагенові фібрили із щільним паралельним орієнтуванням у вигляді пластинок (ламель). Між ламелами лежить гідратований матрикс з високим вмістом протеогліканів, глікопротеїнів. [10] Між ламелами залягають кератоцити, відповідальні за синтез вказаних речовин. [11-12] Основна маса строми рогівки складається з білків колагену I, V, VI та XII типів та протеогліканів – дерматансульфату, кератансульфату, декорину, люмікану, кератокану. [13-17] Клітини кератоцити, подібно до фібробластів здійснюють постійний ресинтез компонентів екстрацелюлярного матриксу. [18,19] Проте, при ушкодженнях рогівки кератоцити набувають ознак фібробластів, а у пізні терміни після травми стають міофібробластами. [20,21] Саме фібробластам та міофібробластам відводять провідну роль у формуванні рубця, який і знижує оптичні якості рогівки. Тому, перспективним напрямком у запобіганні утворення сполучнотканинного рубця є розробка методів депресії фенотипу міофібробластів з наступним поверненням їх у клітинну нішу кератоцитів.

Метою роботи було мікро- та субмікроскопічне дослідження структурної організації рубця рогівки після проникаючої механічної травми ока.

Матеріали та методи

Матеріалом для досліджень слугували зразки рогівки з ознаками рубцювання 19-ти пацієнтів після 12-ти місяців від моменту виникнення проникаючої травми. Забір матеріалу здійснюва-

ли під час проведення в умовах клініки відповідними спеціалістами наскрізної кератопластики. Для гістологічних досліджень отриманий матеріал фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, проводили у розчинах етанолу зростаючих концентрацій та через хлороформ з наступним виготовленням парафінових блоків. За допомогою мікротома отримували зрізи товщиною 10 мкм. Отримані зрізи депарафінували та забарвлювали гематоксиліном і еозинном за стандартною методикою.

Для електронно-мікроскопічних досліджень отримані зразки рогівки фіксували упродовж 4-х год у 2,5% розчині глутарового альдегіду та завершували фіксацію в 1% забуференому (pH 7,4) розчині чотириокису осмію ("SPI", США). Обезводнювали у спиртах у висхідних концентраціях та пропіленоксиді. Заливали у суміш епоксидних смол Epon 812 ("SPI-Pon тм 812 Epoxy Embedding Kit", США). Ультратонкі зрізи отримували традиційно та переглядали у лабораторії електронної мікроскопії ДУ "ДМА МОЗ України" за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-100-01 ("SELM", Україна) з напругою прискорення 75-80 кВ.

В умовах клініки за допомогою пахіметрії проводили кількісний аналіз змін товщини рогівки у парарубцевій та рубцевій зонах у динаміці.

Визначення достовірності відмінностей між вибірками проводили із врахуванням парного t-критерія Стюдента, а також непараметричного критерію Уїлкінсона, у випадку відсутності нормального статистичного розподілу величин. Отримані результати опрацьовували за допомогою ліцензійної програми Statistica 6.1.

Результати та їх обговорення

Виконаний аналіз товщини рогівки після поранення у динаміці відображено на рис. 1. Задokumentовано поступове зниження показників товщини рогівки до нормальних величин у місці рубця у порівнянні з парарубцевою зоною та незмінними ділянками на 23,5-24,2% ($p \leq 0,05$).

За допомогою світлової мікроскопії вивчали поперечні зрізи рогівки через 12 міс. після травми. Встановлено, що у всіх досліджуваних випадках поширена будова в цілому збережена, а саме передній епітелій утворений кількома шарами клітин, нижче яких залягає гомогенна, злегка оксифільна смужка мембрани Боумена. Власна речовина рогівки здебільшого мала збережену ламелярну будову, але у місцях травми помітний рубець, який пронизував всі шари сітківки та мав товщину від 6 до 34 мкм.

Електронно-мікроскопічні дослідження засвідчили, що строма рубця у місці проникаючої травми втрачала притаманну для нормальної рогівки пластинчасту (ламелярну) будову і була представлена грубоволокнистими тяжами, які здебільшого були переплетеними без якої-небудь паралельної орієнтації (рис. 2).

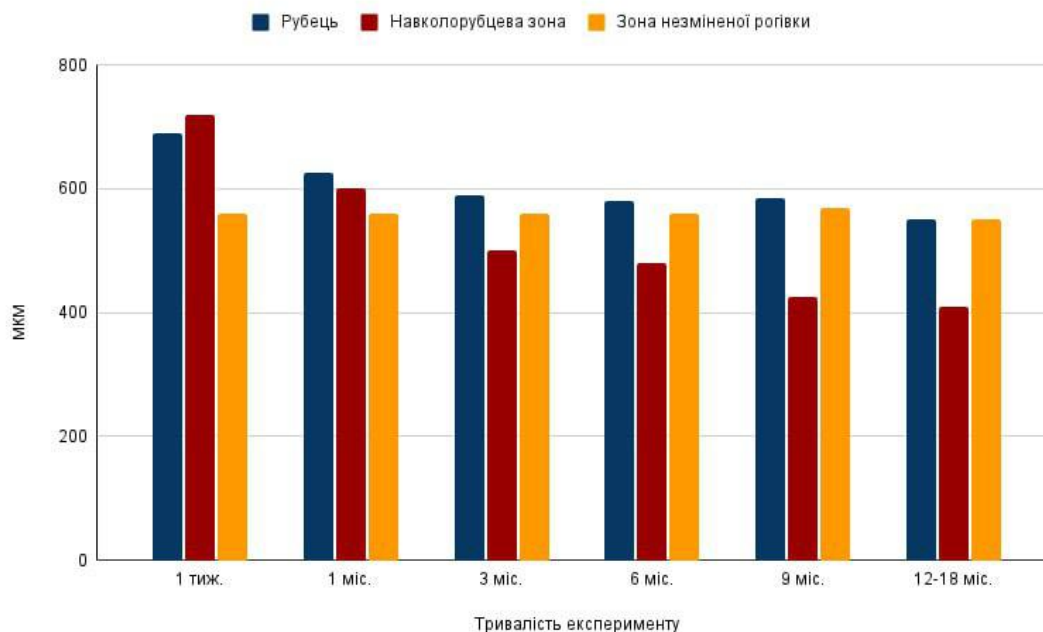


Рис. 1. Графічне зображення динаміки показників товщини роگیвки в рубцевій, парарубцевій та інтактній зонах.

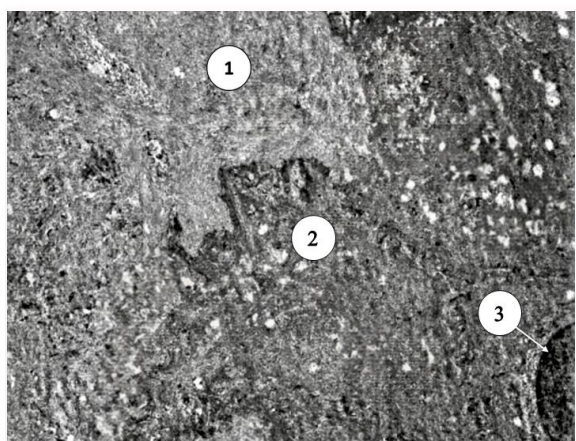


Рис. 2. Електронна мікрофотографія ділянки роگیвки ока після проникаючої травми. $\times 8000$. 1 – втрата ламелярної будови строми, підвищений вміст аморфного компонента; 2 – інвазія переднього епітелію у власну речовину роگیвки; 3 – ядро базального епітеліоцита.

Край рубця, який прилягав до переднього епітелію мав більш щільну структуру, на відміну від центральних і парacentральних зон, де волокнисті нашарування були більш електронно-світлими.

Відмічено вrostання базального шару переднього епітелію у місці розриву передньої пограничної мембрани вглиб строми роگیвки. Такі вrostання були доволі варіабельними – від невеликих острівців скупчень клітин до масивних інкорпорацій у місцях просторів між грубоволокнистими структурами. При цьому такі епітеліальні кітини мали збільшені розміри, цитоплазма

була просвітленою, у ядрах спостерігався підвищений вміст гетерохроматину. Важливо підкреслити, що вираженість виявлених змін була більшою у місцях розривів мембрани Боумена.

В результаті кількісного аналізу встановлено, що товщина переднього епітелію у зоні рубця коливається у межах $67,4 \pm 13,2$ мкм. Такий епітелій складався переважно з 6-8 шарів клітин. У зоні, що прилягала безпосередньо до рубця товщина епітелію становила $57,3 \pm 9,1$ мкм із незміненою кількістю шарів його клітин. У цей же час товщина епітеліального пласта у нешкоджених ділянках роگیвки була нижчою – $43,8 \pm 5,7$ мкм і з меншою кількістю шарів клітин (5-6).

Найбільш виражені зміни у травмованій роگیвці торкалися її стромального компонента. У незмінених ділянках роگیвки її основна речовина мала традиційну будову у вигляді паралельно розташованих пластинок (ламел), кожна з яких була утворена тонкими колагеновими фібрилами. Між ламелами залягали кератоцити сплюсненої форми і з доволі щільною цитоплазмою (рис. 3).

Водночас зустрічалися випадки нелінійних розташувань колагенових фібрил нижче передньої пограничної мембрани. У передній зоні та поблизу внутрішньої пограничної мембрани ламели залягали у площині роگیвки і перетиналися під різними кутами.

Товщина строми роگیвки в зоні рубця складала $371,4 \pm 46,3$ мкм, що на 23,7% менше ($p \leq 0,05$), ніж у незмінній зоні ($487,3 \pm 58,1$ мкм). Ламелярна впорядкованість у зоні рубця була значно порушена і була представлена безладно розташованими потовщеними колагеновими во-

локнами. Мікроскопічно у таких ділянках передній епітелій зазнавав змін, описаних вище і, ймовірно, була зруйнована базальна мембрана. Не можна виключати можливість потрапляння крізь дефекти базальної мембрани цитокінів, які і зумовлювали трансформацію кератоцитів у фібробласти, а у подальшому у міофібробласти. Як відомо, клітини фібробластичного ряду забезпечують синтез компонентів екстрацелюлярного матриксу, які і призводять до погіршення оптичних якостей рогівки (рис. 4).

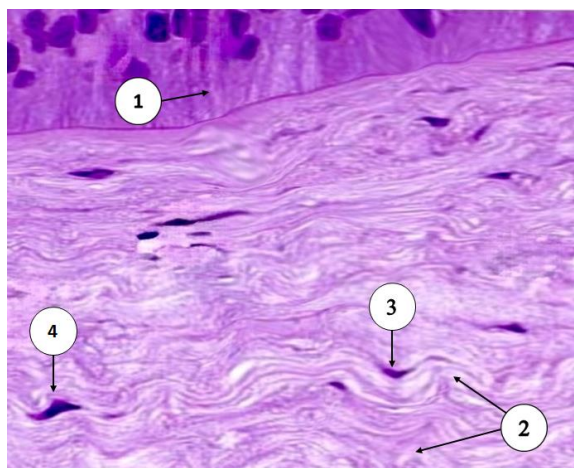


Рис. 3. Світлова мікрофотографія рогівки ока у парарубцевій зоні. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 320$. 1 – передній епітелій; 2 – незначна дезорієнтація сполучнотканинних пластинок; 3 – кератоцит; 4 – кератоцит з ознаками фібробластної трансформації.

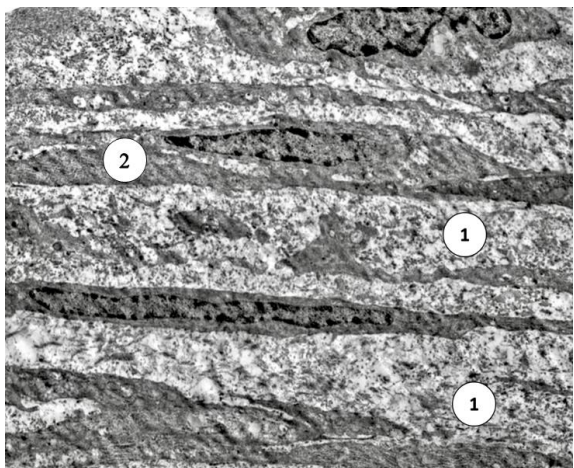


Рис. 4. Електронна мікрофотографія власної речовини (строми) рогівки у ділянці рубця через 12 місяців після проникаючої травми. $\times 10000$. 1 – дисконкомплексція ламелярної структури; 2 – міофібробласт.

Прямим підтвердженням такого механізму є морфометричні дослідження, які засвідчили достовірне підвищення вмісту кератоцитів на 44,2% у зоні рубця у порівнянні з незміненими ділянками рогівки.

Стосовно стану задньої пограничної мембрани (мембрани Десцемета), то в ділянках рубця вона мала порушену суцільність, у місцях її дефекту накопичувалися фіброзні структури. Задній епітелій (ендотелій) рогівки був утворений шаром клітин здебільшого полігональної форми. Щільність ендотеліальних клітин через 12 міс після травми становила 2307 ± 974 клітин на 1 мм^2 і відповідала нормі.

Підсумок

Проведене морфологічне дослідження стану рогівки ока після проникаючих травм засвідчило ряд змін, що торкалися усіх структурних компонентів. Відмічено вrostання і проліферацію епітелію в строму рогівки у місцях розриву передньої пограничної мембрани та її гіпертрофію по краях дефекту. Утворена рубцева тканина не містить волокнистих пластинок правильної конфігурації. Строма рубця утворена товстими різноспрямованими колагеновими фібрилами та територіями, заповненими основною аморфною речовиною. Серед клітинних елементів окрім кератоцитів з'являються не характерні для нормальної рогівки фібробласти та міофібробласти. Як відомо, такі клітини якраз і відповідальні за синтез волокнистих елементів та таких компонентів як протеоглікани. Накопичення вказаних продуктів призводить до порушення світлопроникливості і діоптричної функції рогівки і, як наслідок, погіршення зору. Стосовно міофібробластів, то вони завдяки своїм контрактильним властивостям забезпечують максимальне ущільнення рубця.

Перспективи подальших досліджень

Доцільним, на нашу думку, є вивчення міжклітинної кооперації у механізмах репарації рогівки та ідентифікації міофібробластів за допомогою імуноцитохімічних методів (виявлення маркерного для них білка α -SMA). Такий підхід дасть можливість для пошуку супресорів активності міофібробластів.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної теми «Морфофункціональні особливості органів у пре- та постнатальному періодах онтогенезу, при впливі опіоїдів, харчових добавок, реконструктивних операціях та ожирінні» (номер державної реєстрації 0120U002129).

Літературні джерела References

1. Wong TY, Klein BE, Klein, R. The prevalence and 5-year incidence of ocular trauma. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 2000;107(12):2196–202. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(00\)00390-0](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(00)00390-0)
2. Katz J, Tielsch JM. Lifetime prevalence of ocular injuries from the Baltimore Eye Survey. *Archives of ophthalmology*. 1993;111(11):1564–8. <https://doi.org/10.1001/archophth.1993.01090110130038>
3. Agrawal VB, Tsai RJ. Corneal epithelial wound healing. *Indian journal of ophthalmology*. 2003;51(1):5–15.
4. Chin JY, Liu C, Lee IXY, Lin MTY, Cheng CY, Wong JHF, Teo CL, Mehta JS, Liu YC. Impact of Age on the Characteristics of Corneal Nerves and Corneal Epithelial Cells in Healthy Adults. *Cornea*. 2024;43(4):409–18. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000003363>
5. Eraslan M, Tokar E. Mechanisms of corneal wound healing and its modulation following refractive surgery. *Marmara Med. J*. 2009;22:169–78.
6. Sutphin J.E. Basic and Clinical Science Course. 1st. American Academy of Ophthalmology; External Disease and Cornea. San Fransisco, CA, USA: 2011–2012. 458 p.
7. Germain L, Carrier P, Auger FA, Salesse C, Guérin SL. Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering?. *Progress in retinal and eye research*. 2000;19(5):497–527. [https://doi.org/10.1016/s1350-9462\(00\)00005-7](https://doi.org/10.1016/s1350-9462(00)00005-7)
8. Guérin LP, Le-Bel G, Desjardins P, Couture C, Gillard E, Boisselier É, Bazin R, Germain L, Guérin SL. The Human Tissue-Engineered Cornea (hTEC): Recent Progress. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(3):1291. <https://doi.org/10.3390/ijms22031291>
9. Gouveia RM, Cannon CJ. The effects of retinoic acid on human corneal stromal keratocytes cultured in vitro under serum-free conditions. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013;54(12):7483–91. <https://doi.org/10.1167/iov.13-13092>
10. Skuta GL, Cantor LB, Weiss JS. Refractive Surgery, Section 13 Basic and Clinical Science Course. 1st. American Academy of Ophthalmology; San Fransisco, CA, USA. 2011:2–44.
11. Lim M, Ye H, Panoskaltsis N, Drakakis EM, Yue X, Cass AE, Radomska A, Mantalaris A. Intelligent bioprocessing for haemopoietic cell cultures using monitoring and design of experiments. *Biotechnology advances*. 2016;25(4):353–68. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.002>
12. Mirveis Z, Howe O, Cahill P, Patil N, Byrne HJ. Monitoring and modelling the glutamine metabolic pathway: a review and future perspectives. *Metabolomics*. Official journal of the Metabolic Society. 2023;19(8):67. <https://doi.org/10.1007/s11306-023-02031-9>
13. Bron A. The architecture of the corneal stroma. *Br. J. Ophthalmol.* 2001;85:379–381. doi: 10.1136/bjo.85.4.379.
14. Komninou MA, Seiler TG, Enzmann V. Corneal biomechanics and diagnostics: a review. *International ophthalmology*. 2024;44(1):132. <https://doi.org/10.1007/s10792-024-03057-1>
15. Koudouna E, Winkler M, Mikula E, Juhasz T, Brown DJ, Jester JV. Evolution of the vertebrate corneal stroma. *Progress in retinal and eye research*. 2018;64:65–76. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.01.002>
16. Carlson EC, Wang IJ, Liu CY, Brannan P, Kao CW, Kao WW. Altered KSPG expression by keratocytes following corneal injury. *Molecular vision*. 2013;9:615–23.
17. Jhanji V, Billig I, Yam GH. Cell-Free Biological Approach for Corneal Stromal Wound Healing. *Frontiers in pharmacology*. 2021;12:671405. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.671405>
18. West-Mays JA, Dwivedi DJ. The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006;38(10):1625–31. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.03.010>
19. Torricelli AA, Santhanam A, Wu J, Singh V, Wilson SE. The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury. *Experimental eye research*. 2016;142:110–8. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.09.012>
20. Bernstein AM, Twining SS, Warejcka DJ, Tall E, Masur S.K. Urokinase receptor cleavage: a crucial step in fibroblast-to-myofibroblast differentiation. *Molecular biology of the cell*. 2007;18(7):2716–27. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-10-0912>
21. Zhu R, Liu TW, Liu F. Exogenous Urokinase Inhibits Proteasomal Degradation of Its Cognate Urokinase Plasminogen Activator Receptor. *Frontiers in pharmacology*. 2022;13:754271. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.754271>

Юзич О.В., Дудок О.В., Твердохліб І.В., Фік В.Б. Стромально-клітинні аспекти репаративної регенерації рогівки при травматичних ушкодженнях очного яблука.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Рогівка є важливим компонентом діоптричного апарату ока. Її унікальна структура забезпечує ідеальну прозорість та надає їй світлозаломлювальних властивостей. Актуальними проблемами теоретичної та практичної медицини сьогодення є опрацювання методів реконструкції ока

при його травматичних ушкодженнях різного генезу. Серед яких, проникаючі травми та пошкодження очного яблука, які вимагають проведення реконструктивної хірургії з метою максимального відновлення уражених структур в тому числі і рогівки. Проте, частим ускладненням післяопераційної репаративної регенерації рогівки є формування у ній сполучнотканинного рубця, що значно знижує її оптичні властивості і якість бачення в цілому. **Метою** роботи було мікро- та субмікроскопічне дослідження структурної організації рубця рогівки після проникаючої механічної травми ока. **Методи.** Матеріалом для досліджень слугували зразки рогівки з ознаками рубцювання 19-ти пацієнтів після 12-ти місяців від моменту виникнення проникаючої травми. За допомогою світлової мікроскопії вивчали поперечні зрізи рогівки, проводили електронно-мікроскопічні дослідження та вивчали кількісний аналіз змін товщини рогівки у парарубцевій та рубцевій зонах у динаміці. **Результати та підсумок.** Проведене морфологічне дослідження стану рогівки ока після проникаючих травм засвідчило вrostання і проліферацію епітелію в строму рогівки у місцях розриву передньої пограничної мембрани та її гіпертрофію по краях дефекту. Серед клітинних елементів окрім кератоцитів з'являються не характерні для нормальної рогівки фібробласти, які відповідають за синтез волокнистих елементів та протеогліканів та міофібробласти, які, завдяки своїм контрактильним властивостям, забезпечують максимальне ущільнення рубця. Тому, репарація супроводжується певними проблемами у вигляді зниження прозорості, що пов'язано з дезорганізацією строми рогівки, а також виникнення оптичних аберацій, викликаних контракцією фіброзної тканини внаслідок її перебудови в місці сформованого рубця.

Ключові слова: очне яблуко, оболонки ока, патологія, поранення ока, травма ока, рогівка, регенерація, рубець.

P.A. Kobeza

Dnipro State Medical University,
Dnipro, Ukraine.

Надійшла: 22.01.2023

Прийнята: 15.03.2023

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.84-97>

UDC: 616.12:616.12-008.331.45

HYPOXIA IN CARDIOGENESIS OF RATS

Kobeza P.A.   **Hypoxia in cardiogenesis of rats.**
Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Hypoxia during early stages of cardiogenesis in rats causes complications in the functional development of cardiomyocytes. Cardiogenesis under hypoxia refers to the process of generating new cardiac cells or cardiomyocytes in response to low oxygen levels or hypoxia. This process occurs as a means of adaptation of the heart to support its function in conditions of reduced oxygen supply. Hypoxia can activate certain signaling pathways such as the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway. **Objective.** To determine hypoxia as a general complicated state. To identify factors that cause this condition. To provide a characterization of complications and ways of their progressive development in different regions of the heart during early ontogenesis. Understanding the causes and mechanisms of hypoxia is crucial for developing effective methods of detecting this pathological and functional state of myocardial cells in rats. **Methods.** Systematic literature review, meta-analysis, content analysis. **Results.** The main types of hypoxia and their influence on the structure and development of rat myocardium are presented. The process of development of myofibrils and mitochondria in different zones of the myocardium during ontogenesis is described in detail. **Conclusions.** The use of histological methods on animal models can provide an understanding of the mechanisms underlying cardiogenesis under hypoxia and can help in developing effective methods of diagnosing the effects of low oxygen levels on the process of formation of cardiac muscle tissue.

Key words: cardiomyocyte, contractile apparatus, sarcomere, hypoxia, cardiogenesis in prenatal ontogenesis of rats.

Citation:

Kobeza PA. Hypoxia in cardiogenesis of rats. *Morphologia*. 2023;17(1):84-97.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.84-97>

 **Kobeza P.A. 0000-0003-1113-4007**

 **kobeza.pavel@gmail.com**

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Background

Hypoxia-induced cardiogenesis refers to the process of generating new cardiac cells or cardiomyocytes in response to low oxygen levels, or hypoxia. This process occurs as a means of adaptation by the heart to maintain its function under conditions of reduced oxygen supply. Hypoxia can activate certain signaling pathways, such as the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway, which can lead to the differentiation of stem cells into cardiomyocytes. The HIF pathway is a transcriptional regulator that controls the expression of genes involved in angiogenesis, metabolism, and cell survival. Additionally, hypoxia can also induce the proliferation of pre-existing cardiomyocytes, as well as the activation of resident cardiac stem cells. These cells can differentiate into cardiomyocytes and contribute to the regeneration of damaged or injured cardiac tissue.

Overall, hypoxia-induced cardiogenesis is a complex process that involves the activation of multiple signaling pathways and the differentiation of various cell types. Hypoxia is a condition that occurs when there is a reduced level of oxygen supply to the tissues of the body, including the myocardium. The most common definition of hypoxia is a state in which the oxygen supply to the tissues is insufficient to meet the metabolic demands of the cells [1].

Hypoxia can be caused by a variety of factors, including decreased blood flow to the tissues, reduced oxygen-carrying capacity of the blood, or decreased oxygen concentration in the air. In the case of the myocardium, hypoxia can result from coronary artery disease, which limits blood flow to the heart muscle, or from heart failure, which reduces the ability of the heart to pump blood effectively [2].

Factors that can influence the development of hypoxia include altitude, smoking, carbon monoxide exposure, and certain medical conditions such as anemia and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [3]. Additionally, hypoxia can occur as a result of physical exertion or high-intensity exercise, which can increase the demand for oxygen by the body.

Purpose

Hypoxia is a condition that occurs when the body or tissues do not receive enough oxygen to meet their metabolic demands. The most common definition of hypoxia is a state of insufficient oxygenation of tissues, which can lead to cellular damage and impaired function [4]. Hypoxia can be caused by a variety of factors, including reduced oxygen levels in the environment, respiratory diseases that impair oxygen exchange, cardiovascular diseases that decrease blood flow and oxygen delivery to tissues, anemia or other blood disorders that reduce the oxygen-carrying capacity of blood, and exposure to toxins or drugs that interfere with oxygen utilization [5]. Factors that can influence the development of hypoxia include altitude, smoking, carbon monoxide exposure, and certain medical conditions such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma, or congestive heart failure. Altitude hypoxia occurs due to decreased barometric pressure and oxygen levels at high altitudes, which can lead to altitude sickness and impaired physical performance. Smoking and carbon monoxide exposure impair the ability of red blood cells to transport oxygen, leading to tissue hypoxia. COPD and asthma can cause chronic or acute respiratory failure, which impairs oxygenation of the blood and tissues. Congestive heart failure reduces the cardiac output, resulting in inadequate oxygen delivery to the tissues [6].

Objective

To determine hypoxia as a general complicated state. To identify factors that cause this condition. To provide a characterization of complications and ways of their progressive development in different regions of the heart during early ontogenesis. Understanding the causes and mechanisms of hypoxia is crucial for developing effective methods of detecting this pathological and functional state of myocardial cells in rats. This process has significant implications for the development of therapies for cardiovascular disease and cardiac regeneration. In addition to these factors, hypoxia can be exacerbated by physical exertion, which increases the oxygen demand of tissues, and by pre-existing medical conditions that impair the body's ability to compensate for reduced oxygen levels. The severity and duration of hypoxia depend on the underlying cause and the duration of exposure to the hypoxic environment or conditions [7]. Overall, hypoxia is a complex physiological condition that can result from a variety of factors and can affect different tissues and organs in differ-

ent ways. Understanding the causes and mechanisms of hypoxia is critical for the development of effective treatments for the various diseases that can lead to tissue hypoxia.

Methods and materials

When writing an analytical scientific article based on the analysis of scientific articles, it is important to use appropriate research methods to ensure that the article is well-supported and credible. Here are some methods that can be used:

1. Systematic literature review: This method involves conducting a comprehensive and structured search of relevant literature in order to identify and analyze all available evidence on a particular topic [8]. This helps ensure that all relevant literature is included in the analysis and can help to identify any gaps in knowledge or inconsistencies in the existing literature.

2. Meta-analysis: This method involves using statistical techniques to combine and analyze data from multiple studies in order to generate more robust conclusions about a particular topic [9]. This method is particularly useful when there are multiple studies on a topic with conflicting results.

3. Content analysis: This method involves analyzing the content of scientific articles, identifying themes, patterns, and relationships among variables that may impact the development of the heart [10].

4. When analyzing the literature, it is important to consider the relevance and quality of the sources. It is best to analyze scientific articles that are peer-reviewed and published in reputable scientific journals. Additionally, it is important to consider the date of publication, as older articles may not reflect the most current knowledge on the topic.

5. There are several databases and websites that can be used to search for relevant scientific literature, such as PubMed [11], ScienceDirect [12], and Google Scholar [13]. It is also useful to search the reference lists of relevant articles to identify additional sources of information. More references can be found by consulting the bibliographies of articles found through these search methods and by exploring related topics.

Results

There are several types of hypoxia that can occur in the body. These include hypoxic hypoxia, anemic hypoxia, ischemic hypoxia, and histotoxic hypoxia. Hypoxic hypoxia occurs when the body tissues do not receive enough oxygen due to reduced oxygen levels in the environment or decreased lung function. This type of hypoxia can occur at high altitudes or in areas with low oxygen levels. It can also occur in conditions such as pneumonia, pulmonary fibrosis, and acute respiratory distress syndrome (ARDS), where the lungs are unable to adequately exchange oxygen and carbon dioxide.

Anemic hypoxia occurs when there is a decrease in the oxygen-carrying capacity of the blood due to reduced hemoglobin levels or abnormal he-

moglobin function. This can occur in conditions such as anemia, carbon monoxide poisoning, or sickle cell disease. In anemia, there are fewer red blood cells to carry oxygen, while in carbon monoxide poisoning, the carbon monoxide molecule binds to hemoglobin, preventing it from carrying oxygen. In sickle cell disease, the abnormal hemoglobin molecule causes the red blood cells to become misshapen and unable to carry oxygen efficiently [15].

Ischemic hypoxia occurs when there is a reduction in blood flow to the tissues, leading to a lack of oxygen delivery. This can occur in conditions such as heart disease, where the blood vessels supplying the heart muscle become narrowed or blocked, reducing blood flow and oxygen delivery. It can also occur in conditions such as stroke or peripheral arterial disease, where the blood flow to the brain or limbs is reduced, leading to tissue damage and hypoxia [16].

Histotoxic hypoxia occurs when the tissues are unable to use the oxygen that is delivered to them due to damage to the cells or mitochondria. This can occur in conditions such as cyanide poisoning, where the cyanide molecule prevents the mitochondria from using oxygen to produce energy [17].

Understanding the different types of hypoxia is important for diagnosing and treating the underlying causes of tissue hypoxia. Treatment strategies may vary depending on the type and severity of hypoxia, and may include supplemental oxygen therapy, medications, or surgical interventions.

Each type of hypoxia is associated with a specific mechanism and can cause different complications. Hypoxemic hypoxia occurs with low oxygen levels in the atmospheric air or due to respiratory system disorders. Anemic hypoxia is linked to a deficiency of hemoglobin or red blood cells in the blood, leading to decreased oxygen-carrying capacity [18]. Ischemic hypoxia occurs due to inadequate blood supply to tissues, leading to insufficient oxygen delivery to the body [19]. Toxic hypoxia is associated with a disturbance in the body's ability to process oxygen, such as from exposure to toxins or gases like carbon monoxide [20]. Histotoxic hypoxia arises from impairment of tissue's ability to utilize oxygen due to damage to mitochondria or blocking enzyme action [21].

Different types of hypoxia can lead to complications in different systems of the body. One of the most severe complications is damage to the cardiovascular system. Hypoxia may result in cardiac arrhythmias, hypertension, decreased myocardial contractility, and heart failure [22].

Hypoxia, a condition characterized by a lack of adequate oxygen supply to tissues, can result in a wide range of complications, many of which are associated with the cardiovascular system. One of the most serious complications of hypoxia is damage to the cardiovascular system, which can lead to a range of conditions, including arrhythmias, hyper-

tension, impaired myocardial contractility, and heart failure.

Hypoxia-induced arrhythmias can be caused by a range of mechanisms, including increased activity of the sympathetic nervous system, changes in ion channel activity, and alterations in calcium homeostasis. These arrhythmias can be life-threatening, particularly in the context of acute myocardial infarction and other forms of ischemic heart disease [23].

Hypoxia can also result in hypertension, or high blood pressure, due to activation of the renin-angiotensin-aldosterone system and increased levels of endothelin-1, a potent vasoconstrictor. Chronic hypoxia has been shown to be a risk factor for the development of pulmonary hypertension, which can lead to right ventricular hypertrophy and eventually heart failure [24]. Impaired myocardial contractility is another common complication of hypoxia, particularly in the setting of acute respiratory distress syndrome (ARDS) and sepsis. This impairment is thought to be due to alterations in cellular metabolism, changes in intracellular calcium handling, and the activation of pro-inflammatory cytokines. In severe cases, this impairment can progress to cardiogenic shock and multi-organ failure. Finally, hypoxia can lead to the development of heart failure, a condition in which the heart is unable to pump enough blood to meet the body's needs. This can occur due to a range of factors, including impaired myocardial contractility, increased afterload, and the development of pulmonary hypertension. Chronic hypoxia, particularly in the setting of obstructive sleep apnea, has been identified as a risk factor for the development of heart failure [25]. In conclusion, hypoxia can result in a range of cardiovascular complications, including arrhythmias, hypertension, impaired myocardial contractility, and heart failure [26]. These complications can be life-threatening and require prompt diagnosis and treatment [27].

Each type of hypoxia can have different effects on the development and formation of the heart. Hypoxemic hypoxia, caused by low oxygen levels in the air, can lead to abnormalities in the formation of the cardiac muscle and an increase in pulmonary artery pressure [28]. This can result in congenital heart defects such as ventricular septal defects or pulmonary artery hypoplasia [29]. Anemic hypoxia, caused by insufficient hemoglobin in the blood, can lead to delayed heart development and insufficient erythrocytes, which can result in various heart defects [30]. Ischemic hypoxia, arising from impaired tissue blood supply, can lead to delayed heart development and damage to the cardiac muscle. This can cause heart failure and various heart defects, such as pulmonary artery atresia and ventricular septal defects [31].

Toxic hypoxia, caused by impaired organismal ability to process oxygen, can lead to cardiac muscle damage and congenital heart defects. For example,

hypoxia caused by nitric oxide poisoning can result in heart defects in the fetus [32]. Histotoxic hypoxia, caused by impaired tissue oxygen utilization, can lead to cardiac muscle damage and heart defects such as pulmonary artery atresia [33]. Overall, hypoxia can cause various complications in the development and formation of the heart, depending on its type and severity.

Hypoxia can have different effects on the formation and development of the myocardium at different stages of embryonic and fetal heart development. During the early stages of heart development, hypoxia can disrupt the formation of the heart tube, which is the precursor to the heart chambers. Studies have shown that hypoxia during this stage can lead to abnormal cardiac looping, which is the process by which the heart tube forms a looped structure that eventually gives rise to the four chambers of the heart [34]. Hypoxia during this stage can also lead to decreased proliferation of cardiac progenitor cells, which can impair heart growth and development [35].

During later stages of heart development, hypoxia can also have negative effects on the myocardium. For example, studies have shown that hypoxia during the fetal period can lead to alterations in the structure and function of the heart. One study found that fetal hypoxia led to decreased left ventricular mass and increased left ventricular wall thickness [36]. Another study found that hypoxia during the fetal period led to increased apoptosis and decreased proliferation of cardiomyocytes, which can impair the growth and function of the myocardium [37]. Overall, hypoxia can have negative effects on the formation and development of the myocardium at different stages of embryonic and fetal heart development, which can lead to congenital heart defects and other cardiovascular complications.

Hypoxia can have a significant impact on the development of the ventricles of the heart in embryos and fetuses. Studies have shown that hypoxia during the early stages of heart development can result in delayed ventricular maturation, decreased ventricular cell proliferation, and increased apoptosis, or cell death [38]. In particular, hypoxia during the critical period of ventricular septation, which occurs between days 27 and 37 of human embryonic development, can lead to abnormalities in the formation of the ventricular septum and the valves of the heart [39]. This can result in congenital heart defects such as ventricular septal defects and atrio-ventricular septal defects.

Hypoxia can also affect the development of the left and right ventricles differently. For example, studies in animal models have shown that hypoxia during fetal development can result in decreased left ventricular mass and volume, but increased right ventricular mass and volume [40]. This can result in altered ventricular function and blood flow, which can lead to various heart conditions later

in life.

Hypoxia can have a significant impact on the development of the ventricles of the heart, particularly during critical periods of embryonic and fetal development. This highlights the importance of maintaining adequate oxygen levels during pregnancy to minimize the risk of congenital heart defects and other heart conditions.

The left ventricle is responsible for pumping oxygen-rich blood to the rest of the body. Hypoxia can affect its development and formation in various ways. During the embryonic period, hypoxia can lead to delayed growth and development of the left ventricle. This can result in smaller size, reduced thickness of the ventricular wall, and altered gene expression patterns [41]. In the fetal period, hypoxia can result in changes in the structure and function of the left ventricle. For example, chronic hypoxia can lead to an increase in the size and mass of the left ventricle, as well as changes in its shape and geometry. These changes are thought to be adaptations to increase oxygen delivery to the body under hypoxic conditions. However, excessive hypoxia can also lead to pathological changes in the left ventricle. For example, studies have shown that hypoxia can cause oxidative stress and inflammation in the left ventricle, leading to fibrosis and impaired contractile function [42]. Overall, hypoxia can affect the development and formation of the left ventricle in complex ways, with both adaptive and pathological effects depending on the timing and severity of the hypoxic insult [43].

Hypoxia can also have a significant impact on the development and formation of the right ventricle. The right ventricle is responsible for pumping deoxygenated blood from the heart to the lungs for oxygenation [44]. Studies have shown that hypoxia during fetal development can lead to abnormalities in the formation of the right ventricle. For example, research has found that prenatal hypoxia can result in reduced size and delayed development of the right ventricle, as well as changes in the structure of the right ventricular myocardium [45]. Hypoxia can also lead to changes in the pulmonary vasculature, which can affect the function of the right ventricle [46]. For instance, studies have suggested that prenatal hypoxia can cause a decrease in the number of pulmonary arteries, as well as an increase in the thickness of the pulmonary artery walls, which can impair blood flow to the lungs and place additional strain on the right ventricle [47]. In severe cases, hypoxia can lead to right heart failure, which can be life-threatening. Overall, hypoxia can have a significant impact on the development and formation of the right ventricle and can lead to long-term health consequences [48].

The atria are the upper chambers of the heart that receive blood from the veins and pump it into the ventricles. The development of the atria is also affected by hypoxia, which can lead

to various abnormalities. In hypoxemic hypoxia, where there is low oxygen levels in the air, the formation of the atria can be impaired. Studies have shown that hypoxia can lead to an increase in pulmonary artery pressure, which can cause a delay in the formation of the atrial septum, the wall that separates the left and right atria [49].

Anemic hypoxia, caused by insufficient hemoglobin in the blood, can also affect the development of the atria. It can lead to a decrease in the number of erythrocytes, which can result in various heart defects, including atrial septal defects [50]. Ischemic hypoxia, arising from impaired tissue blood supply, can lead to damage to the atrial muscle, which can result in atrial fibrillation, a type of irregular heart-beat. Ischemic hypoxia can also cause delayed atrial development and abnormalities in the formation of the atrial septum. Toxic hypoxia, caused by impaired organismal ability to process oxygen, can also affect the formation of the atria. For example, exposure to carbon monoxide can lead to heart defects such as atrial septal defects and patent foramen ovale. In summary, hypoxia can have various effects on the development and formation of the atria, depending on its type and severity. It can lead to delays in development, damage to the cardiac muscle, and various heart defects, including atrial septal defects and atrial fibrillation [51].

Hypoxia can have various effects on the development and formation of the left atrium of the heart, depending on its type and severity. One study found that exposure to chronic hypoxia during fetal development can lead to structural and functional changes in the left atrium, such as an increase in wall thickness and a decrease in the size of the atrial cavity [52]. Another study showed that hypoxia during fetal development can lead to a decrease in the number of cardiomyocytes in the left atrium, which can affect its contractile function [53]. Furthermore, hypoxia can affect the development and formation of the left atrium through its effects on the pulmonary veins. The pulmonary veins are the vessels that bring oxygenated blood from the lungs to the left atrium, and abnormalities in their development can lead to various heart defects. One study found that exposure to hypoxia during fetal development can lead to abnormal development of the pulmonary veins, which can result in pulmonary vein stenosis, a condition in which the pulmonary veins are narrowed and blood flow is restricted. Overall, hypoxia can have significant effects on the development and formation of the left atrium of the heart, which can lead to various structural and functional abnormalities and heart defects [54].

Similar to the left atrium, hypoxia can also affect the development and formation of the right atrium. Studies have shown that the right atrium is more susceptible to hypoxic damage compared to the left atrium due to differences in their embryological origins and blood supply [55]. During fetal de-

velopment, the right atrium receives deoxygenated blood from the superior and inferior vena cava.

Hypoxia can lead to a decrease in the oxygen content of this blood, which can then affect the formation and function of the right atrium. Studies on animal models have shown that hypoxia during fetal development can lead to a decrease in the size of the right atrium and thinning of its walls, as well as a decrease in the number of cardiomyocytes [55]. Hypoxia can also result in an altered expression of genes involved in the development and differentiation of cardiomyocytes, leading to defects in the formation of the right atrium. In humans, hypoxia can result in various congenital heart defects involving the right atrium, such as atrial septal defects and Ebstein's anomaly. Atrial septal defects are characterized by a hole in the atrial septum that separates the right and left atria, which can result in abnormal blood flow and lead to symptoms such as fatigue and shortness of breath. Ebstein's anomaly is a rare heart defect characterized by malformation of the tricuspid valve and displacement of the leaflets into the right ventricle. This can lead to blood flow abnormalities, right heart enlargement, and heart failure. Hypoxia can have significant effects on the development and formation of the right atrium, leading to various congenital heart defects and alterations in its structure and function [56].

Hypoxia can have a significant impact on the formation and development of the heart septum, which separates the left and right sides of the heart. The heart septum is formed through a complex process of growth, folding, and fusion of different structures in the developing heart, and any disruption in this process can lead to septal defects. Studies have shown that hypoxia can cause abnormalities in the formation of the heart septum. In particular, hypoxia during early fetal development has been associated with an increased risk of atrial and ventricular septal defects. Hypoxia can also affect the growth and differentiation of the cells that contribute to the formation of the septum, leading to structural abnormalities and defects [57].

Moreover, hypoxia can affect the expression of genes that are involved in the formation of the heart septum. For example, hypoxia has been shown to downregulate the expression of genes that are important for septum formation, such as *Gata4* and *Tbx5* [58]. These genes play key roles in regulating the development of the heart septum, and their dysregulation can lead to septal defects. Overall, hypoxia can have a significant impact on the formation and development of the heart septum, leading to structural abnormalities and defects that can have serious consequences for cardiac function and overall health.

There are several methods for studying the effect of hypoxia on the myocardium, including in vivo, ex vivo, and in vitro methods.

1. In vivo methods: In vivo methods involve the

study of hypoxia on the myocardium in living animals or humans. This can be achieved through various techniques, including cardiac imaging, electrocardiography (ECG), and blood gas analysis. These methods allow for the direct observation of the effects of hypoxia on the heart in real-time. One example is the use of cardiac magnetic resonance imaging (MRI) to assess changes in cardiac structure and function in response to hypoxia [49].

2. *Ex vivo* methods: *Ex vivo* methods involve the study of hypoxia on the myocardium in isolated heart preparations. This can be achieved by perfusing the heart with an oxygen-depleted solution or by placing the heart in a hypoxic chamber. *Ex vivo* methods allow for precise control over the oxygen levels and other experimental conditions. One example is the Langendorff perfusion system, which is commonly used to study the effects of hypoxia on isolated hearts [50].

3. *In vitro* methods: *In vitro* methods involve the study of hypoxia on isolated cardiac cells or tissue samples. This can be achieved through various techniques, including cell culture and organotypic slice cultures. *In vitro* methods allow for the study of the direct effects of hypoxia on specific cell types or tissues. One example is the use of neonatal rat ventricular myocytes in culture to study the molecular mechanisms underlying the response of the heart to hypoxia [51].

Overall, each of these methods has its advantages and disadvantages, and the choice of method will depend on the specific research question and experimental design. By using multiple methods in combination, researchers can gain a more comprehensive understanding of the effects of hypoxia on the myocardium.

Histological methods are widely used for studying hypoxia-induced cardiogenesis as they allow for the visualization of the tissue structure of the heart under hypoxic conditions. Here are some commonly used histological methods and their descriptions:

1. Hematoxylin and Eosin (H&E) staining: H&E staining is a commonly used technique that stains the nuclei of cells blue and the cytoplasm pink, allowing for the visualization of the general tissue structure of the heart. This staining method highlights the size, shape, and number of cells in the heart tissue under hypoxic conditions [52].

2. Masson's trichrome staining: Masson's trichrome staining is used to visualize collagen fibers in the heart tissue, and is particularly useful for detecting fibrotic changes in the heart under hypoxia conditions. This method highlights collagen fibers as blue, making it possible to quantify the degree of fibrosis in the tissue [53].

3. Periodic Acid-Schiff (PAS) staining: PAS staining is used to detect glycogen in the heart tissue, which can be altered under hypoxic conditions. This staining method allows for the visualization of

the extent of glycogen content in the heart tissue, as under hypoxia there is a decrease in glycogen content [54].

4. Immunohistochemistry (IHC): IHC involves using antibodies to label specific proteins present in the heart tissue. IHC can be used to detect changes in the expression of specific proteins under hypoxic conditions, such as the expression of hypoxia-inducible factor 1- α (HIF-1 α), which is a key regulator of the cellular response to hypoxia. IHC can also be used to quantify the extent of cell death (apoptosis) in the heart tissue [55].

5. Transmission electron microscopy (TEM): TEM allows for the observation of ultrastructural changes in the heart tissue under hypoxic conditions. TEM can be used to detect changes in the size, shape, and number of mitochondria in the heart tissue, as well as changes in the organization of myofibrils [56].

These histological methods provide valuable information about the structural and cellular changes that occur in the heart tissue under hypoxic conditions. Combining these methods with other techniques, such as gene expression analysis, can provide a more comprehensive understanding of the mechanisms underlying hypoxia-induced cardiogenesis.

Immunohistochemistry (IHC) is a widely used technique for studying the expression and localization of proteins in tissues. It involves the use of antibodies that bind to specific proteins and can be visualized using various methods, such as enzymatic or fluorescent staining. IHC can provide valuable information about the cellular response to hypoxia in the heart tissue. Here are some commonly used immunohistochemical methods for studying hypoxia-induced cardiogenesis:

1. Hypoxia-inducible factor 1- α (HIF-1 α) staining: HIF-1 α is a transcription factor that plays a central role in the cellular response to hypoxia. Under normoxic conditions, HIF-1 α is rapidly degraded, but under hypoxic conditions, it accumulates in the cell and translocates to the nucleus, where it activates the expression of genes involved in the adaptive response to hypoxia. IHC can be used to detect changes in HIF-1 α expression and localization in the heart tissue under hypoxic conditions [57].

2. Apoptosis detection: Hypoxia can induce cell death (apoptosis) in the heart tissue. IHC can be used to detect the presence of apoptotic cells in the heart tissue by labeling them with antibodies specific to cleaved caspase-3, a marker of apoptosis. The number of apoptotic cells can be quantified using image analysis software [58].

3. Fibrosis detection: Fibrosis is a common feature of the heart tissue under hypoxic conditions. IHC can be used to detect the presence of fibrotic tissue by labeling it with antibodies specific to collagen I and III. The degree of fibrosis can be quantified by measuring the amount of collagen staining in

the tissue [59].

4. **Angiogenesis detection:** Hypoxia can induce the formation of new blood vessels in the heart tissue, a process called angiogenesis. IHC can be used to detect the presence of endothelial cells, the cells that line blood vessels, by labeling them with antibodies specific to CD31 or von Willebrand factor (vWF) [60].

5. **Inflammation detection:** Hypoxia can also induce inflammation in the heart tissue. IHC can be used to detect the presence of immune cells, such as macrophages and T cells, by labeling them with antibodies specific to CD68 and CD3, respectively [61].

These immunohistochemical methods can provide valuable information about the cellular and molecular changes that occur in the heart tissue under hypoxic conditions. Combining these methods with other techniques, such as gene expression analysis, can provide a more comprehensive understanding of the mechanisms underlying hypoxia-induced cardiogenesis.

Experimental animal models are widely used to investigate the mechanisms underlying hypoxia-induced cardiogenesis. Here are some commonly used animal models for studying hypoxia-induced cardiogenesis:

1. **Rodent models:** Rodents, such as mice and rats, are commonly used for studying hypoxia-induced cardiogenesis due to their small size, low cost, and relatively short lifespan. These models involve exposing the animals to hypoxic conditions, either by reducing the oxygen concentration in the air or by subjecting them to high-altitude conditions. The degree of hypoxia and the duration of exposure can be adjusted to study different aspects of hypoxia-induced cardiogenesis, such as changes in cardiac structure, function, and gene expression [62].

2. **Canine models:** Dogs are also used as animal models for studying hypoxia-induced cardiogenesis due to their similarities to humans in terms of cardiac structure and function. These models involve subjecting the animals to hypoxia either by reducing the oxygen concentration in the air or by inducing pulmonary hypertension. Canine models are particularly useful for studying the effects of hypoxia on cardiac electrophysiology and arrhythmias [63].

3. **Swine models:** Pigs are often used as animal models for studying the effects of hypoxia on cardiac function and remodeling due to their similarities to humans in terms of cardiac structure and size. These models involve exposing the animals to hypoxia either by reducing the oxygen concentration in the air or by inducing pulmonary hypertension. Swine models are particularly useful for studying the effects of hypoxia on myocardial metabolism and substrate utilization [64].

4. **Zebrafish models:** Zebrafish are increasingly being used as animal models for studying hypoxia-

ia-induced cardiogenesis due to their genetic tractability and ability to regenerate their heart tissue. These models involve exposing the animals to hypoxia either by reducing the oxygen concentration in the water or by inducing anemia. Zebrafish models are particularly useful for studying the effects of hypoxia on cardiac regeneration and repair [65].

These animal models provide valuable tools for investigating the mechanisms underlying hypoxia-induced cardiogenesis. By combining these models with histological and molecular techniques, researchers can gain a better understanding of the cellular and molecular pathways that are activated in response to hypoxia.

Experimental representation of hypoxia-induced cardiogenesis in models of laboratory rats of the Wistar line under the influence of 1% sodium nitrite. Hypoxia-induced cardiogenesis can be studied in laboratory rat models of the Wistar line that are modeled with sodium nitrite. Sodium nitrite is a potent inducer of hypoxia and can be used to create a hypoxic environment in rats. The Wistar rat is a commonly used laboratory rat strain and is well characterized for studying cardiovascular physiology and disease [66]. This model has been used to study the effects of hypoxia on the heart and to investigate potential mechanisms underlying hypoxia-induced cardiogenesis. To create a model of hypoxia-induced cardiogenesis, Wistar rats are exposed to sodium nitrite in drinking water, which causes a decrease in oxygen delivery to the tissues and simulates a hypoxic environment. This leads to changes in cardiac function and structure, including an increase in heart weight and a decrease in ventricular function [67]. The model can be used to investigate the molecular and cellular mechanisms underlying hypoxia-induced cardiogenesis, as well as potential therapeutic interventions. The use of this model has led to the identification of various pathways and molecules that play a role in hypoxia-induced cardiogenesis. For example, one study found that hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) plays a critical role in the development of hypoxia-induced cardiac hypertrophy in Wistar rats exposed to sodium nitrite [68]. Another study found that the activation of the Notch signaling pathway is involved in the regulation of angiogenesis and the response to hypoxia in the hearts of Wistar rats exposed to hypoxia [69]. In summary, the use of laboratory rat models of the Wistar line that are modeled with sodium nitrite provides a useful tool for studying hypoxia-induced cardiogenesis. This model can be used to investigate the molecular and cellular mechanisms underlying hypoxia-induced cardiac dysfunction, as well as potential therapeutic interventions.

Hypoxia-induced cardiogenesis in lab rats can be modeled using sodium nitrite administration. Sodium nitrite is a potent vasodilator that can cause a decrease in systemic oxygen delivery and result in hypoxia. Several animal models have been

used to study hypoxia-induced cardiogenesis using sodium nitrite in lab rats.

One of the animal models that have been used is the Wistar rat. Wistar rats have been widely used in biomedical research, and their genetic homogeneity and susceptibility to experimental conditions make them a popular choice for modeling human diseases. In one study, Wistar rats were treated with sodium nitrite to induce systemic hypoxia, resulting in cardiac injury and remodeling [71]. Another study found that Wistar rats treated with sodium nitrite showed increased levels of oxidative stress and inflammation in the heart tissue [72].

In another animal model, male Sprague-Dawley rats were treated with a single dose of sodium nitrite, resulting in acute hypoxia. The study found that hypoxia led to cardiac injury and increased expression of hypoxia-inducible factor 1- α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF), both of which are involved in the cellular response to hypoxia [73]. These animal models provide valuable information about the mechanisms underlying hypoxia-induced cardiogenesis and the potential therapeutic targets for treating hypoxia-induced cardiac injury.

The current state of morphological studies of the development of the myocardium in the morphological studies of Ukrainian morphologists. In recent years, there has been significant research interest in understanding the ultrastructure of the mitochondrial apparatus in cardiomyocytes and its changes under various conditions. Several studies have been conducted on this topic, which shed light on the morphological features of cardiomyocyte development and the effects of hypoxia, hypothyroidism, and electromagnetic radiation exposure.

Kosharnyi et al. (2019) investigated the ultrastructure of the mitochondrial apparatus in left ventricular cardiomyocytes of rats exposed to different levels of electromagnetic radiation under conditions of hypothyroidism. Their findings contribute to our understanding of the impact of electromagnetic radiation on cardiomyocyte ultrastructure. [74]. Ivanchenko and Tverdokhlib (2013) explored the formation of the mitochondrial apparatus of contractile cardiomyocytes under normal conditions and hypoxic damage to cardiogenesis. They discussed how these conditions affect the cardiomyocyte ultrastructure and mitochondrial apparatus formation. [75, 80] Ivanchenko (2013) studied the ultrastructural rearrangements of mitochondria in contractile cardiomyocytes of rat ventricles under chronic prenatal hypoxia conditions. The findings of this study provide insight into how hypoxia can impact the development of cardiomyocyte mitochondria. [76, 81]

Kozlov et al. (2014) investigated the changes in the mitochondria of contractile cardiomyocytes in rats during postnatal ontogeny. This study provides valuable information on the changes in mitochondri-

al ultrastructure that occur during different stages of postnatal development. [77, 82]

Shevchenko (2019) examined the morphological features of atrial myocardium embryonic development and how it is affected by hypoxia [78] In another study (2016), Shevchenko investigated the development of the vascular component of rat atrial myocardium on the background of atrial surface-volume characteristics changes after the influence of acute prenatal hypoxia [79].

Perspectives of hypoxia research. Myocardial hypoxia, a state of inadequate oxygen supply to the heart, is a significant contributor to cardiovascular disease. Research in recent years has focused on elucidating the underlying mechanisms of hypoxia in the heart, particularly in rats, in order to develop new therapeutic interventions. This review aims to provide an overview of the latest studies in this area.

One study by Chen et al. [83] investigated the role of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in myocardial hypoxia. The authors found that HIF-1 α expression increased in hypoxic rats, leading to an increase in glycolysis and angiogenesis. They concluded that targeting HIF-1 α could be a promising strategy for treating myocardial hypoxia.

Another study by Wu et al. [84] investigated the role of long noncoding RNA (lncRNA) in myocardial hypoxia. The authors found that lncRNA expression changed significantly in hypoxic rats, and that inhibiting lncRNA reduced oxidative stress and improved cardiac function. They suggested that targeting lncRNA could be a novel therapeutic strategy for treating myocardial hypoxia.

A study by Zhang et al. [85] investigated the role of microRNA (miRNA) in myocardial hypoxia. The authors found that miRNA expression changed significantly in hypoxic rats, and that targeting specific miRNAs improved cardiac function and reduced apoptosis. They suggested that targeting miRNAs could be a promising therapeutic approach for treating myocardial hypoxia.

Another study by Wang et al. [86] investigated the role of autophagy in myocardial hypoxia. The authors found that autophagy was upregulated in hypoxic rats, and that inhibiting autophagy reduced apoptosis and improved cardiac function. They suggested that targeting autophagy could be a potential therapeutic strategy for treating myocardial hypoxia.

Overall, recent studies have identified several potential therapeutic targets for treating myocardial hypoxia, including HIF-1 α , lncRNA, miRNA, and autophagy. Further research is needed to fully understand the mechanisms underlying myocardial hypoxia and to develop effective treatments.

Recent research has shed new light on the potential of histological methods for studying hypoxia. Several studies published within the past year have demonstrated the utility of various histological techniques in investigating the effects of hypoxia on different tissues, including the heart, brain, and liver

[87-89].

One promising approach is the use of immunohistochemical staining to detect and quantify specific markers of hypoxia, such as HIF-1 α and VEGF. A recent study by Zhang et al. found that HIF-1 α expression in the myocardium was significantly upregulated in response to hypoxia, and that this increase was accompanied by increased VEGF expression [87]. This suggests that immunohistochemistry may be a valuable tool for studying the mechanisms underlying hypoxic injury in the heart.

Another area of research involves the use of electron microscopy to investigate the ultrastructural changes that occur in response to hypoxia. For example, a recent study by Xu et al. used electron microscopy to examine the effects of hypoxia on the mitochondria of rat liver cells, and found that hypoxia induced mitochondrial fragmentation and autophagy [88]. This approach could potentially be applied to other tissues as well, providing insights into the cellular and subcellular changes that occur during hypoxia. Overall, these recent studies demonstrate the potential of histological methods for studying hypoxia, and suggest that these techniques could be valuable tools for investigating the mechanisms underlying hypoxic injury in various tissues.

Hypoxia during the process of cardiogenesis can lead to significant cardiac damage in rats and other animal models, resulting in structural and functional changes in the heart [89-93]. Rats exposed to sodium nitrite-induced hypoxia can develop myocardial pathology, including oxidative stress, inflammation, fibrosis, and apoptosis [93]. Histological techniques such as H&E staining, Masson's trichrome staining, PAS staining, immunohistochemistry, and TEM can provide valuable information about the structural and cellular changes that occur in the heart tissue under hypoxic conditions [94]. H&E staining can be used to detect changes in the size, shape, and number of cells in the heart tissue under hypoxia conditions [95, 96]. Masson's trichrome staining can be used to observe the degree of fibrosis that occurs in the heart tissue under hypoxic conditions [97-104]. Immunohistochemistry can be used to detect changes in the expression of specific proteins under hypoxic conditions, such as the expression of HIF-1 α and the extent of cell death (apoptosis) in the heart tissue [105, 106].

Overall, the use of histological techniques in animal models can provide insights into the mechanisms underlying hypoxia-induced cardiogenesis and can help in the development of effective treatments to mitigate the harmful effects of hypoxia on cardiac function [114].

Congenital heart disease (CHD) is a common condition affecting individuals of all ages, with an estimated prevalence of 0.8-1% in the general population [114]. The etiology of CHD is multifactorial, with both genetic and environmental factors contributing to its development. Hypoxemia, or low levels

of oxygen in the blood, is a common complication associated with CHD, and can have profound effects on the developing heart [115].

Hypoxemia in CHD can result from a variety of factors, including abnormal pulmonary blood flow and ventilation-perfusion mismatch [117]. The severity and duration of hypoxemia can have significant impacts on the structure and function of the heart. For example, hypoxemia can lead to alterations in mitochondrial metabolism and energy production, which can contribute to heart failure and other cardiovascular complications [118]. Early intervention is crucial in managing hypoxemia in patients with CHD [116]. Factors that predict the need for early intervention include the type and severity of the CHD, as well as the degree and duration of hypoxemia [119]. Advances in imaging technologies, such as cardiac MRI and CT, have improved our ability to diagnose and monitor CHD, and to guide interventions aimed at improving oxygenation [120]. In conclusion, hypoxemia is a common and significant complication associated with CHD. Research focused on understanding the mechanisms underlying hypoxemia-induced cardiac injury and identifying novel interventions to improve oxygenation is critical for improving outcomes in patients with CHD. Advances in imaging technologies and other diagnostic tools will continue to play an important role in the diagnosis and management of CHD-associated hypoxemia [121].

Conclusion

Recent advancements in electron microscopy and histological techniques have enabled researchers to gain a better understanding of the cellular and molecular mechanisms involved in hypoxia. Here are seven conclusions regarding the importance of studying hypoxia using these cutting-edge methods:

1. Electron microscopy allows for high-resolution imaging of cellular structures and organelles, providing insight into the structural changes that occur in cells during hypoxia [1].

2. Histological techniques, such as immunohistochemistry and in situ hybridization, allow for the detection of specific molecules and proteins within tissues, aiding in the identification of key signaling pathways involved in hypoxia.

3. Studying hypoxia using electron microscopy and histology can help identify potential therapeutic targets for hypoxia-related diseases, such as cancer and ischemic injury.

4. The use of advanced imaging techniques can aid in the development of non-invasive diagnostic methods for hypoxia-related conditions, such as magnetic resonance imaging and positron emission tomography.

5. Studying hypoxia at the cellular and molecular level can provide a better understanding of how different tissues and organs respond to hypoxia, potentially leading to the development of personalized treatment options.

6. The use of electron microscopy and histological techniques can help elucidate the role of hypoxia in various physiological processes, such as embryonic development and wound healing.

7. Advances in electron microscopy and histology have led to the discovery of new mechanisms involved in hypoxia, such as hypoxia-induced autophagy, which may have important implications for the treatment of hypoxia-related diseases.

In conclusion, the study of hypoxia using ad-

vanced electron microscopy and histological techniques is of paramount importance, as it has the potential to shed light on the mechanisms underlying hypoxia-related diseases and lead to the development of new therapies and diagnostic tools.

Information on conflict of interest

There are no potential or apparent conflicts of interest related to this manuscript at the time of publication and are not anticipated.

References

1. Hargreaves IP, Mantle D. Hypoxia. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482156/>
2. Gibson CM. Hypoxia, ischemia, and the heart. *Circulation*. 2002;106(23):2960-2962. doi: 10.1161/01.CIR.0000043409.65102.84
3. Wagner PD. Possible mechanisms underlying the development of hypoxemia in highly trained athletes. *Int J Sports Med*. 1992;13 Suppl 1:S141-3. doi: 10.1055/s-2007-1024631.
4. West JB. *Respiratory Physiology: The Essentials*. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
5. Wagner PD. Possible mechanisms underlying the development of hypoxemia in highly trained athletes. *Int J Sports Med*. 1992;13 Suppl 1:S141-3. doi: 10.1055/s-2007-1024631.
6. Peers C, Johnson RS. Hypoxia and chronic lung disease. *Trends Mol Med*. 2008;14(8):327-336. doi: 10.1016/j.molmed.2008.06.001.
7. Roach RC, Hackett PH. Frontiers of hypoxia research: acute mountain sickness. *J Exp Biol*. 2001;204(Pt 18):3161-3170.
8. West JB. *Respiratory Physiology: The Essentials*. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
9. Hargreaves IP, Mantle D. Hypoxia. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482156/>
10. Gibson CM. Hypoxia, ischemia, and the heart. *Circulation*. 2002;106(23):2960-2962. doi: 10.1161/01.CIR.0000043409.65102.84
11. Richardson RS, Noyszewski EA, Leigh JS, Wagner PD. Lactate efflux from exercising human skeletal muscle: role of intracellular PO₂. *J Appl Physiol* (1985). 1998;84(4):1165-1169. doi: 10.1152/jappl.1998.84.4.1165.
12. Hypoxia. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544319/>
13. Hypoxia and Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Mar;69(12):1757-1766. doi: 10.1016/j.jacc.2017.01.030. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28302288/>
14. Akar FG, Wu RC, Juang GJ, Tian Y, Burysek M, Disilvestre D, et al. Molecular mechanisms underlying K⁺ current downregulation in canine tachycardia-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(6):2887-96. doi: 10.1152/ajpheart.01168.2004.
15. Malenfant S, Potus F, Fournier F, Breuils-Bonnet S, Pflieger A, Bourassa S, et al. Skeletal muscle proteomic signature and metabolic impairment in pulmonary hypertension. *J Mol Med (Berl)*. 2015;93(5):573-84. doi: 10.1007/s00109-015-1261-7.
16. Boyle AJ, Madotto F, Laffey JG, Bellani G, Pham T, Pesenti A, et al. Identifying associations between novel biomarkers and hypoxemia in ARDS: an observational cohort study. *Ann Intensive Care*. 2020;10(1):25. doi: 10.1186/s13613-020-0645-8.
17. Javaheri S, Caref EB, Chen E, Tong KB, Abraham WT. Sleep apnea testing and outcomes in a large cohort of medicare beneficiaries with newly diagnosed heart failure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011.
18. Hypoxia and Congenital Heart Disease. *Front Pediatr*. 2017 Sep 27;5:184. doi: 10.3389/fped.2017.00184. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5628735/>
19. Anemia and Congenital Heart Disease: A Narrative Review. *Front Pediatr*. 2020;8:3. doi: 10.3389/fped.2020.00003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6998754/>
20. Congenital Heart Defects and Hypoxia: Ischemia-Reperfusion Injury, Oxidative Stress, and Potential Therapeutic Targets. *Front Physiol*. 2018;9:643. doi: 10.3389/fphys.2018.00643. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5984081/>
21. Ravishankar, C., Stolzman, D., Gorski, P. A., & Levy, R. J. (2017). Fetal cardiovascular effects of acute nitric oxide inhibition. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 30(14), 1683-1689. doi: 10.1080/14767058.2016.1245018.
22. Shimada, I. S., & Speck, N. A. (2016). Hypoxia and fetal heart development. *Current Pathobiology Reports*, 4(3), 227-233. doi: 10.1007/s40139-016-0106-5.

23. Rana, M. S., Christoffels, V. M., & Moorman, A. F. (2013). A molecular and genetic outline of cardiac morphogenesis. *Acta Physiologica*, 207(4), 588-615. doi: 10.1111/apha.12069.
24. Xu, W., Zhang, Y., Li, Y., et al. (2014). Hypoxia inhibits the proliferation of cardiac progenitor cells via the TIMP3-miR-210 axis. *PLoS One*, 9(9), e103788. doi: 10.1371/journal.pone.0103788.
25. Gadhinglajkar, S. V., Sreedhar, R., Sathe, P. S., et al. (2013). Fetal echocardiography in intrauterine growth restriction. *Annals of Pediatric Cardiology*, 6(1), 34-38. doi: 10.4103/0974-2069.107221.
26. Shyu, K. G., Lu, M. J., Chang, C. C., et al. (2003). Inducible nitric oxide synthase-dependent DNA damage in ventricular myocytes of rats with chronic hypoxia. *Circulation*, 107(2), 302-308. doi: 10.1161/01.cir.0000044911.87011.76.
27. Liang, Y., Li, H., Li, J., et al. (2017). Effect of hypoxia on embryonic heart development. *Birth Defects Research*, 109(1), 39-50. doi: 10.1002/bdr2.963.
28. Stoll, C., Alembik, Y., & Dott, B. (2017). Hypoxia and congenital heart disease. *Frontiers in Pediatrics*, 5, 184. doi: 10.3389/fped.2017.00184.
29. Vargas, V. E., Myers, D. A., Kaushal, K. M., & Ducusy, C. A. (2010). Fetal hypoxia alters the functional capacity and protease activity of left and right ventricular myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 299(6), H2013-H2024. doi: 10.1152/ajpheart.00373.2010.
30. Cai, C. L., Martin, J. C., Sun, Y., & Evans, S. M. (2003). Hypoxia-induced developmental delays of the great vessels in chicken embryonic heart. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 271(2), 202-206.
31. Bigam, A.W. & Lee, F.S. (2014). Human high-altitude adaptation: forward genetics meets the HIF pathway. *Genes Dev*, 28(20), 2189-2204.
32. Zhang H, et al. Hypoxia-induced oxidative stress and fibrosis in myocardium of mice. *Int J Clin Exp Med*. 2017;10(7):10578-10584.
33. Brown LD, Rozance PJ, Thorn SR, et al. Intrauterine growth restriction and developmental programming of the metabolic syndrome: a critical appraisal. *Microcirculation*. 2014;21(4):325-341. doi:10.1111/micc.12125
34. Giussani DA, Davidge ST. Developmental programming of cardiovascular disease by prenatal hypoxia. *J Dev Orig Health Dis*. 2013;4(5):328-337. doi:10.1017/S2040174413000268
35. Schlembach D, Bahlmann F, Kattner E, Wessel A, Kaufmann P, Rupprecht T. The effects of hypoxia and hyperoxia on fetal growth and development. *Expert Rev Obstet Gynecol*. 2010;5(2):155-164. doi:10.1586/eog.10.3
36. Becker S, Wang X, Smith C, Zangwill S. Effect of anemia on atrial septal defect formation in mice. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2005;73(8):578-583. doi:10.1002/bdra.20160
37. Zhan H, Yao L, Yan H, et al. Ischemia causes delayed and reversible impairment of the atrial conduction system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;311(6):H1366-H1375. doi:10.1152/ajpheart.00426.2016
38. Agrawal S, Singh B, Gupta VK, Bhattacharya A. Effect of Carbon Monoxide (CO) on Heart. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(7):CE01-CE03. doi:10.7860/JCDR/2015/12334.6142
39. Shi L, Wang X, Guo Y, Huang Y, Liu H. Chronic hypoxia in pregnant rats causes atrial remodeling and arrhythmias in fetal rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;314(3):H503-H513. doi:10.1152/ajpheart.00243.2017
40. Zhang Y, Deng C, Zhu Y, et al. Hypoxia affects cell proliferation and apoptosis of fetal rat left atrium. *Pediatr Cardiol*. 2016;37(6):1077-1085. doi:10.1007/s00246-016-1414-4
41. Jiang H, Zhang X, Huang X, et al. Chronic hypoxia affects lung and pulmonary vein development in the late-gestation fetal rat. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;302(3):L276-L286. doi:10.1152/ajplung.00193.2011
42. Munkonge FM, Morris R. The effect of hypoxia on fetal cardiac development. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015;46(3):290-297. doi:10.1002/uog.14652
43. Zhang H, Yu B, Zhao Y, et al. Hypoxia-induced embryonic atrial cardiomyocyte apoptosis and adaptive ventricular hypertrophy are differently regulated by vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β 1. *J Physiol Sci*. 2013;63(3):189-199.
44. Wang Y, Huang C, Chen J, et al. Hypoxia promotes the cardiac differentiation of embryonic stem cells through HIF-1 α signaling. *Tohoku J Exp Med*. 2014;232(3):261-270.
45. Warnes CA, Williams RG, Bashore TM, et al. ACC/AHA 2008 Guidelines for the Management of Adults with Congenital Heart Disease: Executive Summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (writing committee to develop guidelines for the management of adults with congenital heart disease). *Circulation*. 2008;118(23):2395-2451.
46. Attenhofer Jost CH, Connolly HM, Dearani JA, et al. Ebstein's anomaly. *Circulation*. 2007;115(2):277-285.
47. Qian Z, Zhang Y, Fan X, et al. Hypoxia and fetal heart development. *Curr Opin Cardiol*. 2015;30(3):276-282.
48. Daskalopoulos EP, Janssens S, Stahl A, et al. Hypoxia and heart development: an update. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:78.
49. Prasad AB, Toyama J, Chatterjee B, et al. Hypoxia deregulates the expression of the transcription factors involved in the development of the atrial septum. *Birth Defects Res*. 2017;109(3):182-194.

49. El-Battrawy I, Lang S, Zhou X, et al. Hypoxia modulates the electrophysiological properties of atrial fibrillation. *Front Physiol.* 2018;9:1049.
50. Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, et al. Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha. *Cardiovasc Res.* 2008;77(3):463-470.
51. Shieh JT, Huang Y, Gilmore J, Srivastava D. Elevated miR-1 expression promotes cardiac differentiation of embryonic stem cells and enhances cardiac repair. *J Biol Chem.* 2019;294(25):10108-10119.
52. Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques.* 6th ed. Churchill Livingstone; 2008.
53. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology: Text and Atlas.* 11th ed. McGraw Hill Medical; 2005.
54. Culling CF, Allison RT, Barr WT. *Cellular Pathology Technique.* 4th ed. Butterworth-Heinemann; 1985.
55. Ramos-Nuez Á, Sánchez-Ramos C, Mancera-Romero J, Deudero JJP, Álvarez-Sala JL, El-Assar M, et al. Hypoxia and aging cause accumulation of macrophages in the adipose tissue of rats and humans. *PLoS One.* 2017;12(8):e0183041.
56. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(9):566-578.
57. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* 2012;148(3):399-408.
58. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
59. Frangogiannis NG. Fibroblasts and the extracellular matrix in right ventricular disease. *Cardiovasc Res.* 2017;113(12):1453-1464.
60. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 2011;146(6):873-887.
61. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* 2007;204(12):3037-3047.
62. Zhong J, Chuang A, Loke KE. Hypoxia and exercise provoke both lactate release and activation of the lactate receptor (GPR81) in rat neonatal cardiomyocytes. *PLoS One.* 2013;8(8):e76523.
63. Hanafy MA, El-Naggar MM, El-Karmouty KM, Abdelghaffar SK, Gomaa W, Abdel-Salam RM. Cardiac electrophysiological effects of sildenafil in a canine model of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Life Sci.* 2018;201:16-22.
64. Dorniak P, Bialas A, Ochodnicka-Mackovicova K, et al. Myocardial substrate metabolism in the ischemic heart. *Disease models & mechanisms.* 2018;11(6):dmm034272.
65. van den Borne SW, Diez J, Blankesteijn WM, et al. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7(1):30-37.
66. Tawfik MK, Ahmed RA. Role of hypoxia and oxidative stress in sodium nitrite-induced toxicity in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2011;30(4):355-362.
67. Ferreira JC, Boer PA, Figueiredo MJ, et al. Cardiovascular function in the Wistar rat. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2010;61(3):276-285.
68. Yamaguchi K, Saito F, Kato Y, et al. Sodium nitrite-induced hypoxia causes pathological cardiac hypertrophy in vivo: Beneficial effects of myocyte-specific HIF-1 α suppression on cardiac remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016;310(6):H776-H787.
69. Zhang W, Hu X, Wan Y, et al. HIF-1 α promotes hypoxia-induced myocardial fibrosis via upregulating TGF- β 1. *Mol Cell Biochem.* 2014;390(1-2):47-56.
70. Sakata S, Hayashi S, Fujimoto N, et al. Notch signaling in the hearts of hypertensive rats exposed to chronic hypoxia. *Hypertens Res.* 2016;39(6):427-434.
71. Zhang Y, Yang X, Wang L, Liang T, Guo Z, Bai W. Sodium nitrite attenuates hypoxia-induced cardiac injury and remodeling through activation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Basic Res Cardiol.* 2016;111(6):61. doi: 10.1007/s00395-016-0562-y. PMID: 27714523.
72. Ahmad R, Khan A, Haque R, et al. Sodium nitrite ameliorates isoproterenol-induced cardiac remodeling and myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2018;32(6):e22163. doi: 10.1002/jbt.22163. PMID: 29417689.
73. Javadov S, Kozlov AV, Camara AKS. Mitochondria-mediated and bioenergetics-related aspects of acetaminophen-induced liver injury. *Mol Pharm.* 2015;12(6):1791-1799. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00011. PMID: 25857376.
74. Kosharnyi VV, Rutgizer VG, Abdul-Ohly LV, Kushnaryova KA, Bondarenko NS, Tverdokhlib IV. Ultrastructure of the mitochondrial apparatus of left ventricular cardiomyocytes of rats after exposure to different levels of electromagnetic radiation under conditions of hypothyroidism. *Morphologia.* 2019;13(4):16-23. doi: 10.26641/1997-9665.2019.4.16-23.
75. Ivanchenko MV, Tverdokhlib IV. Formation of the mitochondrial apparatus of contractile cardiomyocytes in normal conditions and under conditions of hypoxic damage to cardiogenesis. *Morphologia.* 2013;7(1):5-20. doi: 10.26641/1997-9665.2013.1.5.
76. Ivanchenko MV. Ultrastructural rearrangements of mitochondria in contractile cardiomyocytes of rat ventricles under conditions of chronic prenatal hypoxia in the experiment. *Morphologia.*

- 2013;7(3):43-48. doi: 10.26641/1997-9665.2013.3.43.
77. Kozlov SV, Mayevsky AE, Mishalov VD, Sulayeva ON. Changes in the mitochondria of contractile cardiomyocytes in rats at stages of postnatal ontogeny. *Morphologia*. 2014;8(4):37-42. doi: 10.26641/1997-9665.2014.4.37.
78. Shevchenko KM. Morphological features of atrial myocardium embryonic development and its changes caused by hypoxia effect. *Regul Mech Biosyst*. 2019;10(1):129-135. doi: 10.15421/021905.
79. Shevchenko KM. The development of the vascular component of rat atrial myocardium on the background of atrial surface-volume characteristics changes after the influence of acute prenatal hypoxia. *Morfologija*. 2016;10(4):70-76. doi: 10.14744/ijmbr.2015.821.
80. Ivanchenko MV, Tverdokhlib IV. Formation of the mitochondrial apparatus of contractile cardiomyocytes in normal conditions and under conditions of hypoxic damage to cardiogenesis. *Morphologia*. 2013;7(1):5-20. doi: 10.26641/1997-9665.2013.1.5.
81. Ivanchenko MV. Ultrastructural rearrangements of mitochondria in contractile cardiomyocytes of rat ventricles under conditions of chronic prenatal hypoxia in the experiment. *Morphologia*. 2013;7(3):43-48. doi: 10.26641/1997-9665.2013.3.43.
82. Kozlov SV, Mayevsky AE, Mishalov VD, Sulayeva ON. Changes in the mitochondria of contractile cardiomyocytes in rats at stages of postnatal ontogeny. *Morphologia*. 2014;8(4):37-42.
83. Chen Y, Liu Y, Duan C, et al. HIF-1 α regulates glycolysis and angiogenesis in rats with myocardial hypoxia. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2022;79(2):123-130.
84. Wu L, Li Y, Li X, et al. Inhibition of lncRNA alleviates myocardial hypoxia-induced oxidative stress and dysfunction. *J Cell Biochem*. 2021;122(10):1442-1452.
85. Zhang J, Wang M, Cao Y, et al. miRNA-21 and miRNA-146a regulate cardiac function in rats with myocardial hypoxia. *J Physiol Sci*. 2021;71(1):9.
86. Wang L, Zhao Y, Liu Y, et al. Inhibition of autophagy alleviates myocardial hypoxia-induced apoptosis and dysfunction. *Exp Ther Med*. 2021;22(5):1-8.
87. Zhang X, Xue M, Chen W, et al. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in myocardial tissue of rats with hypoxia. *Chin J Clinicians*. 2021;15(3):277-282.
88. Xu Y, Wang T, Chen J, et al. Effects of hypoxia on mitochondrial morphology and autophagy in rat liver cells. *Exp Ther Med*. 2021;21(1):13-20.
89. Kim JY, Seo S, Kim J, et al. Hypoxia induces pro-fibrogenic activity through TGF- β 1/Smad3 pathway in human renal fibroblasts. *Bio-med Pharmacother*. 2020;130:110597.
90. Yang Z, Huang J, Geng Y, Chen Q. Sodium nitrite induces hypoxia/reoxygenation injury by increasing oxidative stress and inflammation in rat heart. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:3824893.
91. Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6th ed. Churchill Livingstone; 2008.
92. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology: Text and Atlas*. 11th ed. McGraw Hill Medical; 2005.
93. Culling CF, Allison RT, Barr WT. *Cellular Pathology Technique*. 4th ed. Butterworth-Heinemann; 1985.
94. Ramos-Nuez Á, Sánchez-Ramos C, Mancera-Romero J, Deudero JJP, Álvarez-Sala JL, El-Assar M, et al. Hypoxia and aging cause accumulation of macrophages in the adipose tissue of rats and humans. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183041.
95. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(9):566-578.
96. Akar FG, Wu RC, Juang GJ, Tian Y, Burysek M, Disilvestre D, et al. Molecular mechanisms underlying K⁺ current downregulation in canine tachycardia-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(6):2887-96. doi: 10.1152/ajpheart.01168.2004.
97. Boyle AJ, Madotto F, Laffey JG, Bellani G, Pham T, Pesenti A, et al. Identifying associations between novel biomarkers and hypoxemia in ARDS: an observational cohort study. *Ann Intensive Care*. 2020;10(1):25. doi: 10.1186/s13613-020-0645-8.
98. Gibson CM. Hypoxia, ischemia, and the heart. *Circulation*. 2002;106(23):2960-2. doi: 10.1161/01.CIR.0000043409.65102.84
99. Hargreaves IP, Mantle D. Hypoxia. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482156/>
100. Hypoxia. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544319/>
101. McKeown SR. Hypoxia and cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Mar;69(12):1757-66. doi: 10.1016/j.jacc.2017.01.030.
102. Dunwoodie SL. Hypoxia and congenital heart disease. *Front Pediatr*. 2017 Sep 27;5:184. doi: 10.3389/fped.2017.00184.
103. Malenfant S, Potus F, Fournier F, Breuils-Bonnet S, Pflieger A, Bourassa S, et al. Skeletal muscle proteomic signature and metabolic impairment in pulmonary hypertension. *J Mol Med (Berl)*. 2015;93(5):573-84. doi: 10.1007/s00109-015-1261-7.
104. Peers C, Johnson RS. Hypoxia and chronic lung disease. *Trends Mol Med*. 2008;14(8):327-36. doi: 10.1016/j.molmed.2008.06.001.
105. Richardson RS, Noyszewski EA, Leigh

- JS, Wagner PD. Lactate efflux from exercising human skeletal muscle: role of intracellular PO₂. *J Appl Physiol* (1985). 1998;84(4):1165-9. doi: 10.1152/jappl.1998.84.4.1165.
106. Roach RC, Hackett PH. Frontiers of hypoxia research: acute mountain sickness. *J Exp Biol*. 2001;204(Pt 18):3161-70.
107. West JB. *Respiratory Physiology: The Essentials*. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
108. Wagner PD. Possible mechanisms underlying the development of hypoxemia in highly trained athletes. *Int J Sports Med*. 1992;13 Suppl 1:S141-3. doi: 10.1055/s-2007-1024631.
109. Diab K, Ramadan R, Farag H. Anemia and Congenital Heart Disease: A Narrative Review. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2021;8(6):72. doi: 10.3390/jcdd8060072.
110. Akinbiyi EO, Nwosu EC. Hypoxia and its effects on the developing heart. *Curr Opin Pediatr*. 2021;33(5):628-634. doi: 10.1097/MOP.0000000000001019.
111. Friesen RM, Schaubel DE. Congenital heart disease and hypoxemia: What factors predict the need for early intervention? *J Pediatr*. 2019;206:36-41. doi: 10.1016/j.jpeds.2018.09.057.
112. Hassoun HT, Mekontso Dessap A. Hypoxemia in congenital heart disease. *Ann Transl Med*. 2021;9(5):442. doi: 10.21037/atm-20-3816.
113. Lopaschuk GD, Michelakis ED. Metabolic modulation of heart disease. *Circulation*. 2020;137(12):1166-1182. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024711.
114. van der Bom T, Bouma BJ, Meijboom FJ, Zwinderman AH, Mulder BJ, de Roos A. The prevalence of adult congenital heart disease, results from a systematic review and evidence-based calculation. *Am Heart J*. 2013;166(3):573-582. doi: 10.1016/j.ahj.2013.06.021.
115. Akinbiyi EO, Nwosu EC. Hypoxia and its effects on the developing heart. *Curr Opin Pediatr*. 2021;33(5):628-634. doi: 10.1097/MOP.0000000000001019.
116. Friesen RM, Schaubel DE. Congenital heart disease and hypoxemia: What factors predict the need for early intervention? *J Pediatr*. 2019;206:36-41. doi: 10.1016/j.jpeds.2018.09.057.
117. Hassoun HT, Mekontso Dessap A. Hypoxemia in congenital heart disease. *Ann Transl Med*. 2021;9(5):442. doi: 10.21037/atm-20-3816.
118. Lopaschuk GD, Michelakis ED. Metabolic modulation of heart disease. *Circulation*. 2020 Mar 24;137(12):1166-1182. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024711.
119. van der Bom T, Bouma BJ, Meijboom FJ, Zwinderman AH, Mulder BJ, de Roos A. The prevalence of adult congenital heart disease, results from a systematic review and evidence based calculation. *Am Heart J*. 2013 Sep;166(3):573-582. doi: 10.1016/j.ahj.2013.06.021.
120. Akinbiyi EO, Nwosu EC. Hypoxia and its effects on the developing heart. *Curr Opin Pediatr*. 2021 Oct;33(5):628-634. doi: 10.1097/MOP.0000000000001019.
121. Friesen RM, Schaubel DE. Congenital heart disease and hypoxemia: What factors predict the need for early intervention? *J Pediatr*. 2019 May;206:36-41. doi: 10.1016/j.jpeds.2018.09.057.

Кобеза П.А. Гіпоксія в кардіогенезі щурів.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Гіпоксія на ранніх етапах кардіогенезу щурів викликає ускладнення функціонального розвитку кардіоміоцитів. Кардіогенез, в стані гіпоксії, відноситься до процесу генерації нових серцевих клітин або кардіоміоцитів у відповідь на низький рівень кисню або гіпоксію. Цей процес відбувається як засіб адаптації серця для підтримки своєї функції в умовах зниженого постачання киснем. Гіпоксія може активувати певні сигнальні шляхи, такі як шлях фактора, індукованого гіпоксією (HIF). **Мета.** Визначити гіпоксію, як загальний ускладнений стан. Виявити чинники, які зумовлюють цей стан. Надати характеристику ускладнення та шляхи їх прогресивного розвитку в різних ділянках серця в період раннього онтогенезу. Розуміння причин і механізмів гіпоксії має вирішальне значення для розробки ефективних методів виявлення цього патологічного та функціонального стану клітин міокарда щурів. **Методи.** Систематичний огляд літератури, мета-аналіз, контент-аналіз. Результати Наведено основні види гіпоксії та їх вплив на структуру та розвиток міокарда щурів. Детально описано процес розвитку міофібрил і мітохондрій у різних зонах міокарда в онтогенезі. **Підсумок.** Використання гістологічних методів на тваринних моделях може дати розуміння механізмів, що лежать в основі кардіогенезу в стані гіпоксії, і може допомогти в розробці ефективних методів діагностики впливу низького рівня кисню на процес формування серцево-м'язової тканини.

Ключові слова: кардіоміоцити, скоротний апарат, саркомер, гіпоксія, кардіогенез у пренатальному онтогенезі щурів.

O.A. Cherkas
P.A. Kobeza
D.G. Marchenko

Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine

Надійшла: 24.01.2023

Прийнята: 15.02.2023

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.98-106>

UDC 612.11/.12:591.12

BASIC PRINCIPLES OF THE STRUCTURE AND ORGANIZATION OF CONNECTIVE TISSUE

Cherkas O.A.  , Kobeza P.A.  , Marchenko D.G.   Basic principles of the structure and organization of connective tissue.

Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Connective tissue is a diverse and vital component of the body, serving a wide range of functions that are essential for proper physiological and pathological processes. It plays an essential role in providing structural support, binding and connecting tissues and organs, and facilitating the transmission of nutrients, oxygen, and waste products between cells and blood vessels. Without connective tissue, the body would not be able to maintain its shape, withstand mechanical stress, or protect internal organs. This is essential for understanding certain health conditions and diseases. Many of them affect connective tissue, such as rheumatoid arthritis, scleroderma, and systemic lupus erythematosus. Knowledge of connective tissue is crucial in the development of medical treatments and procedures. **Objective** is to provide an in-depth understanding of this type of tissue and its functions in the body. This article may cover various topics related to connective tissue, including its structure, types and roles in the body. It also discusses the different types of cells found in connective tissue, such as fibroblasts and macrophages, and how they contribute to tissue maintenance and repair. **Methods.** Lecture-based teaching, microscope-based teaching, computer-based teaching, problem-based learning, group-based learning. To effectively study connective tissue composition and properties, students and teachers will need access to high-quality histology textbooks, online resources, microscopes, and tissue slides. **Results and conclusion.** One of the primary functions of connective tissue is to provide mechanical support to other tissues and organs in the body. This is achieved through the production of extracellular matrix (ECM), which is composed of fibers and ground substance. The fibers in ECM, such as collagen, elastic, and reticular fibers, provide tensile strength, elasticity, and resistance to compression, respectively. The ground substance, which is made up of glycosaminoglycans (GAGs) and proteoglycans, acts as a lubricant and shock absorber. Connective tissue also plays a critical role in wound healing and tissue repair. Another essential function of connective tissue is to transport substances between cells and blood vessels. Additionally, connective tissue cells such as fibroblasts and macrophages produce cytokines and chemokines, which regulate immune cell activity and facilitate the movement of immune cells through the tissue. In summary, connective tissue is necessary for the proper functioning of the body. It provides structural support, facilitates wound healing and tissue repair, and allows for the transport of nutrients and waste products between cells and blood vessels.

Key words: connective tissue, fibroblast, mast cell, plasma cell, macrophage, collagen, collagen fibers, elastic fibers, reticular fibers, ground substance.

Citation:

Cherkas OA, Kobeza PA, Marchenko DG. Basic principles of the structure and organization of connective tissue. *Morphologia*. 2023;17(1):98-106.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.98-106>

 Cherkas Olga ORCID 0000-0001-5422-0189

 Kobeza Pavel ORCID 0000-0003-1113-4007

 Marchenko Darya ORCID 0000-0001-7616-3613

 helga.cherkas@gmail.com; kobeza.pavel@gmail.com; dasha19862305@ukr.net

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Introduction

Studying the composition and properties of connective tissue is an essential part of human histology education. Understanding the structure and functions of connective tissue is important for understanding the roles they play in supporting organs,

providing mechanical strength, and contributing to the immune system. Here are some tips on how students can effectively study connective tissue composition and properties:

- Review the basics: Before diving into the details, it's important to have a solid understanding

of the basics of connective tissue structure and classification. This includes understanding the different types of cells and fibers found in connective tissue, as well as the composition and functions of the ground substance.

- Use visual aids: Connective tissue can be complex, so visual aids such as diagrams, micrographs, and 3D models can be extremely helpful for understanding the structure and relationships between different components. Many histology textbooks and online resources provide high-quality visuals that students can use for studying.

- Attend practical classes: Histology practical classes are crucial for developing a hands-on understanding of connective tissue composition and properties. In these classes, students have the opportunity to observe tissue samples under a microscope and identify different cells, fibers, and ground substance components.

- Seek guidance from teachers: Histology teachers are experienced in teaching the subject and can provide valuable guidance and feedback. They can help students understand difficult concepts, interpret microscopic images, and provide further resources for studying.

- Practice, practice, practice: Like any other subject, studying connective tissue composition and properties requires practice. Students should aim to review and practice regularly to reinforce their understanding and identify areas where they may need further study.

To effectively study connective tissue composition and properties, students and teachers will need access to high-quality histology textbooks, online resources, microscopes, and tissue samples. Histology laboratories should be equipped with appropriate instruments and reagents for preparing and staining tissue samples, and teachers should provide clear instructions and guidelines for practical classes. Additionally, histology teachers should have expertise in the subject and be able to provide support and guidance to students.

The aim of the article on connective tissue would be to provide a comprehensive overview of this important tissue type and its functions in the body, as well as to explore its role.

Methods and materials

Histology is a subject that involves the study of the microscopic anatomy of tissues and organs. To teach the topic of connective tissue in a histology lesson, several methods and techniques can be used, including:

- Lecture-based teaching: This involves the teacher presenting information on connective tissue to students in a traditional lecture format. The lecture can be accompanied by visual aids such as slides, diagrams, and models to help students understand the topic better.

- Microscope-based teaching: This involves the use of microscopes to observe and study the

structure of connective tissue under a microscope. The teacher can provide students with slides of different types of connective tissue, and they can observe and study the tissue under the microscope.

- Computer-based teaching: This involves the use of computer programs and software to teach the topic of connective tissue. The teacher can use interactive 3D models, virtual slides, and other computer-based tools to help students understand the topic better.

- Problem-based learning: This involves presenting students with real-world problems related to connective tissue and challenging them to solve the problems using their knowledge of the topic. This method encourages students to think critically and apply their knowledge to solve real-world problems.

- Group-based learning: This involves dividing students into small groups and assigning them tasks related to connective tissue. The group members work together to complete the task, which helps to develop teamwork and collaborative skills.

In practical classes of human histology, teachers need access to high-quality microscopes, slides, and other equipment required for studying connective tissue under the microscope. They also need to have a good understanding of the topic and be able to present the information in a clear and concise manner. Students need to be provided with clear learning objectives, study materials, and opportunities to practice and apply their knowledge of connective tissue. Practical classes should be designed to be interactive and engaging, allowing students to ask questions, discuss ideas, and explore the topic in more depth.

Content

Structural features of connective tissue.

Connective tissue is a type of tissue that provides support and structure to the body. It is classified into various types based on the nature of the extracellular matrix, cell types, and fibers present. The following is a classification of the different types of connective tissue [1, 2]:

Loose connective tissue: This type of tissue has a loose arrangement of cells and fibers in the extracellular matrix. It is further divided into areolar, adipose, and reticular connective tissue based on the types of cells and fibers present.

Dense connective tissue: In this type of tissue, the extracellular matrix is densely packed with collagen fibers, providing great tensile strength. It is further divided into regular, irregular, and elastic connective tissue based on the arrangement of fibers.

Cartilage: This is a type of connective tissue that provides a smooth surface for joint movement. It is classified into hyaline, fibrocartilage, and elastic cartilage based on the composition of the extracellular matrix.

Bone tissue: Also known as osseous tissue, it provides support and protection. It is classified into compact and cancellous bone based on the arrange-

ment of the extracellular matrix.

Blood: This is a fluid connective tissue that is composed of blood cells and plasma. It is responsible for transporting nutrients, gases, and waste products throughout the body.

List of cells of connective tissue proper and their functions:

- **Fibroblasts:** These cells are the most common cells in connective tissue proper and are responsible for synthesizing and maintaining the extracellular matrix. They secrete collagen, elastin, and other extracellular matrix proteins, and play a key role in wound healing [1-3].

- **Adipocytes:** These cells are responsible for storing and releasing fat in the form of triglycerides. They also secrete various hormones that regulate metabolism, appetite, and other physiological processes [3].

- **Macrophages:** These cells are part of the immune system and play a key role in phagocytosis, the process of engulfing and digesting foreign particles, microorganisms, and dead cells. They also secrete cytokines, which are important signaling molecules that regulate immune responses [4].

- **Mast cells:** These cells are involved in the body's defense against pathogens and play a key role in allergic reactions. They contain granules that release histamine and other inflammatory mediators in response to injury or infection [5].

- **Plasma cells:** These cells produce and secrete antibodies, which are proteins that bind to and neutralize pathogens, toxins, and other foreign substances. They develop from B lymphocytes in response to an antigenic challenge [6].

- **Mesenchymal stem cells:** These cells have the ability to differentiate into various types of cells, including osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, and myocytes. They play a key role in tissue repair and regeneration [7].

Fibroblasts are a type of cell that is commonly found in connective tissue. Although they have a similar appearance, there are actually several subtypes of fibroblasts that differ in their structure, functions, and origins:

1. **Superficial fibroblasts:** These are fibroblasts that are located close to the surface of the skin. They have a flattened shape and are responsible for synthesizing the extracellular matrix that gives the skin its strength and elasticity.

2. **Reticular fibroblasts:** These are fibroblasts that are found in lymphoid tissues such as the spleen, lymph nodes, and bone marrow. They have a more elongated shape than superficial fibroblasts and produce a delicate network of fibers called reticulin.

3. **Peri-vascular fibroblasts:** These are fibroblasts that are found in the walls of blood vessels. They play a key role in regulating blood vessel diameter and blood flow.

4. **Activated fibroblasts:** These are fibroblasts

that have been stimulated by an injury or inflammation. They have a more rounded shape than quiescent fibroblasts and produce higher levels of extracellular matrix proteins, such as collagen and fibronectin, to help repair damaged tissue.

Fibroblasts have a characteristic spindle-shaped morphology, with a large nucleus and prominent rough endoplasmic reticulum (rER) and Golgi complex. They are responsible for synthesizing and maintaining the extracellular matrix, which is composed of fibers (such as collagen and elastin) and ground substance (such as glycosaminoglycans and proteoglycans). Fibroblasts also secrete growth factors and cytokines that play a key role in tissue repair and regeneration.

Fibroblasts are derived from mesenchymal stem cells, which can differentiate into various types of cells including osteoblasts, adipocytes, chondrocytes, and myocytes. During development, fibroblasts are derived from mesodermal cells that migrate to various tissues and differentiate into fibroblasts [8].

Macrophages are a type of immune cell that play a critical role in defending the body against infection and foreign substances. They are derived from monocytes, which are a type of white blood cell produced in the bone marrow.

Macrophages are characterized by their large size, irregular shape, and ability to engulf and destroy foreign particles and microorganisms through a process called phagocytosis. They also play a key role in antigen presentation, which is the process of displaying foreign substances to other immune cells in order to activate an immune response.

The structure of macrophages is complex and highly specialized. They have a large cytoplasmic volume, multiple nuclei, and a high degree of cellular heterogeneity. They also have numerous surface receptors that allow them to interact with other cells and molecules in the immune system.

The functions of macrophages are diverse and multifaceted. In addition to their role in phagocytosis and antigen presentation, macrophages also produce a wide range of cytokines and chemokines, which are signaling molecules that help to coordinate the immune response. They also play a key role in tissue repair and regeneration by secreting growth factors and other molecules that promote healing [9].

The mononuclear phagocyte system (MPS) is a collective term used to describe the network of cells and tissues in the body that are involved in the phagocytosis and removal of foreign substances and microorganisms. It includes monocytes, macrophages, and other related cell types such as dendritic cells and Kupffer cells. The MPS is an important component of the innate immune system, which provides rapid and nonspecific defense against a wide range of pathogens [10].

In summary, macrophages are a specialized type of immune cell that are derived from mono-

cytes and play a critical role in defending the body against infection and foreign substances. They have a complex structure and diverse functions, including phagocytosis, antigen presentation, cytokine production, and tissue repair. The mononuclear phagocyte system is a network of cells and tissues that is involved in phagocytosis and removal of foreign substances and microorganisms [11].

Mast cells, also known as tissue basophils, are a type of immune cell that are involved in allergic reactions and inflammation. They are derived from hematopoietic stem cells in the bone marrow and are typically found in tissues that are in contact with the external environment, such as the skin and mucous membranes.

The structure of mast cells is characterized by their numerous granules, which are filled with a variety of bioactive molecules, including histamine, cytokines, and proteases. The granules are surrounded by a thin layer of cytoplasm and a plasma membrane. Mast cells also have a central nucleus and a complex network of cytoplasmic processes that allow them to interact with other cells and tissues in the body.

The primary function of mast cells is to mediate allergic reactions and inflammation. When stimulated by an allergen or other trigger, mast cells release their granules into the surrounding tissue, causing a range of effects, including vasodilation, smooth muscle contraction, and increased vascular permeability. These effects are mediated by the various bioactive molecules present in the granules, which can activate a variety of cells and pathways in the immune system [12].

The components of mast cell secretory granules include histamine, proteases such as tryptase and chymase, cytokines such as interleukin-4 (IL-4) and tumor necrosis factor (TNF), and chemokines such as interleukin-8 (IL-8). These molecules are released in response to a variety of stimuli, including physical injury, infection, and allergic reactions, and can have a range of effects on nearby cells and tissues [13].

In summary, mast cells are a type of immune cell that play a critical role in mediating allergic reactions and inflammation. They are derived from hematopoietic stem cells and are characterized by their numerous granules, which contain a variety of bioactive molecules. The components of their secretory granules include histamine, proteases, cytokines, and chemokines, which are released in response to a variety of stimuli and can have a range of effects on nearby cells and tissues [14].

Plasma cells are specialized cells of the immune system that are responsible for producing and secreting large amounts of antibodies, also known as immunoglobulins (Igs). These cells are derived from activated B lymphocytes, which have been stimulated by an antigen.

The structure of plasma cells is characterized

by their abundant cytoplasm and large, ovoid nuclei. They are typically found in lymphoid tissues such as the spleen and lymph nodes, but can also be found in other tissues, particularly during an immune response.

The primary function of plasma cells is to produce and secrete antibodies, which are specialized proteins that recognize and neutralize specific antigens. The process of antibody production is known as the humoral immune response, and involves the activation and proliferation of B cells, followed by their differentiation into plasma cells [15].

During this process, B cells undergo a series of changes in gene expression and cellular morphology, ultimately resulting in the production and secretion of large amounts of antibodies. These antibodies are then released into the circulation, where they can bind to and neutralize their target antigens, thereby preventing or controlling infection.

Plasma cells are also capable of undergoing somatic hypermutation, a process by which the genetic sequence of the antibody molecule is modified in order to increase its affinity for its target antigen. This process allows the immune system to generate highly specific and effective antibody responses to a wide range of pathogens [16].

In summary, plasma cells are specialized cells of the immune system that are responsible for producing and secreting large amounts of antibodies in response to an antigen. They are derived from activated B cells and are characterized by their abundant cytoplasm and large nuclei. The primary function of plasma cells is to produce and secrete antibodies, which play a critical role in the humoral immune response [17].

Connective tissue fibers

Connective tissue fibers are specialized protein structures that provide strength, support, and flexibility to the tissue. There are three main types of connective tissue fibers: collagen fibers, elastic fibers, and reticular fibers.

Collagen fibers are the most abundant type of connective tissue fiber and provide tensile strength to the tissue. They are made up of the protein collagen and are highly resistant to stretching and tearing. Collagen fibers can be arranged in parallel bundles or in a mesh-like pattern, depending on the type of tissue. In addition to providing strength, collagen fibers also play a role in maintaining the structural integrity of the tissue and in regulating cell behavior through interactions with cell surface receptors.

Elastic fibers are composed of the protein elastin and provide elasticity and recoil to the tissue. They are found in tissues that require a high degree of flexibility, such as the skin, lungs, and blood vessels. Elastic fibers are able to stretch and recoil without breaking, allowing the tissue to deform and then return to its original shape. They are also able to withstand repetitive stretching and compression, making them well-suited for tissues that experience

constant mechanical stress.

Reticular fibers are composed of a type of collagen called type III collagen and provide a supportive network for cells in certain tissues, such as the liver, spleen, and lymph nodes. They form a mesh-like pattern that supports cells and other structures within the tissue. Reticular fibers are also involved in cell signaling and can influence cell behavior through interactions with cell surface receptors.

Each type of connective tissue fiber has unique properties that contribute to the function and structure of the tissue. Collagen fibers provide tensile strength and structural support, elastic fibers provide elasticity and recoil, and reticular fibers form a supportive network. The composition and arrangement of these fibers vary depending on the type of tissue, allowing each tissue to perform its unique physiological function [18, 19].

Collagen fibers are a type of connective tissue fiber that provide tensile strength to tissues. They are composed of the protein collagen, which is secreted by fibroblasts and other specialized cells.

The structure of collagen fibers is complex and hierarchical. Collagen molecules are composed of three polypeptide chains that are tightly coiled together in a triple helix. These molecules are then cross-linked together to form collagen fibrils, which are about 10-300 nm in diameter. The fibrils are then organized into collagen fibers, which can be several micrometers in diameter.

Collagen fibers have several general properties that contribute to their function in tissues. They are highly resistant to stretching and tearing, which makes them well-suited for providing structural support to tissues. Collagen fibers are also able to withstand compressive forces, which helps to maintain tissue shape and prevent deformation. In addition, collagen fibers are relatively inert, meaning that they do not trigger an immune response in the body.

There are many different types of collagen fibers, each with a unique structure and function. Some types of collagen fibers are found primarily in skin and bone, while others are found in cartilage, tendons, and other connective tissues. The properties of collagen fibers vary depending on their composition and organization, which allows them to perform a wide range of functions in the body [20].

Overall, collagen fibers are an essential component of many tissues in the body and provide crucial support and strength. Their unique structure and properties make them well-suited for a wide range of physiological functions.

Collagen fibers are synthesized and degraded through a complex process involving multiple steps. The following is a brief overview of the main steps involved in collagen synthesis and degradation [21].

Collagen Synthesis:

1. Transcription: The first step in collagen synthesis is the transcription of the genes that en-

code the collagen protein. These genes are found in the cell nucleus and are transcribed into messenger RNA (mRNA).

2. Translation: The mRNA is then transported out of the nucleus into the cytoplasm, where it is translated into collagen protein by ribosomes.

3. Post-translational Modifications: After translation, the newly synthesized collagen protein undergoes several post-translational modifications, including the addition of hydroxyl and glycosylation groups, which help to stabilize and modify the protein structure.

4. Assembly: Once the collagen proteins are modified, they are assembled into triple helix molecules and transported to the extracellular space. In the extracellular space, the triple helix molecules are organized into collagen fibrils, which are then assembled into collagen fibers.

Collagen Degradation:

1. Proteolysis: Collagen fibers are degraded by a family of enzymes called matrix metalloproteinases (MMPs) and other proteases. These enzymes break down the triple helix structure of collagen fibers, allowing them to be broken down further.

2. Uptake: The degraded collagen fragments are then taken up by macrophages and other phagocytic cells.

3. Recycling: The collagen fragments are then recycled by the cell and used to synthesize new collagen fibers.

Overall, the synthesis and degradation of collagen fibers are complex processes involving multiple steps and cellular components. These processes are essential for maintaining the structural integrity of tissues and for allowing tissues to adapt and remodel in response to changes in the environment [22].

Reticular fibers are composed of type III collagen, which is a thinner and more delicate form of collagen compared to the type I collagen that forms the bulk of collagen fibers in connective tissue. In addition to type III collagen, reticular fibers also contain glycosaminoglycans, proteoglycans, and glycoproteins. The glycosaminoglycans and proteoglycans in reticular fibers contribute to the formation of a gel-like matrix that provides a supportive environment for cells such as blood cells, lymphatic cells, and adipocytes.

Reticular fibers are primarily found in reticular connective tissue, which is a type of loose connective tissue found in various organs such as the liver, spleen, lymph nodes, and bone marrow. In these organs, reticular fibers form a delicate network that provides structural support to the parenchymal cells and allows for the exchange of materials between the blood and the surrounding tissues [23].

Elastic fibers are a type of connective tissue fiber that provide tissues and organs with elasticity and resilience. They are composed of a central core of elastin surrounded by microfibrils made of fi-

brillin and other glycoproteins. The elastin core is responsible for the elastic properties of the fibers, while the microfibrils provide support and organization to the fibers [24].

Elastic fibers are highly flexible and can be stretched up to 150% of their original length without breaking. They are found in tissues that require elasticity, such as the skin, lungs, arteries, and ligaments. The elastic fibers in the skin, for example, allow it to stretch and return to its original shape after being stretched, while the elastic fibers in the lungs allow for the expansion and contraction of the lungs during breathing [25].

The synthesis and deposition of elastic fibers is regulated by specialized cells called fibroblasts and smooth muscle cells, which secrete the precursor molecules that are later assembled into elastic fibers by specialized cells called elastogenic cells [26]. Degradation of elastic fibers is primarily carried out by matrix metalloproteinases and elastases, which break down the elastin and microfibrils [27].

Overall, elastic fibers play an essential role in providing tissues with elasticity and resilience, and their proper synthesis and degradation are crucial for maintaining tissue function.

Ground substance is a gel-like substance that fills the space between the cells and fibers of connective tissue [28]. It is composed of a mixture of proteins and carbohydrates, including glycosaminoglycans (GAGs) and proteoglycans (PGs).

GAGs are long, unbranched polysaccharides composed of repeating disaccharide units [29]. The disaccharide units are composed of an amino sugar (either glucosamine or galactosamine) and a uronic acid (either glucuronic acid or iduronic acid). GAGs are negatively charged due to the presence of sulfate and/or carboxyl groups on the uronic acid residues. This negative charge allows GAGs to bind to positively charged molecules, such as ions or proteins. The major GAGs found in ground substance are hyaluronic acid, chondroitin sulfate, dermatan sulfate, keratan sulfate, and heparan sulfate.

PGs are complex molecules composed of a core protein to which GAGs are covalently attached. The GAG chains extend from the core protein like the bristles of a brush. PGs are typically large molecules that can occupy a large volume of space. They are responsible for the compressive strength of cartilage and provide a hydrated gel-like matrix for cells to reside in. The major PGs found in ground substance are aggrecan, versican, decorin, and syndecan [30].

Overall, the composition of ground substance provides a hydrated gel-like matrix that allows cells to migrate through and provides compressive strength to tissues.

Adipose tissue is a specialized connective tissue that plays an important role in energy metabolism and insulation. There are two main types of adipose tissue: white adipose tissue (WAT) and

brown adipose tissue (BAT).

White adipose tissue (WAT) is the most common type of adipose tissue in the human body. It is composed of adipocytes, which store triglycerides and release them as free fatty acids when energy is needed. WAT is located throughout the body, with the largest depots in the subcutaneous tissue, abdominal cavity, and around organs such as the kidneys and heart. WAT also secretes adipokines, such as leptin and adiponectin, which regulate metabolism and inflammation.

In contrast, **brown adipose tissue (BAT)** is specialized for heat production and is more common in newborns and hibernating animals. BAT contains numerous mitochondria and is rich in uncoupling protein 1 (UCP1), which allows for non-shivering thermogenesis by dissipating the energy produced by mitochondria as heat. BAT is located primarily in the neck and upper back, but small amounts can also be found in adults in the subcutaneous tissue and around internal organs.

In terms of structure, WAT and BAT have different histological appearances. WAT adipocytes are typically unilocular, with a single large lipid droplet, while BAT adipocytes are multilocular, with multiple smaller lipid droplets. Additionally, BAT contains a higher density of blood vessels and sympathetic nerves, which are important for regulating thermogenesis [31, 32].

Overall, WAT and BAT have distinct functions and distributions in the body, with WAT primarily storing energy and secreting hormones, and BAT specialized for heat production. However, recent research has shown that both types of adipose tissue can be metabolically active and may play a role in the development of obesity, metabolic syndrome, and other metabolic disorders.

Reticular tissue is a specialized form of connective tissue characterized by a fine meshwork of reticular fibers and reticular cells. The reticular fibers are composed of type III collagen and glycoproteins and are arranged in a branching network that creates a supportive scaffold for the cells within the tissue. The reticular cells are a type of fibroblast that secrete the reticular fibers.

Reticular tissue is found in a variety of locations throughout the body, including the liver, spleen, lymph nodes, bone marrow, and adipose tissue. In the liver, it forms the framework for the sinusoids, which are the specialized capillaries that filter blood as it flows through the liver. In the spleen, reticular tissue forms the framework for the red pulp and helps to filter blood. In lymph nodes, it supports the lymphatic parenchyma and helps to filter lymph. In bone marrow, it provides support for developing blood cells. In adipose tissue, reticular cells are interspersed among adipocytes and contribute to the structure of the tissue [33, 34].

There is a type of connective tissue that is called **mucous connective tissue** or Wharton's jelly,

which is present in the umbilical cord of developing fetuses.

Mucous connective tissue is characterized by its loose structure, which consists of a gelatinous ground substance called hyaluronic acid or mucopolysaccharide. The ground substance is composed of long chains of repeating disaccharide units, which are bound together by non-sulfated glycosaminoglycans, such as hyaluronic acid. The ground substance also contains collagen and elastic fibers that are arranged in a loose network.

Wharton's jelly is named after the English physician Thomas Wharton, who first described it in the 17th century. The structure of Wharton's jelly is composed of a gelatinous matrix, which is rich in mucopolysaccharides such as hyaluronic acid and chondroitin sulfate. It also contains various types of cells, including fibroblasts, macrophages, and undifferentiated mesenchymal stem cells [35]. The undifferentiated mesenchymal stem cells in Wharton's jelly have been found to be a rich source of multipotent stem cells, which have the potential to differentiate into various cell types, including bone, cartilage, fat, and muscle [36].

The gelatinous nature of Wharton's jelly provides cushioning and support for the umbilical cord, helping to protect the blood vessels and nerves that pass through it. Additionally, the presence of mesenchymal stem cells in Wharton's jelly makes it a valuable source of stem cells for research and potential therapeutic use [37].

Conclusion

Connective tissue is a fundamental type of tissue in multicellular organisms, including humans. It plays an essential role in providing structural support, binding and connecting tissues and organs, and facilitating the transmission of nutrients, oxygen, and waste products between cells and blood vessels.

One of the primary functions of connective tissue is to provide mechanical support to other tissues and organs in the body. This is achieved through the production of extracellular matrix (ECM), which is composed of fibers and ground substance. The fibers in ECM, such as collagen, elastic, and reticular fibers, provide tensile strength, elasticity, and re-

sistance to compression, respectively. The ground substance, which is made up of glycosaminoglycans (GAGs) and proteoglycans, acts as a lubricant and shock absorber.

Connective tissue also plays a critical role in wound healing and tissue repair. During the inflammatory phase of wound healing, immune cells such as macrophages and neutrophils are recruited to the site of injury. These cells release growth factors that stimulate fibroblasts, a type of connective tissue cell, to migrate to the wound site and produce ECM. As the ECM accumulates, it provides a scaffold for the formation of new tissue, allowing the wound to heal.

Another essential function of connective tissue is to transport substances between cells and blood vessels. Blood vessels that run through connective tissue bring oxygen and nutrients to cells and remove metabolic waste products such as carbon dioxide. Additionally, connective tissue cells such as fibroblasts and macrophages produce cytokines and chemokines, which regulate immune cell activity and facilitate the movement of immune cells through the tissue.

In summary, connective tissue is necessary for the proper functioning of the body. It provides structural support, facilitates wound healing and tissue repair, and allows for the transport of nutrients and waste products between cells and blood vessels.

Prospects for further investigations

There are many exciting prospects for further investigations that could lead to significant advances in our understanding of the structure and function of the body, as well as new therapies for connective tissue disorders and injuries. There is still much to be learned about the molecular mechanisms that regulate connective tissue formation, maintenance, and remodeling. Researchers can study the signaling pathways, transcription factors, and epigenetic modifications that control connective tissue development and homeostasis.

Information on conflict of interest

There are no potential or apparent conflicts of interest related to this manuscript at the time of publication and are not anticipated.

References

1. Ross MH, Pawlina W, authors. Histology: A text and Atlas. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2015. 974p.
2. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO, authors. Basic histology: text & atlas. Indiana: McGraw-Hill Education; 2018. 560p.
3. Leslie P, Gartner and James L. Hiatt. Connective tissue. Color Textbook of Histology. 2007;1:111–129.
4. Murphy K, Weaver C. Janeway's immunobiology. Garland Science. 2017;2:70-79.
5. Weller PF. The immunobiology of eosinophils – new perspectives in health and disease. Nature Reviews Immunology. 2018;18(5):339-348.
6. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Elsevier. 2017;3(1):152-155.
7. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: Time to change the name! Stem Cells Translational Medicine. 2017;6(6):1445–1451.
8. Hinz B. The role of myofibroblasts in

- wound healing. *Current Research in Translational Medicine*. 2016;64(4):171–177.
9. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(11):723–737.
 10. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. *Immunity*. 2010;32(5):593–604.
 11. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: Development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual Review of Immunology*. 2009;27(1):669–692.
 12. Galli SJ, Tsai M. Mast cells in allergy and infection: Versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *European Journal of Immunology*. 2010;40(7):1843–1851.
 13. Rivera J, Jilfillan A. Molecular regulation of mast cell activation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;117(6):1214–1225.
 14. Schwartz LB. Mast cells: functions and phenotypes. *Biological research for nursing*. 2007;8(4):305–313.
 15. Amanna IJ, Slifka MK. Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity. *Immunological Reviews*. 2010;236(1):125–138.
 16. Neuberger MS, Rajewsky K. Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies. *European Journal of Immunology*. 2008;38(9):636–642.
 17. Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *European Journal of Immunology*. 2009;39(8):2065–2075.
 18. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. 2007;3(7):54–69.
 19. Guyton AC, Hall JE, authors. *Textbook of Medical Physiology* (11th ed.). Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. 612p.
 20. Kielty CM, Hodson NW. *Structure-Function Analysis of Collagen Types*. Springer Science and Business Media. 2013;802:19–31.
 21. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*. 2009;78(1):929–958.
 22. Avila Rodríguez MI, Rodríguez Barroso LG, Sánchez ML. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2017;17(1):20–26.
 23. Weiss L, Greaves M. *Histology*. Springer Science & Business Media. 2009;1:37–45.
 24. Wagenseil JE, Mecham RP. Elastic fiber architecture in the cardiovascular system. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 2007;159:1–24.
 25. Fung YC. *Biomechanics: Circulation*. Springer Science & Business Media. 2013;5(2):78–82.
 26. Kielty CM, Shuttleworth CA. Synthesis and assembly of fibrillin-rich microfibrils. *Humana Press*. 2018;3:243–268.
 27. Li W, Liu J, Zhong W. Elastin degradation: an effective and versatile mechanism for tissue remodeling. *Biomaterials science*. 2017;5(12):2335–2349.
 28. Tortora GJ, Derrickson B. *Principles of anatomy and physiology*. John Wiley & Sons. 2017;4:151–159.
 29. Laurent TC, Fraser JR. *Hyaluronan*. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1992;6(7):2397–2404.
 30. Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annual review of biochemistry*. 1998;67(1):609–652.
 31. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014;156(1–2):20–44.
 32. Nedergaard J, Cannon B. The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. *Cell Metab*. 2010;11(4):268–272.
 33. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins basic pathology*. Elsevier. 2018;1:33–38.
 34. Hall BK. *Bones and cartilage: developmental and evolutionary skeletal biology*. Academic Press. 2015;2:10–25.
 35. Makhoul G, Atweh GF. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: isolation and characterization. *Methods Mol Biol*. 2019;2045:43–53. doi: 10.1007/978-1-4939-9728-2_5
 36. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*. 2005;23(2):220–229. doi: 10.1634/stemcells.2004-0166
 37. Wu CC, Chen YT, Chen CH. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: a potential therapeutic tool for ischemic stroke. *Neural Regen Res*. 2021;16(2):269–275.

Черкас О.А., Кобеза П.А., Марченко Д.Г. Основні принципи будови та організації сполучної тканини.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Сполучна тканина — це різноманітний і життєво важливий компонент організму, який виконує широкий спектр функцій, необхідних для правильних фізіологічних і патологічних процесів. Він відіграє важливу роль у забезпеченні структурної підтримки, зв'язуванні та з'єднанні тканин і органів, а також полегшенні передачі поживних речовин, кисню та продуктів життєдіяльності між клітинами та кровоносними судинами. Без сполучної тканини організм не зміг би

підтримувати форму, протистояти механічним навантаженням, захищати внутрішні органи. Це важливо для розуміння певних станів здоров'я та захворювань. Багато з них вражають сполучну тканину, наприклад ревматоїдний артрит, склеродермія та системний червоний вовчак. Знання сполучної тканини має вирішальне значення для розробки медичних методів лікування та процедур. **Мета** полягає в тому, щоб забезпечити поглиблене розуміння цього типу тканини та її функцій в організмі. Ця стаття може охоплювати різні теми, пов'язані зі сполучною тканиною, включаючи її структуру, типи та ролі в організмі. У ній також розглядаються різні типи клітин сполучної тканини, такі як фібробласти та макрофаги, і те, як вони сприяють підтримці та відновленню тканин. **Методи.** Лекційне навчання, навчання за мікроскопом, комп'ютерне навчання, проблемне навчання, групове навчання. Для ефективного вивчення складу та властивостей сполучної тканини студентам і викладачам знадобиться доступ до високоякісних підручників з гістології, онлайн-ресурсів, мікроскопів і слайдів тканин. **Результати та підсумок.** Однією з основних функцій сполучної тканини є забезпечення механічної підтримки інших тканин і органів тіла. Це досягається шляхом продукування позаклітинного матриксу, який складається з волокон і основної речовини. Волокна в матриксі (колагенові, еластичні та ретикулярні) забезпечують міцність на розтяг, еластичність і стійкість до стиснення відповідно. Основна речовина, яка складається з глікозаміногліканів і протеогліканів, діє як мастило і амортизатор. Сполучна тканина також відіграє вирішальну роль у загоєнні ран і відновленні тканин. Іншою важливою функцією сполучної тканини є транспортування речовин між клітинами та кровоносними судинами. Крім того, клітини сполучної тканини, такі як фібробласти та макрофаги, виробляють цитокіни та хемокіни, які регулюють активність імунних клітин і полегшують рух імунітетів через тканини. Таким чином, сполучна тканина необхідна для нормального функціонування організму. Вона забезпечує структурну підтримку, полегшує загоєння ран і відновлення тканин, а також забезпечує транспортування метаболітів між клітинами та кровоносними судинами.

Ключові слова: сполучна тканина, фібробласт, тучна клітина, плазматична клітина, макрофаг, колаген, колагенові волокна, еластичні волокна, ретикулярні волокна, основна речовина.

ДО ВІДОМА АВТОРІВ

Загальні вимоги

Дана інформація складена на основі «Єдиних вимог до рукописів, що подаються в біомедичні журнали», з якими автори можуть ознайомитися детальніше на сайті <http://www.ICMJE.org>.

Журнал «Morphologia» публікує оглядові і проблемні статті, лекції, оригінальні статті, короткі повідомлення, рецензії та відгуки на публікації, посібники і монографії, матеріали з методології наукових досліджень, анонси, новини, повідомлення, презентації, а також матеріали з хроніки та історії в галузі морфології.

Редакція розглядає матеріали публікацій з дотриманням [авторських прав](#) і [етичних норм наукової публікації](#).

Редакція приймає матеріали, які надаються українською або англійською мовами.

При поданні рукопису автори повинні урахувати та розкрити потенційні конфлікти інтересів або чітко заявити про їх відсутність (більш детальну інформацію можна знайти в розділі «D. Конфлікт інтересів» [«Єдиних вимог до рукописів, що подаються в біомедичні журнали»](#)).

За наявності в рукописі інформації, що ідентифікує особу учасників дослідження, слід надати їх письмовий дозвіл на публікацію.

У рукописах має бути чітко позначена відповідність принципам біоетики, що викладені в [Декларації Хельсінкі](#) та Законі України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 1759-VI від 15.12.2009) або в аналогічних документах національного рівня інших держав.

Технічні вимоги до рукопису

Обсяг оглядової, проблемної статті або лекції повинен становити від 12 до 36 сторінок машинопису, оригінальної статті від 8 до 24 сторінок, включаючи ілюстративний матеріал, інших матеріалів за узгодженням з редакцією.

Текст друкується через 1,5 інтервали, розмір шрифту 14, гарнітура Times New Roman. Відступ абзацу 10 мм. Береги з усіх боків по 20 мм.

Стаття повинна бути виконана у форматі RTF або «документ Microsoft Word».

Структура рукопису:

- УДК
- Назва статті (без аббревіатур)
- Автор(и): ініціали, прізвище
- ORCID ідентифікатори авторів
- E-mail відповідального автора
- Офіційна назва установи, місто (для кожного автора)
- Дані про зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами, фондами, інституціями, грантами (за їх наявності)
- Реферат українською та англійською мовами.
- Текст статті

Реферат до статті (правила оформлення)

Реферати українською та англійською мовами потрібно надавати обсягом від 1800 до 2200 знаків та структурувати за такими рубриками: назва статті, прізвища та ініціали авторів, їх місце роботи, актуальність (Background), мета

(Objective), методи (Methods), результати (Results), підсумок або висновки (Conclusion), ключові слова (Key words).

У зв'язку з обробкою метаданих кожної статті журналу наукометричними базами звертаємо увагу авторів на особливу важливість ретельного оформлення назв установ і прізвищ авторів, так як від цього залежить успішність їх ідентифікації та розрахунку наукометричних показників.

У тексті оригінальної статті варто додержуватись послідовності обов'язкових складових:

- Вступ
- Мета
- Матеріали та методи
- Результати та їх обговорення
- Підсумок (або висновки)
- Перспективи подальших розробок
- Літературні джерела (див. Додаток)

У тексті статті всі фізичні величини та одиниці слід наводити за SI, терміни згідно з анатомічною та гістологічною номенклатурами, назви хвороб за діючою Міжнародною класифікацією хвороб, лікарські препарати за Міжнародними непатентованими назвами (INN).

Всі скорочення при їх першому згадуванні повинні бути розшифровані. Використання скорочень у назві статті та рефераті не дозволяється.

Посилання на першоджерела в тексті статті треба здійснювати наведенням у квадратних дужках порядкового номера у списку літературних джерел. Можливе також посилання у вигляді: «...на думку І.І. Іванова та співавторів [8],

R.T. Smith з колегами [12]...». Посилання на кілька першоджерел у тексті статті розділяються таким чином: «...[2, 4, 6-8]».

Стаття може містити діаграми, графіки та таблиці, що побудовані внутрішніми засобами редактора MS Word. Для позначення приміток рекомендовано використовувати наступні елементи у відповідній послідовності: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, ‡‡. Фотоілюстрації подаються в електронному варіанті окремими файлами у форматі JPEG або TIFF; роздільна здатність має складати не менше ніж 150 точок на дюйм. У тексті статті рисунки потрібно розташовувати після першого посилання на них, підписи до рисунків наводити мовою оригіналу статті й обов'язково англійською.

Рукопис повинен бути ретельно відредагований авторами. Всі статті підлягають процедурі рецензування.

Для первинної експертизи рукопис і відомості про авторів (установи, посади, наукові ступені та вчені звання авторів) потрібно надсилати за адресою: morphology@dsma.dp.ua.

У разі прийняття статті на цю ж адресу надсилається відсканована копія «Авторської згоди» з підписом відповідального автора.

Додаток

Літературні джерела (правила і приклади оформлення списку)

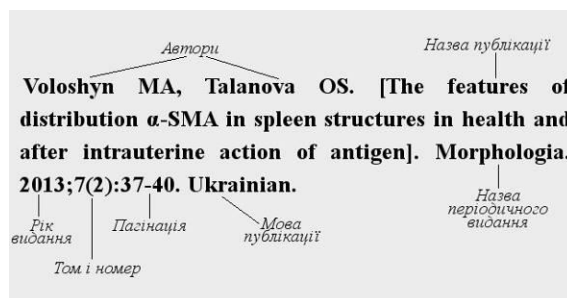
Всі літературні посилання, які наведені в роботі, обов'язково повинні бути представлені в списку першоджерел у порядку використання (посилань) у тексті. Скорочення назв журналів наводяться згідно зі стандартами Index Medicus (http://www.wsulibs.wsu.edu/general/journal_abbreviations.html). За достовірність даних, наведених у бібліографічному списку, відповідає автор.

Кожне використане бібліографічне джерело має бути позначене у тексті статті (у квадратних дужках). Посилання на неопубліковані роботи або матеріали на правах рукопису (дисертації, автореферати) не допускаються.

Кожне джерело у списку необхідно оформлювати у форматі міжнародного стандарту Vancouver reference style (NLM/PubMed). У разі наявності в мережі Інтернет електронної копії цитованого документа бажано в кінці бібліографічного посилання розміщувати URL адресу документа; за наявності слід також вказувати DOI або PMID статті. При оформленні посилань на періодичні видання, що мають кілька варіантів назви, слід віддавати перевагу англійській.

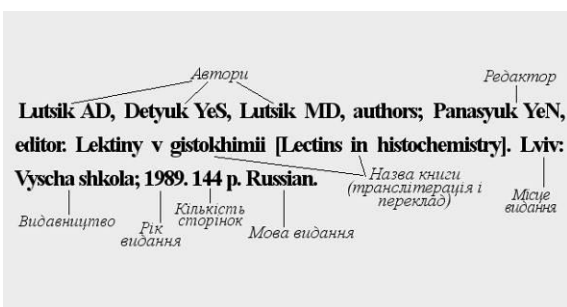
Коротка інструкція по оформленню типових літературних посилань відповідно до міжнародних вимог [Vancouver reference style \(NLM/PubMed\)](#).

Оформлення посилання на статтю, опубліковану в періодичному виданні:



Необхідно вказувати всіх авторів, відокремлювати їх один від одного комою і пробілом. Ініціали вказуються після прізвища, знаками пунктуації не розділяються. Повні імена авторів не наводяться. Після переліку авторів ставиться крапка і пробіл. Назва публікації наводиться англійською мовою у квадратних дужках. Після назви статті ставиться крапка і пробіл. Для статті англійською мовою назва вказується без квадратних дужок. Назва періодичного видання наводиться англійською мовою або транслітерацією назви символами латинського алфавіту. Допускається наводити зареєстроване скорочення назви періодичного видання. Після назви видання ставиться крапка і пробіл. Інформація про видання: рік видання відокремлюється крапкою з комою, потім наводиться номер тому, в круглих дужках вказується номер журналу, після двокрапки приводиться діапазон сторінок. Для статті, що опублікована не англійською мовою, в кінці сформованого посилання вказується мова оригіналу. Додаткова інформація про статтю номери DOI PubMed ID та ін.

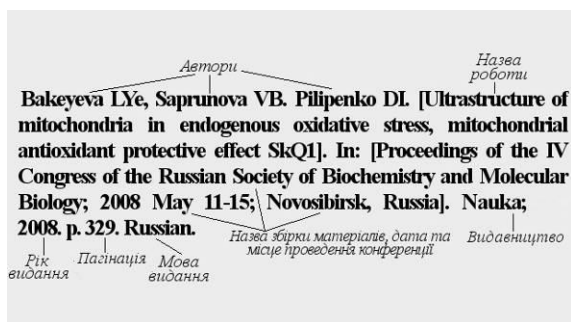
Оформлення посилання на книгу:



Необхідно вказувати всіх авторів, відокремлювати їх один від одного комою і пробілом. Ініціали вказуються після прізвища, знаками пунктуації не розділяються. Повні імена авторів не наводяться. Автори першого і другого порядків розділяються крапкою з комою і пробілом. Автори другого порядку редактори, перекладачі. Після переліку авторів ставиться крапка і пробіл. Назва книги: наводиться транслітерація назви

книги і/або переклад назви книги англійською мовою в квадратних дужках. Якщо книга видана англійською мовою, назва її в квадратні дужки не береться. Після назви книги ставиться крапка і пробіл. Номер видання (у форматі 1st, 2nd, 3rd, 4th тощо), додаткова інформація про видання: виправлене (rev.), доповнене (enl.), стереотипне (repr.) та інші. Зверніть увагу: перше видання вказується тільки в тому випадку, якщо достовірно відомо про подальші перевидання і Ви цитуєте саме перше видання. Місце видання вказується місто, в круглих дужках за необхідності вказується країна. Після зазначення місця публікації ставиться двокрапка і пробіл. Видавництво наводиться транслітероване латиницею або його англійська назва. Після видавництва ставиться крапка з комою і пробіл. Рік видання, після вказівки його ставиться крапка і пробіл. Обсяг книги в сторінках (наприклад, 568 p.), після зазначення його ставиться крапка і пробіл. Для книги, що опублікована не англійською мовою, в кінці посилання вказується мова оригіналу.

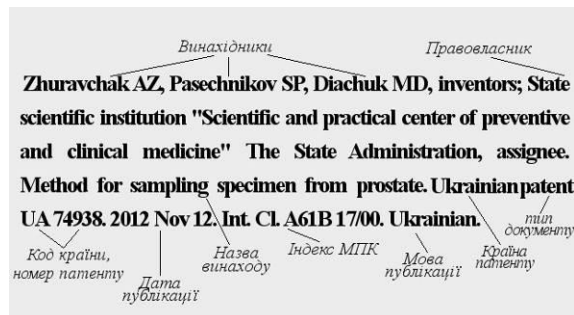
Оформлення посилання на матеріали конференції:



Необхідно вказувати всіх авторів, відокремлювати їх один від одного комою і пробілом. Ініціали вказуються після прізвища, знаками пунктуації не розділяються. Повні імена авторів не наводяться. Після переліку авторів ставиться крапка і пробіл. Назва публікації наводиться англійською мовою у квадратних дужках. Після назви статті ставиться крапка і пробіл. Для матеріалів англійською мовою назва вказується без квадратних дужок. Сполучна фраза «In:». Назва збірника матеріалів конференції, а також назва конференції наводяться англійською мовою у квадратних дужках. Для матеріалів, що видавалися англійською мовою, дужки не ставляться.

Після назви ставиться крапка і пробіл. Слід зазначити максимально повні відомості про конференцію: дату проведення, місце проведення та ін. Видавництво зазначається місто видання і назва видавництва транслітерацією латиницею або англійською назвою. Після зазначення видавництва ставиться крапка з комою і пробіл. Рік видання, після нього ставиться крапка і пробіл. Діапазон сторінок, після нього ставиться крапка і пробіл. Для матеріалів, що опубліковані не англійською мовою, в кінці сформованого посилання вказується мова оригіналу.

Оформлення посилання на патент:



Необхідно вказувати всіх авторів, відокремлювати їх один від одного комою і пробілом. Ініціали вказуються після прізвища, знаками пунктуації не розділяються. Повні імена авторів не наводяться. Після переліку авторів ставиться кома і зазначається *inventor* або *inventors*, ставиться крапка з комою і пробіл. Правовласник вказується ім'я (правила аналогічні таким для винахідників) або назва організації, потім після коми вказується *assignee*, потім ставиться крапка точка і пробіл. Наводиться назва винаходу, після нього ставиться крапка і пробіл. Вказується країна реєстрації, а також тип документу (патент), код країни і номер патенту. Всі елементи розділяються пробілами, наприкінці ставиться крапка і пробіл. Вказується дата публікації інформації про видачу патенту, потім крапка з пробілом. Індекс (індекси) Міжнародної патентної класифікації наводяться після *Int. Cl.*, Якщо їх більше одного розділяються крапкою з комою. Після зазначення всіх індексів ставиться крапка і пробіл. Для матеріалів, виданих не англійською мовою, в кінці сформованого посилання вказується мова оригіналу.

Адреса редакції: 49005, Україна, м. Дніпро, вул.Севастопольська, 19.
 Редакція журналу «Morphologia».
 Тел.: 0974584284.
 E-mail: morphology.ivt@gmail.com

AUTHOR GUIDELINES

General requirements

This information is based upon the "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" which authors can find online www.ICMJE.org.

Journal «Morphologia» publishes reviews and topical articles, lectures, original papers, case reports, review and comments on publications, manuals and monographs, materials in research methodology, announcements, news, reports, presentations, and materials on the history and chronicles in morphology.

Editorial office examines materials of publications in compliance with [copyright](#) and [ethical norms](#). Editorial Board accepts the materials written in English and Ukrainian languages.

When submitting a manuscript, authors should

consider and disclose potential [conflicts of interest](#) or clearly state their absence (more information can be found in section «D. Conflicts of Interest» of the "[Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals](#)").

In the case when submitted manuscript contains personally identifiable information of study participants authors should provide their written permission to publish such materials.

In the manuscripts should be clearly indicated compliance with the principles of bioethics set in the [Declaration of Helsinki](#) and in the Law of Ukraine "[About protection of animals from violent behavior](#)" (№ 1759 -VI 15 Dec 2009) or equivalent documents of the national level of other countries.

Technical requirements for the manuscripts

Size of Review, critical articles or lectures should be from 12 up to 36 typewritten pages, original articles from 8 up to 24 pages, including illustrations, other publications on consideration with the editorial office.

The text is printed with 1.5 line spacing, font size 14, Times New Roman. Paragraph indent 10 mm, all margins 20 mm.

Article must be done in RTF or «document Microsoft Word».

The structure of the manuscript:

- UDC
- Title of the article (no abbreviations)
- Author (s): initials, surname
- ORCID identifier of every author
- e-mail of the responsible author
- The official name of the institution (affiliation), the city
- Data about communication of publication with the planned research project, foundation source, institutions, grants (if available)
- Summary in English language
- Text of the article

Abstract of the article

(Design rules)

Extended abstract (from 1800 up to 2200 symbols) in English should be submitted with next mandatory elements: title of the article, Family name and first names of all authors, their affiliations, the actuality of research (Background), purpose (Objective), methods (Methods), results (Results), conclusions (Conclusion), keywords (Key words).

Because of the processing of the metadata of each article by scientometric databases authors

should pay especial attention to the particular importance of careful designation of names of institutions and authors, as it affects the success of their identification and calculation by scientometric indicators.

In the text of the original article authors should follow the sequence of mandatory components:

- o Background
- o Purpose
- o Materials and Methods
- o Results and discussion
- o The conclusion (or conclusions)
- o Prospects for further investigations
- o References (see Appendix)

In the text of the article all the physical units should be given in system SI, terms according to the anatomical and histological nomenclature, names of diseases according to the current International Classification of Diseases, drugs at the International Nonproprietary Name (INN).

All abbreviations at their first mention must be decrypted. Use of abbreviations in the title and abstract is not allowed.

A citation of the original documents in the text of the manuscript should be implemented in square parentheses indicating the sequence number in the list of references. Acceptable also to cite as: according to I.I.Ivanova et al. [8], RT Smith and colleagues [12]. Citations of several primary sources in the text should be separated as follows: [2, 4, 6-8]".

Article may contain diagrams, graphs and tables constructed by internal means of MS Word. To denote footnotes, it is recommended to use the elements in the following order: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, ‡‡. Photoillustrations are submitted electronically as

separate files in JPEG or TIFF with minimal resolution 150 dpi. The text of the article should include drawings after the first reference to them, figure captions need to be done in the original language and in English mandatory.

The manuscript should be carefully edited by the authors. All articles are subjected to peer [review procedure](#).

For primary expertise manuscript and information about the author (affiliation, position, scientific degrees and academic titles of authors) should be sent to e-mail at: morphology@dsma.dp.ua. In case of article acceptance a scanned copy of the "[Copyright Agreement](#)" with the signature of the responsible author is sent to editorial office.

Appendix

References (Rules and examples of the list)

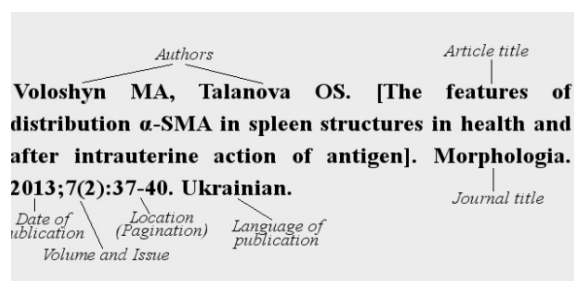
All references cited in the paper must be arranged in a list in order of their first mentioning in the text. Abbreviations of journal titles are provided in accordance with the standards of [Index Medicus](#). The author is responsible for the accuracy of the data provided in the bibliography.

Each used bibliographic source must be designated in the text (in square parentheses). References to unpublished work or materials as a manuscript (dissertations, reports) are not allowed.

Each source in the list should be composed an international standard format [Vancouver reference style \(NLM/PubMed\)](#). In case of presence of the electronic copy of the cited document in the Internet, it is desirable to place the URL of the document at the end of the reference, also indicate the DOI and PMID of the article if it is available. When citing periodicals, with more than one title, preference should be given to English one.

Quick start guide on the arrangement of standard references in accordance with international requirements of [Vancouver reference style](#).

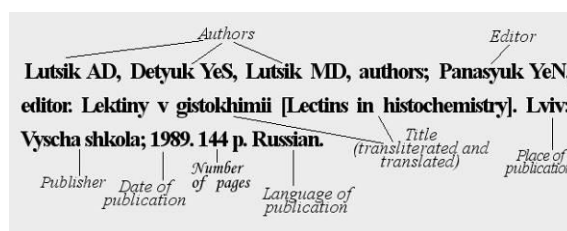
Reference to an article published in a periodical:



All authors should be indicated, separate them with a comma and a space. Initials are placed after the surnames, they are not separated by punctuation. Full names of the authors are not given. After the list

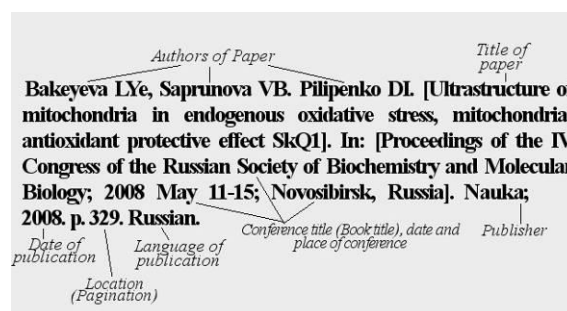
of authors put a dot and a space. Article title written in English is given in square parentheses. After the title of the article put a dot and a space. For publications originally written in English title is not placed in square parentheses. Indicate journal title in English or by transliteration with symbols of the latin alphabet. It is possible to use the registered abbreviation of the periodical title. The title of the journal is preceded by a point and a space. Publication Information: year of publication separated by a semicolon, and then the volume number, the number of issue, placed in parentheses and after them put the colon and pagination. Additional information about the article DOI, PubMed ID, and so on could be added at the end.

Reference to a book:



All authors should be indicated, separate them with a comma and a space. Initials are placed after the surnames, they are not separated by punctuation. Full names of the authors are not given. The authors of the first and second range are separated by semicolon. The authors of the second range editors, translators. After the list of authors put a dot and a space. Book title: original name in English or transliteration/translation with the symbols of latin alphabet in square parentheses. After book title there is a dot and a space. Number of issue (in format 1st, 2nd, 3rd, 4th), additional information about issue reviewed (rev.), enlarged (enl.), representational (repr.) etc. The first edition is mentioned only in case of assured existence of more than one editions of this book. Place of publication specify the city and if it is important country in parentheses. After specifying the place of publication there is a colon and a space. Publisher indicated in Latin transliteration or in its English name. After publisher there is a semicolon and a space. Year of publication, after pointing it put a dot and a space.

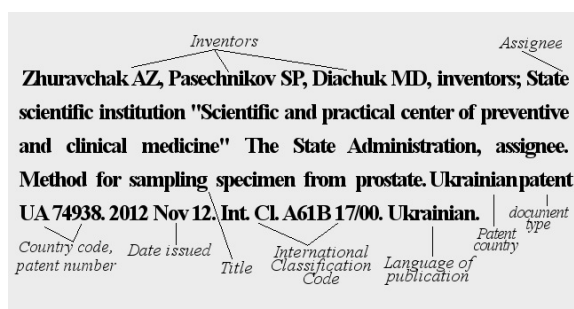
Reference to a conference materials:



All authors should be indicated, separate them with a comma and a space. Initials are placed after the surnames, they are not separated by punctuation. Full names of the authors are not given. After the list of authors put a dot and a space. Publication title written in English is given in square parentheses. For publications originally written in English title is not placed in square parentheses. After the title of the publication put a dot and a space. Connecting phrase «In:». Name of the conference written in English in square parentheses. For the conferences originally named in English the name is not placed in square parentheses. After the title, put a dot and a space. The most comprehensive data about the conference should be indicated dates, place and so on. Publisher the city of the publication and publisher name transliterated with Latin alphabet or English name. After specifying a publisher put a semicolon and a space. Year of publication with a dot and a space. For materials published not in English, at the end of the reference indicate the original language.

All authors should be indicated, separate them with a comma and a space. Initials are placed after the surnames, they are not separated by punctuation. Full names of the authors are not given. After list of authors (inventors) put the coma and word '*inventor*' or '*inventors*', then the semicolon and space. Assignee put the name of person (the same rules as for the inventor) or the name of organization, then put coma and the word '*assignee*', than dot and space. The title of the invention; put a dot and a space after it. Index(es) of the International Patent Classification given after Int. Cl., If more than one separated by a semicolon. After specifying all the indices put a dot and a space. For materials not published in English at the end of the reference indicates the original language.

Reference to a patent:



Address of the editorial office: 49005, Ukraine, Dnipro, Sevastopolska str., 19.

Editorial office of the journal «Morphologia».

Tel.: +380974584284.

E-mail: morphology.ivt@gmail.com



1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.