

MORPHOLOGIA



ISSN 1997-9665

2024 • Том 18 • Номер 4

2024 • Volume 18 • Number 4

MORPHOLOGIA

2024 • Том 18 • Номер 4

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.

Оглядіві, 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 № 6 від 19 грудня 2024 року).

Підписано до друку 20.12.2024 р. Умовн. друк. арк. 14.

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

MORPHOLOGIA

2024 • Volume 18 • Number 4

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), Lugovskyj S.P. (Kyiv), Lutsyk O.D. (Lviv), Maievskiy O.Ye (Kyiv), Medvediev M.V. (Dnipro), Melnyk N.O. (Brno), 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 № 6 Dec 19, 2024).

Signed for publishing on Dec 20, 2024. Conventional printed pages 14.

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

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

*Оглядові та проблемні статті***Волос Л.І., Столяр Г.Л.**

Множинна мієлома, асоційована з дифузним легеневим кальцинозом: патоморфологічне дослідження

*Оригінальні дослідження***Бобр А.М.**Аналітична і кількісна оцінка стану стінки серця щурів при впливі отрути гадюк *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii***Бука Г.Ю., Дасюк Т.Є., Дасюк І.Й., Твердохліб І.В.**

Кількісна морфологічна оцінка шкіри скроневої ділянки голови у різних вікових категорій жінок із супутньою внутрішньою патологією

Волос Л.І., Столяр Г.Л.

Рідкісний випадок цементуючої фіброми нижньої щелепи: патогістологічне дослідження

Ковальчук П.Є., Хмара Т.В., Паньків Т.В.

Топографо-анатомічне обґрунтування використання глибоких м'язів задньої групи гомілки для міопластики дефектів великогомілкової кістки

Кріцак М.Ю., Слабий О.Б., Ясіновський О.Б.

Структурні зміни сухожилкової частини діафрагми щура за умов жовтяниці та пневмоперитонеуму низького тиску

Кулеш Д.В., Галатенко Н.А., Рожнова Р.А., Наражайко Л.Ф., Примушко С.О., Тарнавський Д.В.

Вивчення цитотоксичності та аналіз клітинних реакцій на імплантацію поліуретансечовин з іфосфамідом

Ласавуц В.С.Аналіз морфометричних показників легеневої тканини за умов впливу отрути гадюк *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii***Марченко Д.Г.**

Якісний та кількісний аналіз гістологічних змін у структурі кардіоміоцитів ембріонів щурів протягом 18-20-ї діб за умов хронічної алкогольної інтоксикації материнського організму

*Reviews and topical articles***6 Volos L.I., Stoliar H.L.**

Multiple myeloma associated with diffuse pulmonary calcifications: pathomorphological study

*Research, original papers***15 Bobr A.M.**Analytical and quantitative assessment of the condition of the heart wall of rats exposed to the venom of the vipers *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii***22 Buka G.Yu., Dasyuk T.Ye., Dasyuk I.J., Tverdokhlib I.V.**

Quantitative morphological assessment of the temporal region skin in different age categories of women with additional internal pathology

32 Volos L.I., Stoliar H.L.

A rare case of cementifying fibroma of the mandible: a histopathological study

40 Kovalchuk P.Ye., Khmara T.V., Pankiv T.V.

Topographic and anatomical justification use of the deep muscles of the posterior compartment of the leg for myoplasty of tibia defects

45 Kritsak M.Yu., Slabyi O.B., Yasinovskiy O.B.

Structural changes in the tendinous part of the rat diaphragm under conditions of jaundice and low-pressure pneumoperitoneum

52 Kuliesh D.V., Galatenko N.A., Rozhnova R.A., Narazhayko L.F., Prymushko S.O., Tarnavskiy D.V.

Study of cytotoxicity and analysis of cellular reactions to the implantation of polyurethaneureas with ifosfamide

61 Lasavutz V.S.Analysis of morphometric parameters of lung tissue under conditions of exposure to the venom of the vipers *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii***66 Marchenko D.G.**

Qualitative and quantitative analysis of histological changes in cardiomyocytes of rat embryos during days 18-20 under conditions of alcohol intoxication in the maternal organism

Матківська Р.М.

Мікроскопічна характеристика структурних компонентів нирок через 1 годину після впливу на експериментальних щурів отрути скорпіонів *Leiurus macroctenus*

Матяш О.Р., Волощук Н.І.

Вплив донору гідроген сульфід у гістологічні зміни серця щурів за алкогольної кардіоміопатії

Мізякіна К.В.

Кількісна морфологічна характеристика змін зубчастої фасції гіпокампа у щурів з різними нейрокognітивними розладами після тяжкої черепно-мозкової травми

Согомонян Є.А., Челпанова І.В., Смолькова О.В., Серветник М.І., Панкевич Л.В.

Вплив дисбалансу тиреоїдних гормонів на вуглеводні детермінанти яєчників та ендометрію

Ханенко О.Б., Попович Ю.І.

Морфологічні зміни в селезінці щурів у пізні терміни експериментального стрептозототин-індукованого цукрового діабету

Челпанова І.В.

Ремоделювання кістки нижньої щелепи після трансплантації β-трикальційфосфату: гістологічні, імуногістохімічні та ультраструктурні аспекти

Шамелашвілі К.Л.

Антиоксидантна і протипухлинна активність наноліпосом та твердих наночасток, навантажених реній-платиновою системою у щурів з карциномою Герена

Янчишин А.

Мікроскопічна організація міокарда експериментальних щурів через 1 та 3 години після впливу отрути скорпіонів *Leiurus macroctenus*

Методологія наукових досліджень

Кобеза П.А.

Морфометрія. Загальний метод для гістології, цитології та ембріології. Огляд та перспективи інтеграції в освітній процес

До відома авторів

72

Matkivska R.M.

Microscopic characterisation of structural components of the kidneys 1 hour after experimental rats' exposure to the scorpion *Leiurus macroctenus* venom

76

Matias O.R., Voloshchuk N.I.

Effect of hydrogen sulfide donor on histological changes in the heart of rats with alcoholic cardiomyopathy

81

Mizyakina K.V.

Quantitative morphological characteristics of changes in the hippocampal dentate gyrus in rats with various neurocognitive disorders after severe traumatic brain injury

88

Sogomonyan Ye.A., Chelpanova I.V., Smolkova O.V., Servetnyk M.I., Pankevych L.V.

Influence of imbalance of thyroid hormones on carbohydrate determinants of ovaries and endometrium

95

Khanenko O.B., Popovych Y.I.

Morphological alterations in the spleen of rats during late stages of experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus

101

Chelpanova I.V.

Mandibular bone remodeling after β-tricalcium phosphate transplantation: histological, immunohistochemical and ultrastructural aspects

114

Shamelashvili K.L.

Antioxidant and antitumor activity of nanoliposomes and solid nanoparticles loaded with rhenium-platinum system in rats with Guerin carcinoma

120

Yanchyshyn A.

Microscopic organisation of the myocardium of experimental rats 1 and 3 hours after exposure to the venom of the scorpion *Leiurus macroctenus*

Scientific research methodology

126

Kobez P.A.

Morphometry. General method for histology, cytology and embryology. Overview and prospects of integration into the educational process

133

Author guidelines

Л.І. Волос ¹
Г.Л. Столяр ²

¹ Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

² Комунальне некомерційне підприємство Львівської обласної ради «Львівське обласне патологоанатомічне бюро»
Львів, Україна

Надійшла: 14.10.2024

Прийнята: 15.12.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.6-14>

УДК 616-006.448-036.17 – 06:616.24-004.6] – 018-092

МНОЖИННА МІСЛОМА, АСОЦІЙОВАНА З ДИФУЗНИМ ЛЕГЕНЕВИМ КАЛЬЦИНОЗОМ: ПАТОМОРФОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

Volos L.I. , Stoliar H.L.  Multiple myeloma associated with diffuse pulmonary calcifications: pathomorphological study.

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Communal Non-Commercial Enterprise of Lviv Regional Council «Lviv Regional Pathology Bureau», Lviv, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Multiple myeloma is an aggressive lymphoproliferative disease with plasma cell dyscrasia, with symptoms associated with bone marrow infiltration, damage of the hematopoiesis, finally leading to renal failure, bone damage, hypercalcemia, and metastatic calcification. As with all lymphatic tumors, multiple myeloma is characterized by the development of secondary immunodeficiency. Antibody deficiency syndrome is the cause of increased susceptibility of patients to bacterial infections, primarily of the bronchopulmonary system. **Objective:** to study the nature of pathomorphological changes in the lungs of patients who died from multiple myeloma, and to establish the relationship between multiple myeloma disease with renal dysfunction and metastatic pulmonary calcification. **Methods.** A pathomorphological study of the autopsy material of two cases of deceased persons, who were diagnosed with multiple myeloma during their lifetime, was carried out. According to autopsies, morphological changes in internal organs were studied, with an emphasis on changes in the lungs. A detailed morphological examination of the kidneys, bone marrow in the sternum, vertebral bodies and the ilium was carried out also. **Results.** Two cases of multiple myeloma associated with diffuse pulmonary calcinosis in patients in whom renal and pulmonary-cardiac failure were the immediate cause of death are presented. Myeloma disease with damage to many bones was complicated by nephropathy, diffuse metastatic calcification in the lungs and focal - in the myocardium and blood vessels. Diffuse focal deposits of calcium in the interstitium and interalveolar membranes, numerous intraalveolar polypous growths of loose connective tissue (according to the type of organized pneumonia), foci of calcification were found in the lungs. In the lumen of the alveoli there is a thick edematous liquid, fibrin threads, separate siderophages, desquamated alveolocytes, macrophages. There are widespread hemorrhages, focal round cell infiltration of the interstitium, emphysema, dystelectasis, foci of purulent pneumonia, erythrosthesis in the microhemocirculatory channel. **Conclusion.** Metastatic calcification and metastatic pulmonary calcification are rare complications in patients with multiple myeloma, even in patients with renal failure. The risk of metastatic calcification in multiple myeloma is likely strongly related to renal impairment.

Key words: multiple myeloma, lung histopathology, pulmonary complications, metastatic pulmonary calcification, secondary immunodeficiency, pneumonia.

Citation:

Volos LI, Stoliar HL. [Multiple myeloma associated with diffuse pulmonary calcifications: pathomorphological study]. Morphologia. 2024;18(4):6-14. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.6-14>

 Volos L.I. 0000-0002-1733-589X

 Stoliar H.L. 0000-0002-9454-8442

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Множинна мієлома – злоякісна пухлина плазматичних клітин, яка щорічно вражає майже 35 000 людей [1]. Захворювання характеризується моноклональною проліферацією плазматичних клітин, що призводить до збільшення моноклональних антитіл і пошкодження кісткового мозку, що в свою чергу призводить до цитопенії і крихкості кісток [2]. Накопичення моноклональних антитіл, білків Бенс-Джонса призводить також до ураження нирок і ниркової недостатності, що спостерігається у двох третинах випадків множинної мієломи. Активація остеокластів в кістках через ліганд ядерного фактора каппа-В (RANKL), який є рецептором остеокластів, призводить до стимуляції резорбції і руйнування кістки через літичні ураження, що спричиняє біль, переломи, проблеми з рухливістю та кальциноз [3].

Згідно зі статистичними даними Глобальної обсерваторії раку (GLOBOCAN), у 2018 році в усьому світі було зареєстровано близько 160 000 випадків множинної мієломи, що становить 0,9% усіх діагнозів раку [4]. Майже 90 000 із цих випадків були діагностовані у чоловіків та 70 000 – у жінок, що дорівнює стандартизованій за віком частоті 2,1/100 000 та 1,4/100 000 відповідно. Сукупний ризик діагностування множинної мієломи від народження до 74 років становить 0,24% серед чоловіків і 0,17% серед жінок, що говорить про те, що захворювання в 1,5 раза частіше зустрічається у чоловіків [5]. З 1990 по 2016 рік глобальна захворюваність на множинну мієлому зросла на 126% і продовжує зростати в розвинутих країнах світу, при цьому найвищий рівень захворюваності спостерігається в Австралії, Західній Європі та США. У США, за оцінками експертів, у 2020 році було діагностовано 32 000 випадків раку, що становить 1,8% усіх діагнозів раку, при цьому множинна мієлома займає за поширеністю серед новоутворень 14 позицію. У США на множинну мієлому припадає понад 2% смертей від раку, що більше ніж удвічі щодо показників у всьому світі [6].

Згідно Бюлетеню Національного канцер-реєстру загальна кількість випадків захворювання на множинну мієлому в Україні у 2022 році склала 709, з них у чоловіків – 357, у жінок – 352. Загальна кількість померлих від множинної мієломи у 2022 році склала 279 випадків, з них 131 чоловік і 148 жінок. Не прожили 1-го року з числа вперше виявлених у 2022 році 19,7%, з них 19,2% чоловіків і 20,2% жінок. Морфологічно підтверджено множинну мієлому у 96,2%, з них у 95% чоловіків і в 97,4% жінок. Гістологічно підтверджено множинну мієлому у 64,2%, з них у 63,3% чоловіків і в 65,1% жінок [7].

З удосконаленням лікування виживаність пацієнтів зросла більш ніж удвічі, завдяки впровадженню нових комбінацій хіміотерапії,

цільових інгібіторів малих молекул і моноклональних антитіл. Множинна мієлома стає більше схожою на хронічне захворювання, і мета терапії полягає в запобіганні пошкодженню органів і досягненні безрецидивного виживання [8]. Ускладнення можуть бути вторинними по відношенню до самої хвороби або спричинені прийомом ліків. Ураження нирок дуже поширене при множинній мієломі та інших дискразіях плазматичних клітин. Множинна мієлома є однією з поширених причин гіперкальціємії внаслідок злоякісної пухлини [9, 10].

У багатьох проведених дослідженнях вказується на неврологічні ускладнення, які включають периферичну нейропатію та когнітивні проблеми, вторинні по відношенню до терапії. У пацієнтів, які отримували імунomodulatory, відзначають когнітивний дефіцит [11, 12]. За даними авторів існує підвищений ризик розвитку як вторинного гематологічного раку, так і раку солідних органів, особливо за умов підтримки лєналідомідом після трансплантації [13]. Також спостерігається підвищення частоти венозної тромбоемболії порівняно із загальною популяцією [14]. Серцево-судинні ускладнення, такі як серцева недостатність, біль у грудях, аритмії та легенева гіпертензія, спостерігаються у пацієнтів під час лікування карфілзомібом [15, 16].

Останні досягнення в лікуванні подовжили тривалість ремісії та час між фазами рецидиву у пацієнтів з множинною мієломою. Однак лікування множинних рецидивів може призвести до кумулятивної імуносупресії та підвищеного ризику інфекцій, тому пацієнти мають вищий ризик інфікування через хворобу та вторинну імуносупресію після хіміотерапії. Патогенез імунної недостатності є багатофакторним, включаючи чинники, пов'язані з хворобою та лікуванням [17]. Синдром недостатності антитіл є причиною підвищеної схильності хворих на множинну мієлому до бактеріальних інфекцій, насамперед з боку бронхолегеневої системи, у пацієнтів частіше розвиваються пневмонії.

Метою роботи було вивчити характер патоморфологічних змін в легенях у хворих, які померли від множинної мієломи, і встановити зв'язок між множинною мієломою з нирковою недостатністю та метастатичним кальцинозом.

Матеріали та методи

Нами було проведене патоморфологічне дослідження автопсійного матеріалу двох випадків померлих осіб, у яких за життя діагностовано множинну мієлому. За даними автопсій вивчені морфологічні зміни у внутрішніх органах, з акцентом на зміни в легенях. Крім того, детально дослідженні нирки, кістковий мозок в груднині, тілах хребців та клубовій кістці. Гістологічні дослідження автопсійного матеріалу проводилися із застосуванням універсального світлового мікроскопа Leica DM750 (Leica Microsystems GmbH).

Дослідження виконані з дотриманням основних положень «Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини», затверджених Гельсінською декларацією (1964-2013 pp.), ICH GCP (1996 p.), Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986 p.), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 p., № 944 від 14.12.2009 p., № 616 від 03.08.2012 p.

Зразки тканин внутрішніх органів після загального дослідження фіксували в 10% нейтральному забуференому розчині формаліну, з наступним зневодненням у спиртах зростаючої концентрації і заливкою в парафін за стандартною методикою. З парафінових блоків зі зразками тканини на ротаційному мікротомі Leica RM2235 виготовляли гістологічні зрізи товщиною 5 ± 1 мкм, які наносили на предметні скельця з адгезивним покриттям. Депарафінові гістологічні зрізи забарвлювалися гематоксилином та еозином за стандартною методикою.

Результати дослідження

Ми представляємо випадки множинної мієломи, асоційованої з дифузним легенеvim кальцинозом, у пацієнтів, в яких ниркова та легенево-серцева недостатність стали безпосередньою причиною смерті.

Випадок 1

66-річний чоловік з жовтня 2023 року отримував амбулаторно замісну ниркову терапію методом програмного гемодіалізу з приводу мієломної нефропатії. В той самий час діагностована множинна мієлома, на КТ з контрастом виявлені: множинний остеоліз, дилатація правих відділів серця, кардіогенні зміни печінки («мускатна печінка»), пневмоніт. У стернальному пункті: дифузна мієлома. Хворий розпочав курс хіміотерапії. Бригадою швидкої медичної допомоги транспортований у Львівську обласну клінічну лікарню з підозрою на двобічну пневмонію. При поступленні стан вкрай важкий, сопор, періодично збудження, ЧД=24, $SpO_2=92\%$ (з O_2 маскою), ЧСС=74, АТ=100/60, знижений діурез, висока азотемія, анемія. Призначені знеболюючі, інфузії, седативні, цефазолін, інгібітори протонної помпи ін. Проте через 20 годин після поступлення настала смерть. Під час секції легені збільшені, поверхня їх крупногорбиста сіро-червона, еластичність та повітряність знижені, на розрізі тканина ущільнена з «мрамуровим» малюнком, дрібнозерниста, місцями губчаста, при стисканні виділяється велика кількість геморагічної рідини, задньо-базальні відділи також містять неправильної галузистої форми сірі ущільнені вогнища розмірами 1-1,5 см (субплевральні та інтралобулярні) (рис. 1А).

Мікроскопічно в грудині, тілах хребців та клубовій кістці діагностовано гіперцелюлярний кістковий мозок за рахунок дифузних та вогнищевих скупчень атипових плазматичних клітин; еритропоез звужений, мієлопоез омолоджений,

мегакаріюцити 1-2 в п/зору, незначно збільшена кількість еозинофілів. В легенях виявлено дифузно-вогнищеві відкладання кальцію в інтерстиції та міжальвеолярних перетинках, численні інтраальвеолярні поліпозні розростання пухкої сполучної тканини (за типом організованої пневмонії), фокуси карніфікації. У просвітах альвеол густа набрякова рідина, нитки фібрину, окремі сидерофаги, десквамовані альвеолоцити, макрофаги. Мають місце поширені крововиливи, фокальна круглоклітинна інфільтрація інтерстицію, емфізема, дистелектази, вогнища гнійної пневмонії, еритростази в мікрогемоциркуляторному руслі (рис. 2). В нирках діагностована значна кількість еозинофільних та пігментованих циліндрів в просвітах розширених канальців, локальна лімфоїдна інфільтрація, поодинокі дрібні кальцинати та склероз інтерстицію. Звертає увагу виражена гіперемія вен, гіаліноз дрібних артерій. По смерті, крім кальцифікації легень, діагностована вірусно-бактерійна пневмонія (грип А методом ПЛР та бактеріологічно *E. coli*+*St. L-haemol*). Смерть хворого настала внаслідок ниркової та легенево-серцевої недостатності.

Випадок 2

52-річний чоловік протягом місяця скаржився на болі в плечі, приймав нестероїдні протизапальні препарати. За дві доби до поступлення в стаціонар скарги на підвищення артеріального тиску, блювоту, головний біль, утруднене сечовиділення. Звернувся в центральну районну лікарню, діагностована ниркова недостатність, скерований у Львівську обласну клінічну лікарню. Під час поступлення стан важкий, ЧСС=117, ЧД=16, АТ=140/85, крепітація в нижніх відділах легень, в сечовому міхурі 1 л концентрованої сечі, протеїнурія 3 г/л. Консультований урологом (гостре пошкодження нирок, затримка сечі, гіперплазія простати), при УЗД органів черевної порожнини виявлено підгостре дифузне ураження нирок, аденома простати. Призначена замісна ниркова терапія методом гемодіалізу. Невдовзі негативна динаміка – гарячка $38^{\circ}C$, задишка, слабкість, $SpO_2=91\%$, гематурія. Консультований пульмонологом – позашпитальна двобічна пневмонія, пневмоніт?, васкуліт? Внаслідок тяжкої десатурації ($SpO_2=81\%$) хворий переведений на керовану вентиляцію легень. Виконана автоімунна панель (усі показники негативні). Мазок та ПЛР SARS-Cov-2 негативні, мікобактерії туберкульозу не виявлені, Cito Test ВІЛ від'ємний. Надалі хворий перебував у важкому стані на керованій вентиляції легень та вазопресорах. Згідно даних мультиспіральної комп'ютерної томографії з контрастом діагностовані інтерстиційно-альвеолярний набряк легень, множинні остеолітичні Mts в кістках. Рентгенологічно кістки черепа без змін. На восьму добу перебування, незважаючи на проведену терапію, хворий помер.

Під час секції легені збільшені, виповнюють плевральні порожнини, прикривають перикард на 2/3, поверхня гладка сіро-рожева, усі відділи на розрізі зі зниженою повітряністю, дрібнозернисті, ущільнені, сіро-рожеві з «мармуровим малюнком», шматочки легень тонуть у фіксуючому розчині, при стисканні виділяється помірна кількість пінистої рідини через накопичення трансудату, обумовленого гіпергідратацією (рис.1Б). Стінки бронхів тонкі, з просвіту окремих виділяється невелика кількість слизистого ексудату. Серце звичайних розмірів, порожнини містять змішані згортки, помірно розширений правий шлуночок, міокард червоно-коричневого кольору, пружний.

Мікроскопічно в грудині, тілах хребців та клубовій кістці діагностовано гіперцелюлярний кістковий мозок за рахунок дифузних та вогнищевих скупчень атипових плазматичних клітин, які мали різні розміри, базofilьну цитоплазму. Частина таких клітин з наявними ядрцями (рис. 4). Кісткові балки стоншені, зони демінералізованого остеїду, хрящовий остеогенез, еритропоез

звужений, мієлопоез омолоджений, мегакаріоцити 3-4-5 в п/зору. В легенях тотальні відкладання кальцію в міжальвеолярних перетинках, набрякова рідина, окремі сидерофаги, десквамовані альвеолоцити та макрофаги в просвітах альвеол, дрібні крововиливи, поліпозні розростання пухкої сполучної тканини в альвеолах (за типом організованої пневмонії), зони емфізематозного розширення альвеол, в бронхах діагностована перехідноклітинна метаплазія епітелію (рис. 3). В серці дрібні кальцинати в лівому шлуночку, помірний набряк інтерстицію, нерівномірна гіпертрофія кардіоміоцитів, концентричний кальциноз середніх та дрібних епікардіальних судин. Мієломна хвороба з ураженням багатьох кісток ускладнилася нефропатією, дифузним метастатичним звапнінням в легенях і фокальним – в міокарді та судинах. Ниркова та легенево-серцева недостатність стала безпосередньою причиною смерті хворого.



Рис. 1 (А, Б). Легені збільшені, поверхня гладка сіро-рожева, всі частки на розрізі зі зниженою повітряністю, дрібнозернисті, ущільнені, сіро-рожеві з «мармуровим малюнком».

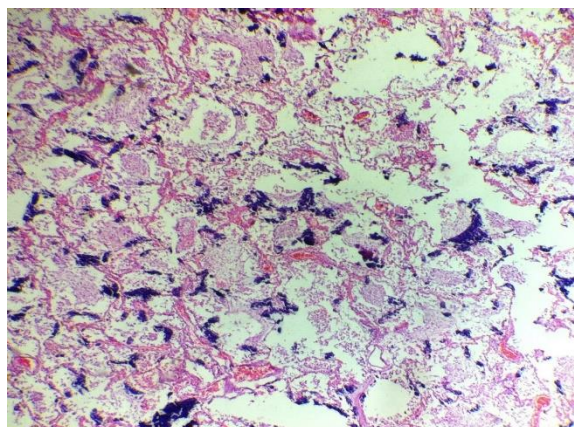


Рис. 2. Вогнищевий кальциноз в легенях з розвитком пневмофіброзу. Вдоль стінки альвеол спостерігалися базofilьні дрібнодисперсні кальцифікати. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 100$.

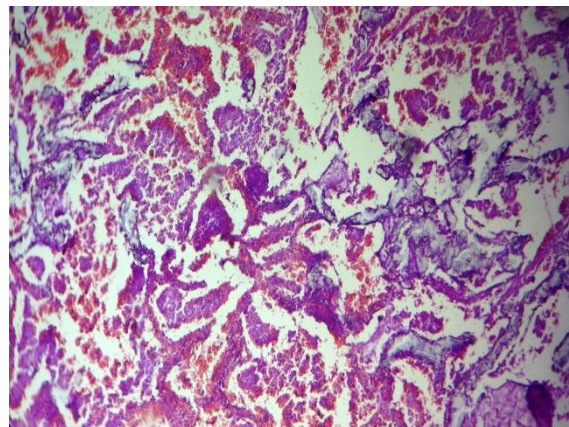


Рис. 3. Дифузний кальциноз в легенях з розвитком пневмофіброзу. Вдоль стінки альвеол спостерігалися дифузні базofilьні дрібнодисперсні кальцифікати, наявність фібрину і геморагій в альвеолах. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 400$.

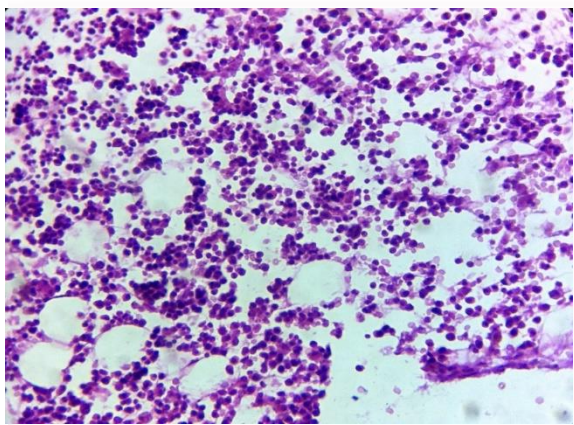


Рис. 4. Інфільтрація кісткового мозку клітинами мієломи. Забарвлення гематоксиліном та еозиним. $\times 200$.

Аналізуючи описані випадки в обох з них мала місце дифузна мієлома з типовими змінами в кістках та нирках, а також клінічно не ідентифіковане кальцифікуюче ураження легень, незважаючи на сучасні параклінічні методи. Зазначимо, що макроскопічна картина також не була однозначною з огляду на дрібні відкладання кальцію в інтерстиції без деформації чи збільшення органу. Разом з тим, метастатичне звапніння легень та міокарда як ускладнення мієломної хвороби було одним з вагомих чинників танатогенезу.

Дискусія

Множинна мієлома є злоякісним новоутворенням плазматичних клітин, і в пацієнтів, зазвичай, спостерігається інфільтрація кісткового мозку клональними плазматичними клітинами і порушення кровотворення. Діагноз множинної мієломи встановлюють, коли явне ураження органів пов'язане з проліферацією атипових плазматичних клітин, або коли наявні результати, які свідчать про високу ймовірність їх розвитку [18]. Ураження органів зрештою призводить до ниркової недостатності, пошкодження кісток і гіперкальціємії [2, 19].

Множинна мієлома в даний час не піддаєтьсявилікуванню, але лікування може подовжити загальну виживаність [20]. Аналіз 1000 пацієнтів із множинною мієломою, які отримували рекомендовану комбінацію леналідоміду, бортезомібу та дексаметазону, показав середню загальну виживаність приблизно 10,5 років [21]. В літературі описуються поодинокі і рідкісні випадки множинної мієломи з ураженням легень. Так, Kaburagi T. зі співавторами [22] навели випадок множинної мієломи з дифузним метастатичним кальцинозом легень. Пацієнтом був 60-річний чоловік з IgA-каппа-мієломою, у якого розвинулася ниркова недостатність і гіперкальціємія. Множинні невеликі вузлуваті тіні спостерігалися як на звичайних знімках грудної клітки, так і на знімках КТ. Хворий помер від прогресуючої дихальної недостатності. Патоморфологічне дослідження показало

легеневі інфільтрати та масивні легеневі кальцинати. Маленькі вузлуваті тіні були наслідком дифузних відкладень кальцію, які спостерігалися в альвеолярних базальних мембранах бронхіол і кровоносних судин і навколо них. Загальноприйнято вважати, що легеневи кальциноз не може бути виявлений за допомогою звичайних знімків грудної клітки, однак вузлуваті тіні, які спостерігалися у пацієнта, здаються патогномічними, і на думку авторів можуть вказувати на тяжкість кальцинозу [22].

Cirpa C. зі співавторами [23] представили також випадок метастатичної кальцифікації з гострою дихальною недостатністю при множинній мієломі. У 60-річної пацієнтки діагностовано мієлому легкого ланцюга, стадія ІА за Дюрі-Сальмоном і стадія ІІ за міжнародною системою визначення стадії. Пацієнтка отримувала лікування згідно з протоколом Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto (GIMEMA) (RV-MM-PI209 EUDRACT № 2007-001610-16). Не зважаючи на призначене лікування, у хворої швидко розвинулася гостра дихальна недостатність. Рентген грудної клітки показав двобічну інтерстиційно-альвеолярну щільність і паренхіматозні консолідації, які наступного дня переросли в повне помутніння обох легневих полів. Призначено в/в протівірусну та антибактеріальну терапію широкого спектру дії (іміпенем, лінезолід, левофлоксацин, ацикловір і ліпосомальний амфотерицин). Стан хворої швидко погіршувався, незважаючи на штучну вентиляцію легень у відділенні інтенсивної терапії. На 4 день у неї розвинулася поліорганна недостатність, і на 5 день після госпіталізації пацієнтка померла. Макроскопічно виявлено дифузно щільні та ригідні легені. Під час мікроскопії в альвеолярних перетинках діагностовано тонкі гематоксифільні шари або тонкі дифузні зернисті відкладення кальцію, що підтверджено фарбуванням за методом Косса. Крім того, спостерігалися вузькі кальцинати в стінках дрібних судин і бронхів. Невелика кількість альвеолярних просторів містила гранулоцити. Дифузне зернисте відкладення кальцію також можна було розпізнати в міокарді, тоді як ламінарні судинні кальцинати спостерігалися в кількох органах. Цікаво, що фіброз інтими, мікротромби та ішемічний некроз не виявлені. Усі ці ознаки відповідали метастатичній кальцифікації. У нирках спостерігалася нефропатія з відкладенням білкового матеріалу в каналцях, при чому гломерулопатії не виявлено. Кістковий мозок показав важку інфільтрацію атиповими плазматичними клітинами (60% загальної клітинної маси). Остеокласти були численними, вистилаючи кісткові трабекули, які локально демонстрували екстремальну реабсорбцію. Фокальний паратрабекулярний фіброз також був очевидним [23].

Хоча було зареєстровано кілька випадків легеневої метастатичної кальцифікації у пацієнтів,

які перебували на хронічному гемодіалізі [24], описано виняткові випадки легеневої метастатичної кальцифікації у пацієнтів, які не отримували замісну ниркову терапію [25, 26].

В літературі є повідомлення про випадок системної вісцеральної кальцифікації у пацієнта з діагностованою множинною мієломою, у якого виникла масивна метастатична кальцифікація легень, що імітувала двобічний інтерстиційний пневмоніт і спричинила гостру дихальну недостатність із летальним наслідком. У кістковому мозку найособливішою ознакою була гіперплазія остеокластів, що спричинила помітну реабсорбцію кісткової тканини за відсутності літичних уражень та гіперкальціємію. Патогенез метастатичної кальцифікації у пацієнта залишився в основному нез'ясованим. Гіперплазія остеокластів також була присутня під час діагностики, але по смерті в зразку вона стала різкою і була пов'язана з гістологічними ознаками важкого ураження кісткового мозку. Важко постулювати ятрогенний ефект лікування, особливо враховуючи, що леналідомід є новим імуномодуючим препаратом, ефективним при мієломі за допомогою кількох механізмів, включаючи інгібування остеокластогенезу [27].

Fukuta T. зі співавторами [10] також повідомляли про випадок множинної мієломи у пацієнта з термінальною стадією ниркової недостатності, в якого розвинулися кальцифікати судин і легень. У 51-річного чоловіка діагностовано множинну мієлому і нефропатію типу Бенс-Джонса, призначено підтримуючий гемодіаліз та хіміотерапію. Під час шостого циклу хіміотерапії стан хворого погіршився. Комп'ютерна томографія показала поширене централобулярне помутніння обидвох легень, дифузне відкладення кальцію у верхній області легень, що є типовим для метастатичного легеневого кальцинозу [10]. Проте за результатами інших авторів під час серії аутопсій вказувалося, що метастатична легенева кальцифікація спостерігалася у 60% (9/15) [28] і в 75% (42/56) [29] пацієнтів, які перебували на хронічному діалізі. Таким чином, було припущено, що хронічний діаліз несе високий ризик кальцифікації легень.

Для з'ясування зв'язку між множинною мієломою та метастатичною кальцифікацією легень було проведено пошук в PubMed за ключовими словами «множинна мієлома» та «метастатична кальцифікація легень» і, за даними Fukuta T. зі співавторами [10] встановлено, що у 92% пацієнтів з множинною мієломою була діагностована ниркова недостатність, у 90% розвинулася гіперкальціємія. Проте тільки у 28% пацієнтів підтверджено кальцифікацію як легень, так і судин, що вказує на те, що множинна мієлома, ймовірно, не відіграє першочергової ролі в метастатичній кальцифікації. Ризик метастатичної кальцифікації при множинній мієломі,

ймовірно, сильно пов'язаний із нирковою недостатністю, але не з самою множинною мієломою. Метастатична кальцифікація і метастатична легенева кальцифікація є рідкісним ускладненням у пацієнтів з множинною мієломою, навіть у пацієнтів з нирковою недостатністю. Однак клініцистам варто знати про цей стан, оскільки він може спричинити пошкодження органів або летальні наслідки [10].

Через розвиток вторинного імунodefіциту, який спостерігається у більшості пацієнтів із множинною мієломою, також збільшується захворюваність на пневмонії на пізніх етапах пухлинної прогресії у хворих з деформацією грудної клітки внаслідок наявності кісткових деструкцій та емфіземи легень. Імунodefіцит у цих пацієнтів сильно впливає на ризик інфікування, у свою чергу збільшуючи захворюваність і смертність навіть через роки після завершення лікування [30]. Дуже часто пневмонії при множинній мієломі набувають важкого, затяжного, рецидивуючого характеру, особливо за наявності хронічної ниркової недостатності. За даними Marcia Garpіsa [31], пацієнти з множинною мієломою хворіли на пневмонію в 13 разів частіше, ніж серед усього населення, а щодо важких інфекцій, таких як сепсис, частота приблизно в 30 разів більша. Дані порівняння пацієнтів, у яких діагностували мієлому в різні десятиліття, показали, що кумулятивна захворюваність на інфекцію зростає в останні десятиліття. З іншого боку, рівень смертності внаслідок інфекції був стабільним, ймовірно, завдяки кращій ефективності діагностичних та лікувальних заходів в області інфекційних захворювань [31]. Гістологічне дослідження легень виявляло чергування ділянок гострої та хронічної емфіземи, дистелектазів з групами альвеол, що містять застійно-запальний вміст (сегментоядерні, паличкоядерні нейтрофіли з домішкою макрофагів та злушеного епітелію). На великих ділянках просвіти альвеол та дрібних бронхів були заповнені фібрином.

У представлених нами випадках при гістологічному дослідженні легень у просвітах альвеол густа набрякова рідина, нитки фібрину, окремі сидерофаги, десквамовані альвеолоцити, макрофаги. Мали місце поширені крововиливи, фокальна круглоклітинна інфільтрація інтерстицію, емфізема, дистелектази, поліпозні розростання пухкої сполучної тканини в альвеолах (за типом організованої пневмонії), зони емфізематозного розширення альвеол, вогнища гнійної пневмонії, еритростази в мікрогемоциркуляторному руслі. У таких хворих пневмонія з легенево-серцевою недостатністю була безпосередньою причиною смерті. Необхідно відзначити, що в пацієнтів, які померли від множинної мієломи, при проведенні рентгенологічних методів дослідження за життя та посмертної гістологічної діагностики мієломною інфільтрації тканини легень не виявлено.

Підсумок

Метастатична кальцифікація і метастатична легенева кальцифікація є рідкісним ускладненням у пацієнтів з множинною мієломою, навіть у пацієнтів з нирковою недостатністю, проте даний стан може спричинити пошкодження органів або летальні наслідки. Діагноз вимагає узагальнення клінічних, лабораторних, рентгенологічних і гістологічних даних.

Аналізуючи описані випадки, в обох з них мала місце дифузна мієлома з типовими змінами в кістках та нирках, а також клінічно не ідентифіковане кальцифікуюче ураження легень, незважаючи на сучасні параклінічні методи. Макроскопічна картина не була однозначною з огляду на дрібні відкладання кальцію в інтерстиції без

деформації чи збільшення органу. Разом з тим, метастатичне звапніння легень та міокарда як ускладнення мієломної хвороби було одним з важких чинників танатогенезу.

Пневмонії з легенево-серцевою недостатністю часто є безпосередньою причиною смерті хворих на множинну мієлому.

Перспективи подальших досліджень

Проведення імуногістохімічних досліджень для кількісного визначення плазматичних клітин (CD138), фарбування на Ig каппа та лямбда для встановлення клональності плазмоцитів.

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. Brigle K, Verina D, Faiman B. A Focus on Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *J Adv Pract Oncol.* 2022;13(4):7-14. doi: 10.6004/jadpro.2022.13.5.10. Epub 2022 Jul 28. PMID: 35937466; PMCID: PMC9342925
2. Jurczynski A, Suska A. Multiple Myeloma. *Encycl. Biomed. Gerontol.* 2019, 2, 461–478. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11412-6>
3. Padala SA, Barsouk A, Barsouk A, Rawla P, Vakiti A, Kolhe R, Kota V, Ajebo GH. Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma. *Med Sci (Basel).* 2021;9(1):3. doi: 10.3390/medsci9010003. PMID: 33498356; PMCID: PMC7838784
4. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2020. <https://gco.iarc.fr/today>
5. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492
6. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD, /, based on November 2018 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2019. Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016.
7. [Bulletin of the National Cancer Registry No. 25 - Cancer in Ukraine, 2022–2023]. Ukrainian. http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_25/index.htm
8. Chakraborty R, Majhail NS. Treatment and disease-related complications in multiple myeloma: Implications for survivorship. *Am J Hematol.* 2020;95(6):672-690. doi: 10.1002/ajh.25764. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32086970; PMCID: PMC7217756
9. Vakiti A, Anastasopoulou C, Mewawalla P. Malignancy-Related Hypercalcemia. 2023 Apr 16. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. PMID: 29494030
10. Fukuta T, Tanaka T, Hashimoto Y, Omura H. The Relationship between Multiple Myeloma with Renal Failure and Metastatic Calcification. *Case Rep Hematol.* 2018;2018:7819792. doi: 10.1155/2018/7819792. PMID: 30026990; PMCID: PMC6031209
11. Leleu X, Masszi T, Bahlis NJ, Viterbo L, Baker B, Gimsing P, Maisnar V, Samoilova O, Rosiñol L, Langer C, Song K, Izumi T, Cleeland C, Berg D, Lin HM, Zhu Y, Skacel T, Moreau P, Richardson PG. Patient-reported health-related quality of life from the phase III TOURMALINE-MM1 study of ixazomib-lenalidomide-dexamethasone versus placebo-lenalidomide-dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma. *Am J Hematol.* 2018;93:985-993. doi: 10.1002/ajh.25134. Epub ahead of print. PMID: 29726031
12. Morgan AE, Smith WK, Levenson JL. Reversible dementia due to thalidomide therapy for multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2003;348(18):1821–1822. doi: 10.1056/NEJM200305013481822. PMID: 12724497
13. McCarthy PL, Holstein SA, Petrucci MT, Richardson PG, Hulin C, Tosi P, Brinchen S, Musto P, Anderson KC, Caillot D, Gay F, Moreau P, Marit G, Jung SH, Yu Z, Winograd B, Knight RD, Palumbo A, Attal M. Lenalidomide Maintenance After Autologous Stem-Cell Transplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Meta-Analysis. *J Clin Oncol.* 2017;35(29):3279-3289. doi: 10.1200/JCO.2017.72.6679. Epub 2017 Jul 25. PMID: 28742454; PMCID: PMC5652871

14. Kristinsson SY, Pfeiffer RM, Björkholm M, Goldin LR, Schulman S, Blimark C, Mellqvist UH, Wahlin A, Turesson I, Landgren O. Arterial and venous thrombosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma: a population-based study. *Blood*. 2010;115(24):4991-4998. doi: 10.1182/blood-2009-11-252072. PMID: 20299513; PMCID: PMC2890150
15. Cornell RF, Ky B, Weiss BM, Dahm CN, Gupta DK, Du L, Carver JR, Cohen AD, Engelhardt BG, Garfall AL, Goodman SA, Harrell SL, Kassim AA, Jadhav T, Jagasia M, Moslehi J, O'Quinn R, Savona MR, Slosky D, Smith A, Stadtmauer EA, Vogl DT, Waxman A, Lenihan D. Prospective Study of Cardiac Events During Proteasome Inhibitor Therapy for Relapsed Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2019;37(22):1946-1955. doi: 10.1200/JCO.19.00231. Epub 2019 Jun 12. PMID: 31188726; PMCID: PMC9798911
16. Waxman AJ, Clasen S, Hwang WT, Garfall A, Vogl DT, Carver J, O'Quinn R, Cohen AD, Stadtmauer EA, Ky B, Weiss BM. Carfilzomib-Associated Cardiovascular Adverse Events: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2018;4(3):e174519. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.4519. Epub 2018 Mar 8. PMID: 29285538; PMCID: PMC5885859
17. Friman V, Winqvist O, Blimark C, Langerbeins P, Chapel H, Dhalla F. Secondary immunodeficiency in lymphoproliferative malignancies. *Hematol Oncol*. 2016;34(3):121-132. doi: 10.1002/hon.2323. Epub 2016 Jul 12. PMID: 27402426
18. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, van Duin M, Sonneveld P, Mateos MV, Gay F, Anderson KC. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17046. doi: 10.1038/nrdp.2017.46. PMID: 28726797
19. Michels TC, Petersen KE. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*. 2017;95(6):373-383. PMID: 28318212. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2017/0315/p373.html>
20. Röllig C, Knop S, Bornhäuser M. Multiple myeloma. *Lancet*. 2015;385(9983):2197-2208. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60493-1. Epub 2014 Dec 23. PMID: 25540889
21. Cowan AJ, Green DJ, Kwok M, Lee S, Coffey DG, Holmberg LA, Tuazon S, Gopal AK, Libby EN. Diagnosis and Management of Multiple Myeloma: A Review. *JAMA*. 2022;327(5):464-477. doi: 10.1001/jama.2022.0003. PMID: 35103762
22. Kaburagi T, Nagai H, Sasaki T, Oka T, Yoneda R, Mouri M. [Case report of multiple myeloma associated with diffuse pulmonary calcinosis]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*. 1991;29(11):1479-1483. Japanese. PMID: 1770690
23. Crippa C, Ferrari S, Drera M, Tardanico R, Ungari M, Facchetti F, Cancarini G, Rossi G. Pulmonary calciphylaxis and metastatic calcification with acute respiratory failure in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2010;28(9):e133-135. doi: 10.1200/JCO.2009.25.1587. Epub 2010 Jan 4. PMID: 20048175
24. Li YJ, Tian YC, Chen YC, Huang SF, Huang CC, Fang JT, Yang CW. Fulminant pulmonary calciphylaxis and metastatic calcification causing acute respiratory failure in a uremic patient. *Am J Kidney Dis*. 2006;47(4):e47-53. doi: 10.1053/j.ajkd.2005.11.033. PMID: 16564932
25. Couto FM, Chen H, Blank RD, Drezner MK. Calciphylaxis in the absence of end-stage renal disease. *Endocr Pract*. 2006;12(4):406-410. doi: 10.4158/EP.12.4.406. PMID: 16901796
26. Feng J, Gohara M, Lazova R, Antaya RJ. Fatal childhood calciphylaxis in a 10-year-old and literature review. *Pediatr Dermatol*. 2006;23(3):266-272. doi: 10.1111/j.1525-1470.2006.00232.x. PMID: 16780477
27. Breitkreutz I, Raab MS, Vallet S, Hideshima T, Raje N, Mitsiades C, Chauhan D, Okawa Y, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC. Lenalidomide inhibits osteoclastogenesis, survival factors and bone-remodeling markers in multiple myeloma. *Leukemia*. 2008;22(10):1925-1932. doi: 10.1038/leu.2008.174. PMID: 18596740
28. Conger JD, Hammond WS, Alfrey AC, Contiguglia SR, Stanford RE, Huffer WE. Pulmonary calcification in chronic dialysis patients. Clinical and pathologic studies. *Ann Intern Med*. 1975;83(3):330-336. doi: 10.7326/0003-4819-83-3-330. PMID: 1190631
29. Kuzela DC, Huffer WE, Conger JD, Winter SD, Hammond WS. Soft tissue calcification in chronic dialysis patients. *Am J Pathol*. 1977;86(2):403-424. PMID: 836675; PMCID: PMC2032079
30. Allegra A, Tonacci A, Musolino C, Pioggia G, Gangemi S. Secondary Immunodeficiency in Hematological Malignancies: Focus on Multiple Myeloma and Chronic Lymphocytic Leukemia. *Front Immunol*. 2021;2:738915. doi: 10.3389/fimmu.2021.738915. PMID: 34759921; PMCID: PMC8573331
31. Marcia Garnica. Multiple myeloma and infection: this association is still close. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2019;41(4):281-82. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2019.09.002>

Волос Л.І., Столяр Г.Л. Множинна мієлома, асоційована з дифузним легеневим кальцинозом: патоморфологічне дослідження.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Множинна мієлома – це агресивне лімфопроліферативне захворювання з дискразією плазматичних клітин, із симптомами, пов'язаними з інфільтрацією кісткового мозку, порушенням кровотворення або ураженням органів, що зрештою призводить до ниркової недостатності, ураження кісток, гіперкальціємії і метастатичної кальцифікації. Як і для всіх лімфатичних пухлин, для множинної мієломи характерний розвиток вторинного імунodefіциту. Синдром недостатності антитіл є причиною підвищеної схильності хворих до бактеріальних інфекцій, насамперед з боку бронхолегеневої системи.

Мета. Вивчити характер патоморфологічних змін в легенях у хворих, які померли від множинної мієломи, і встановити зв'язок між множинною мієломою з нирковою недостатністю та метастатичним кальцинозом.

Методи. Проведене патоморфологічне дослідження автопсійного матеріалу двох випадків померлих осіб, у яких за життя діагностовано множинну мієлому. За даними автопсій вивчені морфологічні зміни у внутрішніх органах, з акцентом на зміни в легенях. Детально дослідженні нирки, кістковий мозок в грудині, тілах хребців та клубовій кістці. **Результати.** Представлено два випадки множинної мієломи, асоційованої з дифузним легеневим кальцинозом, у пацієнтів, в яких ниркова та легенево-серцева недостатність стали безпосередньою причиною смерті. Мієломна хвороба з ураженням багатьох кісток ускладнилася нефропатією, дифузним метастатичним звапнінням в легенях і фокальним – в міокарді та судинах. В легенях виявлено дифузно-вогнищеві відкладання кальцію в інтерстиції та міжальвеолярних перетинках, численні інтраальвеолярні поліпозні розростання пухкої сполучної тканини (за типом організованої пневмонії), фокуси карніфікації. У просвітах альвеол густа набрякова рідина, нитки фібрину, окремі сидерофаги, десквамовані альвеолоцити, макрофаги. Мають місце поширені крововиливи, фокальна круглоклітинна інфільтрація інтерстицію, емфізема, дистелектази, вогнища гнійної пневмонії, еритростази в мікрогемоециркуляторному руслі. **Підсумок.** Метастатична кальцифікація і метастатична легенева кальцифікація є рідкісним ускладненням у пацієнтів з множинною мієломою, навіть у пацієнтів з нирковою недостатністю. Ризик метастатичної кальцифікації при множинній мієломі, ймовірно, сильно пов'язаний із нирковою недостатністю.

Ключові слова: множинна мієлома, гістопатологія легень, легеневі ускладнення, метастатична легенева кальцифікація, вторинний імунodefіцит, пневмонії.

Bobr A. M.

National Pirogov Memorial
Medical University
Vinnytsya, Ukraine

Надійшла: 21.10.2024
Прийнята: 07.12.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.15-21>

UDC: 61:612.1:615.9.616.1:616-099

ANALYTICAL AND QUANTITATIVE ASSESSMENT OF THE CONDITION OF THE HEART WALL OF RATS EXPOSED TO THE VENOM OF THE VIPERS VIPERA BERUS BERUS AND VIPERA BERUS NIKOLSKII

Bobr A.M.  Analytical and quantitative assessment of the condition of the heart wall of rats exposed to the venom of the vipers *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*.

National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ukraine.

ABSTRACT. Background. A significant number of factors of both physical and chemical origin can have a negative impact on the organs of the cardiovascular system. At the same time, implementing the damaging effect of factors of various genesis consists not only of changes in the normal functioning of the heart but also in the launch of complex pathogenetic mechanisms that cause pronounced structural changes in the organ, which are sometimes irreversible. **Objective.** The aim of the study is an analytical and quantitative assessment of the heart wall of rats exposed to the venom of the vipers *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*. **Methods.** Experimental studies were conducted on white nonlinear male rats. The animals were conditionally divided into control and experimental groups, ten individuals each. Experimental rats were intraperitoneally administered a semi-lethal dose (LD_{50}) ($1.576 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) of the venom of *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii* in saline. The animals of the control group were intraperitoneally injected with saline only. Rats were removed from the experiment 24 hours after exposure to the poison and anaesthetised by cervical dislocation. Heart samples were taken for microscopic examination. Material fixation and preparation of paraffin blocks were carried out according to generally accepted methods. Histological preparations of the heart were stained with Picro Sirius Red/Fast Green and hematoxylin-eosin. For a detailed assessment of the effect of the venom of two species of vipers on the general condition of the rat heart, we compared absolute and relative variables, which were measured and calculated, respectively, using Fiji: ImageJ program, between the control and both experimental groups exposed to the venom of the vipers *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*. Statistical processing was carried out using the Excel program with subsequent construction of graphs to visualise the results obtained. **Results and conclusion.** According to the data of morphometric studies, a more pronounced harmful effect of the venom of *Vipera berus nikolskii* was established, which was manifested in the violation of the structure and shape, oedema of cardiomyocytes, which led to significantly higher indicators of the width of these cells both in comparison with the control group and with the second experimental group. In addition, the action of both venoms, albeit to different degrees, led to the growth of connective tissue elements within the endomysium, which was reflected in an increase in the indicator of the proportion of this tissue in the myocardium. The venoms of both vipers provoked an increase in the proportion of connective tissue in the myocardium; however, against the background of oedema of muscle cells, the relative increase in the area of endomysium to them shows a tendency to increase but is not reliable.

Key words: vipers, venom, heart, sarcoplasm, muscle fibres, rats.

Citation:

Bobr AM. Analytical and quantitative assessment of the condition of the heart wall of rats exposed to the venom of the vipers *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*. *Morphologia*. 2024;18(4):15-21.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.15-21>

 Bobr A. M. 0000-0003-3657-2302

✉ annabobr020@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Introduction

A significant number of factors of both physical and chemical origin can have a negative impact on the organs of the cardiovascular system. At the same time, the implementation of the damaging effect of factors of various genesis consists not only of changes in the normal functioning of the heart but also in the launch of complex pathogenetic mechanisms that cause pronounced structural changes in the organ, which are sometimes irreversible [1, 2]. That is why a comprehensive study and generalisation of the features and pathways of damage to the cardiovascular system is critical.

Cardiotoxicity and pronounced electrocardiographic changes are frequent complications of snake bites [3, 4, 5]. The most common are sinus arrhythmia, atrioventricular block and sinus bradycardia. Cases of snake bites of the Viperidae family are often associated with pathologies such as myocardial infarction and ischemic stroke, which arise as a result of activation of the coagulation cascade of blood coagulation and direct cardiotoxicity of proteolytic enzymes of the venom, in particular SVMP (snake venom metalloproteinases). Also, their toxins' components cause hypofibrinogenemia, damage to the vascular endothelium and impaired platelet aggregation [6, 7, 8, 9]. According to the literature, the pathogenesis of myocardial infarction in the bites of snakes of the Viperidae family also includes impaired oxygen supply to cardiomyocytes due to excessive hemolysis of erythrocytes, vasoconstriction of coronary vessels due to significant production of endothelin and the effect of aflatoxins of the venom. Scientists note that the development of myocarditis with pronounced necrosis of contractile myocytes, haemorrhages and accumulation of blood clots in the vessels of the microcirculatory bed of the heart muscle is possible [10, 11, 12].

Cobra cardiotoxins cause impaired contractility, depolarisation and contracture of the heart muscle. It has been established that when they affect the papillary muscle of the heart of guinea pigs, they exhibit a transient positive inotropic effect accompanied by the development of tonic contraction. Studies of the mechanisms of action of cobra cardiotoxin show that in cardiomyocytes, they cause an increase in Ca^{2+} ions, a change in their shape, hypercontracture, and destruction of the plasmalemma. The latter fact is associated with the ability of cardiotoxin to interact with cell membrane lipids. At the same time, the characteristic features of this interaction depend on the type of toxin – P or S. The P-type contains proline at position 30 of the amino acid sequence; the S-type contains a serine residue at position 28. There is evidence that both types cause destabilisation of the lipid bilayer of cardiomyocyte cell membranes but with different intensities [13, 14]. The features of the cardiotoxic effect of snake venom, especially of the Viperidae family, on the heart muscle's structural organisation and functional properties have not yet been

elucidated. Experimental data available in scientific databases are few and do not fully reveal the picture of pathological changes. Since the problem of snake bites is steadily growing every year worldwide, studying the effect of viper venom toxins on the organs of the cardiovascular system is an important task today.

The study aims to analytically and quantitatively assess the condition of the heart wall of rats exposed to the venom of the vipers *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*.

Materials and methods

Experimental studies were conducted on white, non-linear male rats. For preliminary acclimatisation, the animals were kept in the Taras Shevchenko National University of Kyiv animal facility for 7 days and then in laboratory conditions in compliance with temperature and light regimes. Rats received standard food and water ad libitum. All experiments were conducted following the Recommendations of the National Institute of Health for the Care and Use of Laboratory Animals and the European Council Directive of November 24, 1986 on the Care and Use of Laboratory Animals (86/609/EEC). The studies were approved and confirmed by the Bioethics Commission of the National Scientific Center "Institute of Biology and Medicine" of Taras Shevchenko National University of Kyiv (protocol No. 2 dated 08/19/2021). Viper venom *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii* were obtained from V. N. Karazin Kharkiv National University. Lyophilised native venom was stored at -20°C and dissolved in saline immediately before the experiment.

The animals were conditionally divided into control and experimental groups of ten individuals. In saline, experimental rats were intraperitoneally injected with a semi-lethal dose (LD_{50}) ($1.576 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) of *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii* venom. Animals in the control group were intraperitoneally injected with saline only. Rats were removed from the experiment 24 hours after exposure to the venom and euthanised by cervical dislocation.

For a detailed assessment of the effect of the venom of two species of vipers on the general condition of the rat heart, we compared absolute and relative variables, which were measured and calculated, respectively, using Fiji: ImageJ program, between the control and both experimental groups exposed to the venom of the vipers *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*.

The width of cardiomyocytes in the myocardium was measured. To increase the accuracy of the measurements, the width of heart muscle cells was estimated at a magnification of $\times 1000$ on digital images of preparations stained with eosin and hematoxylin. The width of the fibres was measured in microns and compared between three groups of rats. In each, the width of 4 random fibres was measured in 20 different "fields of view" - digital images taken in other parts of the organ. Thus, we had 80 measurements for the control and both experimental groups.

When photographing, a 0.01 mm scale was applied to the image to correctly establish the relationship between the points of the digital image and the micrometres.

The second parameter we chose for quantitative assessment and analytical analysis was the ratio of the area of the endomysium present between the myocardial fibres to the area of the fibres themselves. To perform these measurements, we used digital images of preparations stained using the Picrosirius Red method, which leads to the colouring of collagen fibres in red and cardiomyocytes in green. This creates a colour contrast sufficient for applying thresholds in Fiji: ImageJ program, filtering out one colour using these thresholds and measuring the area occupied by the other. Measurements were performed on images of

preparations taken at a magnification of $\times 1000$.

We measured the area of the endomysium in μm^2 . We calculated the percentage of the area occupied by the connective tissue element relative to the entire preparation area using Fiji: ImageJ program.

Statistical processing was carried out in Excel with subsequent construction of graphs to visualise the results.

Results and conclusion

Since when checking the measurements from the control and both experimental groups for normal distribution, the graphs did not correspond to a Gaussian curve; we used the nonparametric Mann-Whitney test to determine the significance of the differences between the groups.

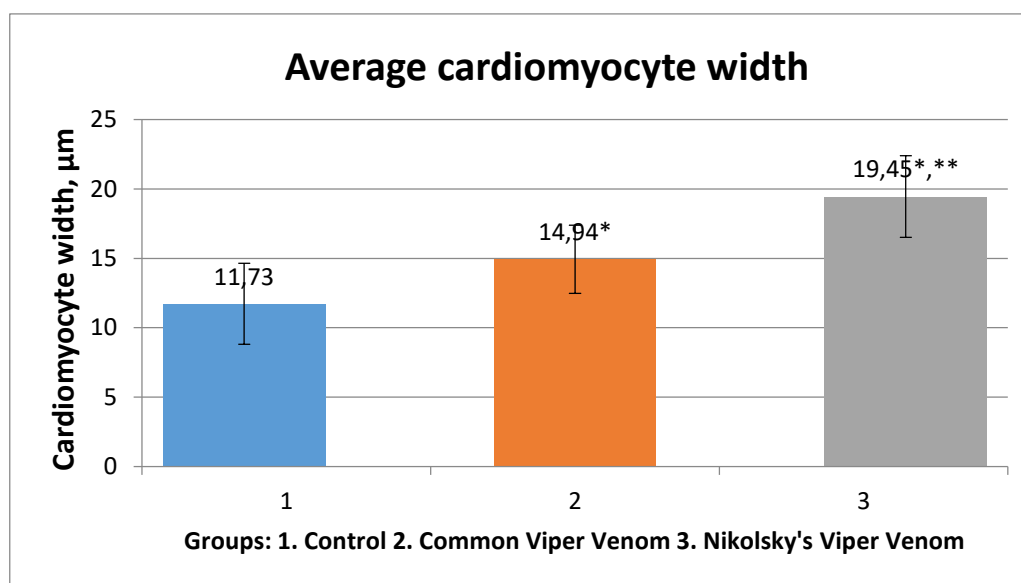


Fig. 1. The average value of the width of cardiomyocytes in the control group, the group introducing *Vipera berus berus* venom and *Vipera berus nikolskii*. * - The difference from the control group is significant at $p \leq 0.05$, ** - the difference from the group with the introduction of *Vipera berus berus* venom is significant at $p \leq 0.05$.

According to our measurements, a significant difference in the width of cardiac muscle cells was found not only between the control group and rats from the groups exposed to the venom of both species of vipers (*Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*) but also between these two experimental groups (Fig. 1).

If the average value of this indicator for the control group is 11.72985 μm (first quartile 9.76525 μm ; third quartile 12.6685 μm), then for the group whose animals were exposed to the venom of *Vipera berus berus*, it is 14.93661 μm (first quartile 13.07675 μm ; third quartile 16.49025 μm). A significant expansion of cardiomyocytes in this experimental group relative to the control is a logical consequence of the venom's effect on the heart's structures. It is fully correlated with morphological changes in this organ.

When describing the condition of the heart of animals from the experimental group exposed to the venom of the Common Viper, oedema was observed

in the muscle fibres, which was probably caused by vacuolisation of the sarcoplasm. The effect of toxic substances causes microcirculation disorders already 3 hours after the external poisonous effect on the organ, which, in turn, leads to acute myocardial hypoxia, which is morphologically expressed in vacuolisation of the sarcoplasm, probably due to the expansion of the internal lumen of the smooth endoplasmic reticulum and oedema of lysosomes in an attempt to fight toxins that have entered the cell cytoplasm. In addition, we noted a violation of the shape of cardiomyocytes, which could not be reflected in their diameter. If in the control group, cardiomyocytes were characterised by clear boundaries and a regular rectangular shape, under the influence of the venom, a loss of the rectangular shape, irregularity and roundness, and convexity of the contours were noted. Such changes in cell shape are quantitatively reflected in increased width.

In addition, during the morphological description of cardiomyocytes, a violation of myocardial striation was noticeable, which indicates a violation in the cytoplasm associated with the regular and clear organisation of actin and myosin fibres - the stratification of these structures also increases the volume of the cytoplasm, and, accordingly, the width of the cell.

If we talk about the surface complex of cells, then the morphological study showed local areas of destruction of the sarcolemma, which is an essential factor in limiting and structuring the cytoplasm. When the structure of the sarcolemma, the precise organisation of actin and myosin fibres, is disturbed, the sarcoplasmic reticulum cisterns likely expand; all these factors together affect the increase in the size of cardiomyocytes, which is reflected in the results of our measurements.

Pronounced pathological changes in the heart wall of rats from the experimental group exposed to the venom of the viper *Vipera berus nikolskii* are reflected in both the results of morphological and morphometric studies (Fig. 1). The average width of cardiomyocytes of animals exposed to the venom of this species of a viper is $19.45278\ \mu\text{m}$ (first quartile $17.18925\ \mu\text{m}$; third quartile $21.22775\ \mu\text{m}$) - significantly greater not only than the parameters of the control group but also statistically significantly different from the width of these cells in animals from the group exposed to the venom of the common viper. This indicates a powerfully destructive effect of the studied venom, which enhances the processes of oedema, disorganisation of intracellular structures and the surface apparatus of cardiomyocytes.

In particular, muscle fibres in preparations from this group were more fragmented and disoriented in the plane than in the other experimental group. They thickened, swelled and acquired a tortuous shape. Uneven staining of myocardial fibres, revealed during morphological description, also indicates the development of oedema processes in the sarcoplasm. Striation, and therefore the organisation of intracellular fibres, was finally lost, the fibres were stratified, and the sarcolemma was no longer partially damaged but in places completely absent. All these morphological signs indicate a more pronounced course of oedema, destruction and necrosis processes in cardiomyocytes of animals from this group, which numerically resulted in a significant increase in their size and width. Thus, we can speak of a morphometrically confirmed effect of the venom of the Nikolsky Viper, which in its negative effect surpassed the other studied venom, which resulted in a statistically significant increase in the width of myocardial fibres relative to not only the control but also the second experimental group with the introduction of venom in our study.

To quantitatively assess the condition of the heart wall of rats exposed to the poison, we chose to measure the area occupied by endomysium in cross-sections because it is this connective tissue that directly surrounds the heart muscle fibres and, together

with them, reacts to adverse external influences. Moreover, it acts as a barrier on the path of toxic substances directly to cardiomyocytes because it contains the vessels of the microcirculatory bed that carry all substances to and from the heart cells. For an adequate and accurate quantitative assessment of the fate of the endomysium, digital images of sections stained with Picrosirius red were used because this dye is considered the standard for detecting collagen and its quantitative assessment in histological sections of normal and abnormal tissues.

The quantitative assessment of the endomysium area in sections showed a statistically significant increase in both experimental groups compared to the control group (Fig. 2, 3), which confirms the results of morphometric studies of myocardial tissues. In particular, in the experimental groups, an activation of the synthetic activity of fibroblasts was noted, as evidenced by their high nuclear-cytoplasmic index. Such activity led to increased collagen production in the surrounding matrix, forming a network of fibres between cardiomyocytes - we measured its area within the endomysium.

In the control group, the mean endomysial area was $2513.25\ \mu\text{m}^2$ (first quartile $1886.422\ \mu\text{m}^2$; third quartile $3018.703\ \mu\text{m}^2$), while for the group exposed to *Vipera berus berus* venom, it was $5119.338\ \mu\text{m}^2$ (first quartile $4013.16\ \mu\text{m}^2$; third quartile $6234.56\ \mu\text{m}^2$). This figure is statistically significantly higher than the control group, which is explained by several aspects.

Firstly, as already mentioned, morphological evidence of increased synthetic activity of fibroblasts indicates collagen production within the endomysium. Secondly, during the morphological study of the myocardium of this experimental group, the thickening of the vessel wall, growth of the adventitia of both veins and arteries, which are formed by loose connective tissue, which is woven into the surrounding connective tissue with its collagen fibres, was noted. Accordingly, this also generally leads to an increase in the area of the endomysium within which they lie. Thirdly, the toxic effect of the poison causes the development of oedema processes not only in cardiomyocytes but also in the elements of the endomysium and the walls of the vessels in its composition, their perfusion, loosening and oedema of the intima. Congestive phenomena in the venous system of the myocardium are also morphometrically reflected in a decrease in the part of the area occupied directly by cardiomyocytes to the location of the connective tissue with the vessels included in it.

The average width of cardiomyocytes of animals exposed to the venom of the Nikolsky Viper is $7112.648\ \mu\text{m}^2$ (first quartile $6346.12\ \mu\text{m}^2$; third quartile $8137.129\ \mu\text{m}^2$) - significantly more significant than the corresponding indicator of the control group, while no significant difference in this indicator was observed between the two experimental groups.

These data correspond to our observations of the morphological state of the myocardium of rats from these

groups.

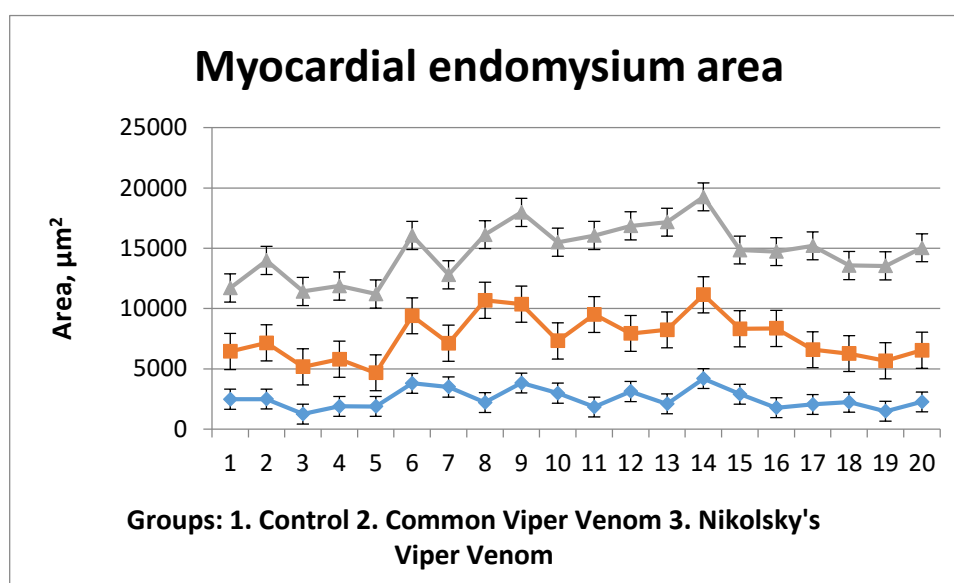


Fig. 2. Individual indicators of the area of endomysium in the myocardium of animals from the control and experimental groups with standard deviation. Row 1 – control group; row 2 – a group introducing the venom of the viper *Vipera berus berus*; row 3 – a group introducing the venom of the *Vipera berus nikolskii*.

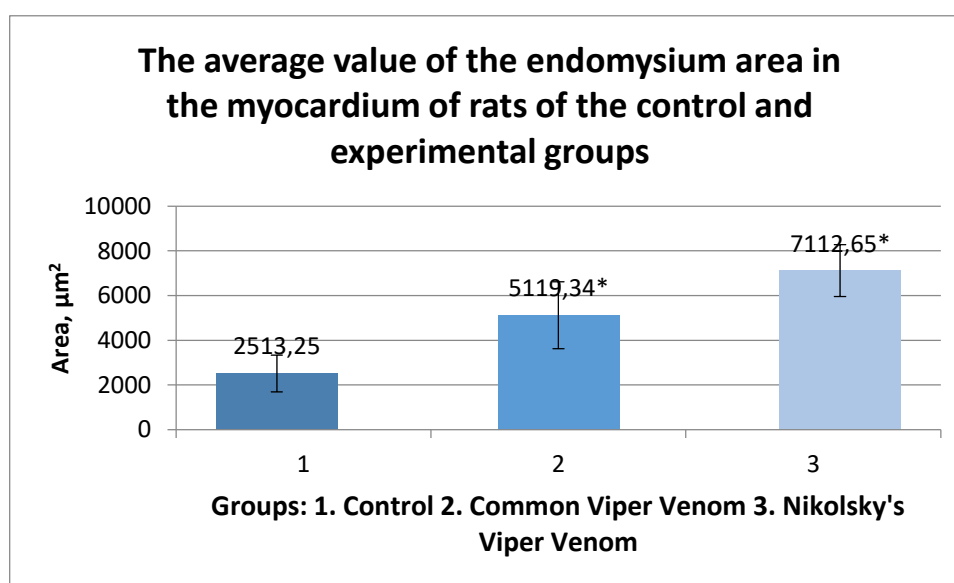


Fig. 3. The average value of the endomysium area of the heart myocardium in the control group, the group with the introduction of *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii* venom. * - The difference from the control group is significant at $p \leq 0.05$.

In particular, this experimental group's foci of necrosis and myocytolysis are surrounded by zones of significant myocardial tissue oedema. The collagen fibres, which we visualised using Picrin red and measured, were added to the total area of connective tissue, as were the adventitia of the vessels, in which collagenisation was noted during the morphological examination. The vessels were dilated and full of blood, increasing their area.

It is important to note that both connective tissue

and muscle components of the myocardium are subject to oedema; during the morphological study, we saw a rounded shape and numerous intracellular edemas in them. The nuclei of cardiomyocytes swelled and lost their elongated shape, reflecting a change in the cells' shape. This is also reflected in the statistical data - the absolute values of the endomysium area in both experimental groups are significantly larger than the control; at the same time, the percentage ratio of the area of connective tissue to the total area of the section is not considerably more significant, although

it shows a tendency to increase (Table 1). The fragmentation of cardiomyocytes noted by us during the morphological description of myocardial tissues, which was accompanied by a violation of the integrity of the sarcolemma of these cells, also necessarily led to an increase in their area.

This suggests that, against the background of specific activation of fibroblasts and a corresponding

increase in the content of collagen and other connective tissue elements in the extracellular matrix, various factors increasing the area index, in particular oedema, delamination of structures and distortion of their shape, uniformly affect both the connective tissue components of the endomysium and the cardiomyocytes themselves.

Table 1

Indicators of the average endomysium fraction in the myocardium of rats from the control and experimental groups

Group	Control Group	Experimental group with common viper venom	Experimental group with Nikolskii viper venom
Average value and standard deviation, %	10,56±3,47	21,51±6,28	29,88±4,88

Summary

According to the data of morphometric studies, a more pronounced harmful effect of the venom of *Vipera berus nikolskii* was established, which was manifested in the violation of the structure and shape, oedema of cardiomyocytes, which led to significantly higher indicators of the width of these cells both in comparison with the control group and with the second experimental group. In addition, the action of both venoms, albeit to different degrees, led to the growth of connective tissue elements within the endomysium, which was reflected in an increase in the indicator of the proportion of this tissue in the myo-

cardium. The venoms of both vipers provoked an increase in the proportion of connective tissue in the myocardium; however, against the background of oedema of muscle cells, the relative increase in the area of endomysium to them shows a tendency to increase but is not reliable.

Prospects for further development related to the study of ultrastructural changes in the heart wall of rats exposed to the venom of the vipers *Vipera berus* and *Vipera berus nikolskii*.

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. Bocian A, Urbanik M, Hus K, Łyskowski A, Petrilla V, Andrejčáková Z, et al. Proteome and peptidome of *Vipera berus berus* venom. *Molecules*. 2016;21(10):1398. Doi: 10.3390/molecules21101398
2. Chan YS, Cheung RCF, Xia L, Wong JH, Ng TB, Chan WY. Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(14):6165-6181. Doi: 10.1007/s00253-016-7610-9
3. Li F, Shrivastava IH, Hanlong P, Dagda RK, Gasanoff ES. Molecular mechanism by which cobra venom cardiotoxins interact with the outer mitochondrial membrane. *Toxins (Basel)*. 2020;12(7):425. Doi: 10.3390/toxins12070425
4. Razok A, Shams A, Yousaf Z. Cerastes cerastes snakebite complicated by coagulopathy and cardiotoxicity with electrocardiographic changes. *Toxicol*. 2020;188:1-4. Doi: 10.1016/j.toxicol.2020.10.003
5. Sunil KK, Joseph JK, Joseph S, Varghese AM, Jose MP. Cardiac involvement in vasculotoxic and neurotoxic snakebite – a not so uncommon complication. *J Assoc Physicians India*. 2020;68(11):39-41. PMID: 33187035
6. Averin AS, Utkin YuN. Cardiovascular effects of snake toxins: cardiotoxicity and cardioprotection. *Acta Naturae*. 2021;13(3):4-14. Doi: 10.32607/actanaturae.11375
7. López-Dávila AJ, Weber N, Kraft T, Matinmehr F, Arias-Hidalgo M, Fernández J, et al. Cytotoxicity of snake venom Lys49 PLA₂-like myotoxin on rat cardiomyocytes ex vivo does not involve a direct action on the contractile apparatus. *Sci Rep*. 2021;11(1):19452. Doi: 10.1038/s41598-021-98594-5
8. Variawa S, Buitendag J, Marais R, Wood D, Oosthuizen G. Prospective review of cytotoxic snakebite envenomation in a paediatric population. *Toxicol*. 2021;190:73-78. Doi: 10.1016/j.toxicol.2020.12.009
9. Virmani S, Bhat R, Rao R, Kapur R, Dsouza S. Paroxysmal atrial fibrillation due to venomous snake bite. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(6):OD01-OD02. Doi: 10.7860/JCDR/2017/27553.9971
10. Binu AJ, Mishra AK, Gunasekaran K, Iyadurai R. Cardiovascular manifestations and patient outcomes following snake envenomation: a pilot study. *Trop Doct*. 2019;49(1):10-13. Doi: 10.1177/0049475518814019

11. Kariyanna PT, Jayarangaiah A, Kamran H, Schechter J, Soroka S, Amarnani A, et al. Myocardial infarction after snakebite envenomation: a scoping study. *Scifed J Cardiol*. 2018;2(3):21. ISSN:XXXX-XXXX SFJC

12. Simpson CH, Richardson WH, Swartzentruber GS, Lloyd VJ. ST segment elevation myocardial infarction following a *Crotalus horridus* envenomation. *Wilderness Environ Med*. 2018;29(3):383-387. Doi: 10.1016/j.wem.2018.02.010

13. Canas CA, Castro-Herrera F, Castano-Valencia S. Clinical syndromes associated with Viperidae family snake envenomation in southwestern Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2021;115(1):51-56. Doi: 10.1093/trstmh/traa081

14. Di Nicola MR, Pontara A, Kass GEN, Kramer NI, Avella I, Pampena R, et al. Vipers of major clinical relevance in Europe: Taxonomy, venom composition, toxicology and clinical management of human bites. *Toxicology*. 2021;453:152724. Doi: 10.1016/j.tox.2021.152724

Бобр А.М. Аналітична і кількісна оцінка стану стінки серця щурів при впливі отрути гадюк *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Значна кількість факторів як фізичного, так і хімічного походження можуть чинити негативний вплив на органи серцево-судинної системи. При цьому, реалізація пошкоджуючої дії чинників різного генезу полягає не лише в змінах нормального функціонування серця, але і в запуску складних патогенетичних механізмів, що стають причиною виражених структурних перебудов органу, які подекуди носять незворотній характер. **Мета.** Метою дослідження є аналітична і кількісна оцінка стану стінки серця щурів при впливі отрути гадюк *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*. **Методи.** Експериментальні дослідження проводили на білих нелінійних щурах самцях. Тварин умовно розподіляли на дві групи – контрольну і дослідну по 10 особин в кожній. Дослідним щурам внутрішньоочеревинно вводили напівлетальну дозу (LD_{50}) ($1.576 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$) отрути *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* на фізіологічному розчині. Тваринам контрольної групи внутрішньоочеревинно вводили лише фізіологічний розчин. Виводили щурів з експерименту через 24 години після впливу отрути, знеживлюючи шляхом цервікальної дислокації. Для мікроскопічного дослідження забирали зразки серця. Фіксацію матеріалу та приготування парафінових блоків проводили за загальноприйнятими методиками. Фарбування гістологічних препаратів серця здійснювали Picro Sirius Red/Fast Green та гематоксилін-еозином. Для детальної оцінки дії отрути двох видів гадюк на загальний стан серця щурів нами було проведено порівняння абсолютних і відносних змінних, які було виміряно і підраховано відповідно, за допомогою програми Fiji:ImageJ, між контрольною та обома експериментальними групами, що піддавались дії отрут гадюк *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*. Статистична обробка з подальшою побудовою графіків для візуалізації одержаних результатів проводилась у програмі Excel. **Результати та підсумок.** Згідно з даними морфометричних досліджень встановлено більш виражений шкідливий вплив отрути *Vipera berus nikolskii*, що проявлявся у порушенні структури та форми, набряку кардіоміоцитів, які призводили до достовірно вищих показників ширини цих клітин як у порівнянні з групою контролю, так і з другою експериментальною групою. Крім того, дія обох отрут, хоч і різною мірою, призводила до розростання елементів сполучної тканини у межах ендомізію, що відображалось у збільшенні показника частки цієї тканини в міокарді. Отрути обох гадюк провокували підвищення частки сполучної тканини в міокарді, проте на фоні набрякlostі м'язових клітин, відносно збільшення площі ендомізію до них проявляє тенденцію до збільшення, але не є достовірним.

Ключові слова: гадюки, отрута, серце, саркоплазма, м'язові волокна, щури.

Г.Ю. Бука¹
Т.Є. Дасюк²
І.Й. Дасюк²
І.В. Твердохліб³

¹ Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

² Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

³ Дніпровський державний медичний університет
Київ, Львів, Дніпро, Україна

Надійшла: 22.10.2024

Прийнята: 12.12.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.22-31>

УДК 611.778.018

КІЛЬКІСНА МОРФОЛОГІЧНА ОЦІНКА ШКІРИ СКРОНЕВОЇ ДІЛЯНКИ ГОЛОВИ У РІЗНИХ ВІКОВИХ КАТЕГОРІЙ ЖІНОК ІЗ СУПУТНЬОЮ ВНУТРІШНЬОЮ ПАТОЛОГІЄЮ

Buka G.Yu. , Dasyuk T.Ye.  , Dasyuk I.J.  , Tverdokhlib I.V.   Quantitative morphological assessment of the temporal region skin in different age categories of women with additional internal pathology. Bogomolets National Medical University, Kyiv; Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv; Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Improvement of the technical aspects of surgery in aesthetic surgery led to an increase in the number of transactions and significant increase contingent of women who are turning to specialized clinics. But it also significantly increased the proportion of patients with a variety of concomitant diseases requiring new approaches to operational technologies and special attention in the postoperative period. In this group of patients is high risk of intraoperative and postoperative complications significantly limits the range of indications. So to prevent these complications is an important question when planning operations in aesthetic surgery of the face. **Objective.** Determine structural and functional changes of temporal region skin in women of different age groups with an additional internal pathology. **Methods.** Intraoperative biopsy material of skin of 104 women at the age from 19 to 73 years, that was taken during standard surgery instrumentations for different defects of face skin correction, was investigated. **Results and conclusion.** It was determined, that involutive dynamic of microvessel condition in papillary layer of derma coincides with grade reduction of relative volume of microvessels bed. Microcirculation age changes include structural disorders of intrapapillary capillary loops, disorganization of arterioles in papillary and reticular layers of derma, disorders of venules because of the changes in microenvironmental fibrillar network. It is typical at the patients with nicotinic dependence, ischemic heart disease, hypertonic disease, a diabetes, and also adiposity of a different degree essential infringement of microvessels bed structure criteria of skin condition that gives the basis for allocation of the given contingent of patients as group of high intraoperative and postoperative risk at carrying out of frontlift.

Key words: human skin, temporal region, structural parameters, microcirculation, age changes, additional internal pathology.

Citation:

Buka GYu, Dasyuk TYe, Dasyuk IJ, Tverdokhlib IV. [Quantitative morphological assessment of the temporal region skin in different age categories of women with additional internal pathology]. Morphologia. 2024;18(4):22-31. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.22-31>

 Buka G.Yu. 0009-0004-6555-065X;  Dasyuk T.Ye. 0000-0001-5529-4681;

 Dasyuk I.J. 0009-0004-2261-5230;  Tverdokhlib I.V. 0000-0002-8672-3773

 dasyuk@gmail.com; irinajs@gmail.com; ivt@dmu.edu.ua

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Удосконалення технічних аспектів оперативних втручань в естетичній хірургії обумовило зби-

льшення кількості операцій та суттєве розширення контингенту жінок, що звертаються до спеціалізованих клінік [1-3]. Але при цьому також значно зросла частка пацієнтів з різноманітною

супутньою патологією, що потребує пошуку нових підходів до оперативних технологій і особливої уваги у післяопераційному періоді. У пацієнтів даного контингенту саме високий ризик інтраопераційних і післяопераційних ускладнень суттєво обмежує діапазон показань [4, 5]. Тому попередження таких ускладнень є важливим питанням при плануванні операцій в естетичній хірургії обличчя.

Визначальними факторами для вибору методу оперативного втручання вважають морфологічний стан тканин, тяжкість супутніх захворювань органів і систем, а також вплив різноманітних екзогенних та ендогенних чинників. Це значною мірою обумовлює можливість і доцільність використання морфологічних даних для обґрунтування методів хірургічного лікування пацієнтів з інволютивними та патологічними змінами шкіри [2, 6]. Сьогодні є очевидною важливість подальшого вивчення субстрату старіння шкіри – її структури, де одне з найважливіших місць посідає система гемомікроциркуляції. Саме ця система найбільш чітко й адекватно реагує на численні екзогенні впливи, вона визначає гістогенетичні закономірності перетворень шкіри з часом [7], саме вона є найчутливішим компонентом дерми, що відповідає за стан епітеліальних і сполучнотканинних структур шкіри [8, 9].

Мета дослідження – визначення впливу супутньої внутрішньої патології на структурні і функціональні характеристики шкіри скроневої ділянки голови у жінок різного віку.

Матеріали та методи

У роботі досліджували інтраопераційний біопсійний матеріал шкіри 104 жінок віком від 19 до 73 років при проведенні фронтліфтингу за відкритою та ендоскопічною технологіями. Розподілення матеріалу проводили за віковими групами: I – до 32 років; II – 33-40 років; III – 41-50 років; IV – 51-57 років; V – 58 років і більше. Всі досліджувані зразки шкіри у I-III вікових групах отримували у пременструальній фазі циклу.

Вивчали інтраопераційні біоптати розміром 3×3 мм з периферійних ділянок шкіри скроневої ділянки голови. Зразки шкірних біоптатів фіксували у рідині Буена, обробляли у висхідній концентрації етанолу та виготовляли парапластові блоки за стандартною методикою. Серійні зрізи тканини виготовляли завтовшки 7 мкм та фарбували гематоксиліном-еозином, резорцин-фуксином, альціановим синім, за Ван Гізеном, за Вейгертом, за Маллорі-Слінченком, конго червоним за Матсуура, за Пачіні.

У кількісному морфологічному дослідженні вивчали відносний об'єм гемомікроциркуляторного русла (ГМЦР) у сосочковому та сітчастому шарах дерми окремо методом крапкового рахунку, а також середній діаметр артеріол підсосочкової сітки, венул поверхневого та глибокого під-

сосочкових сплетень, внутрішньососочкових капілярів та основи внутрішньососочкових капілярних петель.

Електронно-мікроскопічне дослідження проводили за стандартною схемою [10-12]. Квантифіковані результати піддавали статистичній обробці, що включала аналіз статистичного розподілення величин за допомогою критерію J Ястремського, визначення достовірності відмінностей між групою пацієнтів без супутньої патології та групами жінок з психічними розладами, ніотиновою та алкогольною залежністю, ішемічною хворобою серця, гіпертонічною хворобою, порушеннями статеві сфери, захворюваннями травної системи, сечових органів та легень, цукровим діабетом, ожирінням різного ступеня з урахуванням критерію t Стюдента (нормальне розподілення) або X-критерію Ван-дер-Вардена за умов відхилення від нормального розподілення [13].

Результати та їх обговорення

Проведення морфометричного дослідження показало, що у пацієток віком до 32 років, які мають ніотинову залежність, відносний об'єм судин мікроциркуляторного русла у складі сосочкового і сітчастого шарів дерми шкіри скроневої ділянки голови достовірно поступався значенням, що встановлені у групі пацієток без супутньої патології (на 32,1% і на 18,9% відповідно). Статистично вагоме зниження відносного об'єму мікросудин у сосочковому шарі також відзначалося у пацієток з цукровим діабетом (-33,8%). У жінок з ожирінням даний показник на 14,6% ($p<0,05$) поступався контрольним значенням у сітчастому шарі дерми (рис. 1). Зовнішній діаметр артеріол дерми у пацієток молодшої групи із ніотиною залежністю значно поступався (на 21,2%; $p<0,05$) контрольним значенням, в той час як у хворих на цукровий діабет діаметр венул підсосочкових сплетень суттєво перевищував значення, характерні для пацієток без супутньої патології (рис. 2). Також у пацієток з цукровим діабетом відзначалося розширення внутрішньососочкових гемокапілярів (на 51,8%; $p<0,05$) і звуження гемокапілярів в основі капілярних петель (на 21,3%; $p<0,05$). У решті пацієток (з алкогольною залежністю, психічними розладами, іншою супутньою внутрішньою патологією) коливання досліджуваних морфологічних параметрів, що характеризують стан мікросудин шкіри, на мали статистично вагомих відмінностей від відповідних значень у групі пацієток без діагностованої супутньої патології (рис. 1-3).

Морфометричний аналіз мікроциркуляторного русла дерми шкіри пацієток віком 33-40 років виявив зменшення відносного об'єму судин сосочкового та сітчастого шарів у жінок, що мали ніотинову залежність, в обох шарах відповідно на -14,9% та на -25,5% ($p<0,05$) у порівнянні з групою пацієток без супутньої патології.

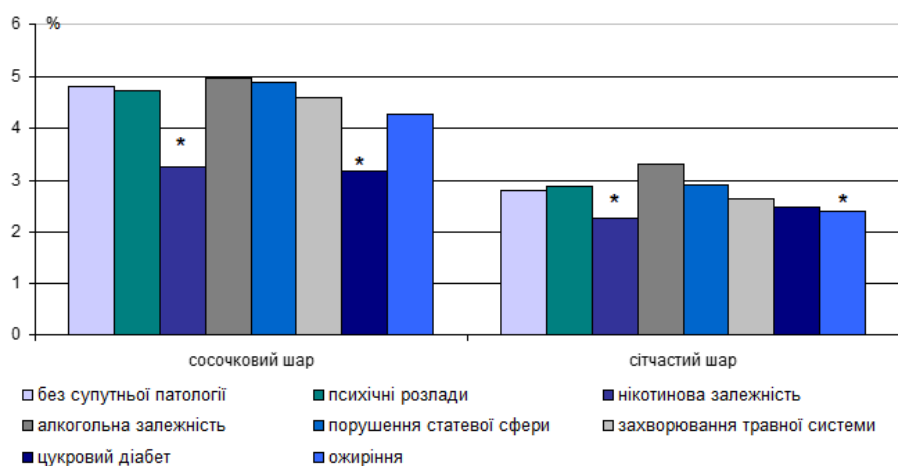


Рис. 1. Значення відносного об'єму судин мікроциркуляторного русла у складі сосочкового і сітчастого шарів дерми у пацієнток віком до 32 років. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від параметрів шкіри пацієнток відповідної вікової групи без супутньої патології.

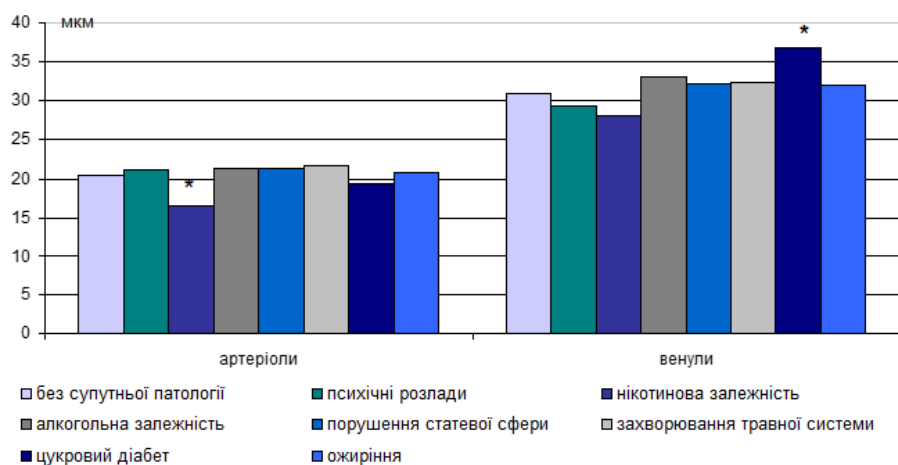


Рис. 2. Значення зовнішнього діаметру артеріол підсосочкової сітки і венул підсосочкових сплетень у пацієнток віком до 32 років. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від параметрів шкіри пацієнток відповідної вікової групи без супутньої патології.

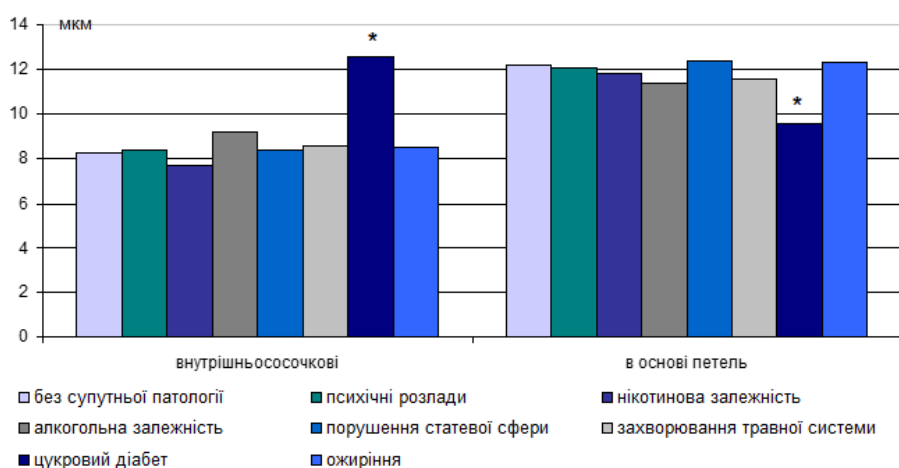


Рис. 3. Значення зовнішнього діаметру внутрішньососочкових гемокапілярів і гемокапілярів в основі капілярних петель у пацієнток віком до 32 років. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від параметрів шкіри пацієнток відповідної вікової групи без супутньої патології.

У пацієнток з цукровим діабетом спостерігалось достовірне зниження цього показника у сосочковому шарі на 13,7%, а у сітчастому – на 21,8%. Зниження відносного об'єму судин відзначалося також у групі пацієнток із ожирінням, де досліджуваний показник поступався контрольним значенням на -11,6% ($p<0,05$) у сосочковому та на -27,4% ($p<0,05$) у сітчастому шарах дерми (рис. 4). У пацієнток другої вікової групи, що мали нікотинову залежність, зовнішній діаметр артеріол підсосочкової сітки поступався показникам контролю (-23,0%; $p<0,05$), в той час як у хворих на цукровий діабет діаметр венул був достовірно збільшеним на 15,5% у порівнянні з групою пацієнток, що не мали супутньої патології (рис.

5). Внутрішньососочкові гемокапіляри у хворих на цукровий діабет були розширеними на 52,4% ($p<0,05$), в той час як значення зовнішнього діаметру гемокапілярів в основі петель навпаки було меншим (-22,3%; $p<0,05$) у порівнянні з контрольною групою. Також у жінок, що мали нікотинову залежність, відзначалося звуження гемокапілярів в основі капілярних петель відносно пацієнток без супутньої патології. Статистично вагомих відмінностей, щодо проаналізованих морфометричних показників стану мікроциркуляторного русла дерми шкіри, у пацієнток з іншими супутніми захворюваннями в порівнянні контрольною групою виявлено не було (рис. 4-6).

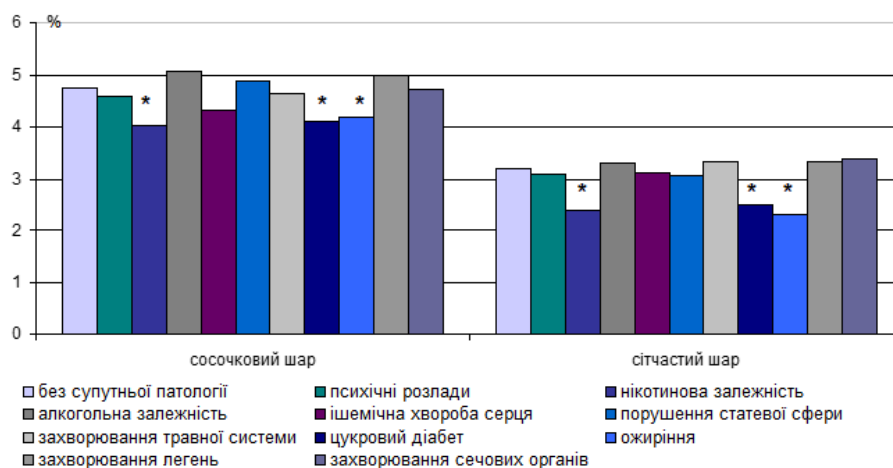


Рис. 4. Значення відносного об'єму судин мікроциркуляторного русла у складі сосочкового і сітчастого шарів дерми у пацієнток 33-40 років. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від параметрів шкіри пацієнток відповідної вікової групи без супутньої патології.

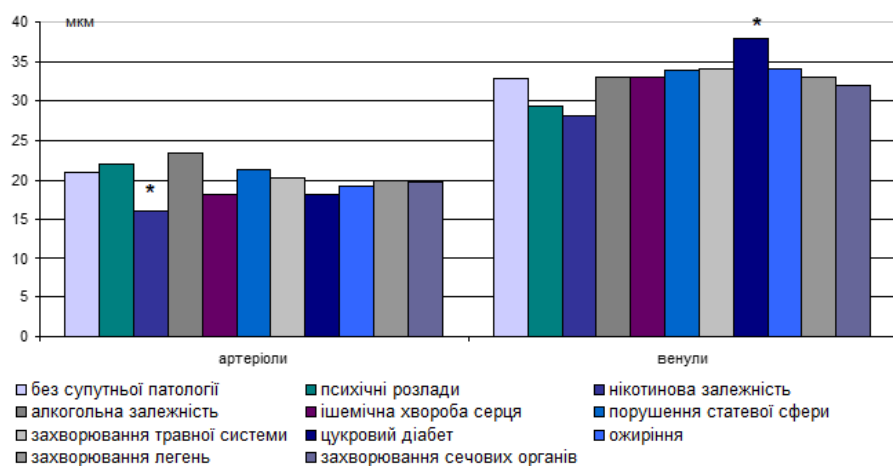


Рис. 5. Значення зовнішнього діаметру артеріол підсосочкової сітки і венул підсосочкових сплетень у пацієнток віком 33-40 років. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від параметрів шкіри пацієнток відповідної вікової групи без супутньої патології.

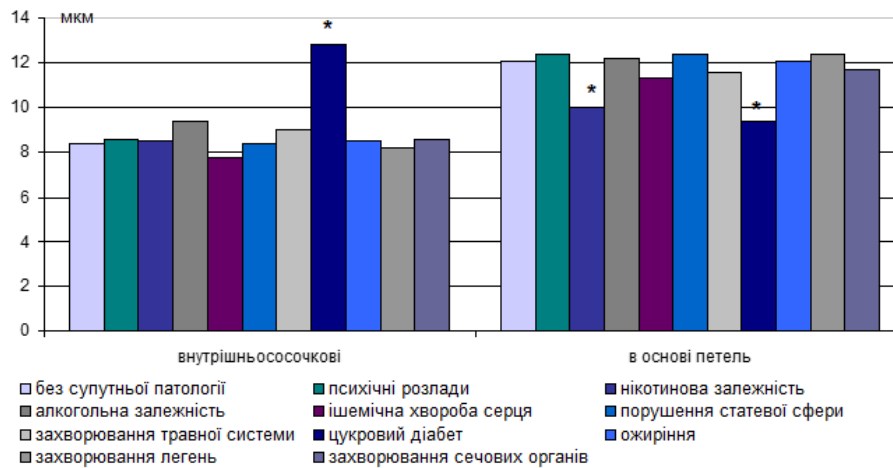


Рис. 6. Значення зовнішнього діаметру внутрішньососочкових гемокапілярів і гемокапілярів в основі капілярних петель у пацієнток віком 33-40 років. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від параметрів шкіри пацієнток відповідної вікової групи без супутньої патології.

Аналіз морфометричних показників стану мікроциркуляторного русла дерми шкіри серед пацієнток віком 41-50 років виявив достовірні зміни відносного об'єму судин в обох шарах дерми серед окремих груп в бік зменшення досліджуваного показника у порівнянні з контрольною групою. Так, серед пацієнток з ніотиновою залежністю відносний об'єм судин сосочкового та сітчастого шарів становив -15,7% ($p<0,05$) та -22,6% ($p<0,05$) відповідно. У хворих з діагностованою ішемічною хворобою серця показники відносного об'єму мікроциркуляторного русла поступалися контрольним значенням на -13,3% ($p<0,05$) у сосочковому та на -13,9% ($p<0,05$) у сітчастому шарах дерми. Статистично вагоме змен-

шення відносного об'єму судин мікроциркуляторного русла спостерігалось на всій глибині дерми в групах пацієнток з гіпертонічною хворобою та цукровим діабетом, в той час як збіднення мікроциркуляторного русла лише в сітчастому шарі (13,9%; $p<0,05$) було характерним для жінок з ожирінням на відміну від групи пацієнток без супутньої патології (рис. 7). Зовнішній діаметр артерій у пацієнток з ніотиновою залежністю, ішемічною хворобою серця та гіпертонічною хворобою статистично вірогідно поступався контрольним значенням відповідно на -25,5%, -18,8%, -27,6%. В свою чергу діаметр венул підсосочкових сплетень у хворих на цукровий діабет відзначався вагомим збільшенням показників (рис. 8).

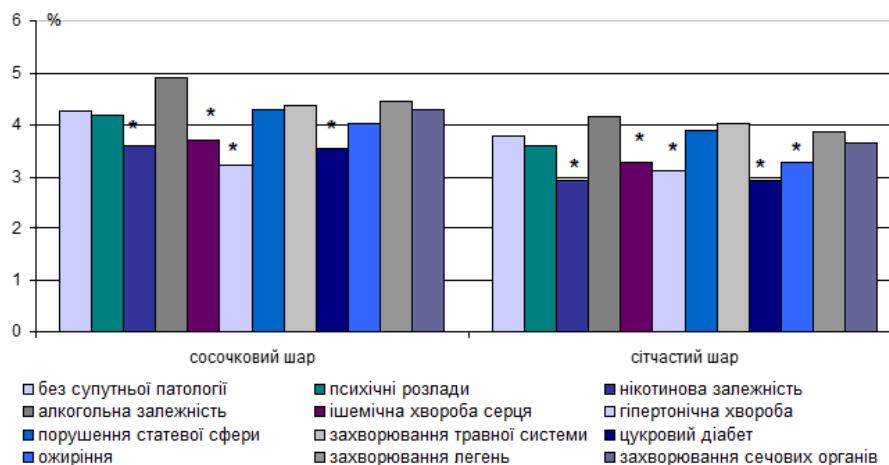


Рис. 7. Значення відносного об'єму судин мікроциркуляторного русла у складі сосочкового і сітчастого шарів дерми у пацієнток віком 41-50 років. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від параметрів шкіри пацієнток відповідної вікової групи без супутньої патології.

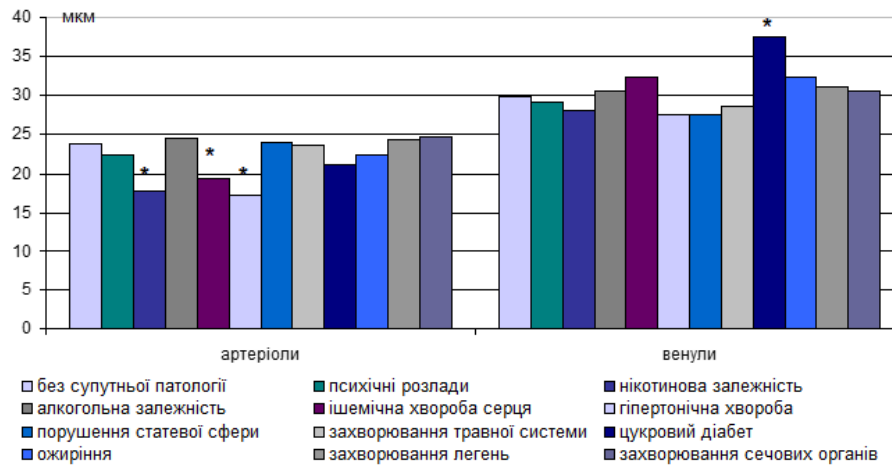


Рис. 8. Значення зовнішнього діаметру артеріол підсосочкової сітки і венул підсосочкових сплетень у пацієнток віком 41-50 років. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від параметрів шкіри пацієнток відповідної вікової групи без супутньої патології.

Суттєве розширення внутрішньососочкових гемокапілярів (на +61,1%; $p < 0,05$) контрастувало із достовірним звуженням гемокапілярів в основі капілярних петель на 26,1% у пацієнток хворих на цукровий діабет. Зовнішній діаметр гемокапілярів в основі капілярних петель в групах з нікотиновою залежністю та гіпертонічною хворобою

значно поступався контрольним значенням та становив відповідно -22,6%, -33,9% ($p < 0,05$). Інших достовірних відмінностей, щодо характеру морфометричних показників мікроциркуляторного русла шкіри, між групою контролю та рештою досліджуваних груп з різними супутніми патологіями виявлено не було (рис. 7-9).

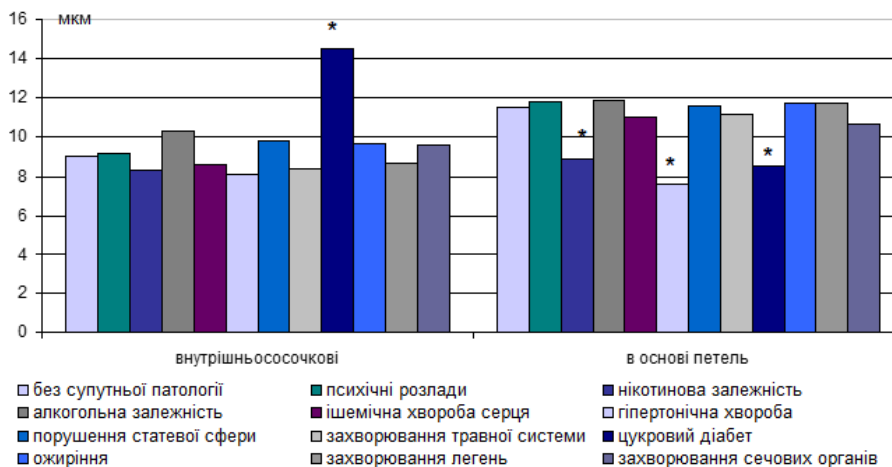


Рис. 9. Значення зовнішнього діаметру внутрішньососочкових гемокапілярів і гемокапілярів в основі капілярних петель у пацієнток віком 41-50 років. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від параметрів шкіри пацієнток відповідної вікової групи без супутньої патології.

Дослідження стану мікроциркуляторного русла дерми шкіри в пацієнток третьої вікової групи на основі порівняння морфометричних показників виявило, що у пацієнток віком 51-57 років, які мали нікотинову залежність, зменшення відносного об'єму судин мікроциркуляторного русла у складі сосочкового і сітчастого шарів дерми складало відповідно -26,1% та -21,7% ($p < 0,05$) на відміну від контрольної групи, а в пацієнток з ішемічною хворобою серця цей показник був змінений на -23,3% ($p < 0,05$) у сосочковому та на -19,8%

($p < 0,05$) у сітчастому шарі. Зниження відносного об'єму судин мікроциркуляторного русла в обох шарах дерми також було характерним для груп хворих на гіпертонічну хворобу та цукровий діабет. Контрольним значенням проаналізований показник поступався також в пацієнток з ожирінням, але лише в межах сітчастого шару дерми (рис. 10). Зовнішній діаметр артеріол підсосочкової сітки достовірно поступався контрольним значенням серед жінок з нікотиновою залежністю, гіпертонічною хворобою та цукровим діабетом на -24,2%, -29,8%, -23,0% відповідно. В свою чергу у

хворих на ішемічну хворобу серця та цукровий діабет діаметр венул підсосочкових сплетень перевищував показники пацієнток без супутньої патології (рис. 11). Також у хворих на цукровий діабет відзначалося збільшення діаметру внутрішньососочкових гемокапілярів на 60,6% ($p < 0,05$) у порівнянні з пацієнтками без діагностованої супутньої патології. В основі капілярних петель діаметр гемокапілярів був достовірно зменшеним серед

груп пацієнток, що мали нікотинову залежність, хворих на гіпертонічну хворобу та цукровий діабет у порівнянні з контрольними величинами. Інших достовірних відмінностей, щодо характеру морфометричних показників мікроциркуляторного русла шкіри в групах контролю та решти досліджуваних груп з різними супутніми патологіями виявлено не було (рис. 10-12).

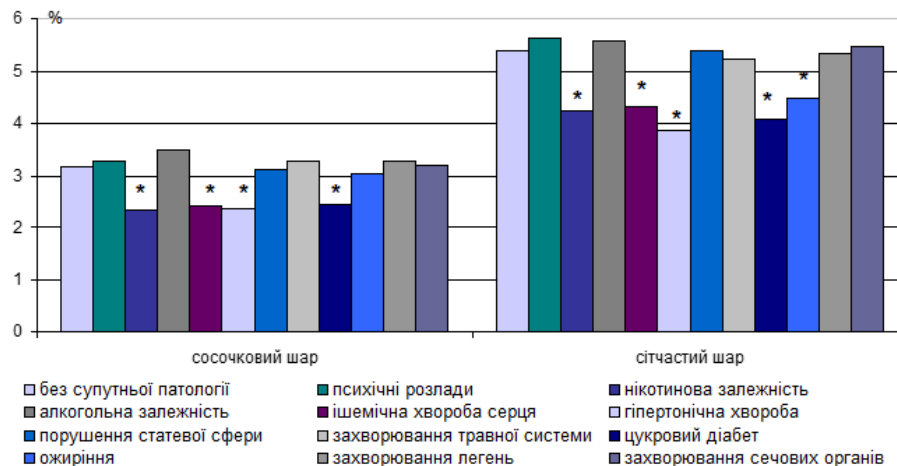


Рис. 10. Значення відносного об'єму судин мікроциркуляторного русла у складі сосочкового і сітчастого шарів дерми у пацієнток віком 51-57 років. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від параметрів шкіри пацієнток відповідної вікової групи без супутньої патології.

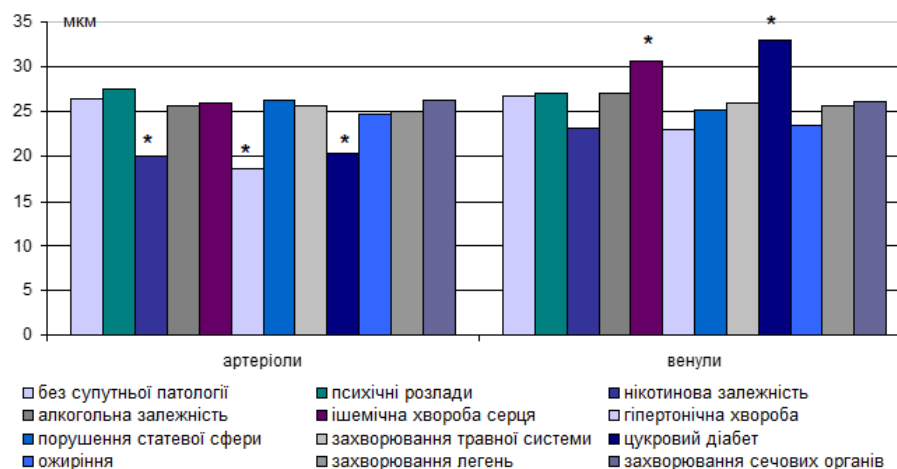


Рис. 11. Значення зовнішнього діаметру артеріол підсосочкової сітки і венул підсосочкових сплетень у пацієнток віком 51-57 років. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від параметрів шкіри пацієнток відповідної вікової групи без супутньої патології.

Аналіз морфометричних показників стану мікроциркуляторного русла дерми шкіри серед пацієнток віком від 58 років виявив достовірне зменшення відносного об'єму судин сосочкового та сітчастого шарів дерми в жінок, що мали нікотинову залежність на -23,2%, 20,0% відповідно у порівнянні з контрольною групою. Подібна тенденція щодо відносного об'єму судин обох шарів

дерми була встановлена й у пацієнток із ішемічною хворобою серця, гіпертонічною хворобою та цукровим діабетом та характеризувалася статистично вагомими значеннями (рис. 13). Зовнішній діаметр артеріол дерми у пацієнток старшої групи поступався контрольним значенням в групах пацієнток, що мали нікотинову залежність, гіпертонічну хворобу, цукровий діабет та складав відповідно -18,5%, -37,3%, 33,0% ($p < 0,05$).

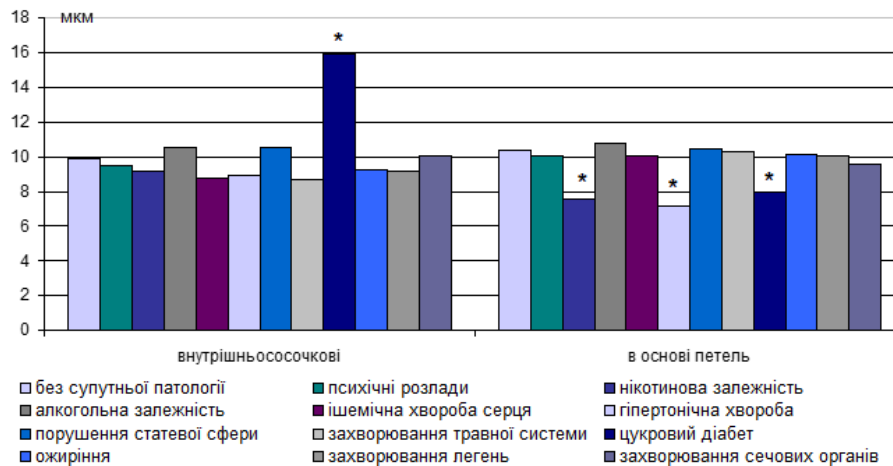


Рис. 12. Значення зовнішнього діаметру внутрішньососочкових гемокапілярів і гемокапілярів в основі капілярних петель у пацієнток віком від 51-57 років. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від параметрів шкіри пацієнток відповідної вікової групи без супутньої патології.

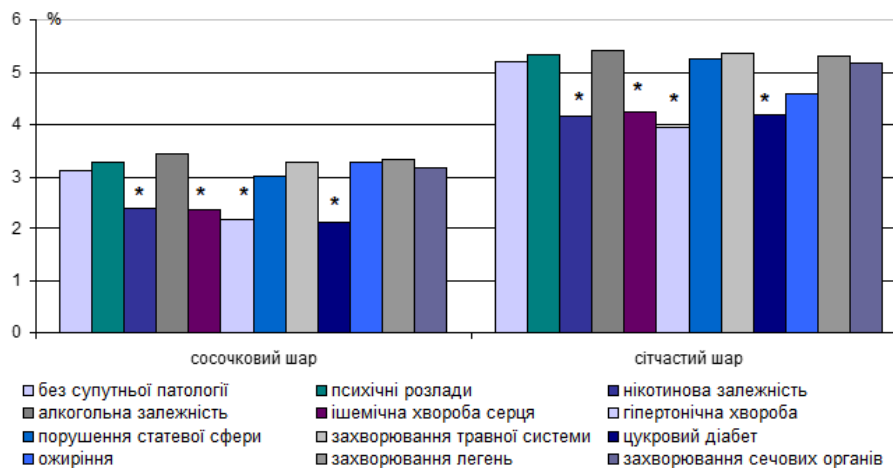


Рис. 13. Значення відносного об'єму судин мікроциркуляторного русла у складі сосочкового і сітчастого шарів дерми у пацієнток віком від 58 років. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від параметрів шкіри пацієнток відповідної вікової групи без супутньої патології.

При цьому значення діаметру венул підсосочкових сплетень серед хворих на цукровий діабет достовірно перевищував показники групи контролю (рис. 14). Внутрішньососочкові гемокапіляри у хворих на цукровий діабет були розширеними на 39,2% ($p < 0,05$), в той час як в основі петель значення зовнішнього діаметру гемокапілярів навпаки було достовірно зниженим (-25,0%) у порівнянні з контрольною групою. Також у жінок з нікотиною залежністю та гіпертонічною хворобою відзначалося звуження гемокапілярів в основі капілярних петель відносно пацієнток без супутньої патології. У решти пацієнток (з алкогольною залежністю, психічними розладами, іншою супутньою внутрішньою патологією) коливання досліджуваних морфологічних параметрів, що характеризують стан мікросудин шкіри, на мали статистично вагомих відмінностей від відповідних значень у групі пацієнток без діагностованої

супутньої патології (рис. 13-15).

Підсумок

У пацієнтів, що мають нікотинову залежність, ішемічну хворобу серця, гіпертонічну хворобу, цукровий діабет, а також ожиріння різного ступеня є характерним істотне порушення структури мікроциркуляторного русла шкіри скроневі ділянки голови, що надає підстави для виділення даного контингенту пацієнтів як групу високого інтраопераційного та післяопераційного ризику при проведенні фронтліфтингу для корекції інволютивних змін шкіри.

Перспективи подальших розробок пов'язані з аналізом структурно-функціональних перебудов шкіри обличчя і шиї після проведення різних варіантів оперативних втручань з приводу корекції інволютивних змін.

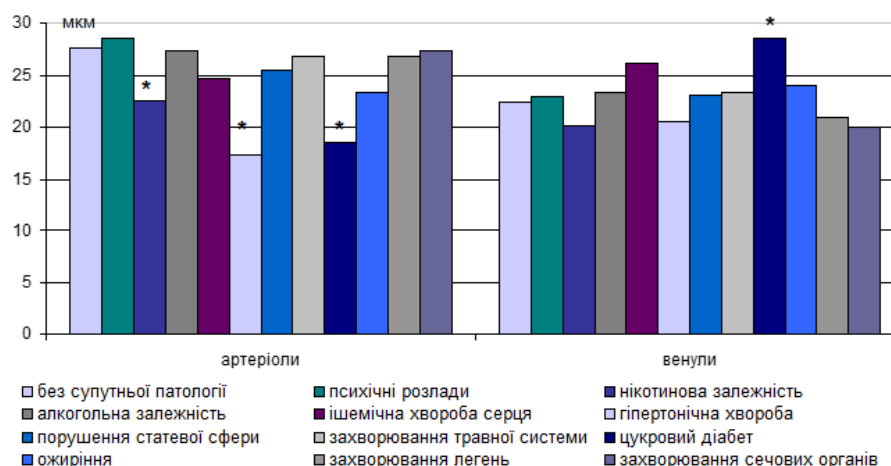


Рис. 14. Значення зовнішнього діаметру артеріол підсосочкової сітки і венул підсосочкових сплетень у пацієнток віком від 58 років. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від параметрів шкіри пацієнток відповідної вікової групи без супутньої патології.

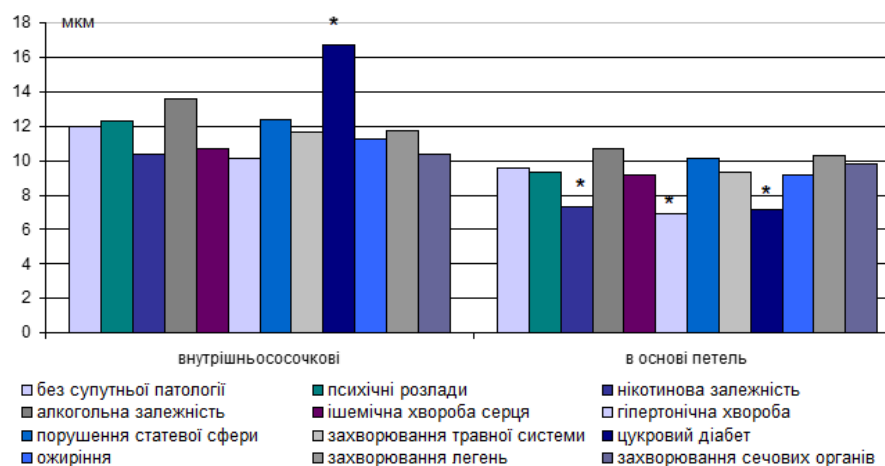


Рис. 15. Значення зовнішнього діаметру внутрішньососочкових гемокапілярів і гемокапілярів в основі капілярних петель у пацієнток віком від 58 років. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від параметрів шкіри пацієнток відповідної вікової групи без супутньої патології.

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 «Нормальний та аномальний морфогенез компонентів серцево-судинної системи людини й експериментальних тварин» (номер державної реєстрації 0118U005592).

Літературні джерела References

1. Lee H, Hong Y, Kim M. Structural and Functional Changes and Possible Molecular Mechanisms in Aged Skin. *Int J Mol Sci*. 2021;22(22):12489. doi: 10.3390/ijms222212489.
2. Rorteau J, Chevalier FP, Fromy B, Lamartine J. [Functional integrity of aging skin, from cutaneous biology to anti-aging strategies]. *Med Sci (Paris)*. 2020;36(12):1155-62. doi: 10.1051/medsci/2020223. French.
3. Zarei F, Abbaszadeh A. Application of Cell Therapy for Anti-Aging Facial Skin. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2019;14(3):244-8. doi: 10.2174/1574888X13666181113113415.
4. Sclafani AP, Kwak E. Alternative management of the aging jawline and neck. *Facial Plast Surg*. 2005;21(1):47-54.
5. Fenske NA, Lober CW. Structural and functional changes of normal aging skin. *J Am Acad*

Dermatol. 1986;15(1):571-85.

6. Harmon CB, Hadley ML. A cosmetic approach to cutaneous defects. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2004;12(1):141-62.

7. Lavker RM, Zheng PS, Dong G. Morphology of aged skin. *Clin Geriatr Med.* 1989;5(1):53-67.

8. Tverdokhlib IV, Makarchuk OI. [Morphological characteristics of temporal area skin in patients with an additional pathology on age aspect]. *Morphologia.* 2015;9(3):83-8. Ukrainian.

9. Makarchuk OI, Silkina YuV, Tverdokhlib IV. [Morphological analysis of temporal area skin in patients with an additional pathology on age aspect]. *Morphologia.* 2020;14(4):35-41. Ukrainian.

10. Mironov AA, Komissarchik YuYa, Mironov VA. *Metody elektronnoy mikroskopii v biologii i meditsine: Metodicheskoe rukovodstvo.* [Electron microscopy methods in biology and medicine : Methodological Guide]. St. Petersburg: Science;

1994. 400 p. Russian.

11. Tverdokhlib IV, Petruk NS, Ivanchenko MV, Silkina JuV, Khripkov IS, Pertseva NO, Shevchenko KM, Goodlett TO, Malkov II, Berehovenko IM, Zinenko DYU, Galaida NO, Varin VV, inventors; State Institution «Dnipropetrovsk medical academy of the Health Ministry of Ukraine». Method of determining the coordinates of ultrastructures in transmission electron microscopy of biological objects. Ukrainian patent UA 83611. 2013 Sep 25. Int. Cl. G01N 1/28. Ukrainian.

12. Kuo J. *Electron microscopy: methods and protocols.* Totowa, New Jersey : Humana Press Inc., 2007. 608 p.

13. Tverdokhlib IV, Shponka IS, Mashtalir MA. *Prikladnaya biometriya dlya morfologa* [Applied biometrics for a morphologist]. Dnepropetrovsk: Porogi, 1996. 226 p. Russian.

Бука Г.Ю., Дасюк Т.Є., Дасюк І.Й., Твердохліб І.В. Кількісна морфологічна оцінка шкіри скроневої ділянки голови у різних вікових категорій жінок із супутньою внутрішньою патологією.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Удосконалення технічних аспектів оперативних втручань в естетичній хірургії обумовило збільшення кількості операцій та суттєве розширення контингенту жінок, що звертаються до спеціалізованих клінік [1-3]. Але при цьому також значно зросла частка пацієнтів з різноманітною супутньою патологією, що потребує пошуку нових підходів до оперативних технологій і особливої уваги у післяопераційному періоді. У пацієнтів даного контингенту саме високий ризик інтраопераційних і післяопераційних ускладнень суттєво обмежує діапазон показань [4, 5]. Тому попередження таких ускладнень є важливим питанням при плануванні операцій в естетичній хірургії обличчя. **Мета** дослідження – визначення впливу супутньої внутрішньої патології на структурні і функціональні характеристики шкіри скроневої ділянки голови у жінок різного віку. **Методи.** У роботі досліджували інтраопераційний біопсійний матеріал шкіри 104 жінок віком від 19 до 73 років при проведенні фронтліфтингу за відкритою та ендоскопічною технологіями. Розподілення матеріалу проводили за віковими групами: I – до 32 років; II – 33-40 років; III – 41-50 років; IV – 51-57 років; V – 58 років і більше. Морфометрично вивчали серійні зрізи для визначення параметрів мікросудин. **Результати та підсумок.** Встановлено, що інволютивна динаміка стану мікросудин у сосочковому шарі дерми супроводжується поступовою редукцією відносного об'єму мікросудинного русла. У сітчастому шарі дерми відбувається зростання відносного об'єму мікросудин у жінок старших вікових груп. Вікові зміни мікроциркуляції включають порушення структури внутрішньососочкових капілярних петель, дезорганізацію артеріол у складі сосочкового і сітчастого шарів дерми, а також ушкодження венул за рахунок змін фібрилярного каркасу мікрооточення. У пацієнтів, що мають нікотинову залежність, ішемічну хворобу серця, гіпертонічну хворобу, цукровий діабет, а також ожиріння різного ступеня є характерним істотне порушення структури мікроциркуляторного русла шкіри, що надає підстави для виділення даного контингенту пацієнтів як групу високого інтраопераційного та післяопераційного ризику при проведенні фронтліфтингу для корекції інволютивних змін шкіри.

Ключові слова: шкіра людини, скронева ділянка голови, структурні параметри, мікроциркуляція, вікові зміни, супутня внутрішня патологія.

Л.І. Волос¹
Г.Л. Столяр²

¹ Львівський національний медичний
університет імені Данила Галицького
² Комунальне некомерційне підприємс-
тво Львівської обласної ради «Львівське
обласне патологоанатомічне бюро»
Львів, Україна

Надійшла: 14.10.2024

Прийнята: 15.12.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.32-39>

УДК 616.716.4-006.327.03-039.42-018-092

РІДКІСНИЙ ВИПАДОК ЦЕМЕН- ТУЮЧОЇ ФІБРОМИ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ: ПАТОГІСТОЛОГІ- ЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

Volos L.I. , Stoliar H.L.  A rare case of cementifying fibroma of the mandible: a histopathological study.
Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Communal Non-Commercial Enterprise of Lviv Regional Council «Lviv Regional Pathology Bureau», Lviv, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Benign fibro-osseous lesions are characterized by the replacement of normal bone tissue with connective tissue that undergoes varying degrees of mineralization. The main forms of fibro-osseous lesions include fibrous dysplasia, cemento-osseous dysplasia, and various variants of ossifying fibroma, such as cemento-ossifying and cementifying fibroma. Fibro-osseous lesions have similar clinical symptoms, radiographic, and histological features. These lesions are a diagnostic problem for maxillofacial surgeons and pathologists. Therefore, a comprehensive evaluation of these lesions will help to avoid diagnostic errors and ensure a correct diagnosis, which will guarantee the correct treatment and an informative prognosis. **Objective:** to establish the histopathological features of a rare case of cementifying fibroma of the mandible for differential diagnosis with other fibro-osseous lesions and to determine prognosis. **Methods.** We present a rare case of cementifying fibroma of the mandible in a 34-year-old patient after diagnostic examination and surgical treatment at the Clinic of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery of the Danylo Halytsky Lviv National Medical University. We conducted a histopathological study of the postoperative material obtained after revision of the pathological lesion on the left mandible, excision of the neoplasm and curettage. The jaw tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin solution, then decalcified with subsequent dehydration in alcohols of increasing concentration and embedded in paraffin. Histological sections with a thickness of $5 \pm 1 \mu\text{m}$ were made from paraffin blocks on a Leica RM2235 rotary microtome, then stained with hematoxylin-eosin according to the standard method. Diagnostics were performed on a Leica DM750 microscope (Leica Microsystems GmbH). **Results.** The microscopic picture showed multiple small fragments of connective tissue with fibroblasts and a small number of vessels. The fibrous-cellular stroma was characterized by a predominance of chaotically arranged spindle-shaped and stellate cells with basophilic hyperchromic nuclei and a minimal amount of cytoplasm. Among the connective tissue were numerous rounded, irregularly shaped and confluent calcified complexes of the cementum type without osteoblast reaction. In addition, a small number of calcified bone beams with osteoid and osteoblasts were found. Orthopantomogram showed a radiolucent well-defined image in the region of 37,38 and in the angle of the mandible. **Conclusion.** Cementifying fibroma, as a mesenchymal benign odontogenic tumor of the jaws, originates from mesenchymal blast cells of the periodontal ligament and forms a combination of cement-like tissue and fibrous cellular tissue. Diagnosis of cementing fibroma is based on clinical and radiological findings of the lesion, and histological examination confirms the diagnosis.

Key words: bone tissue, mandible, fibro-osseous lesion, cementifying fibroma, osteons, osteoblasts, osteoclasts, connective tissue, fibroblasts, histopathology.

Citation:

Volos LI, Stoliar HL. [A rare case of cementifying fibroma of the mandible: a histopathological study]. Morphologia. 2024;18(4):32-9. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.32-39>

 Volos L.I. 0000-0002-1733-589X

 Stoliar H.L. 0000-0002-9454-8442

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Фіброзно-кісткові ураження складають гетерогенну групу, які включають розвиток неопла-

стичних або диспластичних процесів, що характеризуються заміщенням нормальної кісткової архітектури фіброзною тканиною, яка набуває мінералізації [1]. Фіброзно-кісткові ураження були

вперше включені як група серед одонтогенних і щелепно-лицевих пухлин кісток у Класифікацію пухлин голови та шиї, опубліковану ВООЗ у 2017 році [2, 3]. У 2022 році ВООЗ оновила класифікацію одонтогенних і щелепно-лицевих пухлин завдяки отриманим новим молекулярним відкриттям, які мають клінічне застосування та можуть створити основу для початку нової ери підходів до лікування. Група фіброзно-кісткових уражень щелепних кісток включає кілька діагностичних підтипів, зокрема фіброзну дисплазію, псамоматоїдну осифікуючу фіброму, ювенільну трабекулярну осифікуючу фіброму, сімейну гігантоформну фіброму, сімейну цементно-кісткову дисплазію, одонтогенну цементно-осифікуючу фіброму, цементно-кісткову дисплазію та сегментарну одонто-щелепну дисплазію, нещодавно представлену в останній класифікації [4].

Як правило, фіброзно-кісткові ураження мають подібні мікроскопічні гістологічні ознаки, що характеризуються фіброзною стромою з різними типами та кількістю мінералізованих продуктів [5]. До основних форм уражень з подібними гістологічними ознаками належить фіброзна дисплазія, осифікуюча фіброма та цементно-кісткова дисплазія, проте згідно з останньою класифікацією різні підтипи осифікуючої фіброми розглядаються і визнаються як окремі утворення. У той час як фіброзна дисплазія може виникати в будь-якій частині скелета, цементно-осифікуюча фіброма і цементно-кісткова дисплазія зустрічаються виключно в щелепно-лицевих кістках [6].

У 1872 році К. Менцель представив перший опис варіанту осифікуючої фіброми, назвавши цей варіант цементно-осифікуючою фібромою, у 35-річної жінки з великою пухлиною нижньої щелепи, яка характеризувалася повільним ростом [7]. У 1927 році А. Монтгомері [8] вперше використав термін осифікуюча фіброма, а згодом ця назва почала використовуватися іншими авторами [9-11]. До 1948 року вважалося, що фіброзна дисплазія та осифікуюча фіброма були або одним і тим же утворенням, або варіантами одного ураження [10]. Проте у 1948 році Р. Шерман і В. Штернберг [12] опублікували опис клінічних, радіологічних та гістологічних характеристик осифікуючої фіброми, і з тих пір більшість дослідників розглядають фіброзну дисплазію та осифікуючу фіброму як різні клінічні утворення [12, 13].

Ряд авторів описували осифікуючі, цементуючі та цементно-осифікуючі фіброми як доброякісні фіброзно-кісткові ураження, що походять із періодонтальної зв'язки, внаслідок чого вони становлять гістологічні варіанти одного патологічного процесу [9, 14, 15]. Періодонтальна зв'язка — це шар волокнистої сполучної тканини, що оточує корені зубів. Зв'язка містить мультипотентні клітини, які здатні утворювати цемент, пластинчасту кістку та фіброзну тканину [7, 16].

Ураження позначаються по-різному, залежно від типу ідентифікованої тканини [13].

Осифікуюча фіброма — деформуюча, доброякісна пухлина, яка може виникати майже в будь-якому місці лицевого скелета, часто діагностується у жінок у віці від другого до четвертого десятиліття, рідко зустрічаючись у дітей, підлітків і людей похилого віку. Кістки обличчя, особливо задній відділ нижньої щелепи, є місцем рецидиву у 75% [17, 18]. Ця рідкісна пухлина може представляти діагностичну дилему для клініциста та патолога через накладання клінічних та гістоморфологічних особливостей. Існує багато синонімічних номенклатур для однієї сутності, і суперечки щодо класифікації та розподілу підтипів у літературі додають плутанини [19]. Термін осифікуюча фіброма використовується, якщо переважаючим компонентом є кістка, тоді як цементуюча фіброма визначається наявністю криволінійних трабекулярних структур або сферичних кальцифікатів. Загалом пухлина росте відносно повільно, внаслідок чого верхній кортикальний шар кістки та слизова залишаються неушкодженими, тому пухлина може бути присутньою протягом кількох років до постановки діагнозу [20, 21]. Проте деякі ураження можуть з часом стати масивними, спричиняючи значні естетичні проблеми та функціональні деформації, такі як асиметрія обличчя та зміщення зубів [22].

Цементно-осифікуюча фіброма — рідкісна доброякісна мезенхімальна одонтогенна пухлина, іноді інкапсульована, повільно росте з періодонтальної зв'язки [23, 24]. Ураження характеризується мультипотентністю клітин, схильне до утворення цементу поруч із пластинчастою кісткою та фіброзними тканинами. Опубліковані дані поширеності показують, що у жінок, особливо у віці від 30 до 40 років, частіше діагностують ураження, ніж у чоловіків, у співвідношенні 5:1. Цементно-осифікуюча фіброма частіше зустрічається на нижній щелепі (частота 70%), ніж на верхній щелепі, а задні відділи, як повідомляють автори, піддаються більшому ризику, ніж передні [25]. Рентгенологічно цементно-осифікуючі фіброми проявляються різними моделями залежно від ступеня мінералізації ураження. Вони можуть визначатися на підставі виявлення на ортопантомограмі мультилокулярних або унілокулярних рентгенопрозорих і рентгеноконтрастних утворів з крайовим склерозом [26]. Цементно-осифікуюча фіброма, як правило, є сферичною або яйцеподібною формою, що повільно розширюється і вражає ділянки, які оточують і утримують зуби, що призводить до резорбції коренів різного ступеня на сусідніх зубах. Незважаючи на те, що питання про походження цементно-осифікуючої фіброми досі дискутується, вважається, що можливі травми або місцеві подразники є причинами їх виникнення [27].

Цементуюча фіброма вважається добро-якісною пухлиною щелепових кісток і кісток лицевого скелету, яка виникає також з періодонтальної зв'язки, частіше розвивається в ділянці молярів нижньої щелепи і може досягати великих розмірів. Гістологічно цементуюча фіброма демонструє різну кількість скупчень цементу, вбудованих у фіброзну тканину з ділянками розколотих і дезорганізованих кісткових фрагментів [25]. Однак терміни осифікуюча і цементуюча фіброма є лише академічними позначеннями [10, 13]. Цементуюча фіброма дуже тісно пов'язана з іншими фіброзно-кістковими ураженнями, такими як фіброзна дисплазія, періапікальна дисплазія цементу та інші кальцифікуючі одонтогенні кісти та пухлини.

Ціль: встановити гістопатологічні особливості рідкісного випадку цементуючої фіброми нижньої щелепи для проведення диференційного діагнозу з іншими фіброзно-кістковими ураженнями та визначення прогнозу.

Матеріали та методи

У цьому дослідженні ми представляємо випадок цементуючої фіброми нижньої щелепи у 34-річної пацієнтки, яку скерували для діагностичного обстеження і подальшого лікування в клініку хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Нами було проведено гістопатоморфологічне дослідження післяопераційного матеріалу, отриманого після ревізії патологічного вогнища на нижній щелепі зліва, висічення новоутвору та кюретажу в клініці хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії.

Пацієнтка надала свою інформовану згоду щодо використання її персональних та клінічних даних для дослідницьких цілей. Дослідження виконані з дотриманням основних положень «Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини», затверджених Гельсінською декларацією (1964-2013 рр.), ICH GCP (1996 р.), Директиви ЄС № 609 (від 24.11.1986 р.), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р.

Зразки тканин щелепи, забрані після хірургічного лікування, фіксували в 10% нейтральному забуференому розчині формаліну, проводили декальцинацію з наступним зневодненням у спиртах зростаючої концентрації і заливкою в парафін за стандартною методикою. З парафінових блоків зі зразками тканини на ротаційному мікротомі Leica RM2235 виготовляли гістологічні зрізи товщиною 5 ± 1 мкм, які наносили на предметні скельця з адгезивним покриттям. Для морфологічної діагностики препарати фарбували гематоксилін-еозином за стандартною методикою. Гістологічну оцінку операційного ма-

теріалу проводили із застосуванням універсального оптичного мікроскопа Leica DM750 (Leica Microsystems GmbH).

Результати дослідження

Так як цементуюча фіброма щелепно-лицевого скелета зустрічається рідко, представлений випадок підкреслює необхідність належної оцінки та діагностики для визначення відповідного плану лікування та прогнозу.

Презентація випадку

34-річна пацієнтка звернулася в клініку хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького зі скаргами на дискомфорт в ділянці 37,38 зубів нижньої щелепи зліва.

Під час вивчення анамнезу вказівки на попередні травми були відсутні. Стоматологічний, медичний та сімейний анамнез не виявили патологій, які би тим чи іншим чином були пов'язані з основним захворюванням пацієнтки. Внутрішньоротовий огляд виявив утвір в області лівих нижніх молярів, округло-овальної форми, розміром приблизно 5×6 мм. Слизова оболонка була гладкою та неушкодженою. При пальпації припухлість від м'якої до твердої консистенції з чітко окресленими межами, безболісна. На підставі клінічних даних було встановлено попередній діагноз доброякісної одонтогенної пухлини та рекомендовано рентгенологічне дослідження.

На рентгенограмі нижньої щелепи виявлено чіткий прозорий утвір округлої форми, що поширювався на 37,38 ділянку. Утвір мав гострий склеротичний край, рентгеноконтрастність було видно в центрі та вздовж передніх країв. Ортопантомограма показала чітке рентгенопрозоре зображення в 37,38 ділянці і на куті нижньої щелепи. Клінічно встановлено фіброзну остеодисплазію кута та тіла нижньої щелепи зліва.

Було проведено ревізію патологічного вогнища на нижній щелепі зліва. Висічення та кюретаж вогнища виконано під місцевою анестезією. Післяопераційний період перебігав без ускладнень. Під час спостереження за пацієнткою протягом 7 місяців не повідомлялося про рецидиви, що свідчить про сприятливий прогноз.

В гістологічну лабораторію надіслано кілька дрібних темно-сірих фрагментів розмірами 1-3 мм. Для гістопатологічного дослідження були виготовлені декальциновані парафінові зрізи. Мікроскопічна картина демонструвала множинні дрібні фрагменти сполучної тканини з фібробластами та невеликою кількістю судин, серед яких численні округлі, неправильної форми та зливні кальциновані комплекси типу цементиклів без реакції остеобластів. Крім того, виявлена невелика кількість кальцинованих кісткових балок з остеїдом та остеобластами. В патологоанатомічному висновку вказано, що морфологія більш характерна для цементуючої фіброми (рис. 1-7).

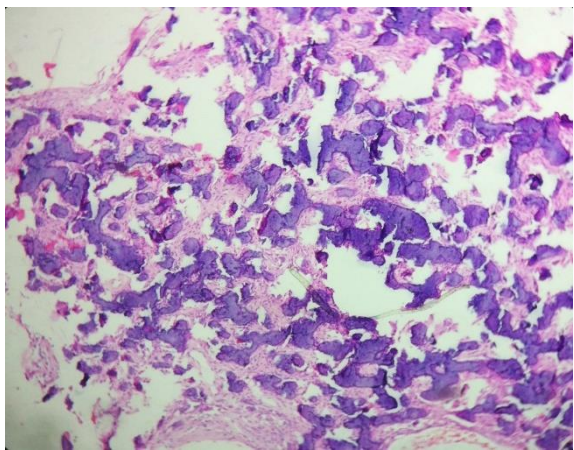


Рис. 1. Цементуюча фіброма нижньої щелепи. На явні хаотично розташовані колагенові волокна, серед яких спостерігаються численні кальцифіковані комплекси типу цементиклів без реакції остеобластів. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 100$.

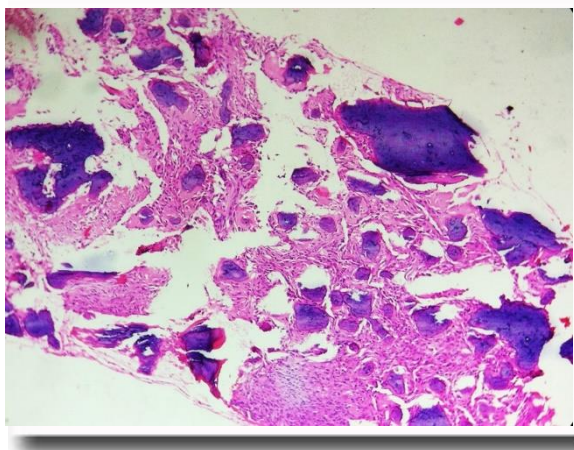


Рис. 2. Цементуюча фіброма нижньої щелепи. Кальцифіковані відкладання серед сполучної тканини різного розміру округлої, неправильної форми та зливні. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$.

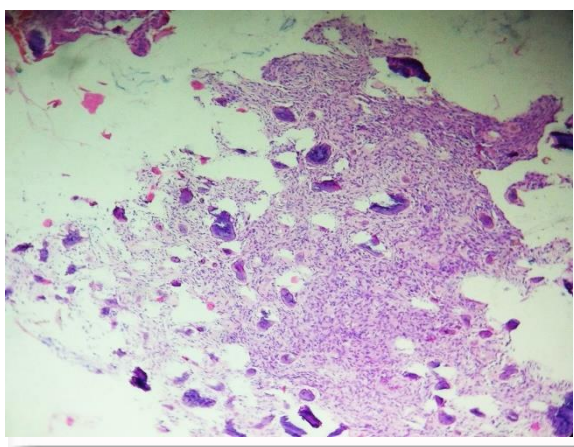


Рис. 3. Цементуюча фіброма нижньої щелепи. Проліферація веретеноподібних клітин, розташованих пучками та завитками, серед яких незначна кількість базофільних відкладань. Фіброзний компонент без запальної реакції. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 100$.

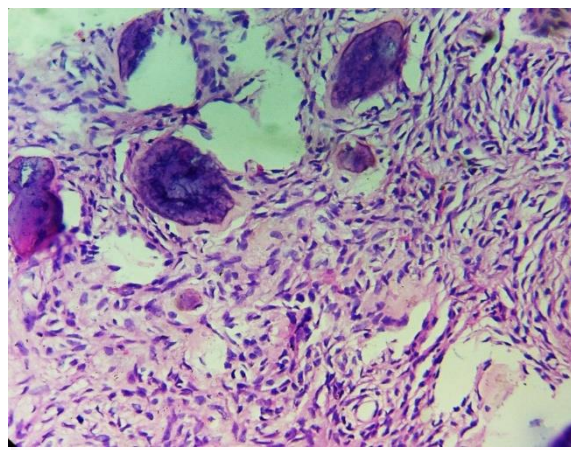


Рис. 4. Цементуюча фіброма нижньої щелепи. Фіброзно-клітинна строма характеризується переважанням хаотично розташованих веретеноподібних та зірчастих клітин з базофільним гіперхромним ядром і мінімальною кількістю цитоплазми та колагенових волокон. Кальцифікати великого розміру овальної та круглої форми нагадували цементоподібні структури. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 400$.

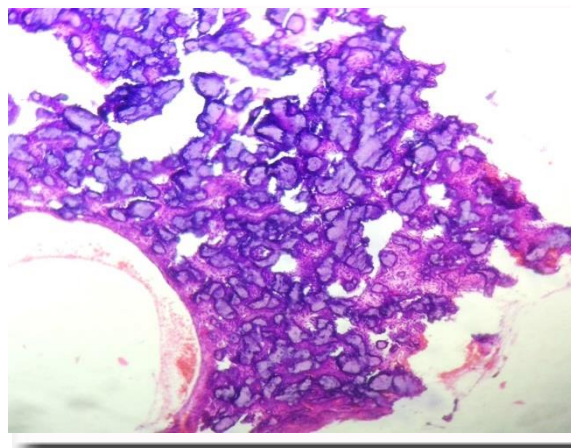


Рис. 5. Цементуюча фіброма нижньої щелепи. Значне скупчення кальцифікованого матеріалу у формі невеликих яйцевидних кулястих базофільних відкладань. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 100$.

Дискусія

Доброякісні фіброзно-кісткові ураження — це група патологічних станів, що характеризуються заміщенням нормальної кісткової тканини клітинно-волокнистою сполучною тканиною, яка піддається мінералізації [5]. Найбільш поширені типи доброякісних фіброзно-кісткових утворень, згідно останньої класифікації пухлин кісток голови та шиї BOOЗ 2022 року, включають фіброзну дисплазію, осифікуючу фіброму та кісткову дисплазію [4]. Завдяки подібним клінічним, рентгенологічним та гістологічним характеристикам фіброзно-кісткові ураження є проблемою не лише для патологоанатомів, але й для щелепно-лицевих хірургів, тому систематичний підхід до оцінки таких випадків є важливим, щоб уникнути діагностичних помилок і забезпечити правильний

діагноз, що гарантуватиме правильне лікування та інформативний прогноз.

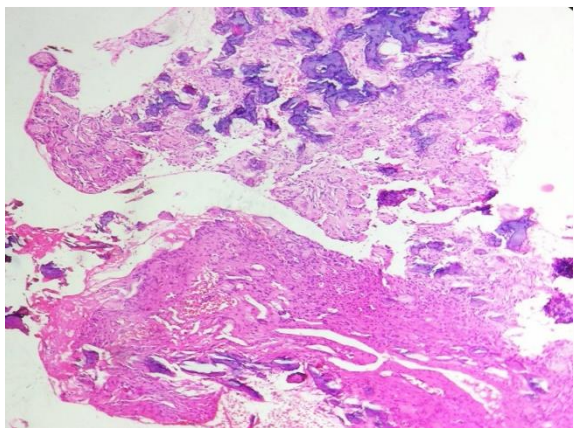


Рис. 6. Цементуюча фіброма нижньої щелепи. Два фрагменти пухлини, один з яких має переважно фіброзний компонент з відносно невеликою кількістю кальцинатів та інший з рівномірним розподілом фіброзної та кальцинованої тканини. Базофільні відкладення типу цементиклів. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 100$.

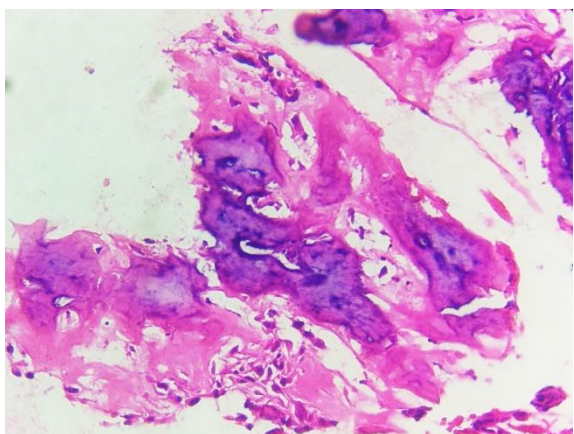


Рис. 7. Цементуюча фіброма нижньої щелепи. Єдиний фрагмент з невеликою кількістю кальцинованих кісткових балок з остеоїдом та остеобластами. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 400$.

Цементуюча фіброма є одним із типів цих уражень. Раніше цементуючу фіброму класифікували як дві різні патології залежно від того, кістка чи цемент утворюють основний кальцифікований продукт. Крім того, в минулому цементуючу фіброму класифікували на різні форми: осифікуючу форму, цементуючу форму, агресивну (ювенільну) форму, множинну осифікуючу фіброму, сімейну гігантоформну цементому [28].

В результаті проведення гістологічного дослідження нами визначено, що цементуюча фіброма складається з різної кількості цементу та фіброзної тканини в різних ділянках утвору. Внаслідок наявності подібних гістологічних ознак, заснованих на неактивному на вигляд одонтогенному епітелії, вбудованому у фіброзну строму, його часто важко диференціювати від фіброзної

дисплазії, тобто існує так зване гістологічне перекриття з фіброзною дисплазією, проте фіброзна дисплазія характеризується нечіткими межами, які непомітно зливаються з нормальною кісткою. Крім того, фіброзна дисплазія може виникати в будь-якій частині скелета, а цементно-осифікуюча і цементуюча фіброма та цементно-кісткова дисплазія зустрічаються виключно в щелепно-лицевих кістках [6]. На цьому етапі, безсумнівно, зрозуміло, що правильна рентгенологічна та клінічна кореляція, диференційна морфологічна діагностика разом відіграють велику роль в ідентифікації.

Диференційна діагностика з фіброзною дисплазією утруднена, оскільки морфологічно обидва захворювання дуже схожі [29]. Важливими диференційно-діагностичними ознаками цементуючої фіброми і фіброзної дисплазії є те, що цементуюча фіброма має круглу форму та спричиняє вузлове або куполоподібне розширення щелепи, тоді як фіброзна дисплазія має прямокутну форму та спричиняє подовжене веретеноподібне розширення. Краї різко визначені при цементуючій фібромі, тоді як краї при фіброзній дисплазії не чітко виражені і зливаються з нормальною кісткою [22]. Цементуюча фіброма має широкий віковий діапазон від 7 до 58 років, тоді як середній вік фіброзної дисплазії становить 20 років [30]. Цементуюча фіброма здебільшого спостерігається на нижній щелепі (70%), тоді як фіброзна дисплазія демонструє помітну схильність до верхньої щелепи [31]. Остаточну постановку діагнозу проводять лише після клінічних та рентгенологічних досліджень.

В літературі останніми роками обговорюється диференційна діагностика фіброзної дисплазії та осифікуючої фіброми на молекулярному рівні, досліджуючи мутацію в гені *GNAS* (guanine nucleotide-binding protein, alpha-stimulating activity polypeptide 1), і висновки вказують на те, що мутаційний аналіз гена *GNAS* є надійним доповненням до диференціації осифікуючої фіброми і фіброзної дисплазії щелепи, а мутація очевидна при фіброзній дисплазії [29].

Крім того, диференційну діагностику, в тому числі морфологічну, необхідно проводити також з резидуальною кісткою, яка на ранній стадії має рентгенологічні ознаки цементуючої фіброми, але наявність анамнезу щодо видалення зуба допомагає визначитися з діагнозом. Періапікальна дисплазія цементу пов'язана з вітальними зубами, зазвичай розвивається у нижніх передніх зубах, не викликає зміщення зубів, рідко досягає діаметра понад 1 см, тоді як цементуюча фіброма зазвичай має більші розміри. Важлива диференційна діагностика з амелобластомою, яка виникає в задній частині нижньої щелепи, має мультилокулярний вигляд і може викликати парестезію губи. І, що важливо, цементуючу фіброму потрібно диференціювати з остеогенною саркомою, яка має

нечіткі межі з утворенням періостальної кістки. Крім того, остеогенна саркома швидко росте і не має навколишньої фіброзної капсули [32].

Слід зазначити, що на гістологічне дослідження необхідно відправляти відразу кілька фрагментів новоутворення, взятих у різних ділянках. Достовірні ознаки пухлини не завжди виявляються у кожному біоптаті, що може призвести до діагностичної помилки.

За даними проведених досліджень А. Barberi для цементуючої фіброми характерні хаотично розташовані колагенові волокна, хоча також можна побачити спірально-видні і звивисті форми волокон. Кальцифіковані відкладення спостерігаються по всій фіброзній стомі. Також помітні неправильні трабекули пластинчастої кістки. Окрім цього, можна виявити кальцифікований матеріал у формі невеликих яйцевидних кулястих базофільних відкладень [33].

Ravi Prakash Sasankoti зі співавторами також представили рідкісний випадок цементуючої фіброми у чоловіка 55 років у задній верхньощелепній області зліва. Гістопатологія продемонструвала подібні мікроскопічні зміни, як і в дослідженні А. Barberi [33], тобто виявлено збільшення кількості колагенових волокон, які були непорядковано орієнтовані. Також було видно спірально-подібні і звивисті колагенові волокна, серед яких хаотично розкидані невеликі яйцеподібні базофільні відкладення матеріалу, схожого на цемент [32].

Мікроскопія зразка в нашому дослідженні показала, що ураження характеризується проліферацією веретеноподібних клітин, розташованих пучками та завитками. Існували різні розміри кальцифікатів, наприклад великого розміру овальної та круглої форми нагадували цементоподібні структури, в окремих полях зору виявляли значне скупчення кальцифікованого матеріалу у формі невеликих яйцевидних кулястих базофільних відкладень, а в інших полях зору серед клітинно-волокнистої сполучної тканини деінде

розташовувалися поодинокі кальцифікати невеликого розміру. Звертала на себе увагу в окремих полях зору невелика кількість кальцинованих кісткових балок з остеїдом та остеобластами.

Таким чином, заключний діагноз цементуючої фіброми орієнтується на клініко-рентгенологічний аспект ураження, проте гістологічне дослідження підтверджує діагноз. Лікування хірургічне з енукеацією-резекцією залежно від розміру ураження або більш широкою резекцією з реконструкцією кістки для великих фібром.

Висновки

Діагностика доброякісних фіброзно-кісткових утворень є надзвичайно складною, оскільки вони збігаються за клінічними, рентгенологічними та гістологічними проявами, що створює діагностичну дилему для хірургів, патологоанатомів і радіологів, оскільки план лікування та прогноз відрізняються у кожному сценарії.

Цементуюча фіброма, як мезенхімальна доброякісна одонтогенна пухлина щелеп, походить із мезенхімальних бластних клітин періодонтальної зв'язки і утворює комбінацію цементоподібної тканини і фіброзної клітинної тканини. Діагностика цементуючої фіброми орієнтована на клінічні та рентгенологічні результати ураження, а гістологічне дослідження підтверджує діагноз.

Виходячи з цього, щелепно-лицеві хірурги повинні бути обізнані про різні аспекти рентгенографічних результатів і враховувати висновок патологоанатомів, оскільки остаточний діагноз здебільшого базується на результатах гістологічного дослідження.

Перспективи подальших досліджень

Проведення гістохімічних, імуногістохімічних досліджень та поляризаційної мікроскопії колагенових волокон сполучної тканини для визначення особливостей колагенового складу в цементуючій фібромі.

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. Aravindan V, Kumar SP, Murugan PS, Krishnan M, Sneha A. A Rare Case of Cemento-Osifying Fibroma: A Case Report. Cureus. 2023;15(5):e38685. doi: 10.7759/cureus.38685. PMID: 37292559; PMCID: PMC10244260
2. Wright JM, Vered M. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumours. Head Neck Pathol. 2017;11(1):68-77. doi: 10.1007/s12105-017-0794-1. Epub 2017 Feb 28. PMID: 28247226; PMCID: PMC5340735

3. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editors: WHO Classification of Tumours. 4th. International Agency for Research on Cancer; 2017. 347 p.
4. Vered M, Wright JM. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumours. Head Neck Pathol. 2022;16(1):63-75. doi: 10.1007/s12105-021-01404-7. Epub 2022 Mar 21. PMID: 35312978; PMCID: PMC9019005

5. Nelson BL, Phillips BJ. Benign Fibro-Osseous Lesions of the Head and Neck. *Head Neck Pathol.* 2019;13(3):466-475. doi: 10.1007/s12105-018-0992-5. Epub 2019 Mar 18. PMID: 30887390; PMCID: PMC6684826
6. MacDonald DS. Classification and nomenclature of fibro-osseous lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2021;131(4):385-389. doi: 10.1016/j.oooo.2020.12.004. Epub 2021 Jan 29. Erratum in: *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2022 Mar;133(3):358. doi: 10.1016/j.oooo.2021.11.001. PMID: 33518490
7. Hamner JE, Scofield HH, Cornyn J. Benign fibro-osseous jaw lesions of periodontal membrane origin. An analysis of 249 cases. *Cancer.* 1968;22(4):861-878. doi: 10.1002/1097-0142(196810)22:4<861:aid-cncr2820220425>3.0.co;2-c. PMID: 5212309
8. Montgomery AH. Ossifying fibroma of the jaw. *Arch Surg.* 1927;15(1):30-44. doi:10.1001/archsurg.1927.01130190033002
9. Huebner GR, Brenneise CV, Ballenger J. Central ossifying fibroma of the anterior maxilla: report of case. *J Am Dent Assoc.* 1988;116(4):507-510. doi: 10.14219/jada.archive.1988.0304. PMID: 3288667
10. Walter JM Jr, Terry BC, Small EW, Matteson SR, Howell RM. Aggressive ossifying fibroma of the maxilla: review of the literature and report of case. *J Oral Surg.* 1979;37(4):276-286. PMID: 107301
11. Sciubba JJ, Younai F. Ossifying fibroma of the mandible and maxilla: review of 18 cases. *J Oral Pathol Med.* 1989;18(6):315-321. doi: 10.1111/j.1600-0714.1989.tb01559.x. PMID: 2810129
12. Sherman RS, Sternberg WC. Roentgen appearance of ossifying fibroma of bone. *Radiology.* 1948;50:295-309. <https://doi.org/10.1148/50.5.595>
13. Eversole LR, Leider AS, Nelson K. Ossifying fibroma: a clinicopathologic study of sixty-four cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985;60(5):505-511. doi: 10.1016/0030-4220(85)90239-7. PMID: 3864113
14. DelBalso AM, Werning JT. The role of computed tomography in the evaluation of cemento-osseous lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1986;62(3):354-357. doi: 10.1016/0030-4220(86)90021-6. PMID: 3462642
15. Yih WY, Pederson GT, Bartley MH Jr. Multiple familial ossifying fibromas: relationship to other osseous lesions of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1989;68(6):754-758. doi: 10.1016/0030-4220(89)90167-9. PMID: 2594324
16. Bertrand B, Eloy P, Cornelis JP, Gosseye S, Clotuche J, Gilliard C. Juvenile aggressive cemento-ossifying fibroma: case report and review of the literature. *Laryngoscope.* 1993;103(12):1385-1390. doi: 10.1288/00005537-199312000-00013. PMID: 8246661
17. Bhatt P, Kaushik A, Vinod VC, Sridevi K, Chaudhry A. Ossifying fibroma of the maxilla: a rare case. *Int J Radiol Radiat Ther.* 2017;3(2):198-201. <https://doi.org/10.15406/ijrrt.2017.03.00054>
18. da Silveira DT, Cardoso FO, E Silva BJ, E Alves Cardoso CA, Manzi FR. Ossifying fibroma: report on a clinical case, with the imaging and histopathological diagnosis made and treatment administered. *Rev Bras Ortop.* 2015;51(1):100-104. doi: 10.1016/j.rboe.2015.12.002. PMID: 26962494; PMCID: PMC4767835
19. Collins LHC, Zegalie NFT, Sassoon I, Speight PM. A Clinical, Radiological and Histopathological Review of 74 Ossifying Fibromas. *Head Neck Pathol.* 2023;17(2):433-446. doi: 10.1007/s12105-022-01522-w. Epub 2023 Jan 9. PMID: 36622534; PMCID: PMC10293549
20. Gondivkar SM, Gadail AR, Chole R, Parikh RV, Balsaraf S. Ossifying fibroma of the jaws: report of two cases and literature review. *Oral Oncol.* 2011;47(9):804-809. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.06.014. Epub 2011 Jul 8. PMID: 21741877
21. Chidzonga M, Sunhwa E, Makunike-Mutasa R. Ossifying Fibroma in the Maxilla and Mandible: A Case Report with a Brief Literature Review. *Cureus.* 2023;15(1):e34257. doi: 10.7759/cureus.34257. PMID: 36843790; PMCID: PMC9957536
22. Tompodung LM, Sensusiati AD. Ossifying fibroma of the maxilla: A case report with literature review. *Radiol Case Rep.* 2021;19(3):915-921. doi: 10.1016/j.radcr.2023.10.059. PMID: 38188957; PMCID: PMC10767277
23. Tamiolakis D, Thomaidis V, Ioani T. Cementoossifying fibroma of the maxilla: a case report. *Acta Stomatol Croat.* 2005;39(3):319-321. <https://hrcak.srce.hr/230>
24. Katti G, Khan MM, Chaubey SS, Amena M. Cemento-ossifying fibroma of the jaw. *BMJ Case Rep.* 2016;2016:bcr2015214327. doi: 10.1136/bcr-2015-214327. Erratum in: *BMJ Case Rep.* 2016 Jun 03;2016: bcr2015214327corr1. doi: 10.1136/bcr-2015-214327corr1. PMID: 27174452; PMCID: PMC4885328
25. Aburas S, Bandura P, Al-Ibraheem A, Berger S, Meier M, Turhani D. A large maxillary cemento-ossifying fibroma superimposed with solitary bone cyst documented over 18 years: A case report. *Int J Surg Case Rep.* 2020;68:257-262. <https://doi.org/10.1016/j.ijscr.2020.03.011>
26. Mohite DP, Palve DH, Udupure SR, Bodele VV, Jambhulkar MD, Borkar VA. A path less travelled—Short review on ossifying fibroma and osseous dysplasia. *Archives of Dental Research.* 2021;11(2):90-95. <https://doi.org/10.18231/j.adr.2021.014>
27. Baumhoer D, Haeffliger S, Ameline B, Hartmann W, Amary F, Clevon A, et al. Ossifying Fibroma of Non-odontogenic Origin: A Fibroosseous Lesion in the Craniofacial Skeleton to be (Re-)considered. *Head Neck Pathol.* 2022;16(1):257-267.

<https://doi.org/10.1007/s12105-021-01351-3>

28. Karjodkar FR, author: Textbook of dental & maxillofacial radiology. 2nd. New Delhi (India): Jaypee Publication; 2006. 560 p.

29. Dube NC, Moshly JR, Vuhahula EA, Sohal KS. Benign fibro-osseous lesions of the jaws: a clinicopathologic study of 98 Tanzanian patients. J Oral Med Oral Surg. 2019;25(4):1-7. <https://doi.org/10.1051/mbcb/2019026>

30. AlAmmari G, Almahbub A, Alfawwaz F. Navigating Fibrous Dysplasia of the Middle Turbinate: A Decade-Long Journey and Comprehensive Management Strategies. Cureus.

2023;15(12):e51313. doi: 10.7759/cureus.51313. PMID: 38288211; PMCID: PMC10823347

31. Alsufyani N, Alzahrani A. Imaging of Fibro-osseous Lesions and Other Bone Conditions of the Jaws. Dent Clin North Am. 2024;68(2):297-317. doi: 10.1016/j.cden.2023.09.005. Epub 2023 Oct 30. PMID: 38417992

32. Mohan RPS, Verma S, Singh U, Agarwa N. Cementifying fibroma. BMJ Case Rep. 2013;1-4. doi:10.1136/bcr-2013-009900

33. Barberi A, Cappabianca S, Colella G, authors: Textbook of oral pathology. 7th. Saunders: Mosby Publication; 2012. 286 p.

Волос Л.І., Столяр Г.Л. Рідкісний випадок цементуючої фіброми нижньої щелепи: патогістологічне дослідження.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Доброякісні фіброзно-кісткові ураження характеризуються заміщенням нормальної кісткової тканини сполучною, яка зазнає різного ступеня мінералізації. До основних форм фіброзно-кісткових уражень відносять фіброзну дисплазію, цементно-кісткову дисплазію та різні варіанти осифікуючої фіброми, такі як цементно-осифікуюча та цементуюча фіброми. Фіброзно-кісткові ураження мають подібні клінічні симптоми, рентгенологічні та гістологічні ознаки. Ці ураження є діагностичною проблемою для щелепно-лицевих хірургів і патологів. Тому комплексна оцінка цих уражень допоможе уникнути діагностичних помилок і поставити правильний діагноз, що стане запорукою правильного лікування та інформативного прогнозу. **Мета.** Встановити гістопатологічні особливості рідкісного випадку цементуючої фіброми нижньої щелепи для проведення диференційного діагнозу з іншими фіброзно-кістковими ураженнями та визначення прогнозу. **Методи.** Представлено рідкісний випадок цементуючої фіброми нижньої щелепи у пацієнта 34 років після діагностичного обстеження та хірургічного лікування в клініці хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Нами було проведене гістопатоморфологічне дослідження післяопераційного матеріалу, отриманого після ревізії патологічного вогнища на нижній щелепі зліва, висічення новоутвору та кюретажу в клініці хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії. Зразки тканини щелепи фіксували в 10% нейтральному забуференому розчині формаліну, декальцинували з подальшою дегідратацією в спиртах зростаючої концентрації та заливали парафіном. Гістологічні зрізи товщиною 5 ± 1 мкм виготовляли з парафінових блоків на ротаційному мікротомі Leica RM2235, потім фарбували гематоксиліном та еозином за стандартною методикою. Діагностику проводили на мікроскопі Leica DM750 (Leica Microsystems GmbH). **Результати.** На мікроскопічному знімку множинні дрібні фрагменти сполучної тканини з фібробластами та невеликою кількістю судин. Фіброзно-клітинна строма характеризувалася переважанням хаотично розташованих веретеноподібних і зірчастих клітин з базофільними гіперхромними ядрами і мінімальною кількістю цитоплазми. Серед сполучної тканини були численні округлі, неправильної форми та злиті кальцифіковані комплекси типу цементу без реакції остеобластів. Крім того, виявлено невелику кількість кальцинованих кісткових балок з остеїдом і остеобластами. Ортопанотограма показала рентгенпрозоре чітке зображення в області 37,38 та під кутом нижньої щелепи. **Підсумок.** Цементуюча фіброма, як мезенхімальна доброякісна одонтогенна пухлина щелеп, походить із мезенхімальних бластних клітин періодонтальної зв'язки і утворює комбінацію цементоподібної тканини та фіброзної клітинної тканини. Діагностика цементуючої фіброми ґрунтується на клінічних і рентгенологічних даних ураження, а гістологічне дослідження підтверджує діагноз.

Ключові слова: кісткова тканина, нижня щелепа, фіброзно-кісткове ураження, цементуюча фіброма, остеони, остеобласти, остеокласти, сполучна тканина, фібробласти, гістопатологія.

П.Є. Ковальчук
Т.В. Хмара
Т.В. Паньків

Буковинський державний
медичний університет
Чернівці, Україна

Надійшла: 22.10.2024

Прийнята: 10.12.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.40-44>

УДК: 616.748.3-089.843-031:611.984:616.748.3

ТОПОГРАФО-АНАТОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИКОРИСТАННЯ ГЛИБОКИХ М'ЯЗІВ ЗАДНЬОЇ ГРУПИ ГОМІЛКИ ДЛЯ МІОПЛАСТИКИ ДЕФЕКТІВ ВЕЛИКОГОМІЛКОВОЇ КІСТКИ

Kovalchuk P.Ye. , Khmara T.V.  ✉, Pankiv T.V.  Topographic and anatomical justification use of the deep muscles of the posterior compartment of the leg for myoplasty of tibia defects.

Bukovynian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine.

ABSTRACT. Actuality. Among the consequences of severe injuries of the lower extremities that cause permanent disability, special difficulties for surgical treatment are defects of the tibial bone, in particular after gunshot wounds. The choice of surgical treatment method for tibial bone defects must be strictly individual in each case, taking into account the nature, size, and localization of the bone defect, the condition of the surrounding tissues, and the general condition of the patient. Myoplasty of tibial defects is of great practical importance for the treatment of osteomyelitis, primarily caused by gunshot wounds. **The aim** of the study was to establish the expediency of using the muscles of the deep tendon of the posterior group of the leg to fill the cavities of the tibial bone by using muscle plastic, taking into account the intramuscular distribution of nerves and arteries. **Methods.** The macromicroscopic layer-by-layer preparation of nerves and arterial vessels of the posterior tibial area was used to prepare the right and left lower limbs of 20 fetuses of 4-10 months and 5 adult corpses of both sexes. The period of maturity for the study of the sources of innervation and blood supply of the tibialis posterior muscle, flexor digitorum longus muscle, flexor digitorum longus muscle, the number of muscle branches, the levels of their departure from nerves and arteries and the levels of entry into the abdomen of these muscles yams Particular attention is paid to the features of the intramuscular branching of the nerves and arteries of the flexor digitorum longus, flexor pollicis longus, and tibialis posterior muscle. **Results.** It was established that when moving the deep muscles of the posterior group of the lower leg for tamponade of the tibial cavity, the long nerve-muscular branches of the tibial nerve may remain intact. However, numerous vessels enter the length of the bellies of the posterior tibial muscle, the long muscle- flexor digitorum and flexor pollicis longus muscle. With the deep muscles of the back group of the leg, preserving the integrity of their nerves and arteries, you can fill the cavities of the back surface of the tibia within its lower half.

Key words: myoplasty, flexor digitorum longus, flexor pollicis longus, tibialis posterior, blood supply, innervation, tibia, human.

Citation:

Kovalchuk P.Ye., Khmara TV., Pankiv TV. [Topographic and anatomical justification use of the deep muscles of the posterior compartment of the leg for myoplasty of tibia defects]. Morphologia. 2024;18(4):40-4. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.40-44>

 Kovalchuk P.Ye. – 0000-0001-7658-0978;  Khmara T.V. 0000-0001-8023-5181;

 Pankiv T.V. 0000-0002-2525-562X

✉ khmara.tv.6@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Травматичні ушкодження нижніх кінцівок, зокрема великогомілкової кістки, є поширеними серед військовослужбовців та цивільного населення, що постраждали внаслідок бойових дій [1, 2]. Відновлення таких травм вимагає ефективних методів, що дозволяють не тільки зберегти кінцівку, але й відновити її функціональність, забезпечуючи максимальну якість життя пацієнта після

травми [3-5]. Глибокі м'язи задньої групи гомілки, завдяки своїй анатомічній близькості до великогомілкової кістки та хорошему кровопостачанню часто використовуються у міопластичі [6, 7]. Глибокі м'язи задньої групи гомілки забезпечують стабільність у зоні дефекту, сприяють швидкому загоєнню та зменшують ризик ускладнень, таких як інфекції або некроз тканин, що є надзвичайно важливим в умовах обмеженого доступу до

медичних ресурсів на полі бою [8, 9]. Також важливо зазначити, що використання глибоких м'язів задньої групи гомілки дозволяє мінімізувати травматизацію інших структур, що критично для збереження функціональних можливостей.

Викроювання клаптів із м'язів глибокого шару задньої групи гомілки вимагає ґрунтовних знань про типову і варіантну топографію їх судин і нервів. Це важливо як з точки зору збереження функції частини м'яза, що залишається, так і для збереження життєздатності викроеного клаптя. Тільки при збереженні кровопостачання, і передусім іннервації, клапоть зможе повністю виконати ту роль, яка покладається на нього при міопластичній операції [10, 11].

У джерелах літератури трапляються одиничні публікації щодо кровопостачання та іннервації глибоких м'язів задньої групи гомілки у плодів [12, 13] та у людей зрілого віку [14]. Проте, у літературі не приділено достатньої уваги внутрішньом'язовому розподілу нервів і артеріальних судин у задньому великогомілковому м'язі, довгому м'язі-згиначі пальців і довгому м'язі-згиначі великого пальця, що може визначити раціональні методи викроювання клаптів із цих м'язів.

Мета

З урахуванням внутрішньом'язового розподілу нервів і артерій у м'язах задньої групи гомілки встановити доцільність їхнього використання для заповнення методом міопластики порожнин великогомілкової кістки.

Матеріали та методи

Методом макромікроскопічного пошарового препарування нервів і артеріальних судин задньої гомілкової ділянки на препаратах правої і лівої нижніх кінцівок 20 плодів 4-10 місяців і 5 трупів людей обох статей другого періоду зрілого віку з'ясовано джерела іннервації та кровопостачання заднього великогомілкового м'яза, довгого м'яза-згинача пальців, довгого м'яза-згинача великого пальця, кількість м'язових гілок, рівні їхнього відходження від нервів та артерій і рівні входу в м'язи цих м'язів. Особливу увагу приділено особливостям внутрішньом'язового галуження нервів і артерій у довгому м'язі-згиначі пальців, довгому м'язі-згиначі великого пальця та у задньому великогомілковому м'язі.

Дослідження проведено відповідно до основних біоетичних положень Конвенції Ради Європи з прав людини та біомедицини (від 04.04.1997 р.), Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964-2013 рр.), наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р. та з урахуванням методичних рекомендацій МОЗ України «Порядок вилучення біологічних об'єктів від померлих осіб, тіла яких підлягають судово-медичній експертизі та патологоанатомічному дослідженню, для наукових цілей» (2018 р.). Комісією з питань біомедичної

етики Буковинського державного медичного університету (протокол № 1 від 09.09.2024 р.) порушень морально-правових норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

Результати та їх обговорення

У плодів людини варіанти іннервації м'язів часто пов'язані з неповною мієлінізацією нервових волокон або атиповим розвитком нервової системи, що впливає на швидкість передачі імпульсів і функціональність. Такі варіації можуть бути тимчасовими, оскільки нервова система плода продовжує розвиватися, а структура іннервації змінюється в процесі росту.

Іннервація довгого м'яза-згинача пальців, довгого м'яза-згинача великого пальця та заднього великогомілкового м'яза у плодів людини у деяких випадках представлена різними варіантами, що залежать від вікових та індивідуальних анатомічних особливостей. Кількість м'язових гілок до кожного м'яза та рівень їх галуження може варіювати. Класично, ці м'язи іннервуються великогомілковим нервом, який відходить від крижового сплетення (L4-S3). У плода 195,0 мм ТКД виявлено варіант високого розгалуження великогомілкового нерва, а саме: дві м'язові гілки до довгого м'яза-згинача пальців відходили на рівні нижнього кута підколінної ямки (рис. 1).

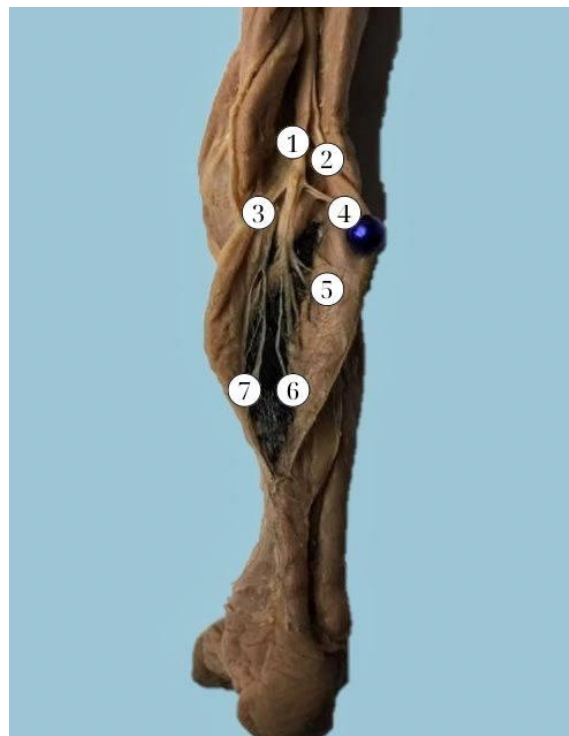


Рис. 1. Права задня гомілкова ділянка плода 195,0 мм ТКД. 1 – великогомілковий нерв; 2 – загальний мало-гомілковий нерв; 3 – м'язова гілка до бічної головки литкового м'яза; 4 – м'язова гілка до присередньої головки литкового м'яза; 5 – м'язові гілки до заднього великогомілкового м'яза; 6 – м'язові гілки до довгого м'яза-згинача великого пальця; 7 – м'язові гілки до довгого м'яза-згинача пальців. Фото макропрепарату. $\times 5$.

Довгий м'яз-згинач великого пальця іннервується трьома м'язовими гілками, що галузяться від великогомілкового нерва на рівні верхньої третини гомілки. У плода 210,0 мм ТКД встановлено варіант іннервації довгого м'яза-згинача пальців – м'язовими гілками малогомілкового нерва, а також подвійна іннервація довгого м'яза-згинача великого пальця – великогомілковим та малогомілковим нервами, що забезпечить додаткову функціональність м'яза.

Задній великогомілковий м'яз у плода 195,0 мм ТКД отримує іннервацію двома м'язовими гілками від великогомілкового нерва, що розгалужуються у верхній третині гомілкової ділянки до вступу нерва у цей м'яз. У плода 210,0 мм часткову іннервацію цього м'яза забезпечує глибока гілка малогомілкового нерва.

Кровопостачання довгого м'яза-згинача пальців, довгого м'яза-згинача великого пальця та заднього великогомілкового м'яза у плодів має певні особливості та варіанти залежно від стадії розвитку. Усі три м'язи глибокого шару задньої групи гомілки зазвичай постачаються кров'ю від задньої великогомілкової артерії, яка є гілкою підколінної артерії. Проте у плодів людини можуть спостерігатися варіації в анатомії артеріальної сітки.

У ранніх плодів людини артеріальні судини можуть бути недорозвиненими, що впливає на кровопостачання м'яза. На нашу думку, нестабільність у розвитку артеріальних гілок, може впливати як на рівень кровопостачання м'яза, так і його функціональний розвиток. Довгий м'яз-згинач пальців, довгий м'яз-згинач великого пальця, задній великогомілковий м'яз отримують основне кровопостачання від задньої великогомілкової артерії, проте в одиничних випадках у їхньому кровопостачанні можуть брати участь і гілки малогомілкової артерії, яка є додатковим джерелом васкуляризації для цієї ділянки.

Загалом, у плодів система кровопостачання цих м'язів перебуває в процесі формування, і артерії можуть мати нетипову будову або варіативність залежно від індивідуальних особливостей. Такі варіанти є характерними для плодового періоду розвитку і зазвичай стабілізуються після народження.

У людей зрілого віку іннервація заднього великогомілкового м'яза забезпечується переважно однією нервовою гілкою, що бере початок від передньої поверхні великогомілкового нерва на 6,0-18,0 см нижче суглобової щілини коліна. У трьох випадках виявлено три гілки великогомілкового нерва, які прямували до заднього великогомілкового м'яза. Привертає увагу те, що перед вступом у верхню половину задньої поверхні черевця заднього великогомілкового м'яза вищезазначені 1-3 м'язові гілки розгалужуються на різну кількість гілок другого порядку. У кровопостачанні заднь-

ого великогомілкового м'яза беруть участь численні короткі м'язові гілки задньої великогомілкової артерії, які проникають в однойменний м'яз на всій протяжності його черевця. На нашу думку, формування клаптів із заднього великогомілкового м'яза навряд чи можливо без пошкодження його нервів, які вступають у ділянці середини задньої поверхні черевця цього м'яза.

Довгий м'яз-згинач великого пальця, який є самим великим м'язом глибокого шару задньої групи гомілки, іннервується, як правило однією, рідко двома м'язовими гілками великогомілкового нерва. У людей зрілого віку найбільш високий рівень відходження цих гілок від великогомілкового нерва відзначено на 5,0-6,0 см нижче суглобової щілини коліна (4 спостереження), а низький рівень – на 18,0-21,0 см нижче цього рівня (6 випадків). Слід зауважити, що 1-2 м'язові гілки великогомілкового нерва, спускаючись по задній поверхні довгого м'яза-згинача великого пальця, діляться на гілки другого порядку, які входять у середню, і в одиничних спостереженнях – у нижню третину черевця м'яза. Кровопостачання довгого м'яза-згинача великого пальця забезпечується 3-6 короткими м'язовими гілками малогомілкової артерії, які вступають у черевце м'яза по всій протяжності його передньої поверхні. Можна припустити, що при тампонаді порожнини великогомілкової кістки довгим м'язом-згиначем великого пальця, легко зберегти цілість нервів цього м'яза як при високому, так і при низькому їх відгалуженні від великогомілкового нерва. Однак, переміщення довгого м'яза-згинача великого пальця у присередній бік пов'язано з порушенням цілості коротких гілок малогомілкової артерії.

В іннервації довгого м'яза-згинача пальців у людей зрілого віку беруть участь 1-2 м'язові гілки, що відокремлюються від великогомілкового нерва на 4,0-18,0 см нижче суглобової щілини коліна. Перед вступом у задню поверхню черевця довгого м'яза-згинача пальців, ці нервові м'язові гілки великогомілкового нерва також розгалужуються на гілки другого порядку, більшість із яких входить у верхню половину черевця довгого м'яза-згинача пальців (рис. 2). Кровопостачання довгого м'яза-згинача пальців забезпечується численними короткими м'язовими гілками задньої великогомілкової артерії, які вступають у черевце м'яза на всій його протяжності.

Тому, поздовжнє розділення довгого м'яза-згинача пальців на частини і переміщення вузького клаптя м'яза у кісткову порожнину великогомілкової кістки може супроводжуватися порушенням цілості нервів і артерій із наступною атрофією переміщеної частини м'яза. Таким чином, довгий м'яз-згинач пальців мало придатний для переміщення на присередню поверхню великогомілкової кістки.

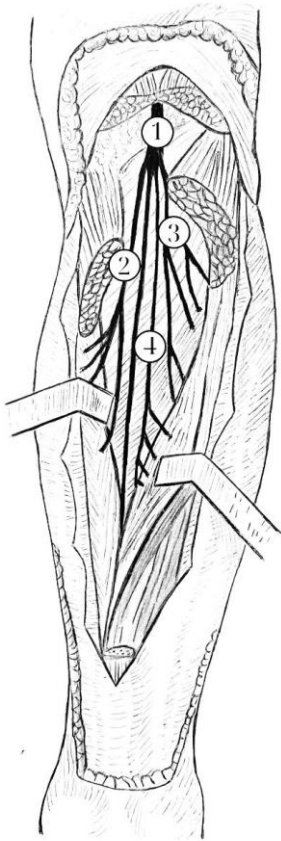


Рис 2. Іннервація глибоких м'язів задньої групи правої гомілки жінки 62 років (схематичне зображення): 1 – великогомілковий нерв; 2 – м'язові гілки до довгого м'яза-згинача пальців; 3 – м'язові гілки до заднього великогомілкового м'яза; 4 – м'язові гілки до довгого м'яза-згинача великого пальця.

Описане топографічне розміщення артерій і нервів довгого м'яза-згинача пальців дозволяє швидше заповнювати цим м'язом дефект задньої поверхні великогомілкової кістки і до того ж без поздовжнього поділу довгого м'яза-згинача пальців.

Висновки

1. При переміщенні глибоких м'язів задньої групи гомілки для тампонади порожнини великогомілкової кістки можуть залишитися непошкодженими довгі нервові м'язові гілки великогомілкового нерва, але ушкоджуються численні судини, що входять по довжині черевців заднього великогомілкового м'яза, довгого м'яза-згинача пальців і довгого м'яза-згинача великого пальця.

2. Глибокими м'язами задньої групи гомілки, зберігаючи цілість їх нервів і артерій, можна заповнити порожнини задньої поверхні великогомілкової кістки у межах її нижньої половини.

Перспективи подальших досліджень

Визначити практичне значення індивідуальної та вікової анатомічної мінливості артерій та нервів у товщі м'язів передньої групи гомілки у людей зрілого віку.

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 «Розробка і впровадження нових технологій остеосинтезу та ендопротезування» (номер державної реєстрації 0122U002210).

Літературні джерела References

1. Kovalchuk P, Khmara T, Komar T. Modern views on methods of surgical treatment of tibial defects after gunshot injuries. Clin Anat Oper Surg. 2024;23(2):121–126. <http://dx.doi.org/10.24061/1727-0847.23.2.2024.39>
2. Tao S, Dong Z, Wei J, Liu L, Zhang L, Shi S. Modified medial gastrocnemius myocutaneous flap with extended anterior, inferior and/or posterior boundaries: Anatomical observation and report of a clinical series of 33 flaps. Injury. 2024;55(6):111491. <http://dx.doi.org/10.1016/j.injury.2024.111491>
3. Liu WJ, Zhang HY, Liu DW. Clinical effects of different types of tissue flaps in repairing the wounds with steel plate exposure and infection after proximal tibial fracture surgery. Zhonghua Shao Shang Yu Chuang Mian Xiu Fu Za Zhi. 2023;39(12):1140–1148. <http://dx.doi.org/10.3760/cma.j.cn501225-20231101-00171>
4. Liu H, Liu J, Wu Y, Ma Y, Zhou M, Xue Y, et al. Analysis of the risk factors for free flap necrosis in soft tissue reconstruction of the lower limbs. Orthop Surg. 2023;15(6):1534–1540. <http://dx.doi.org/10.1111/os.13727>
5. Chen H, Meng D, Yin G, Hou C, Lin H. Translocation of the soleus muscular branch of the tibial nerve to repair high common peroneal nerve injury. Acta Neurochir (Wien). 2019;161(2):271–277. <http://dx.doi.org/10.1007/s00701-018-03797-x>
6. Yu D, Yin H, Han T, Jiang H, Cao X. Intramuscular innervations of lower leg skeletal muscles: applications in their clinical use in functional muscular transfer. Surg Radiol Anat. 2016;38(6):675–685. <http://dx.doi.org/10.1007/s00276-015-1601-x>
7. Fracol ME, Janes LE, Ko JH, Dumanian GA. Targeted muscle reinnervation in the lower leg: An anatomical study. Plast Reconstr Surg. 2018;142(4):541e–550e. <http://dx.doi.org/10.1097/PRS.0000000000004773>
8. Tiwana MS, Sinkler MA, Bordoni B. Anatomy, shoulder and upper limb, triceps muscle. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls

Publishing; 2024.

9. Bao B, Wei H, Zhu H, Zheng X. Transfer of soleus muscular branch of tibial nerve to deep fibular nerve to repair foot drop after common peroneal nerve injury: A retrospective study. *Front Neurol*. 2022;13:745746.

<http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2022.745746>

10. Emamhadi M, Naseri A, Aghaei I, Ashrafi M, Emamhadi R, Andalib S. Soleus nerve transfer to deep peroneal nerve for treatment of foot drop. *J Clin Neurosci*. 2020;78:159–163. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2020.04.086>

11. Huang K, Ye X, Zhu S, Liu Y, Sun F, Su X, et al. Anatomical study of the motor branches of the tibial nerve and incision design for hyperselective neurectomy. *Surg Radiol Anat*. 2024;46(7):1121–1129. <http://dx.doi.org/10.1007/s00276-024-03383-0>

12. Komar TV. Anatomic variability of the nerves of the triceps surae in early human fetuses. *Morphologia*. 2021;15(3):101–108. <http://dx.doi.org/10.26641/1997-9665.2021.3.101-108>

13. Komar TV, Department of Pathological Anatomy, Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine, Khmara TV, Protsak TV, Zamorskii II, Sarafyniuk PV, et al. Variant anatomy of the tibial nerve in posterior calf muscles in human fetuses. *Arch Balk Med Union*. 2022;57(4):363–371. <http://dx.doi.org/10.31688/abmu.2022.57.4.05>

14. Wade MD, McDowell AR, Ziermann JM. Innervation of the long head of the triceps brachii in humans—A fresh look: Innervation of the long head of the triceps brachii. *Anat Rec (Hoboken)*. 2018;301(3):473–483. <http://dx.doi.org/10.1002/ar.23741>

Ковальчук П.Є., Хмара Т.В., Паньків Т.В. Топографо-анатомічне обґрунтування використання глибоких м'язів задньої групи гомілки для міопластики дефектів великогомілкової кістки.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Серед наслідків тяжких ушкоджень нижніх кінцівок, що спричинюють стійку інвалідність, особливі труднощі для оперативного лікування становлять дефекти великогомілкової кістки, зокрема після вогнепальних поранень. Вибір методу оперативного лікування при дефектах великогомілкової кістки має бути суворо індивідуальним у кожному окремому випадку, з урахуванням характеру, розміру та локалізації кісткового дефекту, стану навколишніх тканин, загального стану хворого. Міопластика дефектів великогомілкової кістки має важливе практичне значення для лікування остеомієліту, передусім спричиненого вогнепальними пораненнями. **Метою** дослідження було встановити доцільність використання м'язів глибокого шару задньої групи гомілки для заповнення порожнин великогомілкової кістки методом м'язової пластики з урахуванням внутрішньом'язового розподілу нервів і артерій. **Методи.** Методом макромікроскопічного поширеного препарування нервів і артеріальних судин задньої гомілкової ділянки на препаратах правої і лівої нижніх кінцівок 20 плодів 4–10 місяців і 5 трупів людей обох статей другого періоду зрілого віку з'ясовано джерела іннервації та кровопостачання заднього великогомілкового м'яза, довгого м'яза-згинача пальців, довгого м'яза-згинача великого пальця, кількість м'язових гілок, рівні їхнього відходження від нервів та артерій і рівні входження у черевця цих м'язів. Досліджено особливості внутрішньом'язового галуження нервів і артерій у довгому м'язі-згиначі пальців, довгому м'язі-згиначі великого пальця та у задньому великогомілковому м'язі. **Результати.** Встановлено, що при переміщенні глибоких м'язів задньої групи гомілки для тампонади порожнини великогомілкової кістки можуть залишитися непошкодженими довгі нервові м'язові гілки великогомілкового нерва, але ушкоджуються численні судини, що входять по довжині черевців заднього великогомілкового м'яза, довгого м'яза-згинача пальців і довгого м'яза-згинача великого пальця. Глибокими м'язами задньої групи гомілки, зберігаючи цілість їх нервів і артерій, можна заповнити порожнини задньої поверхні великогомілкової кістки у межах її нижньої половини.

Ключові слова: міопластика, довгий м'яз-згинач пальців, довгий м'яз-згинач великого пальця, задній великогомілковий м'яз, кровопостачання, іннервація, великогомілкова кістка, людина.

М.Ю. Кріцак
О.Б. Слабий
О.Б. Ясіновський

Тернопільський національний
медичний університет імені І.Я.
Горбачевського МОЗ України
Тернопіль, Україна

Надійшла: 24.10.2024

Прийнята: 19.11.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.45-51>

УДК 616.26-018.28-091.8:616.381-003.219]-092.9

СТРУКТУРНІ ЗМІНИ СУХОЖИЛКО- ВОЇ ЧАСТИНИ ДІАФРАГМИ ЩУРА ЗА УМОВ ЖОВТЯНИЦІ ТА ПНЕВМО- ПЕРИТОНЕУМУ НИЗЬКОГО ТИСКУ

Kritsak M.Yu.  , Slabyi O.B. , Yasinovskyi O.B.  Structural changes in the tendinous part of the rat diaphragm under conditions of jaundice and low-pressure pneumoperitoneum.

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Obstructive jaundice is one of the most serious complications of diseases of the organs of the pancreatoduodenal zone. Laparoscopy is widely used in surgical operations for jaundice and not only because of its minimally traumatic nature and contributes to the rapid recovery of the patient. In recent years, laparoscopic methods have significantly progressed in minimally invasive hepatobiliary and pancreatic surgery. However, there is still not enough data on how pneumoperitoneum caused by carbon dioxide, which is a companion of any laparoscopy, affects the abdominal organs. **Objective** of the work was to investigate changes in the tendon part of the diaphragm that occur in the presence of mechanical jaundice after the creation of pneumoperitoneum. **Methods.** The study was performed on 75 rats, divided into 5 groups. Mechanical jaundice was simulated by ligation of the common bile duct under anesthesia. Pneumoperitoneum was created using the KARL STORZ electronic laparoflator 264300 20 insufflator. The preparations were stained with hematoxylin and eosin. **Results.** In the intact group, the tendon part microscopically corresponded to the structure inherent to this tissue. Under the influence of jaundice, structural disorders occurred: the thickness increased, which was due to edematous loosening; collagen fibers had a tortuous appearance; increased cellular infiltration, both diffuse and with the formation of focal infiltrates. After 2 hours, edema increased and the unidirectionality of collagen fibers was disturbed. The presence of fatty tissue and macrophage and lymphocytic infiltrates was also monitored. After 3 hours, the compact arrangement of collagen fibers was partially preserved in the tendons, and over a larger area, collagen fibers were represented by an amorphous mucoid mass. **Conclusion.** In the presence of jaundice, looseness and tortuous course of collagen fibers with cellular infiltration in which macrophages were noted were noted. When pneumoperitoneum was used, deeper structural disorders were observed, which depended directly on the duration of intra-abdominal pressure.

Key words: jaundice, diaphragm, pneumoperitoneum, rats, histology.

Citation:

Kritsak MYu, Slabyi OB, Yasinovskyi OB. [Structural changes in the tendinous part of the rat diaphragm under conditions of jaundice and low-pressure pneumoperitoneum]. Morphologia. 2024;18(4):45-51. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.45-51>

 Kritsak M.Yu. 0000-0003-1020-3584

 Slabyi O.B. 0000-0001-5645-7905

 Yasinovskyi O.B. 0000-0002-5121-3140

 kricakmy@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Механічна жовтяниця (МЖ) відноситься до найбільш серйозних ускладнень захворювань органів панкреатодуоденальної зони, яка різко обтяжує стан хворих і призводить до розвитку печінково-ниркової недостатності, тромбоцитопенії, геморагічного синдрому, гнійного холангіту, абсцесів печінки тощо [1-5]. Стрімке зростання по-

казників пігментного обміну і, як наслідок, розвиток печінково-ниркової недостатності вимагають від хірургів проведення корекції жовчовідведення в ургентному порядку. При цьому частота ускладнень після операцій на висоті МЖ становить 24–54 %, летальність – 7–45 %, а при розвитку гострого холангіту та біліарного сепсису сягає 80–90 %.

На думку Benjamin R. Poh, пацієнти з жовтяницею можуть не мати такий хороший післяопераційний період, як аналогічні пацієнти без жовтяниці після лапароскопічної холецистектомії [1]. Причому попередні дослідження продемонстрували вищі коефіцієнти конверсії та несприятливі результати, що пояснюється низкою факторів, не в останню чергу з яких більшість, якщо не всі ці пацієнти можуть мати клініку холангіту, дисфункції печінки або коагулопатії [6, 7, 8]. Це може бути пов'язано з тим, що сам жовтяничний стан викликає додаткову захворюваність, або той факт, що жовтяниця є супутнім маркером більш серйозного основного захворювання, обидва вони можуть призвести до збільшення післяопераційної захворюваності та гірших результатів [3, 5].

Холестаз визначається як порушення відтоку жовчі, викликане захворюваннями гепатоцитів, внутрішньопечінкових жовчних проток або позапечінкової жовчовивідної системи. Холестатична хвороба печінки є однією з найпоширеніших форм захворювань печінки, що є наслідком спадкових або набутих захворювань печінки [9]. Недостатній відтік жовчі з будь-якої причини призводить до накопичення вмісту жовчі, включаючи білірубін, жовчні кислоти та ліпіди, у печінці, що, як наслідок, викликає підвищення рівня білірубіну та жовчних солей у печінці та крові, а також порушення ліпідного обміну [2, 9]. Клінічно у пацієнтів зазвичай спостерігається жовтяниця внаслідок гіпербілірубінемії. Інші симптоми включають глинистий стілець, свербіж або нечасті епізоди кровотечі, такі як внутрішньочеревний крововилив. Хронічна холестатична хвороба печінки може прогресувати до цирозу печінки та печінкової недостатності та є основною причиною трансплантації печінки [4, 6]. Позапечінковий холестаз спричинений структурними аномаліями жовчних шляхів, включаючи обструкцію жовчних проток і жовчного міхура. Хірургічне лікування зазвичай застосовується для відновлення фізіологічної функції. Однак внутрішньопечінковий холестаз є більш складним і зазвичай потребує складних досліджень [8].

Лапароскопія широко використовується в хірургічних операціях через її малотравматичність і сприяє швидкому одужанню хворого [6, 8]. За останні роки лапароскопічні методи значно прогресували в малоінвазивній гепатобіліарній та панкреатичній хірургії. Проте досі немає достатньо даних за те, як впливає пневмоперитонеум викликаний вуглекислим газом, який є супутником будь-якої лапароскопії, на органи черевної порожнини. Наявні дані свідчать, що інтраабдомінальний тиск створений в черевній порожнині зменшує ємність легень і зміщує діафрагму в каудальному напрямку [10]. А як впливає пневмоперитонеум на мікроструктуру діафрагми за

умов жовтяниці, яка сама собою негативно впливає на цей дихальний м'яз?

Мета

Дослідити зміни сухожилкової частини діафрагми, які виникають під час наявності механічної жовтяниці після створення пневмоперитонеума, який супроводжує кожне лапароскопічне оперативне втручання.

Матеріали і методи

Для вирішення поставленої мети нами випадковим чином було відібрано 75 статевозрілих щурів віком 6 місяців та масою тіла $225 \pm 20,0$ гр.. щурів знаходились на стандартному вигодовуванні і утримувались у віварії Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського Міністерства Охорони Здоров'я України згідно правил. Під час експериментального дослідження тварин розділено на 5 групи по 15 особин в кожній. I група – інтактна група, де не проводили моделювання жодного патологічного процесу, для визначення нормальної структури сухожилка діафрагми. II група – де проводилось моделювання механічної жовтяниці на протязі 7 днів [11]. Даний термін вибраний не випадково, згідно літератури проміжок часу від 5 до 7 днів достатній для вираженості жовтяниці у щурів та виникнення змін у органах та системах організму і оптимальний для вивчення цієї патології. III група – моделювалась 7-ми денна жовтяниця, опісля створювався пневмоперитонеум на рівні 5 мм.рт.ст. вуглекислим газом за допомогою інсуфлятора KARL STORZ electronic laparoflator 264300 20. IV група – жовтяниця плюс пневмоперитонеум на протязі 2 годин. V група - жовтяниця і пневмоперитонеум 3 години. Наявні терміни вибрані у зв'язку з тим, що кожне оперативне втручання з приводу хронічного калькульозного холециститу, холедохолітазу та механічної жовтяниці триває 1-3 години, що залежить від індивідуальних особливостей анатомічної будови, вираженості патології і також навиків хірургічної бригади. Наявність жовтяниці оцінювалось візуально по наявності таких ознак як: пожовтіння склер; зміна забарвлення сечі; ахолічний кал; пожовтіння вушок; у процесі відбору діафрагми відмічались жовтушний відтінок внутрішніх органів та розширення позапечінкових жовчних проток.

Усі хірургічні маніпуляції проводили в відповідному приміщенні з температурою повітря $18-20^{\circ}\text{C}$ та відносній вологості 70-80 %, за однаковою технікою. За 12 годин до проведення анестезії щурів не годували проте вони мали вільний доступ до води, за дві години до анестезії воду забирали із клітки. Щурів вводили проводили знечулення за допомогою ін'єкції 10 мг/кг розчину ксилазину та 90 мг/кг розчину кетаміну, вводили з інтервалом 15 хв внутрішньом'язово. Тварин фіксували на столику в положенні лежачи на спині. Перед оперативним втручанням черевну стінку

звільняли від шерсті, а потім продезінфікували 10 % розчином повідон-йоду, обложували стерильними одноразовими пеленками. Проводили серединний лапаротомний доступ довжиною 3 см, після входу в черевну порожнину загальну жовчну протоку ідентифікували шляхом обережного каудального витягування шлунку та дванадцятипалої кишки (рис. 1). Протоку перев'язували шовним матеріалом розміру 5/0.

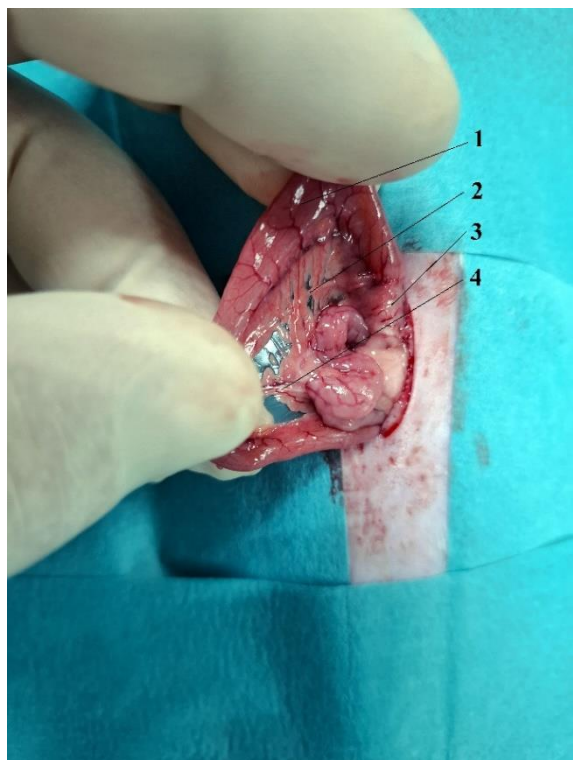


Рис. 1. Моделювання механічної жовтяниці: 1 – дванадцятипала кишка; 2 – загальна жовчна протока; 3 – пілорична частина шлунку; 4 – панкреатична протока.

На 7-му добу проводилось повторне знечуження вище вказаними препаратами і проводилось утворення пневмоперитонеуму згідно авторського свідоцтва на твір № 126409 [12] (рис.

2). Усі маніпуляції з тваринами проводилися в першій половині дня. Евтаназію тварин здійснювали за допомогою внутрішньоочеревинної ін'єкції високих доз препарату, а саме – розчину тіопенталу з розрахунку 75 мг/кг маси тіла. Після проведеного експерименту проводили забір діафрагми щура відповідно до авторського свідоцтва на твір № 126059 від 29 квітня 2024 року [13]. При проведенні роботи над експериментальними тваринами дотримувались положень Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях від 18.03.1986 р., Директиви Ради Європи 2010/63/EU.

На макропрепараті діафрагми проводили виділення окремо сухожильної, частини і поміщали у 10 % розчин нейтрального формаліну (рис. 3). Після фіксації гістологічний матеріал зневоднювали в етилових спиртах зростаючої концентрації та заливали у парафін. З кожного парафінового блоку на мікротомі виготовляли гістологічні зрізи товщиною 5–7 мкм., які після депарафінізації фарбували гематоксиліном і еозином [14].

Слід зазначити, що два щури із основної групи загинули на 5 та 6 добу після операції. У III групі – 3 тварини, дві на 4-ту добу і одна на 6. У IV групі – 2 особини на 4-ту добу. У V групі смертності не було, усім тваринам відтворено повністю експеримент. Слід відмітити при створенні пневмоперитонеуму смертності серед тварин не констатовано. Механічна жовтяниця все ж таки є важким захворюванням для організму, яке призводить до поліорганної недостатності і є причиною високої смертності і наш експеримент не є виключенням. Щури, які загинули під час експериментальної процедури, були виключені з аналізу дослідження, і нових щурів не додавали замість них. Усіх інших щурів умертвляли в кінці експерименту. Розширення жовчних проток було виявлено у всіх щурів наприкінці експерименту.

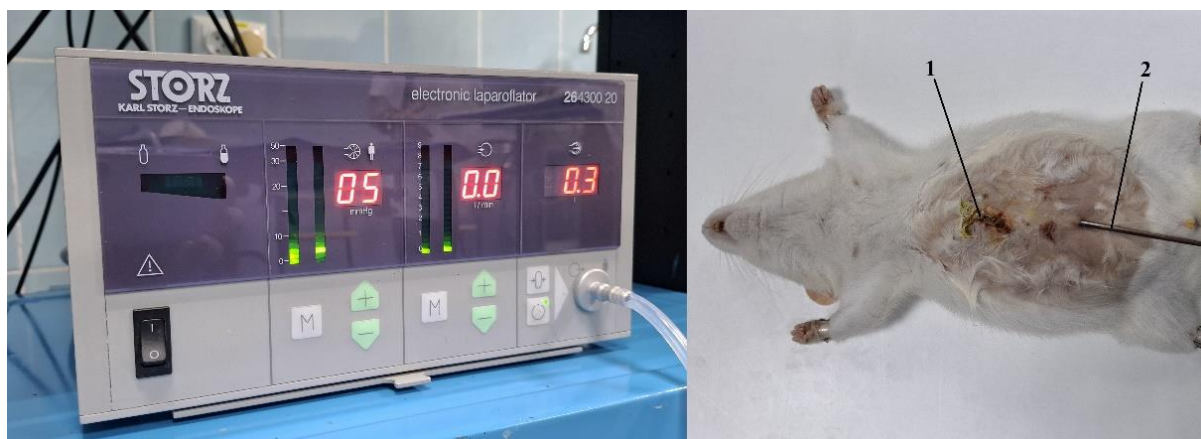


Рис. 2. Створений пневмоперитонеум вуглекислим газом 5 мм.рт.ст.: 1 – рана після лапаротомії; 2 – голка Вереша.

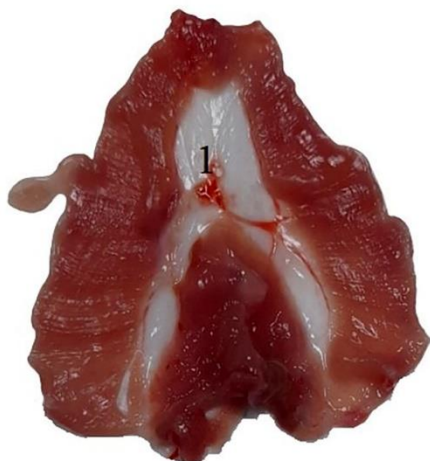


Рис. 3. Макропрепарат діафрагми: 1 – сухожилкова частина.

Результати та їх обговорення

Діафрагма представляє собою непарний м'язово-апоневротичний орган, що розділяє грудну і черевну порожнини. З боку цих порожнин діафрагма покрита тонкими фасціями і серозними оболонками. Діафрагма має форму склепіння, зверненого опуклістю в грудну порожнину, що обумовлено більш високим тиском очеревинної порожнини і найнижчим - в плевральній. Відомо, що складається з двох основних частин сухожильної та м'язової. М'язові пучки діафрагми радіально орієнтовані до її центру і за місцем початку поділяються на поперекову, реберну та грудину частини. Аналогічний склад має і діафрагма щурів.

Сухожилкова частина діафрагми інтактних щурів І групи була представлена переважно щільними пучками колагенових волокон, які формують апоневротичний листок. Товщина його незначно варіює в різних зрізах. Як і вся діафрагма, з боку грудної порожнини сполучна тканина вкрита діафрагмальною фасцією. Мікроскопічно вона має пухку консистенцію і містить місцями жирову клітковину. Збоку черевної порожнини вкрита тонким листком парієтальної очеревини. Колагенові волокна гомогенно еозинофільні з незначними змінами інтенсивності забарвлення, нерідко розриваються без втрати їхньої цілісності. Клітинний компонент бідний і складається з фібробластів, фіброцитів та гістіоцитів (рис.4).

Колагенові волокна одні з позаклітинних, близькоспоріднених білків, що є основним компонентом сполучної тканини і зумовлює її міцність і гнучкість. Він є фібрилярним білком глікопротеїдної природи, що складається із макромолекул, які мають унікальну триспиральну структуру, становить близько 1/3 усіх білків організму ссавців і 70 % маси білків шкіри. Входить до складу кісток, сухожилля, судин, хрящів, шкіри переважно у вигляді нерозчинних позаклітинних волокон. Цей білок в організмі людини виконує важливу «регу-

ляторну роль» функціонування сполучної тканини: якісний склад структури клітин; забезпечення пружності та еластичності тканини; запобігання її зневодненню; забезпечення зволоженню більш глибоких шарів шкіри та сповільнення її старіння; покращання стану волосся та нігтів.

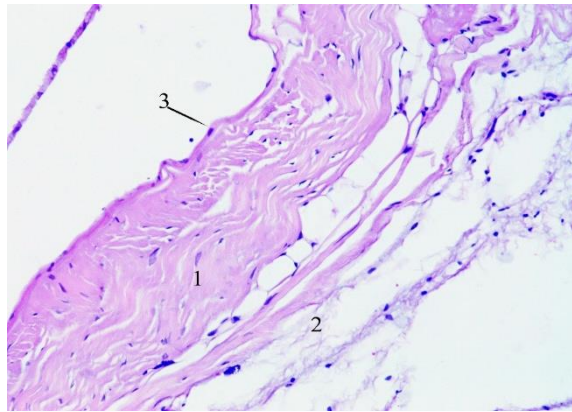


Рис. 4. Гістологічна структура сухожилкової частини діафрагми щура інтактної групи: 1 - щільні пучки колагенових волокон; 2 - пухка клітковина грудної поверхні; 3 - парієтальна очеревина. Забарвлення гематоксилином і еозином. $\times 200$.

При дослідженні мікропрепаратів отриманих від особин II групи, де моделювалась жовтяниця сухожилкова частина діафрагми мала ідентичний інтактним щурам тканинний склад, але різнилась співвідношенням структурних компонентів. Загалом товщина сухожилкового пласту збільшувалася, що було зумовлено набряковим розрихленням. Колагенові волокна мали звивистий вигляд, а нерівномірність забарвлення ставала більш виразною у порівнянні із інтактною групою. Звертала увагу посилені клітинна інфільтрація як дифузна, так із формуванням осередкових інфільтратів. В структурі інфільтратів поряд із традиційними клітинами з'являлися макрофаги (рис. 5).

В процесі застосування пневмоперитонеума вуглекислим газом на протязі різного часу структура цієї частини діафрагми ще більше зазнавала змін. В сухожилковій частині діафрагми через 1 годину інтраабдомінального тиску, який в лапароскопічній хірургії прийнято називати «низьким тиском» спостерігався помірний набряк, який призводив до розрихлення колагенових волокон. Мали місце осередки розпаду волокон із незначною реактивною клітинною інфільтрацією (рис. 6). Ми це пояснюємо тим що поряд із порушеною структурою внаслідок механічної жовтяниці, дихальний м'яз зазнає впливу ще одного патологічного стану, який зміщує діафрагму у плевральну порожнину і виникає перерозтягнення сухожилкової частини.

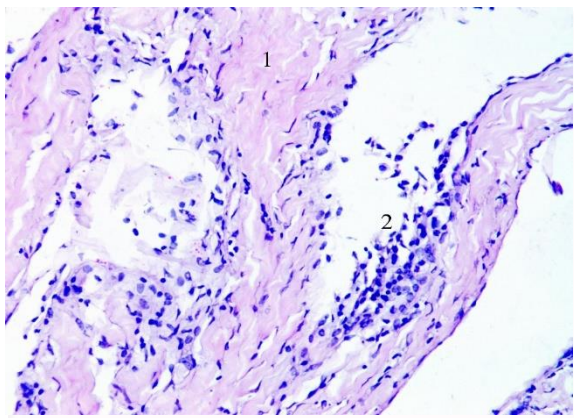


Рис. 5. Гістологічна структура сухожилкової частини діафрагми щура із модельованою жовтяницею: 1 - звивисті і нерівномірно забарвлені колагенові волокна; 2 - клітинний інфільтрат. Забарвлення гематоксилином і еозином. $\times 200$.

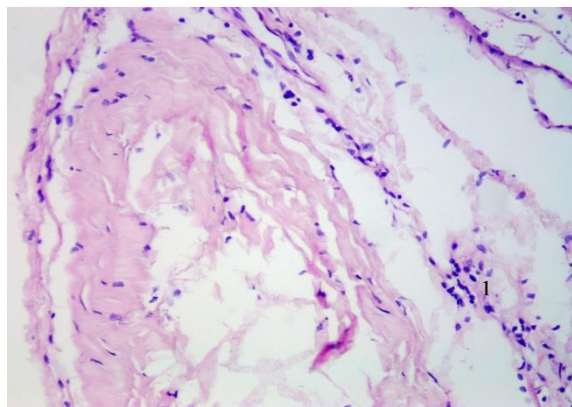


Рис. 7. Гістологічна структура сухожилка діафрагми щура із змодельованою жовтяницею після 2-х годинного пневмоперитонеуму: 1 - порушення типового розташування колагенових волокон, набряк та помірна клітинна інфільтрація. Забарвлення гематоксилином і еозином. $\times 200$.

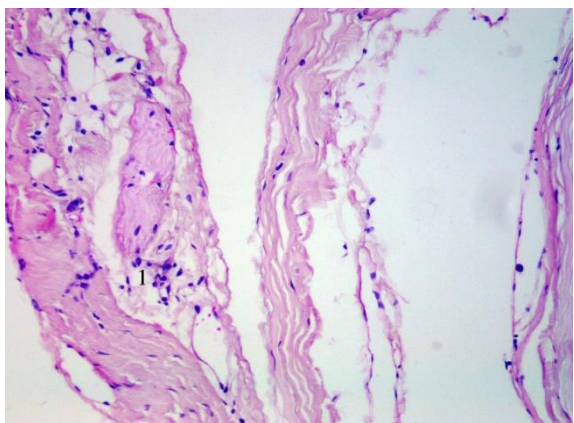


Рис. 6. Гістологічна структура сухожилка діафрагми щура із змодельованою жовтяницею через 1 годину після створення пневмоперитонеуму: 1 - набряк, розволокнення та клітинна інфільтрація. Забарвлення гематоксилином і еозином. $\times 200$.

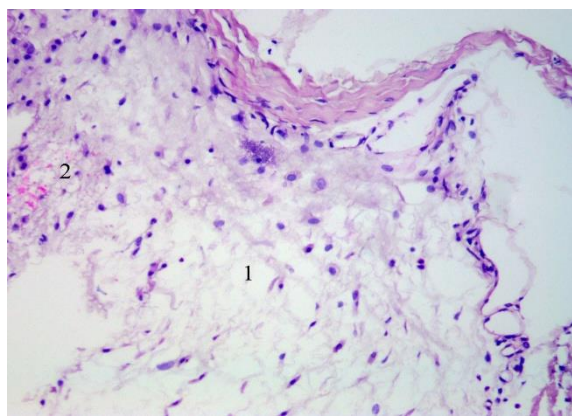


Рис. 8. Гістологічна структура сухожилка діафрагми щура із змодельованою жовтяницею після 3-х годинного пневмоперитонеуму: 1 - дезорганізація, руйнування колагенових волокон, різкий набряк; 2 - розсіяний крововилив. Забарвлення гематоксилином і еозином. $\times 200$.

При дослідженні препаратів IV дослідної групи, тваринам якої був створений пневмоперитонеум протягом 2 години майже завжди було відмічено наростання набряку та подальше порушення структури, яке проявлялось зміною однонаправленості розташування колагенових волокон, місцями було відмічено фрагментацію волокон з хаотичним скупченням їхніх фрагментів. Також відслідковувалось присутність жирової клітковини та макрофагальних і лімфоцитарних інфільтратів (рис. 7).

У тварин дослідної групи де створювався пневмоперитонеум на рівні 5 мм.рт.ст. протягом 3 годин на мікропрепаратах відмічено, що в сухожилках частково зберігалось компактне розташування колагенових волокон. На більшій площі вони були представлені аморфною слизоподібною масою. В ряді випадків мали місце дифузні геморагії (рис. 8).

Висновок

При наявності жовтяниці відмічено розрихленість та звивистий хід колагенових волокон із клітинною інфільтрацією в якій відмічались макрофаги. При застосуванні пневмоперитонеума спостерігались глибші структурні порушення, які залежали на пряму від тривалості інтраабдомінального тиску. Серед порушень структури відмічались набряк, осередки розпаду волокон, різнонаправленість волокон. На окремих препаратах відмічено фрагментацію з хаотичним скупченням частинок колагенових волокон. Найтяжчі зміни були після 3 годин, де волокна були представлені аморфною слизоподібною масою.

Перспективи подальших досліджень

У подальшому планується вивчення різних ділянок м'язової частини діафрагми за умов пневмоперитонеуму низького та високого тиску, що є важливим для лапароскопічної хірургії, яка

стрімко розвивається, з метою розуміння патофізіологічних змін дихального м'язу.

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. Poh BR, Cashin PA, Croagh DG. Impact of Jaundice on Outcomes Following Emergency Laparoscopic Cholecystectomy in Patients with Cholelithiasis. *World J Surg.* 2018;42(10):3158-3164. doi: 10.1007/s00268-018-4588-8. PMID: 29541824
2. Pavlidis ET, Pavlidis TE. Pathophysiological consequences of obstructive jaundice and perioperative management. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2018;17(1):17-21. doi: 10.1016/j.hbpd.2018.01.008. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29428098
3. Poh BR, Ho SP, Sritharan M, Yeong CC, Swan MP, Devonshire DA, Cashin PA, Croagh DG. Randomized clinical trial of intraoperative endoscopic retrograde cholangiopancreatography versus laparoscopic bile duct exploration in patients with cholelithiasis. *Br J Surg.* 2016;103(9):1117-1124. doi: 10.1002/bjs.10207. Epub 2016 Jun 15. PMID: 27302483
4. Li J, Zhuo S, Chen B, Liu Y, Wu H. Clinical efficacy of laparoscopic modified loop cholecystojejunostomy for the treatment of malignant obstructive jaundice. *J Int Med Res.* 2020;48(2):300060519866285. doi: 10.1177/0300060519866285. Epub 2019 Sep 23. PMID: 31547725; PMCID: PMC7593670
5. Muhammad WA, Talha Sh, Ashraf MA, Javaid J. Jaundice: a basic review. *Int J Res Med Sci.* 2016;5(5):1313-1319. DOI: 10.18203/2320-6012.ijrms20161196
6. Uygunovich NA. Effectiveness Minimally Invasive Laparoscopic Cholecystectomy during the Complication of Acute Cholecystitis. *Research Journal of Trauma and Disability Studies.* 2022;1(11):20-28.
7. Kamallesh NP, Prakash K, Pramila K, George TD, Sylesh A, Shaji P. Laparoscopic approach is safe and effective in the management of Mirizzi syndrome. *J Minim Access Surg.* 2015;11(4):246-250. doi: 10.4103/0972-9941.140216. PMID: 26622114; PMCID: PMC4640023
8. Koo JGA, Tham HY, Toh EQ, Chia C, Thien A, Shelat VG. Mirizzi Syndrome-The Past, Present, and Future. *Medicina (Kaunas).* 2023;60(1):12. doi: 10.3390/medicina60010012. PMID: 38276046; PMCID: PMC10818783
9. Pavlovic Markovic A, Stojkovic Lalosevic M, Mijac DD, Milovanovic T, Dragasevic S, Sokic Milutinovic A, Krstic MN. Jaundice as a Diagnostic and Therapeutic Problem: A General Practitioner's Approach. *Dig Dis.* 2022;40(3):362-369. doi: 10.1159/000517301. Epub 2021 May 20. PMID: 34015787
10. Aditjaningsih D, Mochtar CA, Lydia A, Siregar NC, Margyaningsih NI, Madjid AS, Suwanto S. Effects of low versus standard pressure pneumoperitoneum on renal syndecan-1 shedding and VEGF receptor-2 expression in living-donor nephrectomy: a randomized controlled study. *BMC Anesthesiol.* 2020;20(1):37. doi: 10.1186/s12871-020-0956-7. PMID: 32019488; PMCID: PMC7001365
11. Reznikov OG. [The fundamental ethical principles of experiments on animals]. *Endocrinology.* 2003;8(1):142-145. Ukrainian.
12. Kritsak MYu, Rosolovska SO, Levchuk OI, inventors. Method for modeling experimental coxypertoneum in rats. Ukraine Certificate of copyright registration for the work UA 126409. 2024 May 16. Ukrainian.
13. Kritsak MYu, Slabyi OB, Yasinovskiy OB, inventors. Method of selecting experimental material from the diaphragm of white rats. Ukraine Certificate of copyright registration for the work UA 126059. 2024 April 29. Ukrainian.
14. Bahriy MM, Dibrova VA, Popadynets OH, Hryshchuk MI, authors; Bahriy MM, Dibrova VA, editors: *Metodyky morfolohichnykh doslidzhen [Methods of Morphological Research]*. Vinnytsia: A new book; 2016. 328 p. Ukrainian.

Кріцак М.Ю., Слабий О.Б., Ясіновський О.Б. Структурні зміни сухожилкової частини діафрагми щура за умов жовтяниці та пневмоперитонеуму низького тиску.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Механічна жовтяниця відноситься до найбільш серйозних ускладнень захворювань органів панкреатодуоденальної зони, Лапароскопія широко використовується в хірургічних операціях при жовтяниці і не тільки через її малотравматичність і сприяє швидкому одужанню хворого. За останні роки лапароскопічні методи значно прогресували в малоінвазивній гепатобіліарній та панкреатичній хірургії. Проте досі немає достатньо даних за те, як впливає пневмоперитонеум викликаний вуглекислим газом, який є супутником будь-якої лапароскопії, на органи черевної порожнини. **Метою** роботи було дослідити зміни сухожилкової частини діафрагми, які виникають під час наявності механічної жовтяниці після створення пневмоперитонеума. **Методи.** Дослідження виконано на 75 щурах, яких розділено на 5

груп. Механічну жовтяницю моделювали шляхом перевязки загальної жовчної протоки під анестезією. Пневмоперитонеум створювали за допомогою інсуфлятора KARL STORZ electronic laparoflator 264300 20. Препарати фарбували гематоксиліном та еозином. **Результати.** В інтактній групі мікроскопічно сухожилкова частина відповідала притаманній будові для цієї тканини. Під впливом жовтяниці відбувались структурні порушення: товщина збільшувалася, що було зумовлено набряковим розрихленням; колагенові волокна мали звивистий вигляд; посилена клітинна інфільтрація як дифузна, так із формуванням осередкових інфільтратів. Через 2 години наростав набряк та порушення однонаправленості колагенових волокон. Також відслідковувалось присутність жирової клітковини та макрофагальних і лімфоцитарних інфільтратів. Через 3 години в сухожилках частково зберігалось компактне розташування колагенових волокон, на більшій площі колагенові волокна представлені аморфною слизоподібною масою. **Висновки.** При наявності жовтяниці відмічено розрихленість та звивистий хід колагенових волокон із клітинною інфільтрацією в якій відмічались макрофаги. При застосуванні пневмоперитонеума спостерігались глибші структурні порушення, які залежали на пряму від тривалості інтраабдомінального тиску.

Ключові слова: жовтяниця, діафрагма, пневмоперитонеум, щурі, гістологія.

D.V. Kuliesh¹, N.A. Galatenko¹,
R.A. Rozhnova¹, L.F. Narazhayko¹,
S.O. Prymushko¹, D.V. Tarnavskiy²

¹ Institute of Macromolecular Chemistry of the
National Academy of Sciences of Ukraine

² National University of Life and Environmental
Sciences of Ukraine
Kyiv, Ukraine

Надійшла: 19.10.2024

Прийнята: 25.11.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.52-60>

UDC 678.664, 57.084.1, 57.085.1

STUDY OF CYTOTOXICITY AND ANALYSIS OF CELLU- LAR REACTIONS TO THE IM- PLANTATION OF POLYURE- THANEUREAS WITH IFOSFAMIDE

Kuliesh D.V. , Galatenko N.A. , Rozhnova R.A. , Narazhayko L.F. , Prymushko S.O. , Tarnavskiy D.V.  Study of cytotoxicity and analysis of cellular reactions to the implantation of polyurethaneureas with ifosfamide.

Institute of Macromolecular Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Society's need for modern implants and tissue engineering products is steadily growing due to the increase in the number of surgical interventions caused by various diseases, injuries and age-related changes. An increasing number of materials based on synthetic polymers, intended for implantation in the tissues of a living organism, are becoming widely used in medical practice. **The aim** of this work was to study the cytotoxicity and analysis of cellular reactions to the implantation of polyurethaneureas with immobilized ifosfamide, synthesized using 4,4'-diaminodiphenylmethane and 3,6-dioxoctane-1,8-diamine as macrochain extenders by the method of tissue culture of fibroblasts and by means of the implantation test. **Results.** Using the method of tissue culture of fibroblast cells, it was shown that the dynamics and nature of the growth of cellular elements during cultivation in experimental vials with composite materials based on polyurethaneureas, including ifosfamide, did not differ significantly from control cultures, which allows us to conclude that the extracts from the studied cells do not have a cytotoxic effect materials on cultured cells. It was established that the implantation of test samples of polyurethaneureas in the body of experimental animals led to the development of cellular reactions typical for aseptic inflammation, without signs of acute inflammatory and other reactive processes. Histological studies have shown that the studied samples are biocompatible with the tissues of experimental animals. Implantation of polymer samples with ifosfamide led to the development of intense cellular reactions in the area where the implants were placed. The content of ifosfamide in the polymer matrix probably affected the proliferation of cellular elements in implantation site, as a result of which regenerative processes were inhibited in the early stages of the study. **Conclusion.** Based on the results of the research, it was shown that the developed composite materials based on polyurethaneureas with ifosfamide do not have a pronounced cytotoxic effect, are biocompatible and promising materials for use in medical practice during anti-tumor therapy.

Key words: polyurethaneureas, ifosfamide, fibroblast tissue culture, implantation test, biocompatibility.

Citation:

Kuliesh DV, Galatenko NA, Rozhnova RA, Narazhayko LF, Prymushko SO, Tarnavskiy DV. Study of cytotoxicity and analysis of cellular reactions to the implantation of polyurethaneureas with ifosfamide. *Morphologia*. 2024;18(4):52-60.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.52-60>

 Kuliesh D.V. 0000-0002-0484-7853;  Galatenko N.A. 0000-0002-5961-5750;

 Rozhnova R.A. 0000-0003-3284-3435;  Prymushko S.O. 0000-0002-3623-1068;

 Narazhayko L.F. 0000-0001-7031-9998;  Tarnavskiy D.V. 0000-0002-3300-9269

✉ d_kulesh@ukr.net

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Background

The need of society for modern implants and tissue engineering products is steadily increasing due to the growing number of surgical interventions caused

by various diseases, injuries, and age-related changes. The development, design and modification of implantation materials and products based on metals and al-

loys, bioceramics and bioglasses, natural and synthetic polymers lead to an exponential growth of functional replacements for damaged tissues [1-4].

An increasing number of materials based on synthetic polymers intended for implantation into living tissues are being widely used in medical practice [5-7]. The growing interest in polymer implantation materials is due to their unique mechanical and physico-chemical properties, non-toxicity, and biocompatibility. Thanks to this, polymer materials can be "adapted" for various purposes in practical medicine, and the ability to introduce modifications into the structure of synthesized polymers allows the creation of new biocompatible composite materials with the necessary set of specified properties and characteristics. An undeniable advantage of polymer materials for creating modern implants is that polymers can be functionalized with various medicinal drugs and biologically active substances, which significantly expands their application range and substantially increases their bioavailability and, accordingly, their effectiveness [8]. Such implants can become powerful therapeutic agents for diseases that are not amenable to effective treatment, and their biological activity, providing continuous therapy, can exert a targeted effect on the source of the pathological process at the application site for a defined period, sparing the tissues and organs of the body from many side effects of such substances.

One of the main problems in the application of polymer materials in medical practice as implants is their interaction with the surrounding tissues of the body. Studying the cellular reactions at the implant-tissue interface is an extremely important issue for understanding the degree of biocompatibility and effectiveness of implanted materials, as well as ways to minimize the possible negative impact of implanted materials throughout their functional lifespan. It is known that the immune system, which is formed by a complex network of cells, induces an inflammatory response to tissue damage during the implantation procedure, the presence of a foreign body in living tissue or bacterial infection. As a result, varying degrees of cellular reactions are observed, leading to subsequent fibrosis and isolation of the implants, which can impair the diffusion of the drug into the surrounding tissues [9-11], sometimes even to the complete loss of their functionality. Therefore, the search for new and modification of existing polymer implantation materials aimed at minimizing the cellular response of tissues while simultaneously increasing the effectiveness of the use of implanted materials/products without losing their functionality is a relevant task.

One of the types of polymer materials used in medicine as implants are polyurethanes containing biologically active substances and medicinal drugs in their composition [12], which, under the influence of the internal environment of the body, are released into the surrounding tissues, exerting a therapeutic effect

at the implantation site and can influence the growth and development of cellular elements in the connective tissue surrounding the implant and the biocompatibility of the implantation material as a whole. Therefore, studying the effect of prolonged forms of biologically active substances and medicinal drugs in the composition of polymer implants on the growth of cellular elements under *in vitro* conditions is a necessary stage of research, which will allow predicting the effectiveness of the developed materials and assessing their biocompatibility for further implementation in medical practice.

There are known works aimed at developing polymer implantation materials with immobilized anti-tumor agents, in particular ifosfamide, as means of adjuvant therapy in the treatment of pathological neoplasms [13-15].

Ifosfamide (IFO) is a cytostatic medicinal drug from the group of oxazaphosphorines, which is used for the comprehensive treatment of malignant neoplasms (lung cancer, ovarian cancer, breast cancer, cervical cancer, soft tissue sarcomas). In the liver, IFO is activated to the active metabolite ifosfamide mustard, whose antitumor effect is due to alkylation of nucleophilic centers, disruption of DNA replication and RNA transcription, leading to impaired nucleic acid function [16].

Considering that the prolonged form of IFO in the composition of polymer implants can influence the growth and development of cellular elements under *in vivo* conditions, studies of its cytotoxic effect using the express method of toxicological evaluation of fibroblast tissue culture with subsequent assessment of its biocompatibility upon implantation in experimental animals are relevant.

The aim of this work was to study the cytotoxicity and analyze the cellular reactions to the implantation of polyurethaneureas with immobilized ifosfamide, synthesized using 4,4'-diaminodiphenylmethane (DADPh) and 3,6-dioxyoctane-1,8-diamine (DA2) as chain extenders, using fibroblast tissue culture methods and histological techniques.

Materials and Methods

The objects of the study were polyurethaneureas (PUUs) synthesized based on a diisocyanate prepolymer (DFP) using 4,4'-diaminodiphenylmethane (DADPh) and 3,6-dioxyoctane-1,8-diamine (DA2) as chain extenders in a molar ratio of DADPh to DA2 of 0.3:0.7, and PUUs with immobilized IFO in the amount of 1 wt%; abbreviations: DFP-30DADPh-70DA2, DFP-30DADPh-70DA2+IFO [17, 18].

Holoxan® – (RS)-N-Bis(2-chloroethyl)-1,3,2-oxazaphosphinan-2-amine 2-oxide (Baxter, Germany) – active substance Ifosfamide $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ (Molecular weight = 261.09; melting point – (39-41)°C; log P (octanol-water) = 0.86. White crystalline powder, well soluble in water (3780 mg/L at 25 °C); purity 99.999%).

Fibroblast Tissue Culture Method. When study-

ing the cytotoxicity of samples of polymer compositions with IFO, the fibroblast tissue culture method was used, which allows assessing the biocompatibility of polymer materials intended for medical use under *in vitro* conditions [19, 20]. The method is based on culturing under standard conditions the subcutaneous adipose tissue of Wistar rats, which under cultivation conditions gives the growth of fibroblastic elements.

Fibroblast tissue culture was obtained by explanting pieces of subcutaneous adipose tissue from Wistar rats, which were placed in Carrel flasks with a nutrient mixture consisting of solid and liquid phases. Solid phase: rooster blood plasma, chicken embryo extract (obtained under laboratory experimental conditions). Liquid phase: medium 199 (LLC "BIOTESTLAB", Ukraine), bovine serum (LLC "Veterinary Medicine", Ukraine). Source of fibroblastic element growth – cultured tissue (subcutaneous tissue of Wistar rats).

Preparation of Fibroblast Tissue Culture for Explantation. Experimental groups: control (cultured tissues) and experimental (on the 3rd day of cultivation, samples of compositions were added at a rate of 100 mg of product per 1 ml of liquid phase). Each group had 3 implantations.

Explantation Conditions. The animals were euthanized using ether anesthesia. Under sterile conditions, fragments of subcutaneous tissue measuring 1 × 1 cm were isolated from the posterior dorsal part of the torso. The pieces of tissue were placed in physiological solution with the addition of streptomycin (pharmaceutical grade) at a rate of 25 ml of the drug per 10 cm³ of solution. After that, they were rinsed three times with portions of physiological solution without antibiotic. The initial pieces of tissue were divided into separate explants with a width of no more than 1.0-1.5 mm. The explants were transferred into identically sized Carrel flasks with a nutrient mixture consisting of rooster plasma and medium 199. On the bottom of each flask, 4-5 explants were evenly placed. An embryonic extract prepared from 10-day-old chicken embryos was added. After the formation of the solid phase, a mixture of bovine serum and medium 199 was added to the flasks. The ratio of ingredients in the nutrient medium was: medium 199 – 50%, chicken embryo extract – 10%, rooster blood plasma – 20%, bovine serum – 20% (for flasks with a height of 1 cm, diameter 3.5 cm). The culture was incubated at a temperature of 37°C, the liquid phase was replaced every 3 days. On the 3rd day, the migration of cellular elements was observed. Under conditions of cellular element migration, the test sample was introduced into the experimental samples at a rate of 100 mg per 1 ml of liquid medium. On days 3, 7, 10, and 14, observations were made of the growth of the compact, reticular zone and the zone of migrating fibroblastic elements, using a Carl Zeiss Primo Star microscope at ×160 magnification. Microphotography was performed using a Canon PowerShot A640

camera with a Soligor Adapter Tube for Canon A610/A620 52 mm Tele. The criterion for distinguishing these zones was the nature of the arrangement of the growing fibroblastic elements. A qualitative analysis of the growth zones was performed with a description of the nature of the growth of cellular elements. The compact zone included areas of dense arrangement of growing cells; the reticular zone included areas of arrangement of cellular cords that anastomose and branch. At the tips of isolated cellular cords growing into the solid phase of the nutrient medium to the location of isolated cells, the zone of migrating elements was determined.

Implantation Test and Histological Studies. For the purpose of histological study of cellular reactions to the implantation of composite materials with IFO based on PUUs and evaluation of their biocompatibility, implantation of experimental samples was carried out in the bodies of 24 Wistar rats weighing 240 ± 20 g. All manipulations with experimental animals were carried out in compliance with the principles set forth in the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes [21] and in accordance with the Law of Ukraine "On the Protection of Animals from Cruelty" No. 3447-IV of 21.02.2006. Healthy, young sexually mature animals were used. Model operations were performed under general anesthesia of laboratory animals in aseptic conditions.

Procedure of Implantation. After general anesthesia, the hair on the back of the animals was shaved in the interscapular area. The surgical field was treated with 70% ethanol solution, after which a longitudinal skin incision was made, and subcutaneous "pockets" were formed on both sides of the spine in the subcutaneous adipose tissue, where experimental samples measuring 10 × 10 mm, thickness 2 mm, were placed. Such an implantation area is characterized by good blood supply, high cell density of various differentiation stages, as well as low mobility of this zone and inaccessibility for the animal itself, which minimizes the risk of its interference in the experimental process. After the surgical procedure, the wound was sutured with sterile suture material. The animals were euthanized on the 7th, 14th, 30th, and 90th day after the operation by humane euthanasia. The experimental material (polymer sample with surrounding connective tissue) was fixed in 10% formalin solution and embedded in paraffin after histological processing according to standard methods [22]. Sections 10-15 μm thick were stained with hematoxylin and eosin. Analysis of cellular reactions and evaluation of the biocompatibility of composite materials were carried out by studying histological specimens using light microscopy with a Carl Zeiss Primo Star microscope; microphotography was performed using a Canon PowerShot A640 camera with a Soligor Adapter Tube for Canon A610/A620 52 mm Tele.

Results and Discussion

Study of Biocompatibility of Composite Materials with IFO Using the Fibroblast Tissue Culture Method In Vitro. To study the features of the dynamics of growth and development of fibroblastic elements, the tissue culture method was applied. This method allows for quick and accurate assessment of the cytotoxic effects of test materials and their components on connective tissue cells – rat fibroblasts, which play an important role in the interaction between a polymer implant and connective tissue. It is known that fibroblasts are components of the stroma of parenchymal organs and actively participate in morphogenesis and differentiation of specialized cells, allowing extrapolation of data obtained in fibroblast cultures to *in vivo* studies [19, 20]. The growth

and development of cellular elements from the subcutaneous tissue of Wistar rats were studied on days 3, 7, 10, and 14.

Migration of fibroblastic elements in the study of the DFP-30DADPh-70DA2 sample without IFO, as in the control, began on the 3rd day of cultivation. The primary zone was formed by individual cells with a spindle-shaped form and strands oriented mostly perpendicular to the surface of the explant; irregular polygonal cells were also observed (Fig. 1a). For samples with the addition of the drug IFO, migration of fibroblastic elements in Carrel flasks also began on the 3rd day of cultivation, but a characteristic feature was the presence of a greater number of polygonal and round-shaped cells (Fig. 1b).

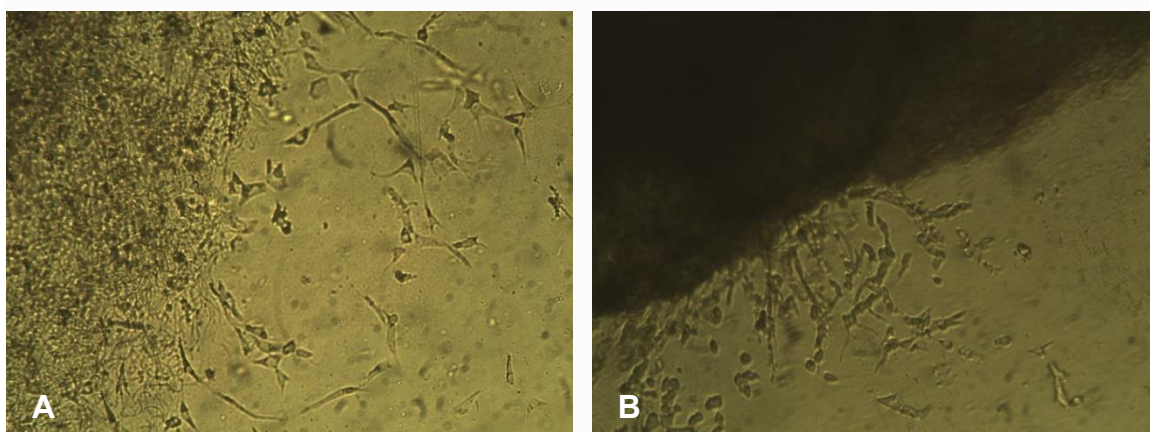


Fig. 1. Growth of fibroblast culture on the 3rd day of cultivation. a) Migration of fibroblast-like cells. DFP-30DADPh-70DA2 without IFO. $\times 160$. b) Migration of polygonal fibroblast-like cells. DFP-30DADPh-70DA2+IFO. $\times 160$.

On the 7th day of cultivation, both in the control and in the experimental samples (DFP-30DADPh-70DA2 and DFP-30DADPh-70DA2+IFO), three growth zones formed around the explants: a compact zone consisting of spindle-shaped and polygonal cells; a reticular zone where bundles and strands of cells formed; and a zone of individual migrating elements (Fig. 2). Notably, in the study of the DFP-30DADPh-70DA2+IFO sample, the compact zone was smaller in area than in the control and consisted of polygonal and oval cells closely adjacent to each other, which may indicate the influence of the prolonged biological action of IFO.

On the 10th day after explantation, the areas of cell growth zones increased in all Carrel flasks. In the study of the DFP-30DADPh-70DA2 polymer without IFO, growth zones similar to those in control flasks were observed, characterized by an expansion of the growth zone of individual migrating cells with diverse cell forms. Tissue-like growth was observed only in the control. In the study of the DFP-30DADPh-70DA2+IFO sample, the pattern of growth zone formation was similar to the polymer sample without IFO and the control, but the areas of growth zones were smaller. Disorientation of cells in the reticular zone and the presence of a large number

of polygonal cellular elements with blunt processes were noted. In flasks with the DFP-30DADPh-70DA2+IFO sample, signs of degenerative changes in fibroblastic and fibroblast-like cells in the compact and reticular zones were detected (Fig. 3). Vacuolization and granular degeneration of the cytoplasm were observed.

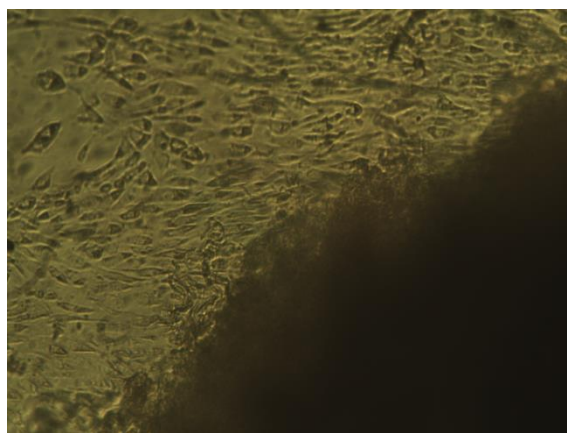


Fig. 2. Compact and reticular growth zones of cellular elements on the 7th day of cultivation for the DFP-30DADPh-70DA2+IFO sample. $\times 160$.

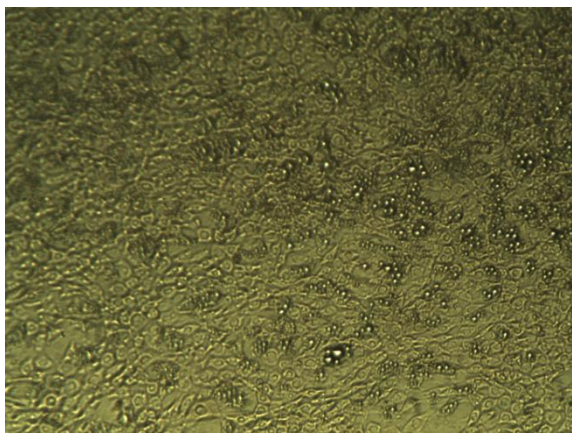


Fig. 3. Degenerative changes of fibroblasts in the compact zone on the 10th day of cultivation for the DFP-30DADPh-70DA2+IFO sample. $\times 160$.

On the 14th day of cultivation, the cell population entered a phase of pronounced degeneration, with rounding of cell bodies and complete loss of intercellular contacts, both in control flasks and in all experimental flasks.

Thus, observations of tissue cultures showed that the dynamics and nature of cellular element growth in experimental flasks did not significantly differ from control cultures. This allows us to conclude that there is no cytotoxic effect of the experimental samples on the cultured cells.

Study of Biocompatibility of PUUs with IFO Using the Histological Method In Vivo. To histologically study cellular reactions and assess the biocompatibility of the obtained composite materials with IFO, model operations for implanting PUUs samples with IFO into the bodies of experimental animals –

Wistar rats were conducted. During the experiment, the behavioral reactions of the animals, their external condition, and the postoperative field were monitored. Daily visual assessment of the epithelial reaction at the surgical site showed that the wound healed within 3-5 days after surgery without signs of inflammatory reaction. Morphological examination revealed virtually no degenerative changes, tumors, or tissue necrosis in either the short-term or distant postoperative periods. Throughout the experiment, the implanted materials were palpable through the skin of the animals. Implantation of the test samples did not cause aggression or changes in the behavior of the experimental animals.

The main focus in histological studies was on signs of inflammatory phenomena development in the implantation zone of the polymer samples at the "implant – tissue" interface. Macroscopically, connective tissue was detected around the implanted samples at all study periods, which separated the implanted samples from the surrounding tissues and did not differ in color and structure from tissues distant from the implantation site.

On the 7th day after surgery around the polymer samples DFP+30DADPh+70DA2, the formation of a thick connective tissue capsule was observed, separating the implanted samples from the surrounding connective tissue (Fig. 4a). The capsule exhibited a pronounced round-cell reaction, mainly consisting of leukocytes (polymorphonuclear neutrophils) and monocytic-macrophage cells with pronounced phagocytic activity. In some areas, young forms of fibroblastic elements without clear signs of maturity were observed.

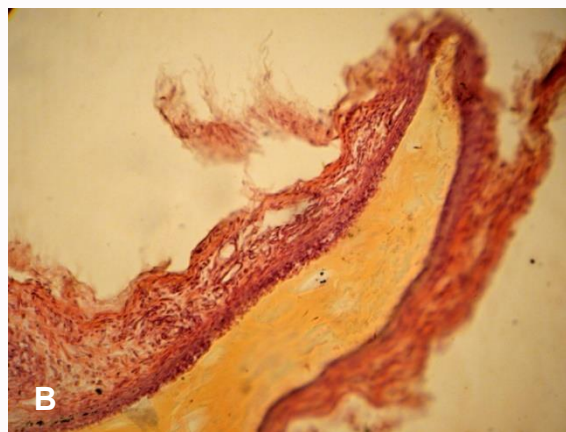


Fig. 4. Formation of connective tissue capsules around implanted samples: DFP-30DADPh-70DA2 (a), DFP-30DADPh-70DA2+IFO (b) on the 7th day after surgery. Hematoxylin and eosin staining. $\times 200$.

Occasionally, a small number of poorly differentiated cells and cellular debris were present. A moderate number of blood vessels were observed, with microcirculatory processes occurring without disturbances. On the 7th day after surgery around the poly-

mer samples DFP-30DADPh-70DA2+IFO, separation of the implanted polymer sample from the surrounding tissues by a connective tissue capsule was observed, differing in cellular composition throughout its length. In some areas, a formed and immature capsule was observed, whose cellular composition

was mainly represented by round-cell elements. In other areas, spindle-shaped fibroblasts located within collagen fiber bundles were observed. Single local infiltrations with round-cell elements were noted. Macrophages were present in significant quantities in certain areas of the capsule, indicating activation of phagocytic processes (Fig. 4b). Blood vessels were present in small numbers, without signs of microcirculatory disturbances.

On the 14th day after surgery around the polymer samples DFP-30DADPh-70DA2, a decrease in the thickness of the connective tissue capsule was observed compared to the previous study period, due to maturation of the capsule and the initiation of active proliferative processes and intercellular substance formation in the implant area. The cellular composition consisted of fibroblasts located within collagen fiber bundles (Fig. 5a). In some areas, the capsule had a low degree of maturity and was represented by round-cell elements – polymorphonuclear leukocytes

and an intense monocytic-macrophage reaction, indicating active phagocytosis. A small number of blood vessels without microcirculatory disturbances were characteristic at this study period. On the 14th day after surgery around the polymer samples DFP-30DADPh-70DA2+IFO, a decrease in the thickness of the connective tissue capsule was observed compared to the previous period (Fig. 5b). The capsule had a fairly high degree of maturity throughout its length and was well-formed. The outer layer of the capsule consisted of fibroblasts located within mature collagen fiber bundles. The inner layer sometimes contained young forms of fibroblasts and poorly differentiated cellular elements. In some areas, the capsule had a low degree of maturity and was represented by round-cell elements – polymorphonuclear leukocytes and an intense monocytic-macrophage reaction, indicating active phagocytosis. A large number of blood vessels of various calibers without microcirculatory disturbances were observed at this period.

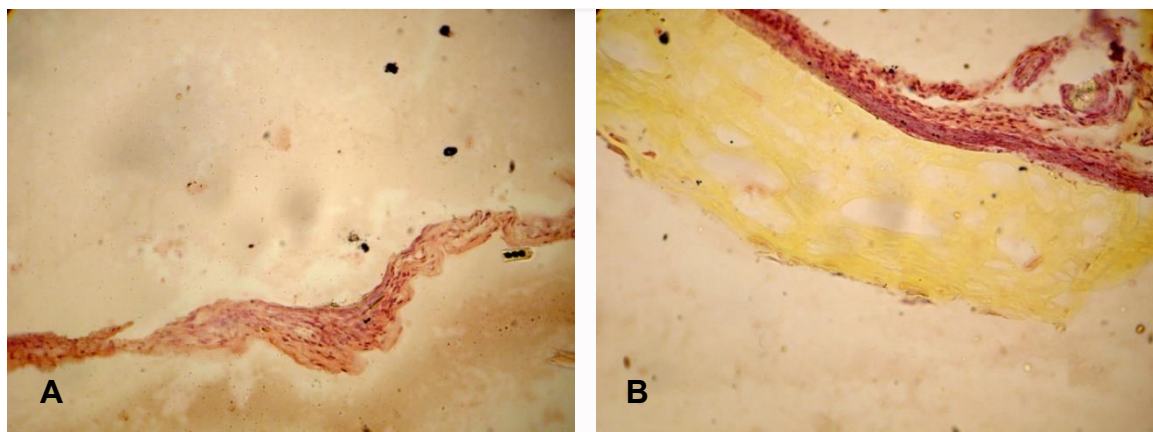


Fig. 5. Formation of connective tissue capsules around implanted samples: DFP-30DADPh-70DA2 (a), DFP-30DADPh-70DA2+IFO (b) on the 14th day after surgery. Hematoxylin and eosin staining. $\times 200$.

On the 30th day after surgery around the DFP-30DADPh-70DA2 sample, a mature connective tissue capsule was observed, consisting mainly of collagen fiber bundles and spindle-shaped fibroblasts between them, which actively synthesized collagen and formed intercellular substance (Fig. 6a). In some areas of the capsule, accumulations of round-cell elements – polymorphonuclear leukocytes and macrophages were observed. A small number of blood vessels without disturbances in microcirculatory processes were noted at this period. On the 30th day after surgery around the DFP-30DADPh-70DA2+IFO sample, a connective tissue capsule characterized by a high degree of maturity was observed. It consisted of densely arranged collagen fiber bundles and spindle-shaped fibroblasts between them, oriented along the implanted material. In some areas of the capsule, slight round-cell infiltration was observed, mainly represented by macrophage reaction and mild leukocyte infiltration. A characteristic feature of the polymer sample implantation at this period was the for-

mation of adipose tissue in the surrounding connective tissue. The number of blood vessels was small, and microcirculatory processes in them were undisturbed (Fig. 6b).

On the 90th day after surgery around the implanted DFP-30DADPh-70DA2 sample, a fairly thin connective tissue capsule was observed, which had a high degree of maturity throughout its length. The capsule consisted of bundles of wavy collagen fibers with spindle-shaped fibroblasts between them. In some areas of the capsule, slight foci of macrophage infiltration were characteristic. At this study period, single blood vessels with normal microcirculation were observed. On the 90th day after surgery around the implanted DFP-30DADPh-70DA2+IFO sample, a thin and mature connective tissue capsule was observed, consisting of bundles of wavy collagen fibers and spindle-shaped fibroblasts between them. It should be noted that the density of the capsule increased due to active synthesis of collagen fibers and other components of the extracellular matrix by fibroblasts. Blood vessels were present in small quantities

with normal microcirculation.

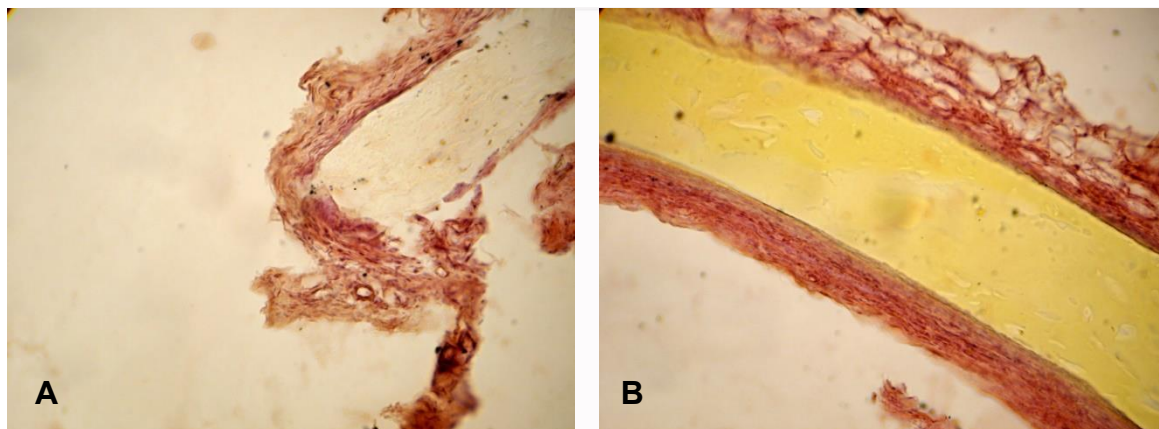


Fig. 6. Formation of connective tissue capsules around implanted samples: DFP-30DADPh-70DA2 (a), DFP-30DADPh-70DA2+IFO (b) on the 30th day after surgery. Hematoxylin and eosin staining. $\times 200$.

Thus, based on the results of histological studies, it was established that implantation of composite materials with IFO based on multiblock PUUs (DFP-30DADPh-70DA2, DFP-30DADPh-70DA2+IFO) into the bodies of experimental animals led to the development of similar cellular reactions at all study periods. Separation of the implanted samples from the surrounding tissues by connective tissue capsules occurred already at early study periods, which did not differ significantly from each other in thickness, cellular composition or degree of maturity. Cellular reactions in the capsules themselves and beyond were typical for the classical development of aseptic inflammation. The dynamics of inflammatory reactions and the nature of their development were largely due to the complex of biological processes in the focus of inflammation, leading to the formation of formed connective tissue capsules already at early study periods, with a tendency for full maturation by the 30th day after implantation. Around the control implanted samples, normalization of cellular reactions occurred only on the 30th day after surgery, whereas with the implantation of the composite material with IFO, pronounced cellular reactions were observed even 30 days after implantation, which was most likely associated not only with the body's reaction to the presence of a foreign material but also with the biological activity of IFO itself and its cytostatic action. Full-fledged formation and maturation of the connective tissue capsule around the implanted DFP-30DADPh-70DA2+IFO sample was also observed 30 days after surgery. At the same time, at almost all study periods, the capsules around the DFP-30DADPh-70DA2+IFO sample exhibited an intense reaction of leukocytes (polymorphonuclear neutrophils) and monocytic-macrophage cells with pronounced phagocytic activity, associated with the process of phagocytosis to implement the body's protective-compensatory mechanisms.

Conclusions

1. The biocompatibility of composite materials based on PUUs with extenders 3,6-dioxyoctane-1,8-diamine (DA2), including with IFO, was studied using the fibroblast cell culture method. It was shown that the dynamics and nature of cellular element growth in the experimental flasks did not significantly differ from control cultures, allowing the conclusion that there is no cytotoxic effect of extracts from the studied materials on the cultured cells.

2. It was shown that implantation of the experimental PUUs samples (DFP-30DADPh-70DA2, DFP-30DADPh-70DA2+IFO) into the bodies of experimental animals led to the development of cellular reactions typical for aseptic inflammation, without signs of acute inflammatory and other reactive processes. Histological studies showed that the studied samples are biocompatible with the tissues of experimental animals.

3. It was established that implantation of polymer samples DFP-30DADPh-70DA2+IFO led to the development of intense cellular reactions in the implant placement zone, primarily reactions of round-cell elements – polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells (macrophages). The content of IFO in the polymer matrix likely influenced the proliferation of cellular elements in the implant placement zone, resulting in inhibition of regenerative processes at early study periods.

Prospects for Further Development

Conducting further medical and biological studies aimed at determining the possibility of using the developed composite materials in medical practice during antitumor therapy.

Conflict of Interest Information

No potential or actual conflicts of interest exist or are anticipated at the time of publication.

References

1. Farag MM. Recent trends on biomaterials for tissue regeneration applications: review. *Journal of Materials Science*. 2023;58:527-558. <https://doi.org/10.1007/s10853-022-08102-x>
2. Kovylin RS, Aleynik DY, Fedushkin IL. Modern Porous Polymer Implants: Synthesis, Properties, and Application. *Polymer Science, Series C*. 2021;63:29-46. <https://doi.org/10.1134/S1811238221010033>
3. Al-Shalawi FD, Mohamed Ariff AH, Jung D-W, Mohd Ariffin MKA, Seng Kim CL, Brabazon D, Al-Osaimi MO. Biomaterials as Implants in the Orthopedic Field for Regenerative Medicine: Metal versus Synthetic Polymers. *Polymers*. 2023;15:2601. <https://doi.org/10.3390/polym15122601>
4. Domingues Goncalves A, Balestri W, Reinwald Y. Biomedical Implants for Regenerative Therapies. *Biomaterials*. 2020. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.91295>
5. Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J Polym Sci B Polym Phys*. 2011;49(12):832-864. <https://doi.org/10.1002/polb.22259>
6. Ornaghi HL Jr, Monticeli FM, Agnol LD. A Review on Polymers for Biomedical Applications on Hard and Soft Tissues and Prosthetic Limbs. *Polymers*. 2023;15(19):4034. <https://doi.org/10.3390/polym15194034>
7. Cui M, Chai Z, Lu Y, Zhu J, Chen J. Developments of polyurethane in biomedical applications: A review. *Resources Chemicals and Materials*. 2023;2(4):262-276. <https://doi.org/10.1016/j.recmm.2023.07.004>
8. Stewart SA, Domínguez-Robles J, Donnelly RF, Larrañeta E. Implantable Polymeric Drug Delivery Devices: Classification, Manufacture, Materials, and Clinical Applications. *Polymers*. 2018;10(12):1379. <https://doi.org/10.3390/polym10121379>
9. Teo AJT, Mishra A, Park I, Kim Y-J, Park W-T, Yoon Y-J. Polymeric Biomaterials for Medical Implants & Devices. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2016;2(4):454-472. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.5b00429>
10. Avula MN, Rao AN, McGill LD, Grainger DW, Solzbacher F. Foreign body response to subcutaneous biomaterial implants in a mast cell-deficient Kitw-sh murine model. *Acta Biomaterialia*. 2014;10(5):1856-1863. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.056>
11. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annual Review of Materials Research*. 2001;31(1):81-110.
12. Galatenko NA, Rozhnova RA. [Biologically Active Polymeric Materials for Medicine]. Kyiv: Naukova Dumka; 2013. 210 p. Russian.
13. Wang Y, Sun L, Mei Z, Zhang F, He M, Fletcher C, Wang F, Yang J, Bi D, Jiang Y, Liu P. 3D printed biodegradable implants as an individualized drug delivery system for local chemotherapy of osteosarcoma. *Materials & Design*. 2020;186:108336. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.108336>
14. Gladyr I, Kozlova G, Narazhayko L, Galatenko N. [Development and research of polymeric composite materials of medical purpose with ifosfamide on the basis of polyurethanes with isocyanurate fragments]. *Polymer Journal*. 2020;42(2):125-135. <https://doi.org/10.15407/polymerj.42.02.125>
15. Prymushko SO, Galatenko NA, Rozhnova RA, Kozlova GA, Gladyr II, Danko NO. Synthesis and research of polyurethane urea with 2-(2-aminoethoxy)ethan-1-amine and 3-{2-[2-(3-aminopropoxy)ethoxy]ethoxy}propane-1-amine as macrochain extenders, and compositions with ifosfamide based on them. *Issues of Chemistry and Chemical Technology*. 2024;(1):70-80. <http://dx.doi.org/10.32434/0321-4095-2024-152-1-70-80>
16. Zhang Y, Kawedia J, Myers A, McIntyre C, Anderson P, Kramer M. Physical and chemical stability of high-dose ifosfamide and mesna for prolonged 14-day continuous infusion. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. 2013;20(1):51-57. <https://doi.org/10.1177/1078155213478284>
17. Prymushko SO, Galatenko NA, Rozhnova RA, Kozlova GA, Gladyr II. Synthesis and investigation of new polyurethaneureas containing 3,6-dioxyoctane-1,8-diamine as a macrochain extender. *Polymer Journal*. 2022;44(3):231. <https://doi.org/10.15407/polymerj.44.03.231>
18. Prymushko SO, Kozlova GA, Gladyr II, Galatenko NA. Development of medical composite materials with ifosfamide based on polyurethaneureas containing 3,6-dioxyoctane-1,8-diamine in their structure. In: [XXIII International Conference of Students, Postgraduates, and Young Scientists "Modern Problems of Chemistry"; 2022 May 18-20; Kyiv, Ukraine]. 2022. p. 114.
19. Burenko HV, Galatenko NA, Kabak KS. [Morfologicheskie i biokhimicheskie aspekti biodestruktsii polimerov]. Kyiv: Naukova Dumka; 1986. 221 p. Russian.
20. Lebedev EV, Konstantinov YuB, Galatenko NA, Yatsenko VP, Rozhnova RA, Maksymenko VB, authors: [Toksikologo-gigienichni ta doklinichni doslidzhennya polimernih materialiv i virobiv na ih osnovi medichnogo pryznachennya: metod. vkazivki]. Kyiv: Naukova dumka; 2009. 99 p. Ukrainian.
21. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg: Council of Europe; 1986. 53 p.
22. Bagrij MM, Dibrova VA, Popadynets OG, Hryshchuk MI, authors: [Metodiki morfologichnikh doslidzhen: monografiya]. Vinniczya: Nova Kniga; 2016. 328 p. Ukrainian.

Кулеш Д.В., Галатенко Н.А., Рожнова Р.А., Наражайко Л.Ф., Примушко С.О., Тарнавський Д.В.
Вивчення цитотоксичності та аналіз клітинних реакцій на імплантацію поліуретансечовин з іфосфамідом.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Потреба суспільства в сучасних імплантатах і виробих тканинної інженерії неухильно зростає у зв'язку зі збільшенням кількості оперативних втручань, викликаних різноманітними захворюваннями, травмами та віковими змінами. Широкого застосування в медичній практиці набуває все більша кількість матеріалів на основі синтетичних полімерів, що призначені для імплантації в тканини живого організму. **Метою** даної роботи було вивчення цитотоксичності та аналіз клітинних реакцій на імплантацію поліуретансечовин з іммобілізованим іфосфамідом, синтезованих з використанням як продовжувачів макроланцюга 4,4'-діамінодіфенілметану та 3,6-діоксиоктан-1,8-діаміну методом тканинної культури фібробластів та за допомогою імплантаційного тесту. **Результати.** Методом тканинної культури клітин фібробластів показано, що динаміка і характер росту клітинних елементів при культивуванні в дослідних флаконах з композиційними матеріалами на основі поліуретансечовин, в тому числі з іфосфамідом, суттєво не відрізнялися від контрольних культур, що дозволяє зробити висновок про відсутність цитотоксичного впливу екстрактів з досліджуваних матеріалів на клітини, що культивувались. Встановлено, що імплантація дослідних зразків поліуретансечовин в організм експериментальних тварин приводила до розвитку клітинних реакцій типових для асептичного запалення, без ознак гострих запальних та інших реактивних процесів. Проведені гістологічні дослідження показали, що досліджені зразки є біосумісними з тканинами експериментальних тварин. Імплантація полімерних зразків з іфосфамідом призводила до розвитку інтенсивних клітинних реакцій в зоні розміщення імплантатів. Вміст іфосфаміду в полімерній матриці, ймовірно, впливав на проліферацію клітинних елементів в зоні розміщення імплантату, в результаті чого відбувалося інгібування регенераторних процесів на ранніх термінах дослідження. **Висновок.** За результатами проведених досліджень показано, що розроблені композиційні матеріали на основі поліуретансечовин з іфосфамідом не мають вираженої цитотоксичної дії, є біосумісними та перспективними матеріалами для використання в медичній практиці при протипухлинній терапії.

Ключові слова: поліуретансечовини, іфосфамід, культура тканин фібробластів, імплантаційний тест, біосумісність.

V.S. Lasavutz

Bogomolets National Medical
University
Kyiv, Ukraine

Надійшла: 14.10.2024

Прийнята: 15.12.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.61-65>

UDC: 61:612.2:615.9.616.2:616-008

ANALYSIS OF MORPHOMETRIC PARAMETERS OF LUNG TISSUE UNDER CONDITIONS OF EXPOSURE TO THE VENOM OF THE VIPERS VIPERA BERUS BERUS AND VIPERA BERUS NIKOLSKII

Lasavutz V.S.   Analysis of morphometric parameters of lung tissue under conditions of exposure to the venom of the vipers *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*.

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

ABSTRACT. Background. According to the Ministry of Health of Ukraine, since the beginning of 2020, 36 cases of snake bites have been registered in Ukraine, including six children. Their significant prevalence is registered in the southern and eastern regions, and only one species is in the western and northern regions. The venom of vipers consists of about 25 proteins and peptides with enzymatic activity. The latter mainly exhibit hemotoxic effects, but neurotoxic, myotoxic, etc., have also been studied. **Objective.** Analysis of morphometric indicators of rat lung tissue under the influence of the venom of the vipers *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*. **Methods.** Experimental studies were conducted on white, nonlinear male rats. The animals were conditionally divided into control and experimental groups, 10 individuals each. In saline, experimental rats were intraperitoneally injected with a semi-lethal dose (LD_{50}) ($1.576 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) of *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii* venom. Control group animals were intraperitoneally injected with saline only. Rats were removed from the experiment 24 hours after exposure to the venom and euthanised by cervical dislocation. Morphometric studies were performed using a system for visual analysis of histological preparations. Images from histological preparations were displayed on a computer monitor from a MICROMED SEO SCAN microscope using a Vision CCD Camera video camera. Morphometric studies were performed using SEO ImageLabBio, ImageJ, and STATISTICA 10.0 programs. The studies were performed within the specified experimental periods in preparations stained with hematoxylin and eosin. **Results and conclusion.** The introduction of the venom of the viper *Vipera berus berus* to rats was accompanied by a significant increase in the average value of the area of blood vessels by 1.31 times compared to the group of intact animals. A significant decrease in the average value of the respiratory department was noted to 0.8. In this group of animals, the indicators of dysatelectasis, atelectasis and emphysematous lung tissue also significantly increased by 6.03, 7.15 and 2.0 times compared to the control rats. When exposed to the venom of the viper *Vipera berus nikolskii*, the experimental animals showed a significant increase in the average value of the area of blood vessels by 1.55 times compared to the group of intact rats. A significant decrease in the average value of the respiratory department was found to be 0.74. The relative areas of dysatelectasis, atelectasis, and emphysematous areas of lung tissue significantly increased by 6.64, 8.80, and 2.92 times compared to the control group.

Key words: vipers, lungs, venom, respiratory tract, rats.

Citation:

Lasavutz V.S. Analysis of morphometric parameters of lung tissue under conditions of exposure to the venom of the vipers *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*. *Morphologia*. 2024;18(4):61-5.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.61-65>

 Lasavutz V.S. 0009-0005-1216-8737

 vladyslav.lasavuts@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Introduction

According to the Ministry of Health of Ukraine, since the beginning of 2020, 36 cases of snakebites have been registered in Ukraine, including six children. The cases were recorded in the Transcarpathian, Lviv, Donetsk, and Zhytomyr regions. It should be

noted that from 2019 to 2020, there were no deaths due to snake toxins. Only poisonous vipers are found in Ukraine, namely the common viper (*Vipera berus berus*), steppe viper (*Vipera ursinii*), Nikolsky's viper (*Vipera berus nikolskii*), Renard's viper (*Vipera renardi*), and snub-nosed viper (*Vipera ammodytes*).

Their significant distribution is recorded in the southern and eastern regions, and only one species in the western and northern areas.

According to the literature, *Vipera berus berus* venom comprises about 25 proteins and peptides with enzymatic activity. The latter mainly exhibit hemotoxic effects. Hemotoxins of this species of snake can be classified according to the mechanism of action into the following groups: activators of blood clotting factors, anticoagulants, inhibitors and activators of platelets; agents affecting fibrinolysis; haemorrhaging [1, 2]. Proteins of the first group act on blood clotting factors or directly on fibrinogen. Most of them cause the formation of fibrinopeptides A or B or, in rare cases, both types. The thrombi formed in this case are unstable and prone to endogenous or venom-induced fibrinolysis. The group of anticoagulants includes serine proteases, protein C activators, and phospholipase A₂ (PLA₂). Platelet-activating proteins belong to the lectin-like proteins of type C and thrombin-like enzymes [3]. In turn, platelet deactivators are represented by disintegrins and metalloproteinases. The group of proteins responsible for fibrinolysis includes proteins that directly destroy fibrin and plasmin activators. The last in the list are haemorrhaging or cytolytic, which cause vascular damage and haemorrhage and are represented mainly by metalloproteases [4-8].

Many authors in recent studies have described pronounced histological changes in the respiratory system due to the bite of *Crotalus durissus terrificus*. The study of lung tissue samples 2, 6 and 12 hours after subcutaneous administration of crotoxin to mice revealed such changes as a decrease in the area of alveolar sacs and an increase in the thickness of the alveolar walls. Congestive phenomena, haemorrhages, infiltration of lung tissue with polymorphonuclear leukocytes, foamy macrophages, and increased permeability of pulmonary vessels were recorded. An increase in myeloperoxidase activity was determined in homogenates. It has also been established that crotoxin from the venom of this viper species exhibits neurotoxic effects. It is a β -neurotoxin that induces blockade of impulses in neuromuscular synapses, inhibiting the release of acetylcholine from presynaptic membranes and postsynaptic desensitisation of nicotinic receptors, causing flaccid paralysis of the respiratory muscles. In addition, PLA₂ of crotoxin leads to the degradation of phospholipids of cell membranes, triggering the arachidonic acid cascade and production of prostaglandin E₂ (PGE₂), which is associated with myo-, neurotoxicity and activation of the immune response [9].

To date, there is no data describing the full range of histological changes in the lungs during bites of venomous snakes. The available studies are few and do not reveal the main pathogenetic links in developing one or another complication from the respiratory system under these conditions. In particular, the liter-

ature is completely lacking in data on the effect of *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii* venom toxins on the respiratory system's structure and function, which explains our study's importance. However, it is worth considering the results of separate thorough studies that demonstrate the characteristic features of bronchopulmonary complications in bites of different species of snakes.

The study aims to analyse the morphometric parameters of rat lung tissue under the influence of the venom of the vipers *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*.

Materials and methods

Experimental studies were conducted on white, non-linear male rats. For preliminary acclimatisation, the animals were kept in the Taras Shevchenko National University of Kyiv animal facility for 7 days and then in laboratory conditions in compliance with temperature and light regimes. Rats received standard food and water ad libitum. All experiments were conducted according to the Recommendations of the National Institute of Health for the Care and Use of Laboratory Animals and the European Council Directive of November 24, 1986 on the Care and Use of Laboratory Animals (86/609/EEC). The studies were approved and confirmed by the Bioethics Commission of the National Scientific Center "Institute of Biology and Medicine" of Taras Shevchenko National University of Kyiv (protocol No. 2 dated August 19, 2021). Viper venom *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii* were obtained from V. N. Karazin Kharkiv National University. Lyophilised native venom was stored at -20°C and dissolved in saline immediately before the experiment.

The animals were conditionally divided into control and experimental groups containing ten individuals. In saline, experimental rats were intraperitoneally injected with a semi-lethal dose (LD₅₀) (1.576 mg·g⁻¹) of *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii* venom. Animals in the control group were intraperitoneally injected with saline only. Rats were removed from the experiment 24 hours after exposure to the venom and euthanised by cervical dislocation.

Morphometric studies were carried out using a system to analyse histological preparations visually. Images from histological preparations were displayed on a computer monitor from a MICROMED SEO SCAN microscope using a Vision CCD Camera video camera. Morphometric studies were conducted using SEO ImageLabBio, ImageJ and STATISTICA 10.0 programs. The studies were conducted within the specified experimental periods in preparations stained with hematoxylin and eosin.

They morphometrically determined the relative proportion of vessels, bronchi, lymphoid tissue and respiratory tract, in which the relative proportion of lung tissue with unchanged histostucture, atelectasis, dysatelectasis and emphysematous lung tissue was measured.

The obtained digital material was processed using

variational statistics using the Student's t-test. Arithmetic means (M), errors of arithmetic means (m), coefficients of variation, and standard deviations were calculated. Changes were considered significant at $p \leq 0.05$.

Results and conclusions

Morphometrically, it was established that the average value of the relative area of the respiratory tract of intact animals is $(82.96 \pm 3.84)\%$, the average value of the relative location of the vessels is $(4.82 \pm 0.21)\%$, and the average value of the relative area of the bronchi is $(5.47 \pm 0.26)\%$.

Table 1
Correlation of structural components of animal lungs after exposure to the venom of *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii* ($M \pm m$)

Indicator	Control group	<i>Vipera berus berus</i>	<i>Vipera berus nikolskii</i>
Vessels, %	4.82 ± 0.21	6.33 ± 0.25 ***	7.48 ± 0.32 ***
Bronchi, %	5.47 ± 0.26	12.24 ± 0.46 ***	13.63 ± 0.58 ***
Lymphoid tissue, %	6.75 ± 0.23	15.05 ± 0.55 ***	17.40 ± 0.74 ***
Respiratory department, %	82.96 ± 3.84	66.38 ± 2.89 ***	61.49 ± 2.71 ***

Note: * – values that are statistically significantly different from the indicators of the control group of animals (* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$).

In the adventitia and fibrocartilaginous membrane of the bronchi, less often in the adventitia of the vessels, there is an accumulation of lymphocytes that usually form follicles and provide, together with other immunocompetent cells and structures of the lungs, powerful immune protection. The average area of the lymphoid tissue of the lungs of the intact group is $(82.96 \pm 3.84)\%$ (see Table 1).

In the respiratory department of animals of the

intact group, lung tissue with unchanged histostucture prevails; however, dys- and atelectasis and emphysema are also detected within the physiological norm. Accordingly, the average area of lung tissue with unchanged histostucture is $(82.82 \pm 3.91)\%$, dysatelectasis – $5.28 \pm 0.24\%$, atelectasis – $(3.55 \pm 0.15)\%$, emphysematous lung tissue – (8.35 ± 0.39) (Table 2).

Table 2
Correlation of structural components of the respiratory tract of animals exposed to the venom of *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii* ($M \pm m$)

	Indicators			
	The relative proportion of lung tissue with unchanged histostucture, %	Relative proportion of atelectasis, %	Relative proportion of dys-atelectasis, %	Relative proportion of emphysematous lung tissue, %
Control group	82.82 ± 3.91	3.55 ± 0.15	5.28 ± 0.24	8.35 ± 0.39
<i>Vipera berus berus</i>	26.06 ± 1.25 ***	25.38 ± 1.23 ***	31.85 ± 1.49 ***	16.71 ± 0.81 ***
<i>Vipera berus nikolskii</i>	9.33 ± 0.43 ***	31.24 ± 1.46 ***	35.04 ± 1.68 ***	24.39 ± 1.20 ***

Note: * – values that are statistically significantly different from the indicators of the control group of animals (* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$).

In animals injected with *Vipera berus berus* venom, a significant increase in the average area of blood vessels was 1.31 times ($p < 0.001$) compared to the intact group. The average area of bronchi and lymphoid tissue also progressively increased by 2.24 and 2.23 times ($p < 0.001$) compared to the average values of the intact group. Accordingly, the average respiratory tract index significantly decreased to 0.8 compared to the intact value (see Table 1). Morphometrically, it was found that under the influence of *Vipera berus berus* toxins in the lungs of experimental animals, the relative proportions of dys- and atelecta-

sis, emphysematous lung tissue significantly increased by 6.03; 7.15 and 2.0 times ($p < 0.001$) compared to the intact group. Accordingly, the average value of lung tissue with unchanged histostucture progressively decreases, which is 0.31 compared to the value of the intact group (see Table 2).

In animals that received the venom of *Vipera berus nikolskii* vipers, morphometric calculations revealed a significant increase in the average area of blood vessels by 1.55 times ($p < 0.001$) compared to the value of the intact group. Along with the vessels, the average values of the area of bronchi and lymphoid tissue also increased by 2.49 and 2.58 times

($p < 0.001$), respectively, compared to the values of the intact group. Therefore, the average value of the respiratory department significantly decreases to 0.74 compared to the intact indicator (see Table 1).

Morphometric calculation of the respiratory tract parameters of white rats under the conditions of *Vipera berus nikolskii* bite showed that the values of the relative areas of dis- and atelectasis, emphysematous lung tissue significantly increased by 6.64; 8.80 and 2.92 times ($p < 0.001$) compared to the values of the intact group. Therefore, the average value of lung tissue with unchanged histostucture decreases and is 0.11 compared to the indicator of the intact group of animals (see Table 2).

Summary

The introduction of the venom of the viper *Vipera berus berus* to rats was accompanied by a significant increase in the average value of the area of blood vessels by 1.31 times compared to the group of intact animals. A significant decrease in the average value of the respiratory department was noted to 0.8. In this group of animals, the indicators of dysatelectasis, atelectasis

and emphysematous lung tissue also significantly increased by 6.03, 7.15 and 2.0 times compared to the control rats.

When exposed to the venom of the viper *Vipera berus nikolskii*, a significant increase in the average value of the area of blood vessels was found in the experimental animals by 1.55 times compared to the group of intact rats. A significant decrease in the average value of the respiratory department was found to be 0.74. The relative areas of dysatelectasis, atelectasis, and the emphysematous regions of lung tissue significantly increased by 6.64, 8.80 and 2.92 times compared to the control group.

Prospects for further development are related to the study of submicroscopic changes in rat lung tissue under the influence of the venom of the vipers *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*.

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. Cristina RT, Kocsis R, Tulcan C, Alexa E, Boldura OM, Hulea CI, et al. Protein structure of the venom in nine species of snake: from bio-compounds to possible healing agents. *Braz J Med Biol Res.* 2020;53(1):e9001. Doi: 10.1590/1414-431X20199001
2. Hiu JJ, Yap MKK. Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. *Biochem Soc Trans.* 2020;48(2):719-731. Doi: 10.1042/BST20200110
3. Jeon YJ, Kim JW, Park S, Shin DW. Risk factor, monitoring, and treatment for snakebite induced coagulopathy: a multicenter retrospective study. *Acute Crit Care.* 2019;34(4):269-275. Doi: 10.4266/acc.2019.00591
4. Dyachenko IA, Murashev AN, Andreeva TV, Tsetlin VI, Utkin YN. Analysis of nociceptive effects of neurotoxic phospholipase A2 from *Vipera nikolskii* venom in mice. *J Venom Res.* 2014;4:1-4. PMID: 23577231
5. Ferras CR, Arrahman A, Xie C, Casewell NR, Lewis RJ, Kool J, et al. Multifunctional toxins in snake venoms and therapeutic implications: from pain to hemorrhage and necrosis. *Front Ecol Evol.* 2019;7. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00218>
6. Malina T, Krecsák L, Westerström A, Szemán-Nagy G, Gyémánt G, M-Hamvas M, et al. Individual variability of venom from the European adder (*Vipera berus berus*) from one locality in Eastern Hungary. *Toxicon.* 2017;135:59-70. Doi: 10.1016/j.toxicon.2017.06.004
7. Sartim MA, Souza COS, Diniz CRAF, da Fonseca VMB, Souza LO, Peti APF, et al. Crotoxin-induced mice lung impairment: role of nicotinic acetylcholine receptors and COX-derived prostanooids. *Biomolecules.* 2020;10(5):794. Doi: 10.1016/j.biomac.2017.05.146
8. Tasoulis T, Isbister GK. A review and database of snake venom proteomes. *Toxins (Basel).* 2017;9(9):290. Doi: 10.3390/toxins9090290
9. Megale AAA, Magnoli FC, Kuniyoshi AK, Iwai LK, Tambourgi DV, Portaro FCV, et al. Kn-Ba: a novel serine protease isolated from *Bitis arietans* snake venom with fibrinogenolytic and kinin-releasing activities. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2018;24:38. Doi: 10.1186/s40409-018-0176-5

Ласавуц В.С. Аналіз морфометричних показників легеневої тканини за умов впливу отрути гадюк *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*.

РЕФЕРАТ. Актуальність. За даними МОЗ в Україні з початку 2020 року зареєстровано 36 випадків укусів змій, серед них – шестеро дітей. Значна їх розповсюдженість зареєстрована в південних і східних областях і лише один вид в західних та північних. Отрута гадюк складається з близько 25 білків та пептидів з ферментативною активністю. Останні проявляють, в основному, гемотоксичну дію, але досліджено також нейротоксичну, міотоксичну дії, тощо. **Мета.** Аналіз морфометричних показників тканини легень щурів за умов впливу отрути гадюк *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*. **Методи.** Експериментальні до-

слідження проводили на білих нелінійних щурах самцях. Тварин умовно розподіляли на дві групи – контрольну і дослідну по 10 особин в кожній. Дослідним щурам внутрішньоочеревинно вводили напівлетальну дозу (LD_{50}) ($1.576 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$) отрути *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* на фізіологічному розчині. Тваринам контрольної групи внутрішньоочеревинно вводили лише фізіологічний розчин. Виводили щурів з експерименту через 24 години після впливу отрути, знеживлюючи шляхом цервікальної дислокації. Морфометричні дослідження здійснювали, використовуючи систему візуального аналізу гістологічних препаратів. Зображення з гістологічних препаратів на монітор комп'ютера виводили з мікроскопу MICROmed SEO SCAN та за допомогою відеокамери Vision CCD Camera. Морфометричні дослідження проведені за допомогою програм SEO ImageLabBio, ImageJ та STATISTICA 10.0. Дослідження проводили у визначені терміни досліду в препаратах забарвлених гематоксиліном і еозином. **Результати і підсумок.** Введення щурам отрути гадюк *Vipera berus berus* супроводжувалось достовірним зростанням середнього значення площі судин у 1,31 рази відносно групи інтактних тварин. Відмічали достовірне зменшення середнього показника респіраторного відділу до 0,8. У даної групи тварин також достовірно підвищувались показники дисателектазів, ателектазів та емфізематозно зміненої легеневої тканини у 6,03; 7,15 та 2,0 рази відносно контрольних щурів. При впливі отрути гадюк *Vipera berus nikolskii* у дослідних тварин виявлено достовірне збільшення середнього показника площі судин у 1,55 рази порівняно з групою інтактних щурів. Встановлено достовірне зниження середнього значення респіраторного відділу до 0,74. Показники відносних площ дисателектазів, ателектазів, емфізематозно змінених ділянок легеневої тканини достовірно зростали у 6,64; 8,80 та 2,92 рази порівняно з групою контролю.

Ключові слова: гадюки, легені, отрута, респіраторний відділ, щури.

Д.Г. Марченко

Дніпровський державний
медичний університет
Дніпро, Україна

Надійшла: 02.11.2024
Прийнята: 15.12.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.66-71>

УДК 616-001.17:615.451.3

ЯКІСНИЙ ТА КІЛЬКІСНИЙ АНАЛІЗ ГІ- СТОЛОГІЧНИХ ЗМІН У СТРУКТУРІ КА- РДІОМІОЦИТІВ ЕМБРІОНІВ ЩУРІВ ПРОТЯГОМ 18-20-Ї ДІБ ЗА УМОВ ХРО- НІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКА- ЦІЇ МАТЕРИНСЬКОГО ОРГАНІЗМУ

Marchenko D.G.   Qualitative and quantitative analysis of histological changes in cardiomyocytes of rat embryos during days 18-20 under conditions of alcohol intoxication in the maternal organism.
Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Alcohol is a teratogen that can easily cross the placenta, leading to the damage of the developing fetus. Studies on laboratory animals and clinical observations have demonstrated that ethanol diffuses through the placenta and is rapidly distributed, accumulating in amniotic fluid. The identification of various adverse effects of prenatal alcohol exposure remains a significant area of concern among scientists. The **purpose** of a study- is to conduct a qualitative and quantitative analysis of histological changes in cardiomyocytes of rat embryos during days 18-20 under condition of chronic alcohol intoxication in the maternal organism. **Methods.** The subjects of study were the hearts of offspring from rats during days 18-20 of prenatal development in a model of chronic maternal alcohol intoxication. Quantitative and qualitative parameters of cardiomyocyte myofibrils from different regions of the ventricular myocardium were assessed using transmission electron microscopy. **Results.** Our findings indicated that following ethanol exposure to the maternal organism, the orientation of damaged myofibrils in the offspring was chaotic and spread over significant areas of the sarcoplasm. Unlike normal conditions, the cardiomyocytes of experimental animals displayed not only myofibrils in a regular contracted or relaxed state, but also those with deformed sarcomeres exhibiting signs of excessive contraction and disorientation of fragmented myofilaments. The intracellular organelles of cardiomyocytes in the experimental group of newborns underwent significant and varied changes. **Conclusions.** Chronic alcohol intoxication during prenatal cardiogenesis damages the contractile apparatus of ventricular cardiomyocytes due to the disorganization of sarcomere structure, fragmentation, and disorientation of myofibrils, significant suppression of sarcomerogenesis, and reduction of myofibril content, which is associated with mitochondrial destruction. The severity of changes in these structures depends on the region and developmental stage of the embryo.

Key words: prenatal ontogenesis, rats, alcohol intoxication, heart, ventricular myocardium, myofibrils, ultrastructure.

Citation:

Marchenko DG. [Qualitative and quantitative analysis of histological changes in cardiomyocytes of rat embryos during days 18-20 under conditions of alcohol intoxication in the maternal organism]. *Morphologia*. 2024;18(4):66-71. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.66-71>

 Marchenko D.G. 0000-0001-7616-3613

 dasha19862305@ukr.net

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Серед багатьох патологій, розповсюджених у світі, особливе місце займає ураження серцево-судинної системи. Воно є однією з основних причин, які можуть призводити до утворення чисельних вад серця, як у ембріональному періоді, так і в дорослому віці, і навіть смерті людини. Тому актуальним залишається дослідження механізму формування скоротливого апарату серця, які б

могли допомогти покращити методики діагностики розвитку різних патологічних станів. Окремий важливий напрям у наукових дослідженнях становлять виникнення вад пов'язаних з впливом патологічними чинниками, серед яких – уживання алкоголю. Вплив етанолу, призводитиме до виникнення дистрофічних змін та зниження скоротливої функції міокарду. Алкогольна кардіоміопатія, яка є результатом хронічної алкогольної інтоксикації, викликає незворотні зміни у структурі

елементів міофібрилярного апарату [1].

У морфологічних і молекулярно-біологічних дослідженнях доведено, що тривала дія етанолу пригнічує синтез і викликає деградацію структурних білків кардіоміоцитів, особливо білків міофібрил – актину, міозину, тітину, небуліну, тропоніну, тропоміозину. Це призводить до ушкодження міофібрил, їх стоншення, дезорієнтації, втрати цілісності, спотворення конфігурації телофрагм та вставних дисків. Показано, що в кардіоміоцитах за умов дії етанолу можна визначити міофібрили як у релаксованому, так і в надмірно скороченому стані [2].

На підставі цих даних вважаємо, що актуальним є аналіз морфологічних особливостей ультраструктури кардіоміоцитів за хронічної дії алкоголю.

Мета

Мета дослідження – провести якісний та кількісний аналіз гістологічних змін у кардіоміоцитах ембріонів щурів протягом 18-ї -20-ї доби за умов хронічної алкогольної інтоксикації материнського організму

Матеріали та методи

Для дослідження були використані білі лабораторні щури лінії Wistar, маса яких 150–160 г. Усі дослідження проведені згідно з правилами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986) і нормами біомедичної етики, відповідно до Закону України №: 3446 - IV 21.02.2006 р., м. Київ, «Про захист тварин від жорстокого поводження» під час проведення медико-біологічних досліджень [3].

Тварин, відібраних для експерименту, розділено на групи: контроль-щури отримували звичайну воду та алкоголізовані -які отримували етанол різної концентрації.

Моделювання алкогольної інтоксикації здійснювали впродовж шести тижнів шляхом повної заміни питної води на розчин етанолу. Концентрація етанолу змінювалась кожні два тижні – 5%, 10%, 15%, 20% розчин. 20% розчин надавався щурам не 2 тижня, а 4 тижня. Після їх вагітності етанол надавався самкам-щурів ще 1 тиждень, після чого алкоголь повністю заміщували на воду

Наприкінці дослідження тварин вводили у стан наркозу за допомогою ефіру та вилучали ембріональний матеріал. Для дослідження використовувались ембріони, які знаходилися на 18-й та 20-й добі пренатального розвитку

Під час дослідження структур скоротливого апарату кардіоміоцитів використовували трансмісійну електронну мікроскопію. Зразки міокарда правого та лівого шлуночків і міжшлуночкової перегородки фіксували в охолодженому розчині глютаральдегіду з наступною постфіксацією у розчині тетроксиду осмію. Потім проводили зневоднення у спиртах зростаючої концентрації і

пропіленоксиді. Епоксидні блоки виготовляли з використанням композиції епон-аралдїт. Ультратонкі зрізи виготовляли на ультрамікротомі УМТП-6М та розміщали на мідних опорних сітках. Дослідження проводили за допомогою мікроскопа ПЕМ-100-01 при напрузі прискорення 65-90 кВ і первинних збільшеннях від 2000 до 25000 за стандартною схемою. Потім фотографували і сканували фотоплівки для подальшого вивчення [5, 6].

Кількісну оцінку ультраструктурних змін проводили за допомогою морфометричного визначення трьох параметрів: 1. Щільність упаковки міофібрил свідчила про ступінь накопичення акто-міозинових комплексів. 2. Абсолютна питома площа поверхні оцінювала характер їх просторової взаємодії. 3. Ступінь орієнтації міофібрил використали для вимірювання геометричної упорядкованості міофібрил всередині кардіоміоцитів. Отже, всі ці три параметри слугували для визначення ступеня ушкоджень скоротливого апарату з різних боків. Це дозволяло співставляти його стан як між досліджуваними групами, так і між окремими термінами у динаміці кардіогенезу.

Визначення статистичної значущості відмінностей між експериментальною групою (після дії етанолу на материнський організм) та групою інтактних тварин (нормальний розвиток) проводили з урахуванням критерію t Стюдента. У тому випадку, якщо отримане в дослідженні емпіричне розподілення не відповідало нормальному закону, оцінку відмінностей між вибірками оцінювали за допомогою непараметричного критерію Вілкоксона для пов'язаних вибірок та Манна-Уїтні для непов'язаних вибірок або із використанням рангового критерію Ван-дер-Вардена. При проведенні біостатистичної обробки отриманих квантифікованих результатів усі необхідні розрахунки виконували в оболонці електронної таблиці Excel при використанні відповідних формул і з використанням ліцензійної програми STATISTICA (версія 6.1; серійний номер AGAR 909 E415822FA).

Для аналізу впливу етанолу на формування скоротливого апарату вивчали морфологічні характеристики субепікардіальної (СЕП), інтрамуральної (ІМЗ) і субендокардіальної (СЕН) зон стінки лівого (ЛШ) та правого шлуночків (ПШ), а також лівої (ЛШЧ) та правої (ПШЧ) частин міжшлуночкової перегородки (МШП).

Результати та їх обговорення

Протягом 18-20-ї доби ембріогенезу у кардіоміоцитах експериментальних тварин міофібрили виявлялися протягом усієї цитоплазми, однак розподіл міофібрил в кардіоміоцитах був нерівномірний, зустрічалися ділянки, у яких були відсутні впорядковані актинові та міозинові міофіламенти, спостерігалася часткова фрагментація міофібрил з фрагментацією Z-

дисків (рис. 1, 2, 3).

При хронічній дії етанолу в ембріональних кардіоміоцитах на 18 добу деякі волокна зберігають поперечну посмугованість і форму. Проте в них виявлено ознаки атрофії, що супроводжувалось зменшенням кількості ядер та товщини кардіоміоцитів.

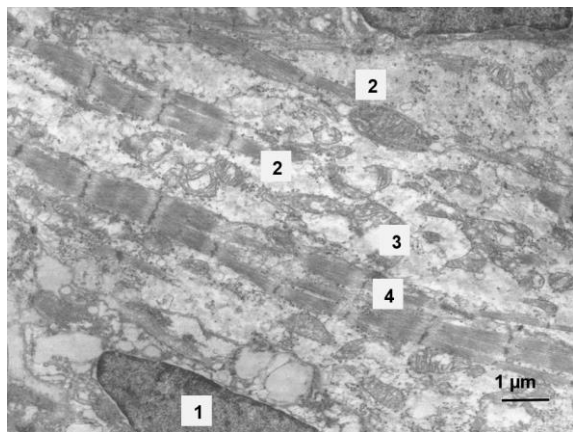


Рис. 1. Міокард щура контрольної групи на 18-у добу пренатального розвитку. 1 – ядро кардіоміоцита; 2 – ушкодження та розрив міофібрили; 3 – руйнування мембран мітохондрій; 4 – поява міофібрил різної товщини; 4 – пошкодження телофрагми.

Товщина кардіоміоцитів була значно менше, порівняно з контролем, що свідчило про зменшення кількості скоротливих елементів, а саме міозинових та актинових філаментів. Інші кардіоміоцити втрачали свою структуру та чіткі межі. Спостерігали порушення впорядкованості міофібрил. Відзначені атрофовані волокна різної товщини, а у деяких випадках саркомери міофібрил були розірвані у ділянках телофрагми.

Було чітко видно різну товщину міофібрил. Зокрема, міофібрили, які мали товщину вдвічі більшу від норми, межували з міофібрилами, товщина яких була в 2-3 рази менша за нормальні структури.

У ембріонів 20-ї доби розвитку кардіоміоцити на рівні окремих клітин характеризуються порушенням цілісності сарколеми, утворенням на ній інвагінацій, розривом міофібрили на окремі короткі фрагменти, заміщення скоротливого апарату колагеновими структурами в ділянках міофібрили, що відділилися. Характерною особливістю цих кардіоміоцитів було порушення непосмугованості. У деяких міофібрилах А- та І-диски майже не визначалися, Z-лінія не була чіткою. Прилеглі до міофібрил структури такі як Т-цистерни та мітохондрії мали змінену форму та були значно розширені. У деяких мітохондрій слабо визначалися кристи. На цьому етапі розвитку, як і на 18-у тиждень ембріогенезу щурів, спостерігалися міофібрили різної товщини.

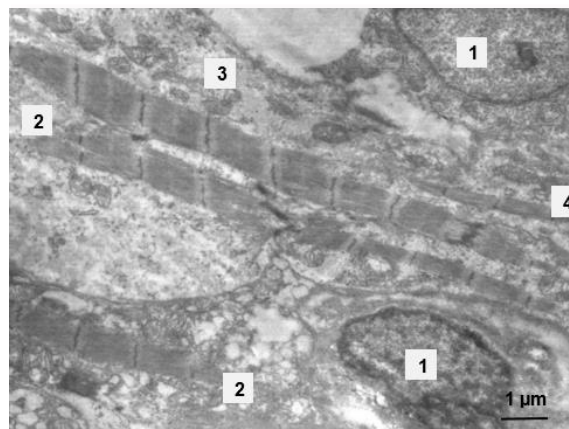


Рис. 2. Міокард щура експериментальної групи на 18-у добу пренатального розвитку. 1 – ядра сусідніх кардіоміоцитів; 2 – порушення цілісності міофібрил; 3 – ушкодження структури мітохондрій; 4 – поява міофібрил різної товщини.

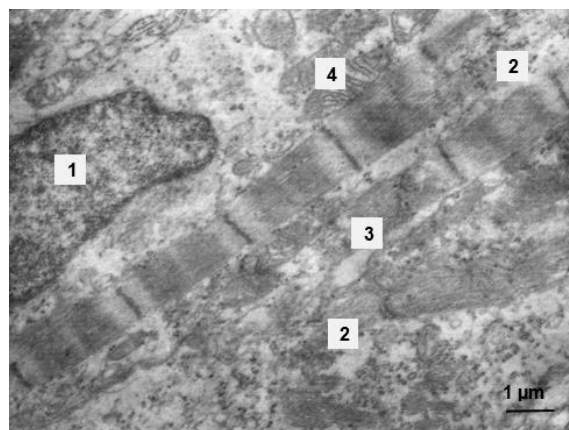


Рис. 3. Міокард щура експериментальної групи на 20-у добу пренатального розвитку. 1 – ядро кардіоміоцита; 2 – ушкодження та розрив міофібрили; 3 – пошкодження телофрагми; 4 – мітохондрії.

Хронічне зловживання етанолом явно пригнічує синтез і деградацію білка, залучаючи як структурні, так і неструктурні білки серця. На патологічному рівні викривлення Z-лінії саркомерів і порушення візерунка саркомерів призводить до міоцитолізу. Міоцитоліз проявляється через вогнищеве розчинення міоволокон, вакуолізацію клітин і розлад волокон. На саркомерний комплекс, на який впливав етанол, зменшувався вміст тітину, білка, який відповідає за розслаблення саркомерів. Етанол також знижував чутливість міофіламентів до Ca^{2+} . Крім того, етанол також впливав на скоротливі білки саркомерів, такі як міозин, актин і тропонін, що спричиняв функціональну дисфункцію скорочувальної здатності міоцитів, викликаючи прогресування серцевої недостатності. Оскільки серцеві міоцити є збудливими клітинами, і етанол може легко пошкодити цей механізм збудження-скорочення, порушення цього механізму з'єднання бере участь у патогенному

процесі АСМ. Етанол може викликати модифікацію Ca^{2+} -каналів L-типу сарколемальної мембрани, що призводить до зменшення трансмембранних електрично індукованих Ca^{2+} переміщень процесів.

Патологічні перебудови внаслідок пренатальної алкоголізації відбувалися й у мітохондріальному апараті: органели різної величини і конфігурації містили матрикс помірної електронної щільності та поодинокі слабко розвинуті кристи. Кількість мітохондрій з ознаками обмеженої функціональної активності помітно збільшувалась у порівнянні з новонародженими тваринами. Такі органели концентрувалися переважно в парануклеарних ділянках і розподілялися по тих просторах, які зазнавали літичної дисоціації міофібрил. Примітивна Т-система була представлена розширеними недорозвинутими трубочками та цистернами. Вторинні розгалуження також характеризувалися значними розширеннями, що не було характерним для нормального розвитку. Проте більшість мітохондрій все ще зберігали свою нормальну будову (рис. 4).

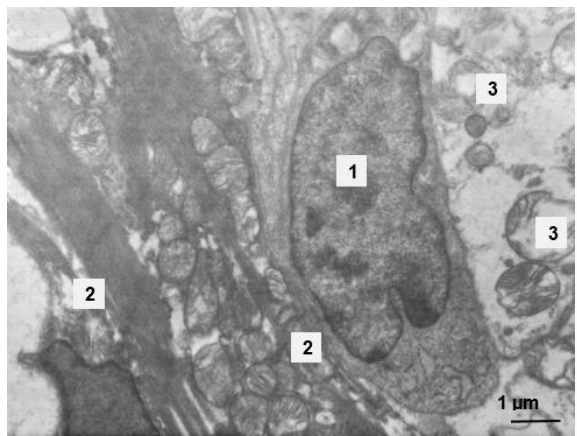


Рис. 4. Міокард щура контрольної групи на 20-у добу пренатального розвитку. 1 – ядро кардіоміоцита; 2 – ушкодження та розрив міофібрили; 3 – пошкодження мітохондрії.

Протягом 18-ї та 20-ї діб ембріонального розвитку після алкоголізації материнського організму спостерігалися зміни в тенденції наростання параметрів у СЕН міокарда обох шлуночків, що відбувалося на тлі значного зростання міокардіальної маси цих компактних зон у порівнянні з раннім періодом ембріогенезу. Після алкогольної інтоксикації відбувалося збільшення ступеня орієнтації міофібрил. Це пов'язано з тим, що у даний період провідними процесами міофібрилогенезу було не упакування та рівномірне розташування міофібрил по всій саркоплазмі кардіоміоцита, а зменшення кількості неорганізованих примітивних структур. Активні зміни ступеня орієнтації спостерігалися до 20-ї доби пренатального розвитку. Надалі темпи зростання параметра уповільнювалися. Починаючи з

20-ї доби спостерігалися суттєві зміни в параметрах різних зон шлуночкового міокарда. Як і при нормальному розвитку, в цей період морфометричні показники міофібрил у СЕН і ІМЗ шлуночкового міокарда прискорювали темпи. І вже при народженні параметри в цих зонах випереджали відповідні показники кардіоміоцитів СЕН обох шлуночків, що підтверджувало класичні уявлення про активну компактизацію міокарда СЕН та ІМЗ у даний період.

У тварин експериментальної групи на 18-у добу пренатального розвитку значення ступеня орієнтації міофібрил достовірно поступалися нормальному рівню у всіх зонах міокарда: у СЕН – на 40,7% у ЛШ та на 40,0% у ПШ, в ІМЗ – на 30,3% у ЛШ та на 21,0% у ПШ, у СЕН – на 32,5% у ЛШ та на 20,7% у ПШ, у МШП – на 30,5% у ЛШЧ та на 24,5% у ПШЧ перегородки (рис. 5).

За умов нормального розвитку на 20-у добу пренатального онтогенезу величина ступеня орієнтації міофібрил підвищувалася у СЕН у ЛШ на 38,2% ($p < 0,05$) та у ПШ – на 29,3% ($p < 0,05$) у порівнянні з 18-ю добою (рис. 6).

Також показники достовірно зростали в ІМЗ у ЛШ на 58,3% та у ПШ – на 68,9%. Значення ступеня орієнтації міофібрил МШП зросли на 33,1% ($p < 0,05$) у ЛШЧ та 35,7% ($p < 0,05$) у ПШЧ порівняно з показниками попереднього терміну дослідження.

В експериментальній групі тварин протягом 20-ї доби значення ступеня орієнтації міофібрил статистично вагомо відрізнялися від показників 18-ї доби. Зокрема, значення параметра вірогідно підвищувалися в ІМЗ – на 51,9% у ЛШ та на 70,6% у ПШ, у СЕН – на 34,4% у ЛШ та на 34,5% у ПШ, у МШП – на 24,0% у ЛШЧ та на 42,0% у ПШЧ. У порівнянні з нормальним кардіогенезом величина параметра в кардіоміоцитах СЕН достовірно зменшувалася на 41,5% у ЛШ та на 40,2% у ПШ, в ІМЗ – на 31,1% у ЛШ та на 20,2% у ПШ, у СЕН – на 32,7% у ЛШ та на 21,8% у ПШ. Ступінь орієнтації у ЛШЧ МШП поступався нормальному значенню на 32,4% ($p < 0,05$) та у ПШЧ МШП – на 21,0% ($p < 0,05$).

Отримані в нашому дослідженні дані про характер дезорганізації міофібрил після внутрішньоутробного впливу алкоголю узгоджуються з сучасними уявленнями про токсичну дію даного чинника на структуру та функцію кардіоміоцитів, а ультраструктурний аналіз змін суттєво уточнює характер патологічних перебудов скоротливого апарату міокарда під час його формування на різних етапах онтогенезу

Підсумок

Хронічна алкогольна інтоксикація під час пренатального кардіогенезу ушкоджує скоротливий апарат кардіоміоцитів шлуночків за рахунок дезорганізації структури саркомерів, фрагмента-

ції та дезорієнтації міофібрил, значного пригнічення саркомерогенезу, зниження вмісту міофібрил, що асоційовано з деструкцією міто-

хондрій. Виразність змін у даних структурах залежить від зони та терміну розвитку ембріона.

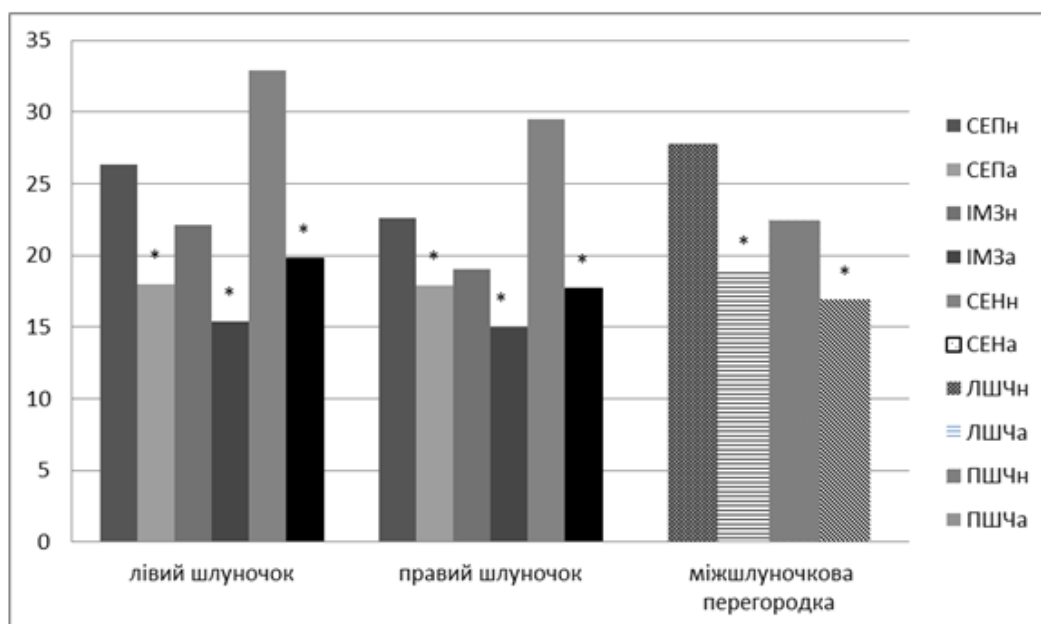


Рис. 5. Ступінь орієнтації міофібрил (%) у саркоплазмі скоротливих кардіоміоцитів різних зон шлуночкового міокарда щурів на 18-у добу пренатального онтогенезу в нормі та після дії алкоголю. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від норми. СЕП (СЕН – норма, СЕПа – алкоголь) – субепікардіальна зона; ІМЗ (ІМЗн – норма, ІМЗа – алкоголь) – інтрамуральна зона; СЕН (СЕНн – норма, СЕНа – алкоголь) – субендокардіальна зона; ЛШЧ (ЛШЧн – норма, ЛШЧа – алкоголь) і ПШЧ (ПШЧн – норма, ПШЧа – алкоголь) – лівошлуночкова і правошлуночкова частини міжшлуночкової перегородки.

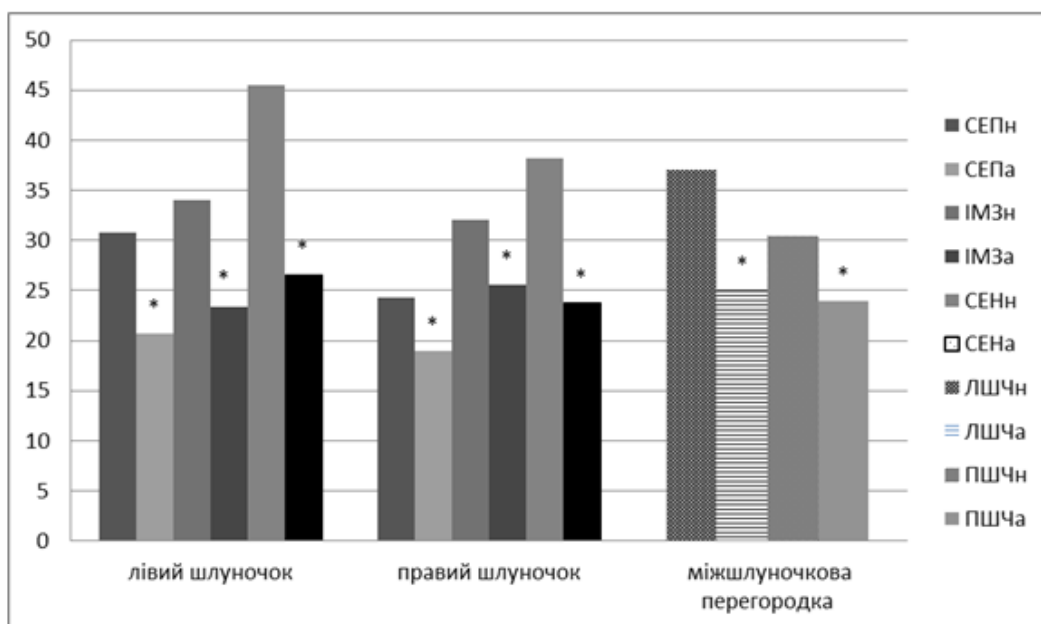


Рис. 6. Ступінь орієнтації міофібрил (%) у саркоплазмі скоротливих кардіоміоцитів різних зон шлуночкового міокарда щурів на 20-у добу пренатального онтогенезу в нормі та після дії алкоголю. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від норми. СЕП (СЕН – норма, СЕПа – алкоголь) – субепікардіальна зона; ІМЗ (ІМЗн – норма, ІМЗа – алкоголь) – інтрамуральна зона; СЕН (СЕНн – норма, СЕНа – алкоголь) – субендокардіальна зона; ЛШЧ (ЛШЧн – норма, ЛШЧа – алкоголь) і ПШЧ (ПШЧн – норма, ПШЧа – алкоголь) – лівошлуночкова і правошлуночкова частини міжшлуночкової перегородки.

Перспективи подальших розробок
пов'язані з вивченням наслідків постнатальної алкоголізації на структуру скоротливого апарату кардіоміоцитів щурів після народження.

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
Роботу проведено в рамках науково-дослідної теми «Гістогенез компонентів серцево-судинної системи людини та лабораторних тварин в

нормі та за умов експерименту» (номер державної реєстрації 0118U004730).

Літературні джерела References

1. Conen D. Alcohol consumption and incident cardiovascular disease: not just one unifying hypothesis. *Eur. Heart J.* 2015;36(15):897–898.
2. Gardner JD, Mouton AJ. Alcohol effects on cardiac function. *Compr. Physiol.* 2015;5(2):791-802.
3. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe. 18 Mar 1986. 53 p.
4. Becker HC. Animal models of excessive alcohol consumption in rodents. *Curr Top Behav Neurosci.* 2013;13:355–377.
5. Hayat MA, author: Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications. 4th. Cambridge: Cambridge University Press; 2000. 543 p.
6. Kuo J, author: Electron microscopy: methods and protocols. Totowa (New Jersey): Humana Press Inc; 2007. 608 p.

Марченко Д.Г. Якісний та кількісний аналіз гістологічних змін у структурі кардіоміоцитів ембріонів щурів протягом 18-20-ї діб за умов хронічної алкогольної інтоксикації материнського організму.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Алкоголь є тератогеном, який легко може проникати через плаценту, що призводить до пошкодження плода, що розвивається. Дослідження, як на лабораторних тваринах, так і клінічні, продемонстрували, що етанол дифундує через плаценту і швидко розподіляється, накопичуючись в навколоплідних водах. Виявлення ряду несприятливих наслідків пренатального впливу алкоголю все ще залишається актуальною сферою серед науковців. **Мета** дослідження – провести якісний та кількісний аналіз гістологічних змін у кардіоміоцитах ембріонів щурів протягом 18-ї -20-ї доби за умов хронічної алкогольної інтоксикації материнського організму. **Методи.** Об'єктом дослідження слугували серця потомства щурів від 18-ї до 20-ї доби пренатального розвитку в моделі хронічної алкогольної інтоксикації материнського організму. За допомогою трансмісійної електронної мікроскопії визначені кількісні та якісні параметри міофібрил кардіоміоцитів різних зон міокарда шлуночків. **Результати.** За нашими дослідженнями було встановлено, що після впливу етанолу на материнський організм, орієнтація ушкоджених міофібрил їхнього потомства була хаотичною та розповсюджувалась на значні ділянки саркоплазми. На відміну від норми, в кардіоміоцитах експериментальних тварин поряд з міофібрилами, які перебували у звичайному скороченому або релаксованому стані, були й такі, що містили деформовані саркомери з ознаками надмірного скорочення та дезорієнтацією фрагментованих міофіламентів. Внутрішньоклітинні органели кардіоміоцитів в експериментальній групі новонароджених тварин зазнавали значних і різноманітних змін. **Підсумок.** Хронічна алкогольна інтоксикація під час пренатального кардіогенезу ушкоджує скоротливий апарат кардіоміоцитів шлуночків за рахунок дезорганізації структури саркомерів, фрагментації та дезорієнтації міофібрил, значного пригнічення саркомерогенезу, зниження вмісту міофібрил, що асоційовано з деструкцією мітохондрій. Виразність змін у даних структурах залежить від зони та терміну розвитку ембріона.

Ключові слова: пренатальний онтогенез, щури, алкогольна інтоксикація, серце, міокард шлуночків, міофібрили, ультраструктура.

R.M. Matkivska

Bogomolets National Medical University
Kyiv, Ukraine

Надійшла: 14.10.2024
Прийнята: 15.12.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.72-75>

UDC: 616-001.43;616-022.912/.913

MICROSCOPIC CHARACTERISATION OF STRUCTURAL COMPONENTS OF THE KIDNEYS 1 HOUR AFTER EXPERIMENTAL RATS' EXPOSURE TO THE SCORPION LEIURUS MACROCTENUS VENOM

Matkivska R.M.   Microscopic characterisation of structural components of the kidneys 1 hour after experimental rats' exposure to the scorpion *Leiurus macroctenus* venom.

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

ABSTRACT. Background. The kidneys function in the human body as important organs for maintaining the constancy of the internal environment. With their participation, constant control is carried out over such parameters as the constancy of the circulating blood volume, electrolyte composition, osmotic pressure, ion concentration, acid-base balance, blood pressure, etc. Under the influence of pathogens of various genesis, these constants undergo pronounced changes due to disruption of the structural organisation of the kidneys. **Objective.** Study of microscopic changes in rat kidney tissue 1 hour after exposure to the venom of the scorpion *Leiurus macroctenus*. **Methods.** The study used 10 white male laboratory rats weighing 200 g (± 10 g) grown in the vivarium of the Educational and Scientific Center "Institute of Biology and Medicine" of the Taras Shevchenko National University of Kyiv. The venom of scorpions of the Buthidae family, genus *Leiurus*, species *Leiurus macroctenus*, was administered to rats once intramuscularly (0.5 ml of venom solution previously dissolved in saline; 28.8 $\mu\text{g/ml}$; LD50=0.08 mg/kg). Kidney samples from animals of all groups were taken for microscopic examination. Histological preparations of the heart were stained with hematoxylin and eosin. **Results and conclusion.** It has been established that when the venom of the scorpion *Leiurus macroctenus* is administered, after 1 hour, toxic substances cause the development of significant hemodynamic disorders and the initiation of inflammatory processes in the organ in experimental rats, acute renal failure as a result of acute damage to the glomerular apparatus, disruption of the cytoskeleton of podocytes and the tubular apparatus of nephrons with manifestations of desquamation, hydropic, hyaline-droplet dystrophy of the tubular epithelium.

Key words: venom, scorpions, kidneys, hemodynamic disorders, rats.

Citation:

Matkivska R.M. Microscopic characterisation of structural components of the kidneys 1 hour after experimental rats' exposure to the scorpion *Leiurus macroctenus* venom. *Morphologia*. 2024;18(4):72-5.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.72-75>

 Matkivska R.M. 0000-0002-4082-2899

 rujena011279@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Introduction

The kidneys are essential organs in the human body for maintaining the constancy of the internal environment. With their participation, constant control is carried out over such parameters as the constancy of the circulating blood volume, electrolyte composition, osmotic pressure, ion concentration, acid-base balance, blood pressure, etc. Under the influence of pathogens of various genesis, these constants undergo pronounced changes due to disruption of the structural organisation of the kidneys [1].

Kidney pathology is a common phenomenon.

The influence of physical and chemical environmental factors causes the development of morpho-functional disorders of the organ, which have unpredictable consequences. As is known, the kidneys are characterised by a fairly significant blood supply (about 25% of the total cardiac output), which makes them highly susceptible to the action of toxic substances since the concentration of the latter during the period of their maximum content in the blood in the renal vessels is higher than in other tissues, which contributes to the rapid damage to the endothelial layer and basal membranes of the capillary walls. The presence of a well-developed system of anastomoses is often

the cause of the vulnerability of the interstitium of the renal medulla to the effects of toxins. Compounds absorbed by the nephron tubules, interacting with the transport system of the tubular epithelium and actively accumulating in the basal parts of the cells, cause the development of degenerative and dystrophic changes in them [2]. In addition, substances secreted into the lumen of the tubules by secretion can affect the enzyme system of the nephron tubules, disrupting the normal course of biochemical reactions in them. It should also be noted that the high level of energy processes in the renal tissue determines their increased susceptibility to circulatory disorders and hypoxia [3, 4, 5]. In response to these factors, the development of stress, disruption of the microscopic structure of the organ and shifts in the physiological constants of the body are characteristic [6, 7, 8].

According to WHO, about 1.5 million cases of poisoning due to scorpion stings are registered in the world annually, leading to 2000-3000 deaths. Cases of scorpionism are common in the United States of America, Canada, Europe, and Australia. Still, this problem has become most widespread in Africa, India, Mexico, Brazil, Iran, Saudi Arabia, and Venezuela, where more than 2 billion people are under constant threat [9, 10, 11]. Among the currently known pathological processes associated with scorpionism, according to experimental studies, kidney damage is considered one of the most critical complications, which is often fatal [12, 13].

The study aims to examine microscopic changes in rat kidney tissue one hour after exposure to *Leiurus macroctenus* scorpion venom.

Materials and methods

The venom of scorpions of the Buthidae family, genus *Leiurus*, species *Leiurus macroctenus*, was administered to rats once intramuscularly (0.5 ml of venom solution previously dissolved in saline; 28.8 µg/ml; LD₅₀=0.08 mg/kg) [14, 15].

The study used 10 white male laboratory rats weighing 200 g (±10 g), raised in the vivarium of the Educational and Scientific Center "Institute of Biology and Medicine" of Taras Shevchenko National University of Kyiv. The rats were kept on a standard diet in an accredited vivarium by the "Standard Rules for the Arrangement, Equipment and Maintenance of Experimental Biological Clinics (Vivaria)". The experiments were conducted by the current regulatory documents regulating work organisation with experimental animals and compliance with the principles of the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes". Also, all work with animals was carried out by the Law of Ukraine dated February 21, 2006, No. 3447-IV, "On the Protection of Animals from Cruelty and Ethical Norms and Rules for Working with Laboratory Animals".

The rats selected for the experiment were divided into two groups: control—5 rats; no poison was

administered; the material was collected one hour after the administration of saline; and experimental—5 rats; histological material was collected one hour after the administration of poison. The rats were euthanised by carbon dioxide inhalation. The kidneys of the rats were isolated at 4 °C immediately after euthanasia.

Kidney samples from animals of all groups were collected for microscopic examination. The pieces were fixed in a 10% formalin solution for 1 day. Then, they were dehydrated in alcohols of increasing concentration and embedded in paraffin blocks. Histological preparations of rat kidneys were stained with hematoxylin and eosin. Histological preparations were studied using an SEO SCAN light microscope and photographed using a Vision CCD Camera with an image output system from histological preparations.

Results and conclusions

Histological studies of kidney preparations 1 hour after the introduction of scorpion venom into experimental animals established the onset of acute renal failure as a result of acute damage to the glomerular apparatus of nephrons, the onset of significant hemodynamic disorders and the initiation of inflammatory processes in the organ.

The fibrous capsule is edematous; it easily peels off from the organ. In the interstitium of the organ around the vessels of the microcirculatory bed, there is dilation and engorgement of the vessels of the venous bed and ischemia of the vessels of the arterial bed. Perivascular oedema with infiltration by lymphocytes and macrophages-histiocytes is also present. Hemocapillaries are spasmodic and engorged, with increased intracapillary aggregation of erythrocytes.

In the cortical substance, next to the renal corpuscles, which have preserved the typical histological structure, hypertrophied renal corpuscles are found where the lumen of the afferent and efferent arterioles is spasmodic with moderate anaemia. In their lumens, erythrocyte aggregation is enhanced. The wall of the arteries and arterioles is thickened due to hypertrophy and slight leukocyte infiltration of the media, smooth myocytes, losing their spindle-shaped shape, become rounded, their nuclei are hyperchromic, and the cytoplasm is brightly oxyphilic. There is slight oedema and lymphohistiocytic infiltration in the subendothelial layer of the intima and adventitia. The endothelial cells of their intima had a cubic shape; in the cytoplasm, there was slight oedema. The nuclei are hyperchromic, and their plasmalemma is indistinct and forms significant protrusions into the lumen and invaginations. The basement membrane is continuous, but in some places, there are signs of endothelial desquamation (Fig. 1).

In the glomerular vascular glomeruli, there is anaemia; in their lumens, there is stasis. In some places, their lumens have collapsed due to spasms of the afferent arteriole. The urinary spaces were sharply

dilated. In the wall of the glomerular capillaries, initial signs of focal endothelial dystrophy are observed. The cytoplasm of endothelial cells is swollen; the nuclei are hypertrophied and hyperchromic, which significantly protrude into the vessel's lumen. The basement membrane is thickened and swollen. Due to the increase in the proliferative activity of mesangio-cytes, there is an expansion of the mesangium and an increase in the amount of matrix. Hyperplasia of the mesangium and pleurisy of the glomerular capillaries caused a sharp narrowing of the urinary space of the renal corpuscles; in most fields of view, it looked slit-like or was not visualised at all (Fig. 2).

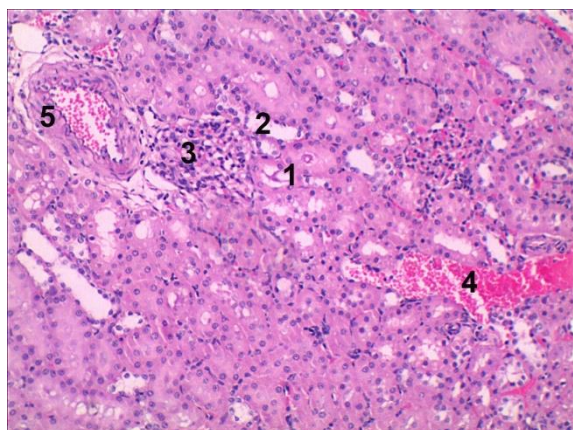


Fig. 1. Microscopic structure of the kidney of white rats 1 hour after the introduction of scorpion venom. 1 - dystrophy of proximal tubules with an accumulation of cellular detritus in the lumen, 2 - the destruction of distal tubules, 3 - hypertrophied renal corpuscle, 4 - an area of haemorrhage, 5 - de-structured artery. Staining with hematoxylin-eosin. $\times 200$.

The cells of the outer leaf of the Shumlyansky-Bowman capsule are sharply flattened, their nuclei are hyperchromic with invaginations of the karyolemma, the basement membrane is thickened. The growth of the mesangium leads to a disruption of the cytoskeleton of podocytes of the inner leaf of the capsule. There is a disorganisation of the cytopodia and cytotrabeculae of podocytes, and as a result, the process of filtration disorders begins. In the proximal and distal renal tubules, the lumens are unevenly expanded with thinning of the walls. In the proximal and distal tubules, the epithelium is damaged. The brush border and basal striation are especially noticeable dystrophic changes. Focal cells almost completely lose them, and the epithelium's desquamation into the tubule's lumen is observed. The cells show signs of hydropic and hyaline-droplet dystrophy, characterised by the appearance of vacuoles and single acidophilic granules in the weakly oxyphilic cytoplasm,

indicating cytoplasmic oedema. The nuclei are hyperchromic, compacted, and have indistinct contours. Fibrin accumulations were detected in the lumens of the tubules. In thin tubules, hyperplasia of epithelial cells is due to oedema of their cytoplasm. On the cross-section, thin tubules with slit-like lumens. When tubules with moderately dilated lumens are collected, epithelial cells almost completely lose microvilli and basal striation in their cytoplasm, oedema, and single vacuoles in the weakly oxyphilic cytoplasm. The nuclei are hyperchromic and compacted. Along the course of the vessels of the microcirculatory bed of the interstitium, both in the cortex and the medulla, local single haemorrhages occur (Fig. 2).

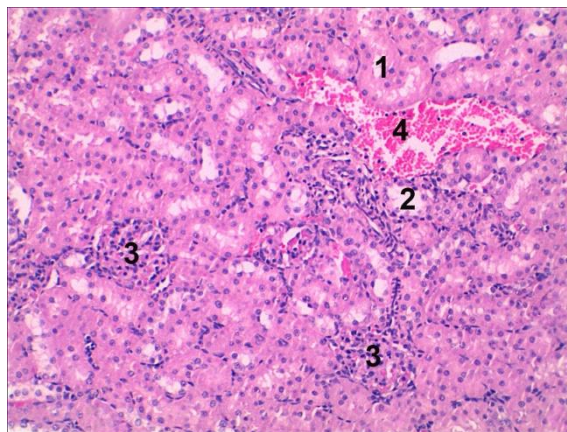


Fig. 2. Microscopic structure of the kidney of white rats 1 hour after the introduction of scorpion venom. 1 - dystrophy of proximal tubules, 2 - destruction of distal tubules, 3 - renal corpuscles with no urinary space, 4 - area of hemorrhage. Staining with hematoxylin-eosin. $\times 200$.

Summary

When the venom of the scorpion *Leiurus macroctenus* is administered, after 1 hour, toxic substances cause the development of significant hemodynamic disorders and the initiation of inflammatory processes in the organ in experimental rats, acute renal failure as a result of acute damage to the glomerular apparatus, disruption of the cytoskeleton of podocytes and the tubular apparatus of nephrons with manifestations of desquamation, hydropic, hyaline-droplet dystrophy of the tubular epithelium.

Prospects for further development are related to studying histological changes in rat kidneys under the influence of *Leiurus macroctenus* scorpion venom at later stages of the experiment.

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. Assmus AM, Mullins JJ, Brown CM, Mullins LJ. Cellular plasticity: A mechanism for homeostasis in the kidney. *Acta Physiol (Oxf)*. 2020;229(1):13447. doi: 10.1111/apha.13447

2. Tatarina O, Chulak O, Chulak Y, Nasibullin B. Changes in the kidney and liver structure and functions during the experimental, non-lethal load of carbon tetrachloride (CCL₄). *Georgian Med News*. 2021;314:150-155. PMID: 34248046
3. Abd El-Aziz FEA, El Shehaby DM, Elghazally SA, Hetta HF. Toxicological and epidemiological studies of scorpion sting cases and morphological characterization of scorpions (*Leiurus quinquestriatus* and *Androctonus crassicauda*) in Luxor, Egypt. *Toxicol Rep*. 2019;6:329-335. doi: 10.1016/j.toxrep.2019.03.004
4. Basile DP, Yoder MC. Renal endothelial dysfunction in acute kidney ischemia reperfusion injury. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2014;14(1):3-14. doi: 10.2174/1871529x1401140724093505
5. Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(10):629-646. doi: 10.1038/nrneph.2017.107
6. Honda T, Hirakawa Y, Nangaku M. The role of oxidative stress and hypoxia in renal disease. *Kidney Res Clin Pract*. 2019;38(4):414-426. doi: 10.23876/j.krcp.19.063
7. Scammell MK, Sennett CM, Petropoulos ZE, Kamal J, Kaufman JS. Environmental and occupational exposures in kidney disease. *Semin Nephrol*. 2019;39(3):230-243. doi: 10.1016/j.semnephrol.2019.02.001
8. Thompson RH, Lane BR, Lohse CM, Leibovich BC, Fergany A, Frank I, et al. Renal function after partial nephrectomy: effect of warm ischemia relative to quantity and quality of preserved kidney. *Urology*. 2012;79(2):356-360. doi: 10.1016/j.urol.2011.10.031
9. Galíndez-Cerón JD, Jorge RJB, Chavez-Acosta MH, Jorge ARC, Alves NQ, Prata MMG, et al. Renal alterations induced by the venom of Colombian scorpion *Centruroides Margaritatus*. *Curr Top Med Chem*. 2019;19(22):2049-2057. doi: 10.2174/1568026619666190731143523
10. Radi ZA. Kidney pathophysiology, toxicology, and drug-induced injury in drug development. *Int J Toxicol*. 2019;38(3):215-227. doi: 10.1177/1091581819831701
11. Reis MB, Zoccal KF, Gardinassi LG, Faccioli LH. Scorpion envenomation and inflammation: Beyond neurotoxic effects. *Toxicon*. 2019;167:174-179. doi: 10.1016/j.toxicon.2019.06.219
12. Naqvi R. Scorpion sting and acute kidney injury: case series from Pakistan. *Br J Med Med Res*. 2015;9(10):1-6. Doi: 10.9734/BJMMR/2015/19611
13. Ranaweera GG, Bavanthan V, Nazar AL, Lokuhetty MD. Acute renal insufficiency after scorpion sting. *Ceylon Med J*. 2015;60(1):31-32. doi: 10.4038/cmj.v60i1.7487
14. Gunas V, Maievskiy O, Raksha N, Vovk T, Savchuk O, Shchypanskyi S, Gunas I. Study of the Acute Toxicity of Scorpion *Leiurus macroctenus* Venom in Rats. *The Scientific World Journal*. 2024;1:9746092. doi: 10.1155/2024/9746092
15. Özkan Ö, Filazi A. The determination of acute lethal dose-50 (LD50) levels of venom in mice, obtained by different methods from scorpions, *Androctonus crassicauda* (Oliver 1807). *Türkiye Parazit Derg*. 2004;28(1):50-53.

Матківська Р.М. Мікроскопічна характеристика структурних компонентів нирок через 1 годину після впливу на експериментальних щурів отрути скорпіонів *Leiurus macroctenus*.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Нирки функціонують в організмі людини як важливі органи для підтримання сталості внутрішнього середовища. За їх участю здійснюється постійний контроль таких параметрів, як сталість об'єму циркулюючої крові, електролітного складу, осмотичного тиску, концентрації іонів, кислотно-основної рівноваги, артеріального тиску, тощо. За умов впливу патогенів різного генезу дані константи зазнають виражених змін внаслідок порушення структурної організації нирок. **Мета.** Вивчення мікроскопічних змін тканини нирок щурів через 1 годину після впливу отрути скорпіонів *Leiurus macroctenus*. **Методи.** У дослідженні використано 10 білих лабораторних щурів-самців масою 200 г (± 10 г), вихованих у віварії Навчально-наукового центру "Інститут біології і медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Отруту скорпіонів родини Buthidae роду *Leiurus* виду *Leiurus macroctenus* вводили щурам одноразово внутрішньом'язово (0.5 мл розчину отрути попередньо розчиненому у фізіологічному розчині; 28.8 мкг/мл; ЛД₅₀=0.08 мг/кг). Для мікроскопічного дослідження забирали зразки нирок тварин всіх груп. Фарбування гістологічних препаратів серця здійснювали гематоксиліном та еозином. **Результати та підсумок.** Встановлено, що при введенні отрути скорпіона *Leiurus macroctenus* через 1 годину токсичні речовини спричиняють в експериментальних щурів початок розвитку значних гемодинамічних розладів та запуску запальних процесів в органі, гострої ниркової недостатності як наслідок гострого ураження гломерулярного апарату, порушенням цитоскелету подоцитів та тубулярного апарату нефронів з проявами десквамації, гідропічної, гіаліново-крапельної дистрофії епітелію каналців.

Ключові слова: отрута, скорпіони, нирки, гемодинамічні розлади, щури.

О.Р. Матяш
Н.І. Волошчук

Вінницький національний
медичний університет ім.
М.І. Пирогова
Вінниця, Україна

Надійшла: 20.10.2024

Прийнята: 29.11.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.76-80>

УДК: 546.221.1:615:577:611.1:611.018

ВПЛИВ ДОНОРУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ НА ГІСТОЛОГІЧНІ ЗМІНИ СЕРЦЯ ЩУ- РІВ ЗА АЛКОГОЛЬНОЇ КАРДІОМІОПА- ТІЇ

Matiash O.R. , Voloshchuk N.I.  ✉ Effect of hydrogen sulfide donor on histological changes in the heart of rats with alcoholic cardiomyopathy.

Vinnitsya National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine.

ABSTRACT. Relevance. Alcoholic cardiomyopathy is an actual problem today, because it is characterized by high prevalence and rapid development of complications. The question of effective pharmacotherapy of alcoholic heart damage remains open. The use of hydrogen sulfide donors is prospective in this direction. **Aim.** To evaluate the influence of hydrogen sulfide donor on histological changes of rat myocardium during experimental alcoholic cardiomyopathy in rats. **Methods.** Experimental studies were conducted on 30 white non-linear male rats. According to the purpose of the study, all animals were divided into three groups (10 rats each): 1st group – control; 2nd group - animals that were simulated alcoholic cardiomyopathy by intragastric administration of 20% aqueous ethanol solution (at a dose of 8 g/kg/day) for 90 days; Group 3 - rats that, after the cessation of alcoholism, were injected with the donor H₂S - NaHS in a dose of 3 mg/kg/day intraperitoneally for two weeks. Histological studies of fragments of the left ventricle were carried out on the basis of the Vinnytsia Regional Pathological and Anatomical Bureau according to the generally accepted method using an Olympus BX-41 light microscope (Olympus Europe GmbH, Japan). **Results.** Data from histological studies showed that alcoholic cardiomyopathy is accompanied by a number of changes in the vessels of the myocardial stroma and muscle fibers. Ischemia and spasm of blood vessels, partial detachment of the endothelial layer, signs of myocardial inflammation, as well as ischemia of muscle fibers, which is accompanied by myolysis, fragmentation, abrasion of transverse striations, areas of hypertrophy, are noted. Under the conditions of using the hydrogen sulfide donor NaHS, the expressiveness of the structural changes of the myocardium initiated by alcoholic cardiomyopathy decreases: the condition of the endothelial lining of the arterioles improves, the signs of vascular spasm, myocardial inflammation, and ischemia of muscle fibers decrease. **Conclusion.** The conducted histological studies confirmed the presence of donor hydrogen sulfide cardioprotective properties in experimental alcoholic cardiomyopathy.

Key words: alcoholic cardiomyopathy, morphology, hydrogen sulfide, treatment, rats.

Citation:

Matiash OR, Voloshchuk NI. [Effect of hydrogen sulfide donor on histological changes in the heart of rats with alcoholic cardiomyopathy]. Morphologia. 2024;18(4):76-80. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.76-80>

 **Matiash O.R.** 0000-0002-9797-1588

 **Voloshchuk N.I.** 0000-0002-0166-9676

✉ voloshchuknatali@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Зловживання алкоголем є важливою медико-соціальною проблемою сьогодення, що обумовлено високою поширеністю, токсичним ураженням різних тканин і органів та асоціюється з високою смертністю [1, 2, 3]. У всьому світі кожна третя людина вживає алкоголь, серед них 25% жінок і 39% чоловіків, а в Європі до 50% дорослого населення споживають алкоголь регулярно [1]. Останім часом зафіксована тенденція щодо зростання частоти споживання алкогольних

напоїв серед молоді та підлітків [1, 4]. Так, наприклад в Україні за даними опитування у 2019 році близько 85 % підлітків мають досвід вживання алкоголю [4]. Надмірне вживання алкоголю є важливим фактором ризику розвитку різноманітних гострих та хронічних захворювань і є причиною близько 5 % усіх смертей [5].

Токсичний вплив етанолу на організм має системну дію і викликає пошкодження практично всіх органів та систем організму [2, 5]. Алкогольне ураження серцево-судинної системи

посідає друге місце за поширеністю після пошкодження печінки та шлунково-кишкового тракту. У високих дозах (більше 60 г/добу для чоловіків і 40 г/добу для жінок) і за тривалого споживання (зазвичай більше 10 років) етанол спричиняє розвиток атеросклерозу коронарних, церебральних і периферичних судин, артеріальної гіпертензії та прогресуючого пошкодження міокарду (алкогольна кардіоміопатія) [5]. На сьогодні питання патогенезу розвитку токсичного ураження серця залишається відкритим, що в значній мірі стримує розробку ефективних засобів профілактики та лікування алкогольної кардіоміопатії.

Останім часом проводяться інтенсивні дослідження щодо вивчення ролі системи гідроген сульфід (H_2S) в механізмах пошкодження міокарду та кардіоцитопroteкції. Показано, що використання донорів H_2S виявляє потужні захисну дію щодо серця за діабетичної кардіоміопатії, ішемії / реперфузії міокарду та інших патологічних станів [6]. Проте, практично відсутні дані щодо ролі H_2S в патогенезі алкогольної кардіоміопатії та можливості використання модulatorів його обміну з метою фармакотерапії.

Мета

Оцінити вплив донора гідроген сульфід на гістологічні зміни міокарду щурів за експериментальної алкогольної кардіоміопатії у щурів.

Матеріали та методи

Експериментальні дослідження проведені на 30 білих щурах-самцях лінії Вістар масою тіла 180-200 г, отриманих з ДУ «Інститут фармакології та токсикології АМН України». До початку дослідження тварин утримували 14 днів в умовах віварію Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова для адаптації. Під час проведення експериментальних досліджень спостерігали за загальним станом тварин, споживанням корму і води, щоденно визначали масу тіла. Лабораторних тварин годували збалансованим гранульованим кормом для гризунів та поїли охолодженою кип'яченою водою *ad libitum* у відповідності до нормативів. Світловий режим складав 12 годин світла та 12 годин темноти. Всі етапи досліджень виконані за загальними етичними принципами експериментів на тваринах згідно Першого національного конгресу України з біоетики (Київ, 2001), «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), а також Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Відповідно до мети дослідження усі піддослідні тварини поділені на три груп (по 10 щурів у кожній). Перша група – контрольна, отримували еквіоб'ємні кількості розчинників. В другій та третій групах моделювали алкогольну кардіоміо-

патію шляхом інтрагастрального введення за допомогою зонду 20 % водного розчину етанолу (в дозі 8 г/кг/добу) протягом 90 діб [7]. Щурам 3-ої групи після припинення алкоголізації вводили донор H_2S - $NaHS$ (Sigma, США) у дозі 3 мг/кг/добу інтраперитонеально протягом двох тижнів [8].

Гістологічні дослідження проведені на базі Вінницького обласного патолого-анатомічного бюро (ліцензія МОЗ України АЕ № 638623 від 23.04.2015, № 240). Матеріалом для гістологічних досліджень були фрагменти лівого шлуночка розміром 1x1 см. Шматочки фіксували в 10 % розчині формаліну (тривалість експозиції - 1-2 доби). Після фіксації шматочки промивали водою, проводили зневоднення фіксованого матеріалу у спиртах зростаючої концентрації та заливали в парафінові блоки. Далі готували напівтонкі зрізи (4-5 мкм) з використанням санного мікротома (MC-2M, Мікромед), забарвлювали їх гематоксиліном і еозином, а також залізним гематоксиліном (за Рего). Світлооптичне дослідження гістологічних препаратів проводили з використанням світлового мікроскопу Olympus BX-41 (Olympus Europe GmbH, Японія) при збільшеннях мікроскопу $\times 100$ (ок. 10, об. 10) та $\times 400$ (ок. 10, об. 40). Мікрофотографії виготовляли за допомогою фотокамери Olympus C-5050 Zoom (Olympus Europe GmbH, Японія).

Результати та їх обговорення

За результатами гістологічних досліджень встановлено, що алкогольна кардіоміопатія супроводжується виразними структурними змінами судин стірки міокарду. Вони характеризувались недостатнім кровонаповненням, артерії середнього та малого діаметру мали звужені просвіти, без наявності в них вмісту. подекуди відмічали ділянки ішемії судин, в яких артеріоли перебували в стані спазму. Стінки останніх були просякненні плазмою крові, просвіти їх нерівні, не містили еритроцитів. Ендотеліоцити інтими артеріол характеризувались нещільним сполученням з базальною мембраною, були розпушеними, мали заокруглену форму, гіперхромні ядра. Спостерігали часткове відшарування ендотеліального вистилання стінок артеріол від базальної мембрани, а також розволокнення підендотеліального шару. Капіляри мікроциркуляторного русла в цій групі експериментальних щурів мали вигляд тяжів, стінки їх були набряклими, ймовірно, внаслідок просякнення плазмою. Відмічали також наявність периваскулярного набряку

Поряд з цим за алкогольного ураження серця саркоплазма скоротливих кардіоміоцитів мала зернистість, їх ядра були поліхроматофільні, оскільки на гістологічних препаратах відмічали як компактизацію, так і розрідження хроматину. Також відмічали наявність вогнищ руйнування м'язових волокон – міолізу. В цих зонах вони втрачали чіткі обриси, поперечна посмугованість була стертою, а їх ядра мали вигляд контурів.

М'язові волокна в окремих ділянках мали звивистий хід. Ділянки ураження волокон добре фарбувались базофільними барвниками. Крім того, характерним був зернисто-глибчастий розпад саркоплазми м'язових волокон, що відмічали в окремих полях зору. Також в окремих ділянках міокарду відмічалась лімфогістіоцитарна інфільтрація (рис. 1-3).

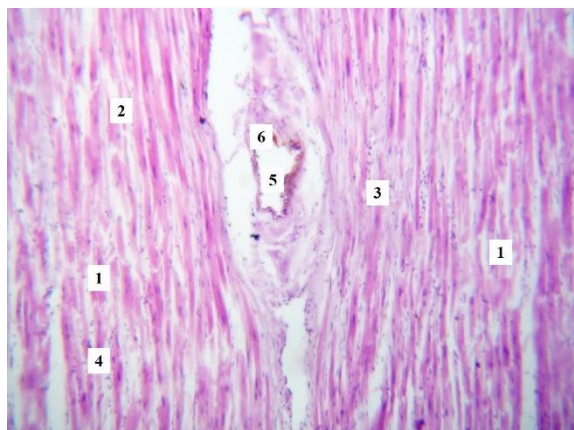


Рис. 1. Гістологічні зміни міокарду щура з гострою алкогольною інтоксикацією та корекцією корвітином. Фрагментація м'язових волокон (1), акцентована поперечна посмугованість (2), скоротливі кардіоміоцити (3), лімфогістіоцитарна інфільтрація (4), просвіт артеріоли (5), відшарування ендотеліального шару стінки артеріоли (6). Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$.

В препаратах, забарвлених за Рего (рис. 3), також відмічали порушення нормальної гісто-структури тканини міокарду, реєстрували ознаки ішемії м'язових волокон. За алкогольної кардіоміопатії м'язові волокна не мали характерної поперечної посмугованості, відмічались ділянки їх фрагментації та деструкції. Поряд з цим реєстрували як атрофію, так і гіпертрофію м'язових волокон.

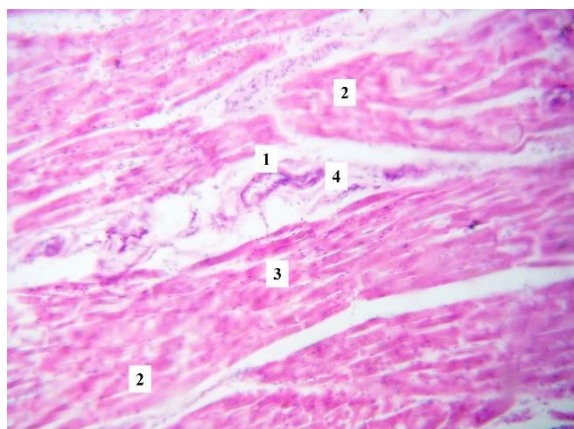


Рис. 2. Структурні зміни міокарду щурів за алкогольної кардіоміопатії. Спазм артеріол (1), міоліз (2), зернисто-глибчастий розпад саркоплазми м'язових волокон (3), периваскулярний набряк (4). Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 100$.

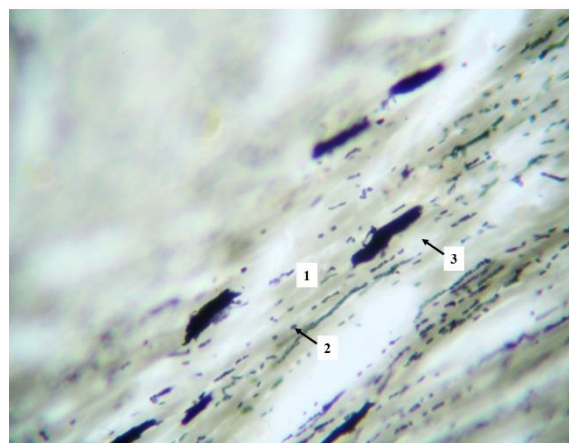


Рис. 3. Гістологічні зміни міокарда щура за алкогольної кардіоміопатії. Скоротливі кардіоміоцити (1), ядра кардіоміоцитів (2), ділянки фрагментації м'язових волокон міокарда (3). Забарвлення за Рего. $\times 400$.

Застосування донору гідроген сульфід NaHS спричиняло покращення гістологічної організації міокарду тварин при алкогольній кардіоміопатії. За цих умов м'язові волокна були фрагментовані лише місцями, поперечна посмугованість була збережена. Цитоплазма скоротливих кардіоміоцитів не містила зернистості, ядра деяких кардіоміоцитів були поліморфні та гіпохромні. Вогнища міолізу не виявлялись. Артеріоли містили складжі еритроцитів та елементи білої крові. Стінки кровоносних судин мали ознаки плазматичного просякання, характерним був периваскулярний набряк, але його інтенсивність була меншою порівняно з нелікованою патологією. (рис. 4). В препаратах, забарвлених за Рего, показано значне зменшення виразності ішемії м'язових волокон, відмічались лише поодинокі ділянки фрагментації та деструкції.

Проведені дослідження засвідчили, що експериментальна алкогольна кардіоміопатія викликає ряд структурних змін в міокарді щурів. В судинах строми щурів реєструються ознаки ішемії, спазму, часткове відшарування ендотелію, периваскулярний набряк. В окремих ділянках міокарду виявляються зони лімфогістіоцитарної інфільтрації, що свідчить про розвиток запальної реакції. Поряд з цим розвивається ішемія міокарду, реєструється міоліз та фрагментація м'язових волокон, акцентується їх поперечна посмугованість, визначаються ділянки гіпертрофії. Отримані результати гістологічних досліджень алкоголь-ініційованих змін в міокарді щурів не суперечать даним літератури [9, 10].

Використання донору гідроген сульфід NaHS за алкогольної кардіоміопатії характеризується виразною кардіоцитопротекторною дією, яка опосередковується через його протиішемічні, протизапальні та ендотеліотропні ефекти, про що доказово свідчать результати гістологічних досліджень.

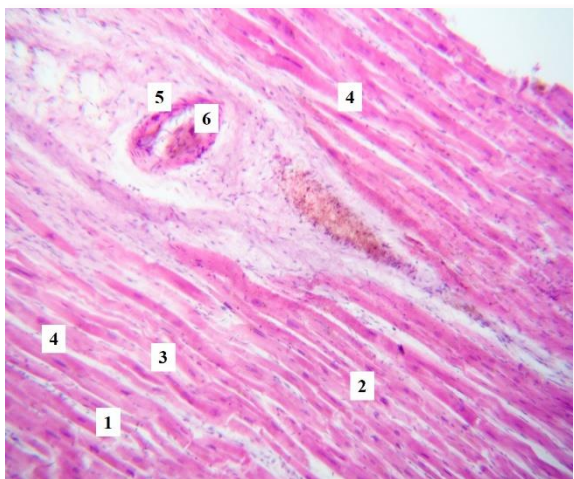


Рис. 4. Гістологічні зміни міокарду щура за алкогольної кардіоміопатії на тлі корекції NaHS. Фрагментація м'язових волокон (1), акцентована позмугованість (2), звивистий хід м'язових волокон (3), видовжені ядра скоротливих кардіоміоцитів (4), набряк стінки артеріоли (5), елементи білої крові в просвіті артеріоли (6). Забарвлення гематоксиліном та еозиним. $\times 200$.

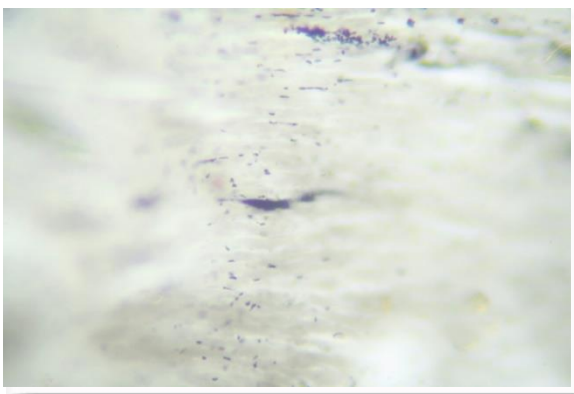


Рис. 5. Гістологічні зміни міокарда щура за алкогольної кардіоміопатії на тлі корекції NaHS. Забарвлення за Рего. $\times 400$.

В літературі нами знайдена лише одна публікація в якій наголошується на захисній дії

гідроген сульфіді щодо серця мишей за алкогольної кардіоміопатії [11]. В той же час існують дані щодо гепато- та нефропротекторної дії донора гідроген сульфіді за алкогольного ураження печінки та нирок [12]. Також в літературі наводяться дані щодо кардіопротекторних властивостей гідроген сульфіді за різних серцево-судинних захворювань [13].

Висновки

1. Алкогольна кардіоміопатія супроводжується рядом гістологічних змін судин строми міокарду та м'язових волокон. Відмічаються ішемія та спазм судин, часткове відшарування ендотеліального шару, ознаки запалення міокарду, а також ішемія м'язових волокон, яка супроводжується їх міолізом, фрагментацією, стертістю поперечної позмугованості, ділянками гіпертрофії.

2. За умов застосування донору гідроген сульфіді NaHS зменшується виразність структурних змін міокарду, ініційованих алкогольною кардіоміопатією: покращується стан ендотеліальної вистилки артеріол, зменшуються ознаки спазму судин, запалення міокарду та ішемії м'язових волокон.

Перспективи подальших розробок

Використання донорів гідроген сульфіді є перспективним напрямком сучасної фармакотерапії алкогольної кардіоміопатії. Подальші дослідження в цьому напрямку дозволять обґрунтувати доцільність використання донорів гідроген сульфіді з метою кардіоцитопротекції за алкогольного ураження серця.

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

Робота виконана в рамках науково-дослідної теми «Роль H_2S -сигнальної системи у модуляції біологічної активності та токсичності лікарських засобів і біологічно-активних речовин» (номер державної реєстрації 0124U002903).

Літературні джерела

References

1. GBD 2016 Alcohol Collaborators. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2018 Sep 22;392(10152):1015-1035. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31310-2. Epub 2018 Aug 23. Erratum in: *Lancet*. 2018 Sep 29;392(10153):1116. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32338-9. PMID: 30146330; PMCID: PMC6148333.
2. Rasoul D, Ajay A, Abdullah A, Mathew J, Lee WEB, Mashida K, Sankaranarayanan R. Alcohol and Heart Failure. *Eur Cardiol*. 2023;18:e65. doi: 10.15420/ecr.2023.12. PMID: 38213665; PMCID: PMC10782426
3. Shahid M, Ibrahim R, Arakelyan A, Hassan K, Sainbayar E, Pham HN, Mamas MA. Alcoholic cardiomyopathy mortality and social vulnerability index: A nationwide cross-sectional analysis. *Int J Cardiol Cardiovasc Risk Prev*. 2023;19:200224. doi: 10.1016/j.ijcrp.2023.200224. PMID: 37964864; PMCID: PMC10641739
4. [Report on the drug and alcohol situation in Ukraine for 2022]. Kyiv: State Institution of Forensic Psychiatry of the Ministry of Health of Ukraine;

2022. 78p. Ukrainian.

5. Fernández-Solà J. The Effects of Ethanol on the Heart: Alcoholic Cardiomyopathy. *Nutrients*. 2020;12(2):572. doi: 10.3390/nu12020572. PMID: 32098364; PMCID: PMC7071520

6. Kolluru GK, Shackelford RE, Shen X, Dominic P, Kevil CG. Sulfide regulation of cardiovascular function in health and disease. *Nat Rev Cardiol*. 2023;20(2):109-125. doi: 10.1038/s41569-022-00741-6. Epub 2022 Aug 5. PMID: 35931887; PMCID: PMC9362470

7. Lieber CS, auhor: Medical and Nutritional Complications of Alcoholism: Mechanisms and Management. New York: Springer; 1992. 677 p.

8. Hashmi SF, Rathore HA, Sattar MA, Johns EJ, Gan CY, Chia TY, Ahmad A. Hydrogen Sulphide Treatment Prevents Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting the Expression of ICAM-1 and NF- κ B Concentration in Normotensive and Hypertensive Rats. *Biomolecules*. 2021;11(10):1549. doi: 10.3390/biom11101549. Erratum in: *Biomolecules*. 2022 Apr 18;12(4):593. doi: 10.3390/biom12040593. PMID: 34680182; PMCID: PMC8534271

9. Belenichev IF, Steblyuk VS, Abramov AV. [Morphofunctional characteristics of cardiomyocytes in modeling alcoholic cardiomyopathy in rats: cardioprotective effects of metabolitotropic drugs]. *Bulletin of Problems in Biology and Medicine*.

2017;2(140):56-62. Ukrainian.

10. Pashynska OS. [Morphological changes in the heart of rats with experimental alcoholic cardiomyopathy after treatment with vinboron and milidronate]. *Reports of Morphology*. 2013;1(19):55-59. Ukrainian.

11. Liang B, Xiao T, Long J, Liu M, Li Z, Liu S, Yang J. Hydrogen sulfide alleviates myocardial fibrosis in mice with alcoholic cardiomyopathy by down-regulating autophagy. *Int J Mol Med*. 2017;40(6):1781-1791. doi: 10.3892/ijmm.2017.3191. Epub 2017 Oct 16. PMID: 29039471; PMCID: PMC5716447

12. Romanenko IV, Melnyk AV. [Hepato- and nephroprotective effects of hydrogen sulfide donor, quercetin and their combination in acute alcohol intoxication]. *Pharmacology and medicinal toxicology*. 2023;17(5):328-337. Ukrainian. <https://doi.org/10.33250/17.04.328>

13. Wang YZ, Ngowi EE, Wang D, Qi HW, Jing MR, Zhang YX, Cai CB, He QL, Khattak S, Khan NH, Jiang QY, Ji XY, Wu DD. The Potential of Hydrogen Sulfide Donors in Treating Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):2194. doi: 10.3390/ijms22042194. PMID: 33672103; PMCID: PMC7927090

Матяш О.Р., Волощук Н.І. Вплив донору гідроген сульфіді на гістологічні зміни серця щурів за алкогольної кардіоміопатії.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Алкогольна кардіоміопатія є актуальною проблемою сьогодення, адже характеризується високою поширеністю та стрімким розвитком ускладнень. Залишається відкритим питання щодо ефективної фармакотерапії алкогольного ураження серця. Перспективним в цьому напрямку є використання донорів гідроген сульфіді. **Мета.** оцінити вплив донора гідроген сульфіді на гістологічні зміни міокарду щурів за експериментальної алкогольної кардіоміопатії у щурів. **Методи.** Експериментальні дослідження проведені на 30 щурах-самцях лінії Вістар. Відповідно до мети дослідження усі тварини поділені на три груп (по 10 щурів у кожній): 1-ша група – контрольна; 2-га група – тварини, яким моделювали алкогольну кардіоміопатію шляхом інтрагастрального введення 20 % водного розчину етанолу (в дозі 8 г/кг/добу) протягом 90 діб; 3 група – щури, яким після припинення алкоголізації вводили донор H_2S – NaHS у дозі 3 мг/кг/добу інтраперитонеально протягом двох тижнів. Гістологічні дослідження фрагментів лівого шлуночка проведені на базі Вінницького обласного патолого-анатомічного бюро за загальноприйнятою методикою з використанням світлового мікроскопу Olympus BX-41 (Olympus Europe GmbH, Японія). **Результати.** Дані гістологічних досліджень показали, що алкогольна кардіоміопатія супроводжується рядом змін судин строми міокарду та м'язових волокон. Відмічаються ішемія та спазм судин, часткове відшарування ендотеліального шару, ознаки запалення міокарду, а також ішемія м'язових волокон, яка супроводжується їх міолізом, фрагментацією, стертістю поперечної посмугованості, ділянками гіпертрофії. За умов застосування донору гідроген сульфіді NaHS зменшується виразність структурних змін міокарду, ініційованих алкогольною кардіоміопатією: покращується стан ендотеліальної вистилки артерій, зменшуються ознаки спазму судин, запалення міокарду та ішемії м'язових волокон. **Підсумок.** Проведені гістологічні дослідження засвідчили наявність у донора гідроген сульфіді кардіопротекторних властивостей за експериментальної алкогольної кардіоміопатії.

Ключові слова: алкогольна кардіоміопатія, морфологія, гідроген сульфід, лікування, щури.

К.В. Мізякіна

Дніпровський державний
медичний університет,
Дніпро, Україна

Надійшла: 25.10.2024
Прийнята: 12.12.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.81-87>

УДК 591.481.1-001:57.012.4

КІЛЬКІСНА МОРФОЛОГІЧНА ХАРАК- ТЕРИСТИКА ЗМІН ЗУБЧАСТОЇ ФАСЦІЇ ГІПОКАМПА У ЩУРІВ З РІЗНИМИ НЕЙРОКОГНІТИВНИМИ РОЗЛАДАМИ ПІСЛЯ ТЯЖКОЇ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВОЇ ТРАВМИ

Mizyakina K.V.  Quantitative morphological characteristics of changes in the hippocampal dentate gyrus in rats with various neurocognitive disorders after severe traumatic brain injury.

Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. Background. In solving numerous issues related to the treatment and rehabilitation of patients with traumatic brain injury, it is of particular interest to study the pathomorphological mechanisms that determine the nature of the formation and dynamics of neurocognitive disorders at various times after the injury. **The study aims** to determine the tissue and cellular posttraumatic changes in the structure of the cerebral dentate cortex of rats with various neurocognitive disorders at different times after severe traumatic brain injury. **Methods.** A "shock acceleration model" was used to reproduce severe traumatic brain injury in rats. According to the results of neurological tests, the rats were divided into three groups: 1) the first – animals after trauma with neurocognitive disorders and memory disorders; 1) the second – animals after trauma with neurocognitive disorders without memory disorders; 3) comparison group – animals after trauma without neurocognitive disorders. A histological, morphometric and immunohistochemical study of the cerebral dentate cortex was carried out using the markers β -tubulin, Synaptophysin, GAP43, NCAM1, N-cadherin, GFAP. **Results and conclusion.** Neurocognitive disorders with memory impairment in the long-term after severe traumatic brain injury are accompanied by a deepening of neurocyte degeneration and chronicity of neuroinflammation with activation of neuronal apoptosis and gliocyte autophagy mechanisms, which leads to irreversible deformation of the dentate gyrus cytoarchitectonics. The progression of neurodegeneration is accompanied by activation of microglia and leads to disintegration and migration of macrogliaocytes with the formation of irreversible mosaic astrocytic deficiency and the formation of glial layers in the form of couplings around hemocapillaries. Preservation of memory function in animals with neurocognitive disorders is associated with the limitation of secondary neurocyte death and stabilization of adhesive properties of astroglia of the dentate cortex, which prevents the formation of astrocytic couplings around newly formed hemocapillaries while maintaining the integrity of the blood-brain barrier. In animals without neurocognitive disorders, compensatory mechanisms are implemented in the dentate cortex during long post-traumatic period through effective neovasculogenesis, limitation of perivascular astrocyte hyperplasia and neuroinflammation, which prevents neurocyte death and leads to the activation of synaptic remodeling from the entorhinal cortex to the CA1 area and from the dentate gyrus to the CA3 area of the hippocampus 40 days after injury.

Key words: traumatic brain injury, rats, neurocognitive disorders, cerebral dentate cortex, morphology.

Citation:

Mizyakina KV. [Quantitative morphological characteristics of changes in the hippocampal dentate gyrus in rats with various neurocognitive disorders after severe traumatic brain injury]. *Morphologia*. 2024;18(4):81-7. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.81-87>

 Mizyakina K.V. 0000-0003-2130-6132

 mizyakina.e@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Черепно-мозкова травма (ЧМТ) викликає складний набір первинних і вторинних реакцій, які ушкоджують ділянки мозку, що обслуговують певні когнітивні функції. Вогнищеві ушкодження викликають стійкі когнітивні порушення, типи

яких відносно нескладно зрозуміти на основі сучасних нейроанатомічних уявлень [1, 2]. У цьому відношенні викликають інтерес конкретні топологічні особливості структурних перебудов різних відділів головного мозку (ГМ), які відбуваються протягом віддаленого посттравматичного

періоду і пов'язані з характером нейрокогнітивних розладів.

Після ЧМТ запальна реакція, токсичність глутамату та інших медіаторів, утворення вільних радикалів, іонний дисбаланс і активація апоптотичних процесів спричиняють масовану вторинну загибель нейронів, тим часом призводячи до набряку мозку, пошкодження аксонів і аноксії, деструкції гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ), посилення запалення, окислювального стресу та нейродегенерації, що обумовлює поглиблення когнітивних порушень [3-5]. Основною причиною нейрокогнітивних порушень є пошкодження нервових клітин, проте також активуються астроцити, олігодендроцити та мікроглія [6-9]. Ексайтотоксичні пошкодження призводять до порушення когнітивних функцій (збудження, швидкості обробки інформації, уваги, пам'яті тощо), які реалізуються за участі уражених ділянок мозку [10, 11]. З мірою того, як гострий нейромедіаторний дисбаланс поступово редукується або трансформується, довготривалий дефіцит розвивається в церебральних холінергічних системах і, можливо, також у катехоламінергічних структурах, що пролонгує або поглиблює порушення когнітивних функцій. Повідомляється також, що існує тісний зв'язок між нейродеструктивними процесами, когнітивними порушеннями та синаптичною передачею [12-15].

Таким чином, дотепер уявлення про взаємозв'язок між послідовністю патогенетичних механізмів травматичного ушкодження головного мозку і характером когнітивних порушень після ЧМТ залишаються фрагментарними. Наразі суперечливими є відомості про динаміку віддалених посттравматичних змін міжклітинних взаємодій у різних відділах ГМ. Потребують суттєвих уточнень відомості про чутливість різних нейронів і клітин нейроглії до травми та їх здатність до відновлення в залежності від локалізації ушкоджень та характеру перебудов гемомікроциркуляції в посттравматичному періоді.

Мета

Метою дослідження було визначення тканинних і клітинних посттравматичних змін структури кори зубчастої звивини головного мозку щурів з різними нейрокогнітивними розладами у різні терміни після тяжкої черепно-мозкової травми.

Матеріали та методи

Для моделювання ТЧМТ у дорослих нелінійних щурів-самців (віком від 4 до 6 міс) з вагою 300-400 г застосовували «модель ударного прискорення» [16, 17]. Перед моделюванням ТЧМТ, а також через 10, 20 і 40 діб після нього щурам проводили комплексне загальне та неврологічне обстеження [18]. За результатами неврологічних тестів щури були розподілені на три групи: 1) перша – тварини після ЧМТ з нейрокогнітивними розладами і порушеннями пам'яті; 1) друга – тварини

після ЧМТ з нейрокогнітивними розладами без порушень пам'яті; 3) група порівняння – тварини після ЧМТ без нейрокогнітивних розладів. Контрольну групу складали інтактні щури віком $4,8 \pm 0,6$ міс з вагою 347 ± 28 г.

Всі дослідження з лабораторними тваринами проводили із дотриманням положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), Ванкуверської декларації про проведення дослідів на тваринах, Постанови Першого Національного конгресу з біоетики (Київ, 2001), Положення з біоетики МОЗ України від 1 листопада 2000 р. № 281, Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3446-IV від 21 лютого 2003 р. 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 [19, 20].

Для морфологічного дослідження великий мозок фіксували протягом 24 годин у 10%-му розчині забуференого формаліну. Після фіксації мозок розрізали у фронтальній площині на часточки на рівні лімбічної частки з подальшим виготовленням парапластових блоків. Гістологічні зрізи завтовшки 5-7 мкм із забарвленням їх за Нісслем (тіоніном із додаванням крезилвіолету) або імпрегнацією сріблом [21, 22] вивчали за допомогою світлооптичного мікроскопа AxioSkope A1 («Carl Zeiss», Німеччина).

Імуногістохімічне дослідження з використанням первинних антитіл (β -tubulin, Synaptophysin, GAP43, NCAM1, N-cadherin, GFAP – «Thermo Scientific», USA) виконували у відповідності до протоколу, який містив наступні етапи. Фіксовані на предметних скельцях гістологічні зрізи демаскувались упродовж 20 хвилин у мікрохвильовій печі при $+100^{\circ}\text{C}$ у цитратному буфері (pH 6,0). Для оцінки специфічності імуногістохімічного забарвлення проводили контрольні реакції. На наступному етапі із залученням системи візуалізації Lab Visison Quanto («Thermo Scientific», USA) проводили обробку скелець та препаратів мозку з кожним реагентом упродовж 10 хвилин з проміжним промиванням у Трис-буферному розчині. В якості хромогена використовували 3,3'-Diaminobenzidine («DakoCytomation», Данія). Для диференціювання кортикальних структур зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра відповідно до загальних стандартів [23, 24].

Проводили фотофіксацію досліджуваних ділянок зубчастої кори за допомогою цифрової фотокамери AxioCam ERc 5s («Carl Zeiss», Німеччина). Обробку отриманих мікрофотографій проводили за допомогою програмного забезпечення AxioVs40 V 4.6.3.0 («Carl Zeiss Imaging Solutions

GmbH», Німеччина). Проводили підрахунок чисельної щільності нейронів, середнього діаметра перикаріона пірамідних нейронів, чисельної щільності макрогліоцитів, мікрогліоцитів і гемокapілярів кори з використанням програмного пакету ImageJ 1,47v [25].

Варіаційно-статистична обробка отриманих результатів проводилась з урахуванням критерію t Стюдента за стандартними процедурами [26]. При проведенні статистичної обробки отриманих квантифікованих результатів усі необхідні розрахунки виконували в оболонці електронної таблиці Excel при використанні відповідних формул і з використанням ліцензійного програмного пакету Statistica v6.1 (Statsoft Inc., USA) (серійний номер AGAR909E415822FA).

Результати та їх обговорення

При морфологічному дослідженні зубчастої фасції гіпокампа ГМ щурів всіх експериментальних груп виявлялась типова тришарова будова кори, проте ознаки її дезорганізації мали неоднаковий ступінь у залежності від характеру нейрокогнітивного дефіциту. У тварин першої експериментальної групи через 10 діб після нанесення ТЧМТ спостерігались численні ушкодження клітинного складу сірої речовини, а також характерні нейродегенеративні та деструктивні зміни. В багатьох ділянках визначались зони деформації гранулярного і молекулярного шарів зубчастої звивини із заповненням їх дрібними осередками астроцитарного гліозу або розповсюдженням зовнішнього поліморфного хілусу на всю товщу кори. Визначалося нерівномірне стоншення кори з утворенням ділянок дегенерації сірої речовини до товщини 360-420 мкм. Спостерігались ознаки дифузного міжклітинного та периваскулярного набряку, ушкодження мікросудин, масованої клітинної загибелі нейронів, варіативні дистрофічні зміни зернистих нейронів. Через 20 і 40 діб посттравматичного періоду ступінь деформації цитоархітекtonіки в даній групі тварин не змінювався або в окремих спостереженнях навіть зростав, що свідчило про незворотній характер патоморфозу змін зубчастої фасції гіпокампа.

У тварин другої експериментальної групи через 10 діб після травми триламінарна структура сірої речовини зберігалася на всій протяжності зубчастої фасції гіпокампа. Зони деформації шарів кори та осередки астроцитарного гліозу зустрічались в обмеженій кількості і мали відносно невеликі розміри. Стоншення кори варіювало у межах від 540 мкм до 660 мкм. Спостерігались ознаки помірного набряку з ушкодженням гемокapілярів і дегенеративні зміни різних типів нейронів. Через 20 і 40 діб посттравматичного періоду цитоархітекtonіка кори в даній групі тварин не змінювалась і відповідала типовій тришаровій будові, ознаки нейрозапалення помітно зменшувались.

У тварин групи порівняння через 10 діб після ТЧМТ патоморфологічні зміни зубчастої фасції

гіпокампа суттєво поступалися за ступенем вираженості тим ушкодженням, які спостерігались у тварин з нейрокогнітивними розладами. Типова тришарова структура кори спостерігалася по всій її протяжності, товщина становила 690-750 мкм і була відносно рівномірною, осередки астроцитарного гліозу виявлялись лише в поодиноких випадках, прояви нейрозапалення та нейродегенерації редукувались протягом досліджуваного терміну посттравматичного періоду.

При аналізі процесів загибелі нейронів зубчастої кори після нанесення ТЧМТ спостерігався інтенсивний апоптоз зернистих нейронів у тварин з нейрокогнітивним дефіцитом через 10 діб експериментую. Через 20 і 40 діб після травми у тварин першої групи апоптотичний процес значно посилювався, у той час як у тварин другої групи частота апоптозу суттєво зменшувалась. У щурів групи порівняння помірна частота апоптотичної загибелі нейронів спостерігалась через 10 діб після ТЧМТ і в подальшому ставала значно менш вираженою. Некротично змінені нейрони виявлялись в окремих спостереженнях у першій експериментальній групі через 10 діб після травми, переважно поблизу дрібних осередків гліозу в зовнішньому шарі кори зубчастої звивини. В другій групі тварин і в групі порівняння некротичні зміни не спостерігались на жодному з досліджуваних термінів. Прояви аутофагії зернистих нейронів зустрічались в поодиноких спостереженнях в усіх групах щурів; їх частота не залежала від терміну після нанесення травми.

Морфометричний підрахунок чисельної щільності нейронів всіх типів за допомогою імуногістохімічного визначення експресії β -тубуліну, який використаний для ідентифікації мікротрубочок нейронів, показав різке зменшення загального вмісту нейронів у зубчастій фасції гіпокампа щурів першої і другої груп через 10 діб після травми – на 42,1% ($p < 0,05$) і 41,4% відповідно ($p < 0,05$), в той час як у групі порівняння параметр зменшувався у помірному ступені – на 21,5% ($p < 0,05$). При цьому у першій і другій групах тварин чисельна щільність нейронів коливалась в обмеженому діапазоні на всіх термінах експерименту та статистично вагомо поступалася показнику групи порівняння (табл. 1). Через 20 і 40 діб після ТЧМТ у щурів без нейрокогнітивних розладів спостерігалось поступове ущільнення нейронів і наближення до нормальних значень за рахунок обмеження апоптотичного процесу і редукції набряку та інших тканинних ознак нейрозапалення. У тварин першої експериментальної групи у віддаленому посттравматичному періоді відбувалось зниження чисельної щільності нейронів відносно показника інтактних тварин: через 20 діб після травми – на 50,2% ($p < 0,05$), через 40 діб – на 57,1% ($p < 0,05$). Така негативна динаміка вмісту нейронів віддзеркалювала поглиблення апоптотичного процесу в зубчастій корі у тварин даної

групи протягом досліджуваного терміну експерименту. У тварин другої групи чисельна щільність нейронів зубчастої звивини через 20 діб після травми поступалася нормальному рівню на 37,2% (р

< 0,05), через 40 діб – на 35,6% (р < 0,05), істотно не змінюючись у порівнянні з терміном 10 діб після травми, що свідчило про обмеження апоптозу протягом посттравматичного періоду.

Таблиця 1

Чисельна щільність нейроцитів зубчастої звивини гіпокампа, $\times 10^2 \text{ мм}^{-2}$ (М $\pm$ m)

Термін після травми	Групи дослідження		
	Перша	Друга	Порівняння
10 діб	15,1 $\pm$ 1,7 * **	15,3 $\pm$ 1,5 * **	20,5 $\pm$ 2,2 *
20 діб	13,0 $\pm$ 1,9 * **	16,4 $\pm$ 1,7 * **	24,7 $\pm$ 3,0
40 діб	11,2 $\pm$ 1,6 * **	16,8 $\pm$ 1,9 * **	24,6 $\pm$ 2,5

Примітка: * – р < 0,05 при порівнянні зі значенням у групі інтактних щурів (26,1 $\pm$ 2,9 $\times 10^2 \text{ мм}^{-2}$); ** – р < 0,05 при порівнянні з відповідним за терміном значенням у групі порівняння.

Імуногістохімічний аналіз впливу ТЧМТ на синаптичний апарат нейронів зубчастої звивини за допомогою моноклональних антитіл до синаптофізину (р38) виявив різке зниження експресії даного маркера у всіх експериментальних групах тварин через 10 діб після травми у порівнянні з інтактними тваринами. Через 20 і 40 діб після ТЧМТ низька щільність р38-позитивних структур у зубчастій корі щурів з нейрокогнітивними розладами і порушеннями пам'яті суттєво не змінювалась, залишаючись на мінімальному рівні. У тварин другої експериментальної групи і в групі порівняння через 20 діб після травми відзначалось збільшення експресії синаптофізину, через 40 діб у переважній більшості об'єму зубчастої звивини у даних експериментальних шрупах відбувалось відновлення щільності р38-позитивних синапсів.

Дослідження синаптичного маркера GAD43, який віддзеркалює регенераторну активність аксонів, показало лише фонове імуногістохімічне забарвлення даного маркера у зубчастій фасції як у інтактних щурів, так і в групах тварин з нейрокогнітивними розладами через 10 діб після травми. Через 20 і 40 діб експерименту у тварин першої групи і групи порівняння в зубчастій корі ГМ спостерігалась активація експресії GAD43, що свідчило про ремоделювання пресинаптичних терміналей аксонів даної локалізації. Найбільшою мірою зростання експресії GAD43 виявлялося у складі поліморфного хілуса, що містить дендрити гранулярних нейронів зубчастої кори і перфорантний провідний шлях від енторинальної кори до ділянки СА1 гіпокампа.

З використанням маркерів CD56 і N-кадгерину було встановлено, що інтенсивність імуногістохімічної мітки на цитолемі нейроцитів зубчастої фасції гіпокампа була подібною до характеру експресії цих маркерів на зовнішній мембрані інтактних нейронів. Загальна інтенсивність специфічного забарвлення зрізів була суттєво меншою після травматичного ушкодження ГМ, ніж у інтактних щурів, за рахунок активного апоптотичного процесу, який відбувався з різною інтенсивністю

в досліджуваних експериментальних групах. Через 20 діб експресія маркерів у зубчастій звивині ГМ щурів першої групи була нижчою, ніж на попередньому терміні експерименту, і до 40-ї доби продовжувала зменшуватись. Розподіл CD56- і N-кадгерин-позитивних нейроцитів у щурів другої групи і групи порівняння не змінювався протягом 40 діб посттравматичного періоду.

Морфологічний аналіз гліального компонента кори зубчастої фасції гіпокампа показав, що через 10 діб після травми у тварин всіх експериментальних груп спостерігалось значне накопичення астроцитів у перивазальних просторах поряд з осередками набряку. У проміжках між мікросудинами візуалізувались ділянки нейропіля, в яких щільність розташування волокнистих астроцитів була помітно нижчою, ніж в аналогічних ділянках кори інтактних щурів. У цих ділянках виявлялись відокремлені одна від одної клітини з довгими відростками, які не контактували із сусідніми астроцитами. Характерними для мозаїчного міжсудинного астроцитарного дефіциту у складі зубчастої кори були прояви масованої аутофагії гліоцитів. Через 20 і 40 діб посттравматичного періоду у тварин першої і другої груп дослідження осередки гліального дефіциту з поширенням аутофагії астроцитів зберігалися, у той час як у щурів групи порівняння подібні осередки з аутофагією зустрічались лише в поодиноких випадках. Важливо зазначити, що у віддаленому посттравматичному періоді у тварин другої групи, на відміну від першої групи, спостерігалось обмеження периваскулярної гіперплазії астроцитів.

Морфометричний аналіз щільності макрогліоцитів за допомогою мітки гліального маркера GFAP показав, що через 10 діб від початку експерименту чисельна щільність клітин у зубчастій корі поступалась нормальному значенню в першій групі тварин на 26,1% (р < 0,05), у другій – на 22,9% (р < 0,05), у групі порівняння – на 21,0% (р < 0,05). Через 20 діб після нанесеної травми у тварин першої експериментальної групи ступінь астроцитарного дефіциту зростав; у тварин другої

групи – не змінювався; у тварин групи порівняння – ставав менш виразним у порівнянні з попереднім терміном дослідження (табл. 2). Через 40 діб після ТЧМТ у тварин першої групи параметр поступався показнику інтактних тварин на 39,5% ($p < 0,05$), показнику групи порівняння – на 37,9% (p

$< 0,05$). У цей термін у тварин другої групи чисельна щільність макрогліоцитів зростала відносно попереднього терміну спостережень, поступаючи показнику інтактних тварин на 17,8% ($p < 0,05$) і не відрізняючись суттєво від значення у групі порівняння.

Таблиця 2

Чисельна щільність макрогліоцитів зубчастої звивини гіпокампа, $\times 10^2 \text{ мм}^{-2}$ ($M \pm m$)

Термін після травми	Групи дослідження		
	Перша	Друга	Порівняння
10 діб	116 $\pm$ 15 *	121 $\pm$ 15 *	124 $\pm$ 16 *
20 діб	103 $\pm$ 11 * **	129 $\pm$ 12 *	139 $\pm$ 11
40 діб	95 $\pm$ 14 * **	145 $\pm$ 13	153 $\pm$ 19

Примітка: * – $p < 0,05$ при порівнянні зі значенням у групі інтактних щурів ($157 \pm 16 \times 10^2 \text{ мм}^{-2}$); ** – $p < 0,05$ при порівнянні з відповідним за терміном значенням у групі порівняння.

Після нанесення ТЧМТ у тварин всіх досліджуваних груп морфологічні зміни мікрогліоцитів у трьох шарах зубчастої фасції гіпокампа характеризувались виразною гетероморфністю. Зокрема, переважна більшість мікрогліоцитів мала сплюснену форму та складно-розгалужені відростки, які занурювались між нейронами або в глибину нейропіля. У тварин з нейрокогнітивним дефіцитом, на відміну від щурів групи порівняння, поблизу зернистих нейронів периваскулярно розташовувались типові транзитні макрофаги та лімфоцити, що свідчило про збереження запального процесу та було пов'язано з елімінацією апоптотично змінених нейроцитів після травми.

Вивчення кровоносних мікросудин у складі зубчастої звивини показало, що у першій і другій групах тварин через 10 діб після ТЧМТ спостерігалась значна кількість ушкоджених артерій і гемокапілярів з ознаками стази, інколи з частково або повністю облітерованим просвітом. За допомогою маркера GFAP на зовнішній поверхні ушкоджених капілярів візуалізувались нашарування протоплазматичних астроцитів у вигляді щільних муфт. Також виявлялися мікросудини з ознаками внутрішньосудинного мікротромбозу в оточенні дрібних осередків вторинних крововиливів, з плазматичним просоченням гемокапілярної стінки та периваскулярного простору. Зустрічались поодинокі гемокапіляри з некрозом, деструкцією або фрагментацією ендотеліальної стінки. Частина гемокапілярів або ендотеліальних тяжів не утворювали характерних для ГЕБ сполучень з астроцитами. Крім гемокапілярів з ушкодженою структурою спостерігалось значне зростання кількості новоутворених гемокапілярів з типовою будовою ендотеліальної стінки і звичайним кровонаповненням, у супроводі астроцитарної глії і зі сформованим ГЕБ.

Через 20 діб після ТЧМТ у зубчастій корі ГМ тварин з нейрокогнітивними розладами зберігалася значна кількість ушкоджених мікросудин,

що вказувало на наявність тривалого деструктивного процесу. Через 40 діб після нанесення травми зберігалась помірна кількість патологічно змінених мікросудин з нашаруваннями астроцитів на зовнішній поверхні; зустрічались поодинокі фрагментовані гемокапіляри та дрібні осередки діapedезних крововиливів. На відміну від першої групи тварин, у другій експериментальній групі протягом віддаленого посттравматичного періоду спостерігались численні новоутворені гемокапіляри з повноцінними структурами ГЕБ, а також ендотеліальні угруповання, що вказувало на активацію неоваскулогенезу. На відміну від першої і другої груп, у тварин групи порівняння ушкоджені мікросудини в оточенні астроцитарних конгломератів зустрічались у невеликій кількості. Переважна більшість гемокапілярів мала інтактну структуру стінки й утворювала типовий за будовою ГЕБ. Через 20 і 40 діб після нанесення травми у тварин без нейрокогнітивного дефіциту кількість ушкоджених гемокапілярів помітно зменшувалась відносно попереднього терміну спостережень. Найбільша інтенсивність неоваскулогенезу у зубчастій корі ГМ у тварин групи порівняння спостерігалась через 10 діб після травми; через 20 і 40 діб експерименту незрілих новоутворених гемокапілярів ставало помітно менше.

Висновки

1. Нейрокогнітивні розлади з порушеннями пам'яті у віддаленому періоді після ТЧМТ супроводжуються поглибленням дегенерації нейроцитів і хронізацією нейрозапалення з активацією механізмів апоптозу нейронів і аутофагії гліоцитів, що призводить до незворотної деформації цитоархітектоніки зубчастої звивини.

2. Прогресування нейродегенерації супроводжується активацією мікроглії і призводить до дезінтеграції та міграції макрогліоцитів з формуванням незворотного мозаїчного астроцитарного дефіциту і утворенням гліальних нашарувань у вигляді муфт навколо гемокапілярів.

3. Збереження функції пам'яті у тварин з нейрокогнітивними розладами пов'язано з обмеженням вторинної загибелі нейроцитів і стабілізацією адгезивних властивостей астроглії зубчастої кори, що запобігає утворенню астроцитарних муфт навколо новоутворених гемокапілярів при збереженні цілісності ГЕБ.

4. У тварин без нейрокогнітивних розладів у віддаленому посттравматичному періоді в зубчастій корі компенсаторні механізми реалізуються через ефективний неоваскулогенез, обмеження периваскулярної гіперплазії астроцитів і нейрозапалення, що запобігає загибелі нейроцитів і призводить до активації синаптичного ремоделювання від енторинальної кори до ділянки CA1 і від зубчастої звивини до ділянки CA3 гіпокампа через 40 днів після травми.

Перспективи подальших розробок полягають у з'ясуванні взаємозв'язку між патоморфологічними механізмами перетворень при ТУГМ і характером когнітивних порушень після ЧМТ. Актуальним також є дослідження чутливості нейронів і гліоцитів до травми та їх здатності до відновлення в залежності від локалізації ушкоджень та характеру перебудов гемомікроциркуляції в посттравматичному періоді.

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

Робота виконана в рамках науково-дослідної теми «Оптимізація діагностики та лікування гострих церебральних пошкоджень» (номер державної реєстрації 0122U000086).

Літературні джерела References

1. Nie L, He J, Wang J, Wang R, Huang L, Jia L, Kim YT, Bhawal UK, Fan X, Zille M, Jiang C, Chen X, Wang J. Environmental Enrichment for Stroke and Traumatic Brain Injury: Mechanisms and Translational Implications. *Compr Physiol*. 2023;14(1):5291-323. doi: 10.1002/cphy.c230007
2. Wu M, Wang C, Gong Y, Huang Y, Jiang L, Zhang M, Gao R, Dang B. Potential mechanism of TMEM2/CD44 in endoplasmic reticulum stress-induced neuronal apoptosis in a rat model of traumatic brain injury. *Int J Mol Med*. 2023;52(6):119. doi: 10.3892/ijmm.2023.5322
3. Chary K, Nissi MJ, Nykänen O, Manninen E, Rey RI, Shmueli K, Sierra A, Gröhn O. Quantitative susceptibility mapping of the rat brain after traumatic brain injury. *NMR Biomed*. 2021;34(2):e4438. doi: 10.1002/nbm.4438
4. Zohar O, Lavy R, Zi X, Nelson TJ, Hongpaisan J, Pick CG, Alkon DL. PKC activator therapeutic for mild traumatic brain injury in mice. *Neurobiol Dis* 2011;41(2):329-337. DOI: 10.1016/j.nbd.2010.10.001
5. Wu M, Wang C, Gong Y, Huang Y, Jiang L, Zhang M, Gao R, Dang B. Potential mechanism of TMEM2/CD44 in endoplasmic reticulum stress-induced neuronal apoptosis in a rat model of traumatic brain injury. *Int J Mol Med*. 2023;52(6):119. doi: 10.3892/ijmm.2023.5322.
6. Di Giovanni S, Movsesyan V, Ahmed F. Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduces glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(23):8333-8338. DOI: 10.1073/pnas.0500989102
7. Jones NC, Cardamone L, Williams JP, Salzberg MR, Myers D, O'Brien TJ. Experimental traumatic brain injury induces a pervasive hyperanxious phenotype in rats. *J Neurotrauma*. 2008;25(11):1367-1374. DOI: 10.1089/neu.2008.0641
8. Bachstetter AD, Zhou Z, Rowe RK. MW151 Inhibited IL-1 β Levels after Traumatic Brain Injury with No Effect on Microglia Physiological Responses. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149451. DOI: 10.1371/journal.pone.0149451
9. Shaw BC, Anders VR, Tinkey RA, Habeau ML, Brock OD, Frostino BJ, Williams JL. Immunity impacts cognitive deficits across neurological disorders. *J Neurochem*. 2023;10.1111/jnc.15999. doi: 10.1111/jnc.15999.
10. Macks C, Jeong D, Bae S, Webb K, Lee JS. Dexamethasone-Loaded Hydrogels Improve Motor and Cognitive Functions in a Rat Mild Traumatic Brain Injury Model. *Int J Mol Sci*. 2022;23(19):11153. doi: 10.3390/ijms231911153.
11. Yang Z, Zhu T, Pompilus M, Fu Y, Zhu J, Arjona K, Arja RD, Grudny MM, Plant HD, Bose P, Wang KK, Febo M. Compensatory functional connectome changes in a rat model of traumatic brain injury. *Brain Commun*. 2021;3(4):244. doi: 10.1093/braincomms/fcab244.
12. Griffiths DR, Law LM, Young C, Fuentes A, Truran S, Karamanova N, Bell LC, Turner G, Emerson H, Mastroeni D, Gonzales RJ, Reaven PD, Lifshitz J. Chronic Cognitive and Cerebrovascular Function after Mild Traumatic Brain Injury in Rats. *J Neurotrauma*. 2022;39(19-20):1429-1441. doi: 10.1089/neu.2022.0015.
13. Gu YL, Zhang LW, Ma N. Cognitive improvement of mice induced by exercise prior to traumatic brain injury is associated with cytochrome c oxidase. *Neurosci Lett*. 2014;570:86-91. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.04.004
14. Hui Y, Zhao H, Shi L, Zhang H. Traumatic

Brain Injury-Mediated Neuroinflammation and Neurological Deficits are Improved by 8-Methoxypsoralen Through Modulating PPAR γ /NF- κ B Pathway. *Neurochem Res.* 2023;48(2):625-640. doi: 10.1007/s11064-022-03788-6.

15. Song H, Chen C, Kelley B, Tomasevich A, Lee H, Dolle JP, Cheng J, Garcia B, Meaney DF, Smith DH. Traumatic brain injury recapitulates developmental changes of axons. *Prog Neurobiol.* 2022;217:102332. doi: 10.1016/j.pneurobio.2022.102332.

16. Foda MA, Marmarou A. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg.* 1994;80(2):301-313. doi:10.3171/jns.1994.80.2.0301

17. Marmarou AI, Foda MA, van den Brink W. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg.* 1994;80(2):291-300. doi:10.3171/jns.1994.80.2.0291

18. Bureš J, Burešová O, Huston JP. Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior. Second edition. Amsterdam – New York : Elsevier science publishers BV; 2016. 326 p.

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

20. 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.

21. 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>

22. 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>

23. 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

24. Nguyen T. *Immunohistochemistry: A Technical Guide to Current Practices.* Cambridge : Cambridge University Press; 2022. 272 p.

25. Poslavska, OV. [Determination of linear dimensions and areas of individual morphological objects on photomicrographs using the ImageJ program]. *Morphologia.* 2016;10(3):377-81.

26. Hruziova TS, Lekhan VM, Ohniev VA, Haliienko LI, Kriachkova LV, Palamar BI. [Biostatistics]. Vinnytsia : New Book; 2020. 384 p.

Мізякіна К.В. Кількісна морфологічна характеристика змін зубчастої фасції гіпокампа у щурів з різними нейрокогнітивними розладами після тяжкої черепно-мозкової травми.

РЕФЕРАТ. Актуальність. У вирішенні численних питань, пов'язаних із лікуванням та реабілітацією пацієнтів з травматичним ушкодженням головного мозку, інтерес представляє вивчення патоморфологічних механізмів, які визначають характер формування та динаміки нейрокогнітивних порушень у різні терміни після травми. **Метою** дослідження було визначення тканинних і клітинних посттравматичних змін структури кори зубчастої звивини головного мозку щурів з різними нейрокогнітивними розладами у різні терміни після тяжкої ЧМТ. **Методи.** Для відтворення тяжкої черепно-мозкової травми у щурів застосовували «модель ударного прискорення». За результатами неврологічних тестів щури були розподілені на три групи: 1) перша – тварини після травми з нейрокогнітивними розладами і порушеннями пам'яті; 1) друга – тварини після травми з нейрокогнітивними розладами без порушень пам'яті; 3) група порівняння – тварини після травми без нейрокогнітивних розладів. Проводили гістологічне, морфометричне та імуногістохімічне дослідження зубчастої звивини з використанням маркерів β -tubulin, Synaptophysin, GAP43, NCAM1, N-cadherin, GFAP. **Результати та підсумок.** Нейрокогнітивні розлади з порушеннями пам'яті у віддаленому періоді після тяжкої черепно-мозкової травми супроводжуються поглибленням дегенерації нейронів і хронізацією нейрозапалення з активацією механізмів апоптозу нейронів і аутофагії гліоцитів, що призводить до незворотної деформації цитоархітекτονіки зубчастої звивини. Прогресування нейродегенерації супроводжується активацією мікроглії і призводить до дезінтеграції та міграції макрогліоцитів з формуванням незворотного мозаїчного астроцитарного дефіциту і утворенням гліальних нашарувань у вигляді муфт навколо гемокapілярів. Збереження функції пам'яті у тварин з нейрокогнітивними розладами пов'язано з обмеженням вторинної загибелі нейронів і стабілізацією адгезивних властивостей астроглії зубчастої кори, що запобігає утворенню астроцитарних муфт навколо новоутворених гемокapілярів при збереженні цілісності гемато-енцефалічного бар'єру. У тварин без нейрокогнітивних розладів у віддаленому посттравматичному періоді в зубчастій корі компенсаторні механізми реалізуються через ефективний неоваскулогенез, обмеження периваскулярної гіперплазії астроцитів і нейрозапалення, що запобігає загибелі нейронів і призводить до активації синаптичного ремоделювання від енториальної кори до ділянки CA1 і від зубчастої звивини до ділянки CA3 гіпокампа через 40 діб після травми.

Ключові слова: черепно-мозкова травма, щури, нейрокогнітивні розлади, зубчаста фасція гіпокампа, морфологія.

Є.А. Согомонян, І.В. Челпанова,
О.В. Смолькова, М.І. Серветник,
Л.В. Панкевич

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
Львів, Україна

Надійшла: 24.10.2024

Прийнята: 08.12.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.88-94>

УДК 611-018.088.1:547.963:611.651.1+616.441-008.61/.64

ВПЛИВ ДИСБАЛАНСУ ТИРОЇДНИХ ГОРМОНІВ НА ВУГЛЕВОДНІ ДЕТЕРМІНАНТИ ЯЄЧНИКІВ ТА ЕНДОМЕТРІЮ

Sogomonyan Ye.A. , Chelpanova I.V. , Smolkova O.V. , Servetnyk M.I. , Pankevych L.V.  Influence of imbalance of thyroid hormones on carbohydrate determinants of ovaries and endometry.

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine.

ABSTRACT. The relevance. The structures of the female reproductive system organs are rich in various classes of high molecular weight biopolymers containing a carbohydrate component. Carbohydrate determinants are among the first to be damaged during the development of pathological processes and therefore can serve as early and informative markers of damage to the female reproductive system organs, reproductive function in particular. Sufficiently sensitive and selective markers of carbohydrate determinants of biopolymers are lectins, the use of which as tools for studying the nature of changes in glycoconjugates of organs and tissues in normal conditions and in various forms of pathology continues to be an urgent task. **The aim:** in an experiment on rats to investigate the effect of hypo- and hyperthyroidism on the carbohydrate determinants of the ovaries and endometrium, using for this purpose a set of lectins of different carbohydrate specificity. **Methods.** The experiment was carried out on 65 sexually mature female white Wistar rats 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). Carbohydrate determinants of the structures of the endometrium and ovaries were studied using 20 lectins, including 15 conventional ones, as well as 5 new original preparations, purified from representatives of the subkingdom of basidiomycetes fungi. **Results.** The analysis of the results of the redistribution of lectin receptors against the background of hypo- and hyperthyroidism showed that hyperthyroidism is accompanied by a more pronounced effect on the carbohydrate determinants of ovarian structures compared to the hypothyroid state. However, the latter was characterized by pronounced leukocyte infiltration of the medulla of the ovary, and the most selective histochemical marker was the lectins PNA, SBA, and UDA. According to our research, yellow bodies that were formed in hyperthyroid animals had morphological signs of increased functional activity. In follicular cells, the lack of thyroid hormone resulted in a slight decrease in the number of UDA and PAFA lectin receptors and increased expression of SBA-reactive glycoconjugates in them. In the microstructures of the endometrium of rats with experimental hypothyroidism, in comparison with controls, a reduction of carbohydrate determinants with terminal DGal and DGalNAc residues was found in combination with the accumulation of glycopolymers with terminal LFuc residues. The group of hypothyroid animals was also characterized by an intense reaction of leukocytes with the majority of lectins. In the group of animals with hyperthyroidism, the reactivity of endometrial structures with the vast majority of used lectins increased. This was especially true of thickened and intensely positive collagen fibers. The results of lectin-histochemical studies of endometrial microstructures during the correction of hypothyroidism with replacement doses of thyroxine correlated well with general morphological data: massive leukocyte infiltration of the endometrial stroma decreased to control values when using 30 mg/kg, but not 1.6 mg/kg of thyroxine. The general morphological and lectin-histochemical changes of the endometrium in the case of thyroid hormone imbalance were more pronounced than the response to the modeling of these pathological conditions by ovarian structures. This was manifested, in particular, in increased leukocyte infiltration and increased collagenization of the endometrium.

Key words: hypothyroidism, hyperthyroidism, ovaries, uterus, lectins.

Citation:

Sogomonyan YeA, Chelpanova IV, Smolkova OV, Servetnyk MI, Pankevych LV. [Influence of imbalance of thyroid hormones on carbohydrate determinants of ovaries and endometry]. Morphologia. 2024;18(4):88-94. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.88-94>

 Sogomonyan Ye.A. 0000-0001-5339-8321;  Chelpanova I.V. 0000-0001-5215-814X;

 Smolkova O.V. 0000-0001-9474-7831;  Servetnyk M.I. 0000-0001-5774-7744;

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

✉ Sogomonyanlviv@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Аналіз доступної фахової літератури показав, що при наявності значної кількості клінічних спостережень стосовно негативного впливу дисфункції щитоподібної залози на жіночу репродуктивну систему недостатньо праць, присвячених експериментальному вивченню тонких патомеханізмів цього впливу [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. Зокрема, в літературі мало даних стосовно змін мікрорфології жіночих репродуктивних органів на тлі гіпо- та гіпертироїдизму. Практично відсутні публікації, присвячені дослідженню змін вуглеводних детермінант (рецепторів лектинів) органів жіночої репродуктивної системи під дією дисбалансу тироїдних гормонів [8, 9, 10]. Поряд із цим, численні публікації свідчать про важливу роль вуглеводовмісних біополімерів як у функціонуванні нормальних структур організму, так і їх залучення до механізмів розвитку різноманітних форм патології [11, 12, 13, 14, 15].

Структури органів жіночої репродуктивної системи багаті різноманітними класами високомолекулярних біополімерів, що містять вуглеводний компонент. Серед них розрізняють глікополімери змішаного складу – глікопротеїни, протеоглікани, гліколіпіди, та біополімери, молекули яких побудовані виключно з вуглеводних компонентів – гомоглікани (зокрема, глікоген), та гетероглікани (глікозаміноглікани). Глікокон'югатам належить виключно важлива роль у гістофізіології репродукції [11, 12, 13]. Вуглеводні детермінанти в числі перших пошкоджуються при розвитку патологічних процесів і тому можуть служити ранніми та інформативними маркерами ушкоджень органів жіночої статеві системи, репродуктивної функції зокрема [11, 13, 15, 16].

Серед структур яєчників глікопротеїнами та протеогліканами багата прозора зона овоцита, клітини гранульози фолікулів, лютеоцити жовтих тіл. Високим вмістом і різноманіттям глікополімерів характеризуються секреторні продукти

маткових залоз, клітини епітеліального вистелення порожнини матки. Олігосахаридним ланцюгам глікокон'югатів належить визначальна роль у забезпеченні видоспецифічності та моноспермності запліднення, адгезії та наступної інвазії бластоцисти в ендометрій [11, 13], тому вивчення змін глікому жіночих репродуктивних органів при тироїдній патології може становити значний інтерес як для теоретичної, так і клінічної медицини.

Достатньо чутливими та селективними маркерами вуглеводних детермінант біополімерів є лектини. Незважаючи на їх достатньо тривале застосування у різних ділянках гісто- та цитохімії [14, 16, 17, 18, 19], пошук і характеристика нових препаратів лектинів, розширення можливостей їх використання в якості інструментів дослідження характеру змін глікокон'югатів органів і тканин у нормі та при різних формах патології продовжує залишатися актуальним завданням.

Мета

В експерименті на щурах дослідити вплив гіпо- та гіпертироїдизму на вуглеводні детермінанти яєчників та ендометрію, використавши з цією метою набір лектинів різної вуглеводної специфічності. Порівняти якісний характер перерозподілу глікокон'югатів у яєчнику і матці при гіпо- та гіпертироїдизмі, а також ступінь ураження означених органів, зумовлених дисбалансом тироїдних гормонів.

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, гіпо- та гіпертироїдизм (по 15 тварин у групі), а також 2 групи з корекцією гіпотироїдизму (по 10 тварин у групі, табл. 1). Гіпотироїдний стан моделювали за допомогою мерказолілу ("Здоров'я", Харків) у добовій дозі 10 мг/кг; гіпертироїдизм викликали L-тироксином ("Фармак", Київ) у добовій дозі 100 мкг/кг маси тіла тварин.

Таблиця 1

Характеристика використаних у роботі груп тварин

Експериментальні групи тварин	Число щурів у групі
(I) Інтактні тварини (контроль)	15
(II) Щурі з модельованим гіпотироїдизмом (мерказоліл)	15
(III) Щурі з модельованим гіпертироїдизмом (тироксин)	15
(IV) Гіпотироїдизм з корекцією тироксином (1,6 мкг/кг)	10
(V) Гіпотироїдизм з корекцією тироксином (30 мкг/кг)	10
Разом	65 тварин

Корекцію гіпотироїдизму проводили тироксином у так званій фізіологічній дозі, яку вводили одночасно із мерказолілом. У першій групі з корекцією гіпотироїдизму ця доза тироксину становила 1,6 мкг/кг маси тіла. Як виявилось, така доза тироксину була недостатньою для компенсації гіпотироїдизму у щурів, тому була утворена друга

група з корекцією, у якій замісна доза тироксину дорівнювала 30 мкг/кг маси тіла тварин.

В усіх дослідних групах мерказоліл і тироксин у вигляді порошку додавали в їжу щоденно протягом двох тижнів, внаслідок чого досягався стан стійкого гіпо- або гіпертироїдизму.

Тварин піддавали евтаназії передозуванням

діетилового ефіру. Тварин піддавали евтаназії на стадії дієструс передозуванням діетилового ефіру. Під час розтину у тварин забирали яєчники, матку та щитоподібні залози (з обох боків). Яєчники та матку фіксували в 4% нейтральному формаліні (яєчники – цілими, в матці відсікали середню частину рогів). Вуглеводні детермінанти структур ендометрію та яєчників досліджували з використанням 20 лектинів за стандартною методикою [20, 21], у тому числі 15 конвенціональних, а також 5 нових оригінальних препаратів, очищених з представників підцарства грибів-базидіоміцетів.

Комітетом з біоетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол №3 від 11 березня 2020р.) встановлено, що усі тварини знаходились в умовах віварію і процедури, що стосувалися 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» (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 [22, 23].

Результати та їх обговорення

Аналіз результатів перерозподілу рецепторів лектинів на тлі гіпо- та гіпертироїдизму показав, що гіпертироїдизм супроводжується більш вираженим впливом на вуглеводні детермінанти структур яєчника порівняно з гіпотироїдним станом. Разом із тим, останній характеризувався вираженою лейкоцитарною інфільтрацією мозкової речовини яєчника, найбільш селективним гістохімічним маркером при цьому виявилися лектини PNA, SBA, та UDA. Отримані нами дані узгоджуються з описаною в літературі підвищеною експресією різними видами лейкоцитів термінальних залишків DGal та DGlcNAc [14, 15, 16, 17].

Слід зазначити, що за даними наших досліджень, жовті тіла, які утворювалися у гіпертироїдних тварин, мали морфологічні ознаки посиленої функціональної активності, до яких можна віднести різку гіперемію, наявність великих клітин із крупними ядрами, посилену проліферацію лютеоцитів. До таких ознак, можливо, слід зарахувати також і виявлене нами зростання реактивності лютеоцитів із переважною більшістю використаних лектинів. Ідентифіковане в групі гіпертироїдних тварин збільшення кількості рецепторів лектину NPA в центрі жовтих тіл, в ділянці рубця, можна пояснити посиленням

апоптозу лютеоцитів, оскільки нещодавно описана здатність цього лектину служити маркером апоптозу [14, 16]. При цьому, однак, зазначимо, що подібне підвищення реактивності центральної частини жовтих тіл при гіпертироїдизмі було задокументовано і з використанням низки інших лектинів, а саме, Con A, LCA, SBA, WGA. Виявлений феномен ще потребує додаткового дослідження та гістофізіологічної інтерпретації.

У фолікулярних клітинах наслідком нестачі тироїдного гормону було деяке зменшення кількості рецепторів лектинів UDA та PAFA і посилення експресії у них SBA-реактивних глікокон'югатів (рис.1, рис.2).

Гіпертироїдизм супроводжувався збільшенням у структурах фолікулів вмісту рецепторів лектинів UDA, MPFA та LPFA і редукуванням вмісту рецепторів лектинів LTFA та PAFA.

У мікроструктурах ендометрію щурів із експериментальним гіпотироїдизмом у порівнянні з контролем було виявлено редукцію вуглеводних детермінант з термінальними залишками DGal та DGlcNAc (рецепторів лектинів PNA, SBA, HPA, LPFA, PAFA та LTFA) у поєднанні з нагромадженням глікополімерів із термінальними залишками LFuc (рецепторів лектинів LABA, LLA та PFA). Водночас, реакція з лектином LASA, який взаємодіє не лише з залишками LFuc, але й DGal, лишалася у гіпотироїдних тварин на контрольному рівні. Очевидно, редукція детермінант DGal компенсувалася підвищеною експресією залишків LFuc.

Стосовно манозогліканів були отримані дані щодо зростання реактивності структур ендометрію з лектином NPA при одночасній редукції їх реактивності з лектином MPFA. Це може бути обумовлено різною конфігурацією олігосахаридних ланцюгів, до яких спрямована афінність означених лектинів. Для групи гіпотироїдних тварин характерною була також інтенсивна реакція лейкоцитів з переважною більшістю лектинів навіть за умов одночасного зниження реактивності усіх інших структур (зокрема, з лектинами WGA, HPA, MPFA, PAFA, LTFA) (рис.3).

У групі тварин із гіпертироїдизмом реактивність структур ендометрію з переважною більшістю використаних лектинів зростала. Особливо це стосувалося потовщених та інтенсивно позитивних колагенових волокон, пучки яких були локалізовані переважно на периферії ендометрію, у його антимезометральній зоні. При цьому найбільш специфічними маркерами колагенових волокон виявилися лектини NPA, UDA, SNA, SBA, LASA, MPFA, LPFA, LTFA та PAFA.

Правдоподібно, причиною означеного феномену може бути порушення процесів фізіологічної деградації колагену, індуковане гіпертироїдизмом. Отримані нами дані добре узгоджуються з результатами S.Saha зі співавт. [24, 25]

стосовно порушень біосинтезу колагену і його посилену деградацію в яєчниках щурів за умов гіпотирозидизму. Таким чином, ефект колагенізації строми ендометрію в гіпертироїдних тварин, виявлений на оглядових препаратах, у результаті лектиногістохімічних досліджень отримав підтвердження і доповнення, яке стосується зміни вуглеводного складу волокнистих структур під впливом підвищеного рівня тироксину в організмі.

Отримані нами результати лектиногістохімічних досліджень мікроструктур ендометрію при корекції гіпотирозидизму замісними дозами тироксину добре корелювали із загально-морфологічними даними: масивна лейкоцитарна інфільтрація строми ендометрія зменшувалася до контрольних показників при застосуванні 30 мкг/кг, але не 1,6 мкг/кг тироксину. Нормалізувалася також експресія лектинових рецепторів як колагеновими волокнами, так і люменальними та залозистими епітеліоцитами. Разом із тим, використання лектинів PNA, SBA та HPA продемонструвало недостатність коригуючого впливу тироксину при експериментальному гіпотирозидизмі, оскільки нормалізації експресії детермінант DGal та DGalNAc, на відміну від сіалогліканів, протягом часу проведення експерименту досягти не вдалося.

Якщо порівняти отримані нами дані щодо змін реактивності з лектинами структурних компонентів ендометрію та яєчників під впливом тирозидної патології, можна стверджувати що в яєчниках та ендометрії зміни при обох видах патології були різноспрямованими.

Виявлені нами закономірності можна пояснити розбалансуванням кінцевих етапів глікозування вуглеводовмісних біополімерів на фоні тирозидної патології. Разом із тим, слід зауважити, що зміни олігосахаридних ланцюгів в органах жіночої репродуктивної системи під впливом дисбалансу тирозидних гормонів носили складний і різноспрямований характер. Серед імовірних причин виявленого нами накопичення сіалогліканів, а також глікополімерів з детермінантами DGal, DGalNAc та DGlcNAc можуть бути як сповільнення секреції, так і пригнічення їх фізіологічної деградації на тлі тирозидної патології.

Загальноморфологічні та лектиногістохімічні зміни ендометрію при дисбалансі тирозидних гормонів були виражені сильніше, ніж відповідь на моделювання цих патологічних станів структурами яєчників. Це проявлялося, зокрема, у посиленій лейкоцитарній інфільтрації та підвищеній колагенізації ендометрію. Правдоподібно, це обумовлено як впливом складних гормональних взаємозв'язків у системі гіпоталамус-гіпофіз-гонади, наявністю власної ендокринної активності яєчників, так і їх більшою захищеністю від впливу екзогенних чинників[26].

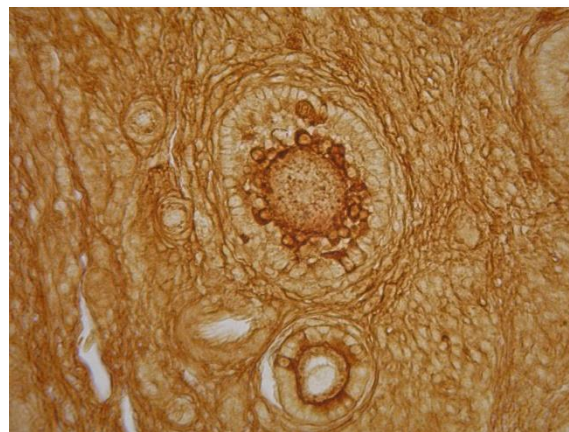


Рис. 1. Експресія рецепторів лектину SBA у яєчнику контрольного щура: цитоплазматичних глікополімерів овоцита, клітин променистого вінця, прозорої зони, волокнистих структур теки фолікула. $\times 400$.

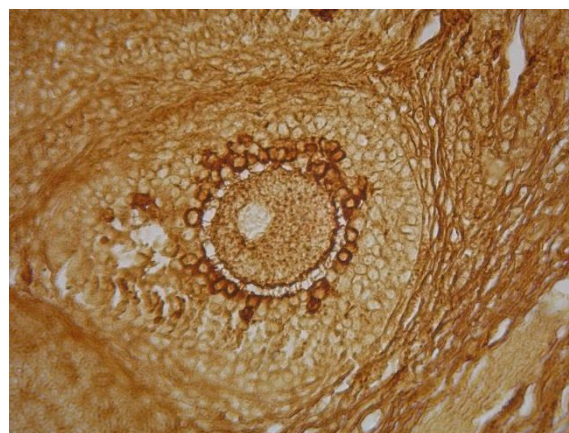


Рис. 2. Рістучий фолікул яєчника гіпотирозидного щура: посилення експресії рецепторів лектину SBA. $\times 400$.

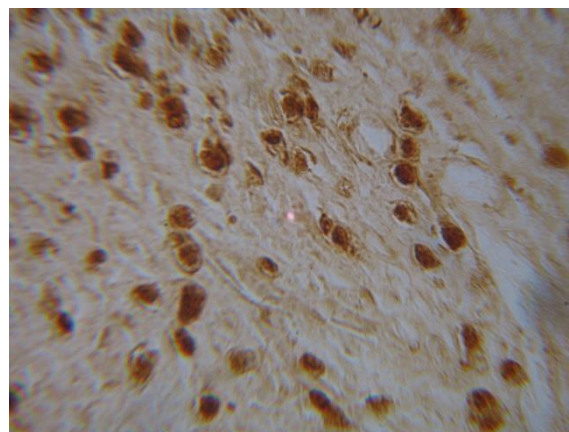


Рис. 3. Лейкоцитарна інфільтрація ендометрія при гіпотирозидизмі: селективне зафарбовування лейкоцитів з використанням лектину HPA. $\times 400$.

Висновки

1. Як гіпо-, так і гіпертироїдизм викликали порушення кількісного співвідношення між основними структурними компонентами яєчника –

фолікулами і жовтими тілами, причому за умов експериментального гіпотирозидизму ідентифіковано гальмування фолікулогенезу, тоді як гіпертирозидизм супроводжувався гіпертрофією та збільшенням кількості жовтих тіл (лютеїнізацією яєчника).

2. Дисбаланс тирозидних гормонів викликав у щурів зміни кількісного складу клітинних і стромальних структур ендометрію, а саме: нагромадження лейкоцитів – при гіпотирозидизмі, децидуальних клітин, потовщених пучків колагенових волокон з підвищеною лектиною реактивністю – при гіпертирозидизмі.

3. Як гіпо-, так і гіпертирозидизм мають суттєвий вплив на глікополімери яєчників та матки, що в умовах експерименту проявлялося у різноспрямованій і суто специфічній для кожної вивченої мікроструктури зміні манозо-, фукозо- та сіалогліканів, а також вуглеводних детермінант DGlcNAc, DGal та DGalNAc, що може свідчити як про розбалансованість (незавершеність) процесів кінцевого глікозилювання глікокон'югатів, так і про посилення або пригнічення їх секреції на тлі дисбалансу тирозидних гормонів.

4. Порівняння двох модельованих патологічних станів показало, що гіпертирозидизм чинить більш виражений вплив на органи жіночої

репродуктивної системи. При порівнянні яєчників та ендометрію встановлено, що останній має вищу чутливість до дисбалансу тирозидних гормонів, свідченням чого служили, зокрема, масивна лейкоцитарна інфільтрація та колагенізація стромы. Корекція гіпотирозидизму тироксином сприяла певній нормалізації як загальноморфологічних (лейкоцити, колагенові волокна), так і гістохімічних характеристик (манозо-, фукозо- та сіалоглікани), однак нормалізації рецепторів лектинів SBA, HPA та PNA за час проведення експерименту досягнуто не було.

Перспективи подальших розробок

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

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 0122U000168).

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. 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. Myshunina TM, Bohdanova TI, Kalinichenko OV, Pil'kevych LI. [Characteristics of experimental models of goiter in rats]. Endokrynolohiya. 2005;10(2):194-200. Ukrainian.

3. Pan'kiv VI. [Prevalence of thyroid pathology in iodine-deficient areas of western Ukraine]. Endokrynolohiya. 2006;11(1):134-137. Ukrainian.

4. 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.

5. 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.

6. Jazaerly MS, Davydov VV. [Age-related features of the action of Mercazolil on free radical processes in the liver]. Problemy endokrynnoi patologiyi. 2006;3:29-33. Ukrainian.

7. Hzhchots'kyi MR, Chupashko OI, Terlets'ka OI. [Experimental hypothyroidism and features of oxidative metabolism in blood and myocardial tissue of rats]. Bukovyns'kyi medychnyy visnyk. 2003;7(1):25-27. Ukrainian.

8. Sato E, Jiang JP. Follicular development and ovulation in hypothyroid rdw rats. Ital.J.Anat.Embryol. 2001;106(2):249-256.

9. 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.

10. Stechenko LO, Kuftireva 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.

11. Alberts B, Heald R, Johnson A, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 7th . W.W.Norton, incorporated; 2022. 2784p.

12. Isci A, Thieme N, Lamp A, Zverlov V, Kaltschmitt M. Production of xylo-oligosaccharides from wheat straw using microwave assisted deep eutectic solvent pretreatment. *Industrial Crops and Products*. 2021;164.
13. Kierszenbaum AL, Tres L, authors: Histology and cell biology: an introduction to pathology. 5th. Elsevier Health Sciences; 2019. 824 p.
14. Khan F, Khan RH, Farhat A, Mohmood S, Azfer A. Lectins as markers for blood grouping. *International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2003;8(12):293-300.
15. Lawrence-Mills SJ, Hughes D, Hezzell MJ, et al. The microvascular endothelial glycocalyx: An additional piece of the puzzle in veterinary medicine. *Vet J*. 2022;285.
16. Zhao R, Qin W, Qin R, et al. Lectin array and glycogene expression analyses of ovarian cancer cell line A2780 and its cisplatin-resistant derivative cell line A2780-cp. *Clin Proteom*. 2017;14-20.
17. Lin G, Zhao R, Wang Y, Han J, Gu Y, Pan Y, Ren C, Ren S, Xu C. Dynamic analysis of N-glycomic and transcriptomic changes in the development of ovarian cancer cell line A2780 to its three cisplatin-resistant variants. *Ann Transl Med*. 2020;8(6):289.
18. Akintayo A, Stanley P. Roles for Golgi Glycans in Oogenesis and Spermatogenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:98.
19. Arekal N, Roopashri A, Divyashree MS, Savitha J. High-sensitivity profiling of glycoproteins from ovarian cancer sera using lectin-affinity and LC-ESI-Q-TOF-MS/MS. *Current Research in Biotechnology*. 2023;5:100-122.
20. Lutsik AD, Detjuk ES, Lutsik MD, authors; Panasjuk EN, editor; Lvov: Lvov University edition; 1989. 144 p. Russian.
21. Lutsyk AD, author; Lutsyk AD, Sogomonian EA, editors: Structural, functional and lectin histochemical characteristics of rat ovaries and endometrium in experimental hyper- and hypothyroidism. *Folia Histochem.Cytobiol*. 2012;3:331-339.
22. Council of Europe: European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasburg. 1986;123:52.
23. 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.
24. Saha SK, Ghosh P, Konar A, Bhattacharya S. Differential expression of procollagen lysine 2-oxoglutarat 5-deoxygenase and matrix metalloproteinase isoforms in hypothyroid rat ovary and desintegration of extracellular matrix. *Endocrinology*. 2005;146(7):2963-2975.
25. Saha SK, Ghosh P, Bhattacharya S, Roy SS. Procollagen synthesis is increased in hypothyroid rat ovary by a parallel and compensatory pathways. *Cell.Physiol.Biochem*. 2007;19(5-6): 313-322.
26. McKey J, Anbarci DN, Bunce C, Ontiveros AE, Behringer RR, Capel B. Integration of mouse ovary morphogenesis with developmental dynamics of the oviduct, ovarian ligaments, and rete ovarii. *Elife*. 2022;11:e81088.

Согомонян Є.А., Челпанова І.В., Смолькова О.В., Серветник М.І., Панкевич Л.В. Вплив дисбалансу тиреоїдних гормонів на вуглеводні детермінанти яєчників та ендометрію.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Аналіз доступної фахової літератури показав, що при наявності значної кількості клінічних спостережень стосовно негативного впливу дисфункції щитоподібної залози на жіночу репродуктивну систему недостатньо праць, присвячених експериментальному вивченню тонких патомеханізмів цього впливу. Структури органів жіночої репродуктивної системи багаті різноманітними класами високомолекулярних біополімерів, що містять вуглеводний компонент. Вуглеводні детермінанти в числі перших пошкоджуються при розвитку патологічних процесів і тому можуть служити ранніми та інформативними маркерами ушкоджень органів жіночої статеві системи, репродуктивної функції зокрема. Достатньо чутливими та селективними маркерами вуглеводних детермінант біополімерів є лектини, використання яких в якості інструментів дослідження характеру змін глікокон'югатів органів і тканин у нормі та при різних формах патології продовжує залишатися актуальним завданням. **Мета:** в експерименті на щурах дослідити вплив гіпо- та гіпертироїдизму на вуглеводні детермінанти яєчників та ендометрію, порівнявши з цією метою набір лектинів різної вуглеводної специфічності. **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-тироксидом ("Фармак", Київ) у добовій дозі 100 мкг/кг маси тіла тварин. В усіх дослідних групах мерказоліл і тироксид у вигляді порошку додавали в їжу щоденно протягом двох тижнів, після чого тварин піддавали евтаназії передозуванням діетилового ефіру. Вуглеводні детермінанти структур ендометрію та яєчників досліджували з використанням 20 лектинів, у тому числі 15 конвенціональних, а також 5 нових оригінальних препаратів, очищених з представників підцарства грибів-базидіоміцетів. **Результати.** Аналіз результатів перерозподілу рецепторів лектинів на тлі гіпо- та гіпертироїдизму показав, що гіпертироїдизм супроводжується більш вираженим впли-

вом на вуглеводні детермінанти структур яєчника порівняно з гіпотироїдним станом. Разом із тим, останній характеризувався вираженою лейкоцитарною інфільтрацією мозкової речовини яєчника, найбільш селективним гістохімічним маркером при цьому виявилися лектини PNA, SBA, та UDA. За даними наших досліджень, жовті тіла, які утворювалися у гіпертироїдних тварин, мали морфологічні ознаки посиленої функціональної активності. У фолікулярних клітинах наслідком нестачі тироїдного гормону було деяке зменшення кількості рецепторів лектинів UDA та PAFA і посилення експресії у них SBA-реактивних глікокон'югатів. У мікроструктурах ендометрію щурів із експериментальним гіпотироїдизмом у порівнянні з контролем було виявлено редукцію вуглеводних детермінант з термінальними залишками DGal та DGal-NAc у поєднанні з нагромадженням глікополімерів із термінальними залишками LFuc. Для групи гіпотироїдних тварин характерною була також інтенсивна реакція лейкоцитів з переважною більшістю лектинів. У групі тварин із гіпертироїдизмом реактивність структур ендометрію з переважною більшістю використаних лектинів зростала. Особливо це стосувалося потовщених та інтенсивно позитивних колагенових волокон. Отримані нами результати лектиногістохімічних досліджень мікроструктур ендометрію при корекції гіпотироїдизму замісними дозами тироксину добре корелювали із загальноморфологічними даними: масивна лейкоцитарна інфільтрація строми ендометрія зменшувалася до контрольних показників при застосуванні 30 мкг/кг, але не 1,6 мкг/кг тироксину. **Підсумок.** Загальноморфологічні та лектиногістохімічні зміни ендометрію при дисбалансі тироїдних гормонів були виражені сильніше, ніж відповідь на моделювання цих патологічних станів структурами яєчників. Це проявлялося, зокрема, у посиленій лейкоцитарній інфільтрації та підвищеній колагенізації ендометрію.

Ключові слова: гіпотироїдизм, гіпертироїдизм, яєчники, матка, лектини.

О.Б. Ханенко
Ю.І. Попович

Івано-Франківський національ-
ний медичний університет
Івано-Франківськ, Україна

Надійшла: 14.10.2024
Прийнята: 15.12.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.95-100>

УДК 616.379-008.64:611.44:616-092:612.82-092

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ В СЕЛЕЗІН- ЦІ ЩУРІВ У ПІЗНІ ТЕРМІНИ ЕКСПЕ- РИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТО- ЦИН-ІНДУКОВАНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

Khanenko O.B.  , Popovych Y.I.   Morphological alterations in the spleen of rats during late stages of experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus.

Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Diabetes is a systemic disease that affects various organs and systems of the body. One of the known complications is damage to the immune system. However, changes in the spleen, as the central organ of the immune system in diabetes, have not been studied sufficiently. **Objective.** To study the features of morphological changes in the spleen in the late stages of experimental diabetes mellitus. **Methods.** The article presents the results of an experimental study of changes in the spleen parenchyma of rats with streptozotocin diabetes. The study was conducted on 11 adult white male rats, which were divided into two groups: control and experimental. Diabetes mellitus was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin. Spleens were harvested 42 days and 56 days after induction of diabetes mellitus. **Results.** In diabetic rats, a sharp decrease in the mean diameter of lymphoid nodules was observed: $(360.9 \pm 10.5) \mu\text{m}$ after 42 days and $(314.64 \pm 11.98) \mu\text{m}$ after 56 days, compared with $(448.06 \pm 9.68) \mu\text{m}$ in the control group ($p < 0.05$). The diameters of periarteriolar lymphoid sheaths also differed significantly in different groups: the average diameter was 31.41% smaller in diabetic rats ($p < 0.01$). The narrowing of the central artery lumen probably led to pathological changes in the lymphoid structures of the spleen in diabetes. **Conclusion.** Significant morphological changes were observed in the red and white pulp of the rat spleen in the late stages of experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus. The obtained results demonstrate a substantial impact of experimental diabetes on the structural elements of the rat spleen, with progressive changes manifesting at both time points, more prominently at 56 days of streptozotocin-induced diabetes mellitus.

Key words: diabetes mellitus, spleen, morphological changes, immune system.

Citation:

Khanenko OB, Popovych YI. [Morphological alterations in the spleen of rats during late stages of experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus]. Morphologia. 2024;18(4):95-100. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.95-100>

 Khanenko O.B. 0000-0001-5719-7121

 Popovych Yu.I. 0000-0002-2401-4699

 olexandrkh29@gmail.com; yupopovych@ifnmu.edu.ua

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Цукровий діабет – одне з найбільш поширених неінфекційних захворювань у світі. В даний час кількість людей які хворіють на дану патологію складає більше ніж 500 млн., а в 2045 році прогнозується збільшення кількості до 700 млн. хворих. Захворювання спричинене абсолютним або відносним дефіцитом інсуліну, що призводить до підвищення рівня глюкози в крові та численних ускладнень. До них належать ураження таких систем та органів, як нервова система з розвитком нейропатій, судинна система з розвитком мікро- та макроангіопатій, а також ураження

нирок [1].

У ряді досліджень показано, що імунна система є дуже вразливою до тривалого підвищення глюкози в крові, яке супроводжується зниженням опірності організму до різноманітних інфекційних захворювань внаслідок ураження імунних органів [2, 3].

Селезінка, як найбільший вторинний лімфатичний орган, відіграє значну в імунній системі — беручи участь в реакціях як вродженого, так і адаптивного імунітету. Крім того, вона бере значну участь у патогенезі самого цукрового діабету

бету 1 типу. Сюди відносяться процеси диференціації субпопуляції Т-клітин, мобілізації макрофагів та сигнальні Т-клітини хелперів, з останніми пов'язане утворення антитіл до β -клітин підшлункової залози [4, 5].

Однак, незважаючи на велику кількість досліджень, безпосередній вплив діабету на саму селезінку залишається недостатньо вивченим. Необхідні подальші дослідження для з'ясування специфічних клітинних змін, які відбуваються в селезінці у відповідь на діабет. Крім того, вивчення потенційної ролі селезінки в імунній дисрегуляції та судинній патології, пов'язаній з діабетом, може забезпечити нові терапевтичні мішені для лікування системних ускладнень захворювання.

Мета дослідження: дослідити особливості морфологічних змін у селезінці на пізніх стадіях експериментального цукрового діабету.

Матеріали та методи

Дослідження проводилося на лабораторних тваринах, які були розділені на дві групи: контрольну та експериментальну з модельованим цукровим діабетом. Контрольна група включала п'ять інтактних дорослих щурів-самців вагою 180-200 г з нормальним рівнем глюкози без модельованого цукрового діабету. Експериментальна група складалася з шести щурів, яким вводили одноразову інтраперитонеальну ін'єкцію стрептозотоцину (Sigma, США) в 0,1 М цитратному буферному розчині (pH 4,5) у дозі 6 мг на 100 г маси тіла [6]. Селезінку забирали через 42 та 56 діб після початку експерименту. Проводили зафарбовування зрізів гематоксиліном та еозинном згідно з протоколом [7]. Експериментальна група складалася з шести щурів, яким вводили одноразову інтраперитонеальну ін'єкцію стрептозотоцину (Sigma, США) в 0,1 М цитратному буферному розчині (pH 4,5) у дозі 6 мг на 100 г маси тіла.

З допомогою програмного забезпечення для аналізу зображень ImageJ проводили вимірювання морфометричних показників: діаметр лімфоїдних вузлів та їх гермінативних центрів, ширина мантийної, маргінальної та периаартеріальної лімфоїдної муфти, діаметр просвіту центральної артерії. Експеримент здійснювався з дотриманням рекомендацій Європейської комісії щодо біомедичних досліджень за участю тварин.

Для виконання статистичного аналізу використовувався пакет програмного забезпечення Python версія 3.12. Рівень значущості був встановлений на рівні $p < 0,05$ [8].

Результати дослідження

При розтині поверхня селезінки інтактних щурів гладка і злегка блискуча. На зрізі чітко диференціюються структури селезінки, виділяються дві основні частини: червона і біла пульпи. Біла пульпа представлена лімфоїдними фолікулами. Червона пульпа займає більшу частину селезінки та містить численні судини.

При морфометричному дослідженні у щурів контрольної групи середній діаметр лімфоїдних вузликів становив $(448,06 \pm 9,68)$ мкм (Рис. 1). У тварин з СЦД спостерігалось виражене зменшення цього показника: до $(360,9 \pm 10,5)$ мкм ($p < 0,05$) через 42 доби та до $(314,64 \pm 11,98)$ мкм ($p < 0,01$) через 56 діб, що на 29,77 % менше у порівнянні з показником у інтактних щурів.

Периаартеріальні лімфоїдні муфти (ПАЛМ) рідко мали правильну округлу форму, частіше були овально-витягнутими. Діаметр ПАЛМ відрізнявся у тварин різних груп. Середній діаметр ПАЛМ у щурів із ЦД становив $(56,35 \pm 1,86)$ мкм, тоді як у тварин контрольної групи цей показник складав $(82,15 \pm 3,08)$ мкм (зменшення на 31,41%, $p < 0,05$) через 56 діб після моделювання ЦД.

Центральна артерія лімфатичних вузликів частіше розташовувалась ексцентрично, нерідко на периферії лімфатичного вузлика. Відмічалось суттєве зниження просвітів артерій, що ймовірно веде до патологічних змін в лімфоїдних структурах селезінки при цукровому діабеті.

У ході експерименту були проведені морфометричні дослідження лімфоїдних структур білої пульпи селезінки щурів з цукровим діабетом (ЦД) та контрольної групи. У селезінці при ЦД виявлено атрофічні зміни лімфоїдного апарату селезінки зменшенні діаметру фолікулів, а також змінах у структурі периаартеріальних зон (усі данні зображено на Мал. 1).

Обговорення

Цукровий діабет викликає значні зміни в селезінці як на макроскопічному, так і на мікроскопічному рівнях, що зумовлено впливом гіперглікемії на цей орган. Так нами виявлено, що у пізні терміни СЦД особливо через 56 днів істотно зменшилися ширина мантийної та маргінальної зон, діаметри лімфоїдних вузликів та їх гермінативних центрів. Отримані результати можуть свідчити про атрофічні зміни в селезінці, що корелює з даними інших авторів. Зазначені перебудови можуть бути зумовлені окислювальним стресом та апоптозом [9]. В окремих дослідженнях було показано, що хронічна гіперглікемія призводить до змін у складі імунної системи, впливаючи на прогресування захворювання і є ключовим фактором метаболічної ендотоксемії та хронічного запалення в тканинах [10].

Хронічне запалення при цукровому діабеті – це складний процес, який виникає внаслідок гіперглікемії та призводить до чисельних ускладнень. Підвищений рівень глюкози в крові активує молекулярні механізми, які сприяють запальній реакції. Одним з таких механізмів є посилення оксидативного стресу, що призводить до посиленого утворення активних форм кисню (АФК), які завдають шкоди білкам, ліпідам і (ДНК), тим самим запускаючи запальні процеси. Одночасно відбувається зниження активності

антиоксидантних ферментів, таких як супероксиддисмутаза, каталаза та глутатіонпероксидаза,

що посилює окислювальний стрес [11-14].

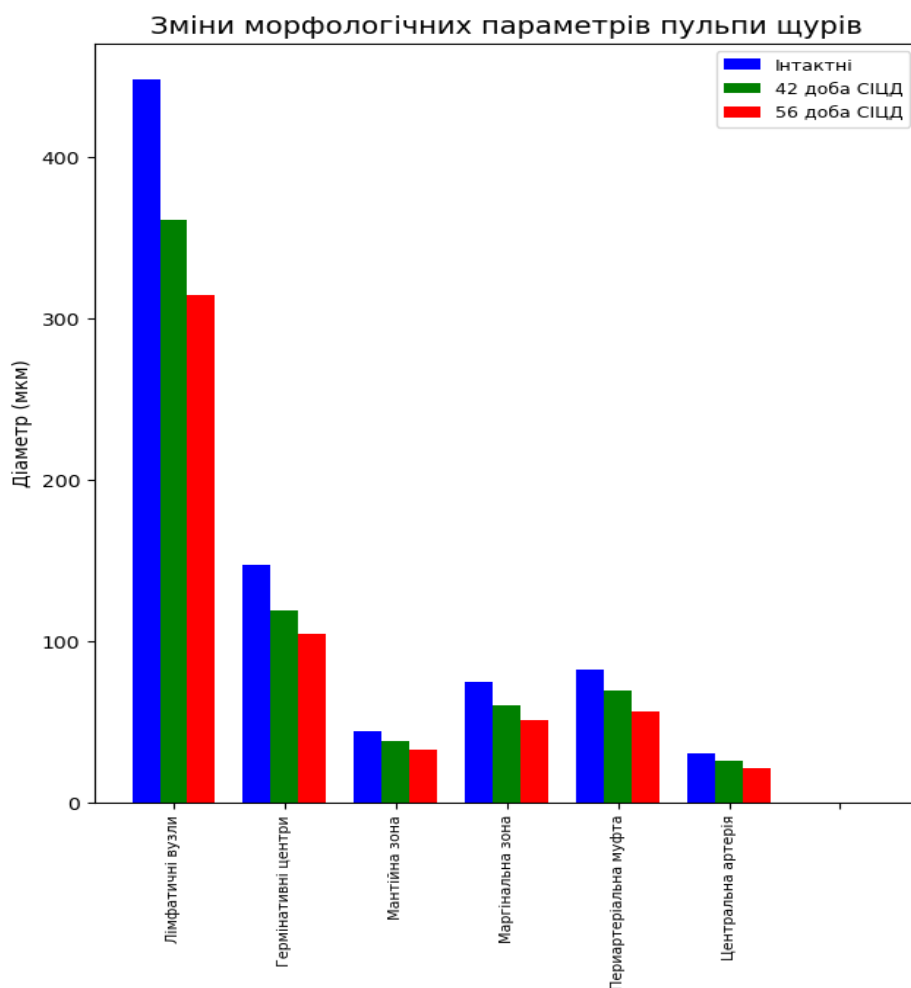


Рис. 1. Морфологічні показники пульпи селезінки у інтактних щурів та у пізні терміни стрептозоточиніндукованого цукрового діабету.

Дисрегуляція імунної системи також відіграє важливу роль, оскільки гіперглікемія погіршує функцію нейтрофілів, Т-лімфоцитів і моноцитів/макрофагів. Зниження фагоцитарної активності нейтрофілів, порушення проліферативної відповіді Т-лімфоцитів та збільшення продукції прозапальних цитокінів моноцитами/макрофагами сприяють розвитку хронічного запалення [11, 12, 13]. Утворюється "вadne коло" запалення, де хронічне запалення посилює інсуліно-резистентність, що призводить до подальшої гіперглікемії та посилення запальних реакцій [13, 14]. Крім того, запалення сприяє дисфункції ендотелію, що характеризується зниженням продукції оксиду азоту та підвищеною експресією молекул адгезії, що полегшує міграцію запальних клітин у тканини [15]. Підвищене вироблення цитокінів, включаючи ФНП- α , ІЛ-6 та ІЛ-1 β , створює запальне середовище, яке сприяє розвитку хронічного запалення [13, 14, 15, 16]. Розу-

міння цих патогенетичних механізмів має вирішальне значення для розробки інноваційних терапевтичних стратегій, спрямованих на зменшення запалення та покращення результатів лікування людей, які страждають на цукровий діабет.

Структурні та функціональні зміни в селезінці, що спостерігаються у пізній термін експериментального цукрового діабету відображають загальний вплив гіперглікемії на організм. Що підтверджується дослідженнями інших авторів [9, 17, 18, 19].

На мікроскопічному рівні в селезінці у пізні етапи цукрового діабету спостерігалася значна дистрофія лімфоїдних структур. Діаметр лімфоїдних вузликів та їх гермінативних центрів, які є основними компонентами імунної відповіді, зменшувався. Це може бути пов'язане зі зниженням реплікації та активації лімфоцитів, що змінює імунну відповідь організму та підвищує вразливість до інфекційних агентів [17, 18, 19].

Периартеріальні лімфоїдні муфти (ПАЛМ), які оточують артеріальні судини селезінки зменшуються в розмірах та втрачають свою структурну компактність, що може впливати на ефективність імунного моніторингу та реакції на антигени. Ці спостереження вказують на глибокі порушення імунної функції селезінки, що має значення для загального стану імунітету і підтверджується в інших дослідженнях [15, 18, 19].

У маргінальній зоні селезінки, яка є перехідною між червоною пульпою та лімфоїдною тканиною, також відмічаються деструктивні зміни, що проявляється розширенням та неправильністю границях. Дані патологічні зміни спостерігалися і в інших дослідженнях [18, 19].

Відомо, що цукровий діабет, хронічне порушення обміну речовин, викликає судинні ускладнення, які вражають як великі, так і дрібні кровоносні судини [17, 18]. Цукровий діабет має значний вплив на судинну систему, включаючи селезінкові артерії, що може призвести до ускладнень, імунологічних порушень та змін з боку інших органів та систем [21, 22, 23].

Ендотеліальна дисфункція (ЕД) є одним з критичних факторів у патогенезі ураження судин при діабеті, причому залучення імунної системи відіграє значну роль у цьому процесі [21]. Крім того, продукція оксиду азоту (NO) ендотеліальними клітинами судин має важливе значення для їх стану, а його порушення через такі фактори, як гіперглікемія та оксидативний стрес, є характер-

ною для діабету [25]. Отже, ендотеліальна дисфункція (ЕД) є ключовим елементом у прогресуванні судинних ускладнень, пов'язаних з цукровим діабетом, тоді як імунна система робить значний внесок у поглиблення цих патологічних станів. Взаємодія між ендотеліальною дисфункцією, запаленням та активацією імунної системи являється потенційною мішенню для терапевтичного втручання з метою усунення судинних ускладнень у хворих на цукровий діабет [24, 25, 26, 27, 28].

Усі ці процеси в сукупності призводять до прогресуючого ушкодження судин, порушення їх функції та структури, що є основою розвитку мікро- та макросудинних ускладнень цукрового діабету.

Підсумок

Морфологічні дослідження лімфоїдних структур білої пульпи селезінки виявили значні зміни у шурів із ЦД, у вигляді зменшення діаметра ПАЛМ, лімфоїдних вузликів, мантийної та маргінальної зон, а також зменшення щільності лімфоцитів у пульпі, що вказує на атрофічні процеси утворень білої пульпи селезінки.

Перспективи подальших досліджень

Необхідні подальші дослідження для з'ясування специфічних клітинних і молекулярних змін, які відбуваються в селезінці у відповідь на цукровий діабет. Вивчення імунної дисрегуляції та судинної патології, пов'язаної з діабетом, може забезпечити нові терапевтичні мішені для лікування системних ускладнень захворювання.

Літературні джерела References

1. International Diabetes Federation: IDF Diabetes Atlas. 10th. Brussels (Belgium): International Diabetes Federation; 2021.
2. Ferlita S, Yegiazaryan A, Noori N, Lal G, Nguyen T, To K, et al. Type 2 Diabetes Mellitus and Altered Immune System Leading to Susceptibility to Pathogens, Especially Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Medicine*. 2019;8(12):2219. DOI: 10.3390/jcm8122219
3. Tang L, Wang H, Cao K, Xu C, Ma A, Zheng M, et al. Dysfunction of circulating CD3+CD56+ NKT-like cells in type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Medical Sciences*. 2023;20(5):652–662. DOI: 10.7150/ijms.83317
4. Aliyu M, Zohora F, Saboor-Yaraghi AA. Spleen in innate and adaptive immunity regulation. 2021;5(1):1–17. DOI: 10.3934/ALLERGY.2021001
5. Kolling J, De Franceschi ID, Nishihira VSK, Baldissera MD, Pinto CG, et al. Resveratrol and resveratrol-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex recovered the changes of creatine kinase and Na⁺, K⁺-ATPase activities found in the spleen from streptozotocin-induced diabetic rats. *Anais Da Academia Brasileira De Ciências*. 2019;91(3):e20181330. DOI: 10.1590/0001-3765201920181330
6. Levytskyi VA, Zhurakivska OYa, Miskiv VA, Zaiats LM, Petriv RB, Yakymiv YuM, Kishchuk BM, Gnatyuk RZ, inventors; Sposib modeliuvannia tsukrovoho diabetu 1-ho typu u tvaryn riznoho viku. Method of modeling type 1 diabetes in animals of different ages. *Ukrainian patent UA 62966 U*. 2011 Feb 11. Int. Cl. A61B10/00. IPC G09B23/28 №u201101566. Filed 2011. Published Sep
7. Michael X Henderson. Hematoxylin and Eosin Stain - FOR PARAFFIN-EMBEDDED TISSUE SECTIONS 2023;1:86. doi: 10.17504/protocols.io.kxygx3q9zg8j/v1
8. Kunzmann P, Hamacher K. Biotite: a unifying open source computational biology framework in Python. *BMC Bioinformatics*. 2018;19(1):346. DOI: 10.1186/s12859-018-2367-z
9. Hossam Ebaid, Jameel Al-Tamimi, Ali Metwalli, Ahmed A, Allam, Kairy Zohir, Jamaan S, Ajarem, Ahmed Rady, Ibrahim M, Alhazza, Khalid

- E, Ibrahim. Effect of STZ-Induced Diabetes on Spleen of Rats: Improvement by Camel Whey Proteins. *Pakistan Journal of Zoology*. 2015;Vols.47-4:1109–1116.
10. Bhatwa A, Anhê G, Anhê F, Schertzer J. Does Obesity or Hyperglycemia Alter Metabolic Endotoxemia? *Physiology*. 2023;38(1):5729581. DOI: 10.1152/physiol.2023.38.s1.5729581
11. Rodrigues Mantuano N, Stanczak MA, Oliveira I de A, Kirchhammer N, Filardy AA, Monaco G, et al. Data from Hyperglycemia Enhances Cancer Immune Evasion by Inducing Alternative Macrophage Polarization through Increased O-GlcNAcylation. *American Association for Cancer Research*. 2020;8(10):1262–1272. DOI: 10.1158/2326-6066.c.6549885.v1
12. Wang Y, Yi B, Wang S, Chen X, Wen Z. Effect of hyperglycemia on the immune function of COVID-19 patients with type 2 diabetes mellitus: a retrospective study. *PeerJ*. 2022;10:e14570. DOI: 10.7717/peerj.14570
13. Chen B, Zhang H, Liu Y. The Correlation Study of Hyperglycemia on the Expression of White Blood cells and Inflammatory Genes in Patients with Type 2 Diabetes. *International Journal of Frontiers in Medicine*. 2021;3(3):5-10. DOI: 10.25236/ijfm.2021.030302
14. Szukiewicz D. Molecular Mechanisms for the Vicious Cycle between Insulin Resistance and the Inflammatory Response in Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(12):9818-9818. doi: 10.3390/ijms24129818
15. Dri E, Lampas E, Lazarou G, Lazarou E, Theofilis P, Tsioufis C, et al. Inflammatory Mediators of Endothelial Dysfunction. *Life*. 2023;13(6):1420. DOI: 10.3390/life13061420
16. Li T, Wang P, Wang X, Liu Z, Zhang Z, Zhang Y, et al. Inflammation and Insulin Resistance in Diabetic Chronic Coronary Syndrome Patients. *Nutrients*. 2023;15(12):2808. DOI: 10.3390/nu15122808
17. Zhang J, Deng Z, Jin L, Yang C, Liu J, Song H, et al. Spleen-Derived Anti-Inflammatory Cytokine IL-10 Stimulated by Adipose Tissue-Derived Stem Cells Protects Against Type 2 Diabetes. *Stem Cells and Development*. 2017;26(24):1749–1758. DOI: 10.1089/scd.2017.0119
18. Özerkan D, Özsoy N, Cebesoy S, Özer Ç. Distribution of spleen connective tissue fibers in diabetic and vitamin C treated diabetic rats. *Biotechnic & Histochemistry*. 2020;96(5):347–353. DOI: 10.1080/10520295.2020.1795718
19. Hashish H, Kamal R. Effect of curcumin on the expression of Caspase-3 and Bcl-2 in the spleen of diabetic rats. *Journal of Experimental and Clinical Anatomy*. 2015;14(1):18-23. DOI: 10.4103/1596-2393.158923
20. Unissa N, Mahveen M, Kumar S, Katla Swapna. An observation cross sectional study to assess the prevalence of microvascular complications in diabetes. *International Journal of Hospital Pharmacy*. 2019;4:31.
21. Ravshanovna NSD. Morphological Appearance of Blood Vessels of Organs in Diabetes Mellitus. *Deleted Journal*. 2023;25:1–3. DOI: 10.62480/tjms.2023.vol25.pp1-3
22. Liu R, Li L, Shao C, Cai H, Wang Z. The Impact of Diabetes on Vascular Disease: Progress from the Perspective of Epidemics and Treatments. *Journal of Diabetes Research [Internet]*. 2022;2022:1–17. DOI: 10.1155/2022/1531289
23. Konda KK. High Blood Sugar Levels Over a Prolonged Period: Diabetes. *Journal of Glycobiology*. 2021;10(3):1-2.
24. Li Z, Wu N, Wang J, Zhang Q. Roles of Endovascular Calyx Related Enzymes in Endothelial Dysfunction and Diabetic Vascular Complications. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:590614. DOI: 10.3389/fphar.2020.590614
25. Torimoto K, Okada Y, Tanaka Y. Type 2 Diabetes and Vascular Endothelial Dysfunction. *Journal of UOEH*. 2018;40(1):65–75. DOI: 10.7888/juoeh.40.65
26. Xue C, Chen K, Gao Z, Bao T, Dong L, Zhao L, et al. Common mechanisms underlying diabetic vascular complications: focus on the interaction of metabolic disorders, immuno-inflammation, and endothelial dysfunction. *Cell Communication and Signaling*. 2023;21(1):298. DOI: 10.1186/s12964-022-01016-w
27. Gora IM, Ciechanowska A, Ladyzynski P. NLRP3 Inflammasome at the Interface of Inflammation, Endothelial Dysfunction, and Type 2 Diabetes. *Cells*. 2021;10(2):314. DOI: 10.3390/cells10020314
28. Van Den OM, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Apoptosis in Diabetes Mellitus. *Mediators of Inflammation*. 2010;2010:1–15. DOI: 10.1155/2010/792393

Ханенко О.Б., Попович Ю.І. Морфологічні зміни в селезінці щурів у пізні терміни експериментального стрептозоточин-індукованого цукрового діабету.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Діабет є системним захворюванням, яке впливає на різні органи та системи організму. Одним з відомих ускладнень є ураження імунної системи. Втім зміни з боку селезінки, як центрального органу імунної системи при діабеті вивчені недостатньо. **Мета.** Дослідити особливості морфологічних змін у селезінці на пізніх стадіях експериментального цукрового діабету. **Методи.** У статті

представлено результати експериментального дослідження змін у паренхімі селезінки щурів зі стрептозоточиновим діабетом. Дослідження було проведено на 11 дорослих білих щурах-самцях, яких було розділено на дві групи: контрольну та експериментальну. Цукровий діабет викликали одноразовою внутрішньоочеревинною ін'єкцією стрептозоточину. Селезінку забирали через 42 дні та 56 днів після індукції цукрового діабету. **Результати.** У щурів з цукровим діабетом спостерігалось різке зменшення середнього діаметра лімфоїдних вузликів: (360.9 ± 10.5) мкм через 42 діб та (314.64 ± 11.98) мкм через 56 діб, порівняно з (448.06 ± 9.68) мкм у контрольній групі ($p < 0.05$). Діаметри періартеріальних лімфоїдних муфт також значно відрізнялися у різних групах: так середній діаметр на 31,41% менший у щурів з цукровим діабетом ($p < 0.01$). Звуження просвіту центральної артерії, ймовірно, призводило до патологічних змін у лімфоїдних структурах селезінки при діабеті. **Підсумок.** У червоній та білій пульпі селезінки щурів у пізні терміни експериментального стрептозоточин-індукованого цукрового діабету виявлено значні морфологічні зміни. Отримані результати демонструють значний вплив експериментального діабету на структурні елементи селезінки щурів, причому прогресуючі зміни проявлялися в обидва терміни, більше в пізні терміни стрептозоточиніндукованого цукрового діабету.

Ключові слова: цукровий діабет, селезінка, морфологічні зміни, імунна система.

І.В. Челпанова

Львівський національний
медичний університет імені
Данила Галицького
Львів, Україна

Надійшла: 21.10.2024

Прийнята: 17.12.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.101-113>

УДК: 616.714-089.843-073.7-018.1

РЕМОДЕЛЮВАННЯ КІСТКИ НИЖ- НЬОЇ ЩЕЛЕПИ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАН- ТАЦІЇ β -ТРИКАЛЬЦІЙФОСФАТУ: ГІСТОЛОГІЧНІ, ІМУНОГІСТОХІМІЧ- НІ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРНІ АСПЕКТИ

Chelpanova I.V.   Mandibular bone remodeling after β -tricalcium phosphate 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 β -tricalcium phosphate 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 β -tricalcium phosphate. **Methods.** Experiments were conducted on 45 male rabbits aged 6-7 months, weighing 2.5-3.0 kg. 20 animals constituted the control group, and 20 the experimental group. 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 experimental group consisted of rabbits where the bone defect was filled with β -tricalcium phosphate (β -TCP). 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. **Results and conclusion.** Implantation of the β -TCP material doesn't affect the nature and dynamics of alternative changes in the native bone tissue of the mandibular alveolar part after trauma, but during the 2-3rd weeks of the experiment it causes a significant increase in the number and density of membranous osteogenesis foci on the periphery of the bone regenerate with their subsequent anastomosis and association with the bone trabeculae of the native cancellous bone. The realization of the osteoconductive potential of synthetic β -TCP granules occurs through the creation of conditions for active neovascularization, migration and cytodifferentiation of osteogenic cells, and these processes spread in a wave-like manner from the periphery to the deep zone of the regenerate. The osteoblasts ultrastructure, near the border with the native bone, indicates a limitation of their synthetic activity, while osteoblasts in the thickness of the ceramic-bone regenerate intensively synthesize amorphous and fibrous osteoid components. In the deep zone of the implant, the appearance of functioning microvessels prevents the formation of cartilage matrix foci and limits the degree of fibrosis, which is accompanied by the formation of islands of desmal osteogenesis. In 5 weeks after implantation of synthetic β -TCP in the peripheral areas of the bone-ceramic regenerate, intensive remodeling of the woven matrix into primitive bone plates occurs. Moreover, the restored osteons of the native bone adjacent to the implantation zone, as well as the structures of the restored periosteum, stimulate the appearance of mature osteocytes in the newly formed trabeculae of the regenerate. Implantation of synthetic calcium phosphate material significantly accelerates the spread of the bone remodeling wave from the periphery to the depths of the regenerate from 4 to 12 weeks of the experiment, but doesn't ensure complete osseointegration of the implant at the cellular level and restoration of the quality of fibrillogenesis at the ultrastructural level, also doesn't prevent partial fibrosis of the deep zone of the regenerate and doesn't ensure complete restoration of the osteocyte lacunae-canal system.

Key words: lower jaw/mandible, dentoalveolar system, bone tissue, regeneration, β -tricalcium phosphate, histostructure, immunohistochemistry, ultrastructure.

Citation:

Chelpanova IV. [Mandibular bone remodeling after β -tricalcium phosphate transplantation: histological, immunohistochemical and ultrastructural aspects]. Morphologia. 2024;18(4):101-113. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.101-113>

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

 ilona.med75@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Дослідження динамічних змін у кістковій тканині після створення експериментального дефекту та його заповнення остеопластичними матеріалами є актуальним напрямком стоматології та пластичної реконструктивної медицини. Незважаючи на вже відомі дані про використання таких матеріалів у клінічній практиці, механізми та темпи повної регенерації кісток щелепно-лицевої ділянки залишаються недостатньо вивченими та потребують уточнення і розширення. Кілька мільйонів пацієнтів потребують кісткової пластики щорічно [1]. З огляду на здатність кісткової тканини до природної регенерації об'ємні посттравматичні дефекти вимагають особливої уваги та підходів у лікуванні. Інфіковані дефекти суттєво уповільнюють регенерацію та спричиняють низку ускладнень, що значно погіршують повне відновлення [2]. Класичними прикладами застосування остеопластики є заповнення кісткових дефектів спричинених травмами [3-4], для синус-ліфтингу та встановлення зубних імплантатів або заповнення кісткових дефектів після остеотомії [5-8].

Синтетичні замінники кістки, зокрема біоактивна кераміка, набувають популярності завдяки своїй здатності стимулювати проліферацію, диференціювання та регенерацію клітин кісткової тканини. Серед них β -трикальційфосфат (β -ТКФ) є широко використовуваним та ефективним синтетичним замінником для кісткової трансплантації. Він має остеокондуктивні та остеоіндуктивні властивості, швидко розкладається в організмі, а його структуру згодом замінює природна кісткова тканина. Ці властивості роблять β -ТКФ одним із найпотужніших замінників кісткового трансплантата [9]. Проте, результати активного використання β -трикальційфосфату в клінічній практиці не завжди відповідають очікуванням [10]. Дослідження гістологічних перебудов кісткового регенерату після застосування різних остеотропних матеріалів було проведено низкою дослідників за допомогою класичного світлооптичного аналізу [11]. Також, значну увагу морфологів привернули дослідження, що стосуються клітинних та внутрішньоклітинних змін після застосування різних матеріалів з метою оптимізації регенераційних процесів у ділянці експериментального кісткового дефекту [12]. В останні роки великого значення набули дослідження щодо визначення імуногістохімічних характеристик клітинного, волокнистого та мікроциркуляторного компонентів під час регенераторних перетворень кісткової тканини та при її взаємодії з остеотропними матеріалами [13].

Мета дослідження – визначити динаміку гістологічних, імуноморфологічних та ультраструктурних змін у кістці нижньої щелепи кролика після її травматичного uszkodження із наступним заміщенням дефекту остеопластичним матеріалом β -ТКФ.

Матеріали та методи

Дослідження було проведено на 45 статевозрілих кроликах-самцях віком 6-7 місяців, вагою 2,5-3 кг. Тварини були розділені на контрольну та експериментальну групу (по 20 тварин кожна). Ще 5 інтактних тварин було використано для вивчення нормальної структури кісткової тканини досліджуваної ділянки нижньої щелепи. Тваринам контрольної та експериментальної 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 4x3 мм.

До контрольної групи увійшли тварини з дефектом кісткової тканини, який загоювався під кров'яним згустком. Експериментальну групу складали кролики, у яких кістковий дефект заповнювали остеотропним матеріалом Synthetic β -tricalcium phosphate CerasorbM B-TCP (Inc. in North Carolina, USA) (β -TCF). 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, а також 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 [14, 15].

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 на протязі 30 хвилин. Використовували систему візуалізації UltraVision Quanto (LabVision). Для ідентифікації реакції наносився розчин хромогену 3-діамінобензидин тетрахлориду (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 [16, 17].

Для ультраструктурного дослідження демінералізованих 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 [18]. 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 [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 дослідження демінералізованих фрагментів коміркової частини нижньої щелепи через одну добу після утворення трепанаційного отвору дозволило візуалізувати різноманітні ознаки альтеративних процесів у прилеглих до експериментального дефекту ділянках кісткової тканини, а також виявити характерні реактивні зміни у складі ясен і пародонта. Зокрема, навколо дефекту визначались численні дрібні осередки крововиливів та тромбоутворення внаслідок руйнування стінок мікросудин. Значний периваскулярний та інтерстиційний набряк істотно пошкоджував загальну гістоархітектуру періосту і м'яких тканин ясен. Помірна лейкоцитарна інфільтрація спостерігалась лише в окремих невеликих ділянках. У кістковій тканині по краях шахти визначались численні дрібні скупчення фібринових мас і осередки гемосидерозу. У просвітах гемокапілярів компактної кортикальної пластинки часто визначались явища стазу та сладжування еритроцитів. Запальні зміни окістя у вигляді тонкої простої періостальної реакції були виражені в помірному ступені.

У материнській компактній кістці навколо дефекту в контрольній групі спостерігались дезорганізація та гомогенізація пластинок остеонів з

появою численних резорбційних лакун. За допомогою трансмісійної електронної мікроскопії виявлялись морфологічні ознаки активації поодиноких остеокластів, що підтверджувалось негативним імуногістохімічним забарвленням парафінових зрізів Calcitonin-SP17-клональними антитілами, а також прояви інтрацелюлярного набряку остеокитів, інтерстиційного набряку та деструкції колагенових волокон з гомогенізацією кісткового матриксу.

Через одну добу експерименту порожнина експериментального дефекту була заповнена кров'яним згустком. З боку періосту навколо дефекту не виявлялося будь-яких ознак неоваскулогенезу, фіброзування або проліферації фібробластів. Поблизу ендосту ушкоджених кісткових трабекул у поверхневих ділянках згустку спостерігались примітивні гемокапіляри та ендотеліальні тяжі в супроводі фібробластів, що свідчило про утворення грануляційної тканини на периферії експериментального дефекту.

Через один тиждень після нанесення експериментальної травми прояви набряку та інші ознаки травматичного запалення навколо зони дефекту були редуковані. Ступінь дезорганізації материнської пластинчастої кістки поглиблювався у порівнянні з попереднім терміном спостереження, посилювалась гомогенізація кісткового матриксу та зростала площа резорбційних порожнин, заповнених тканинним детритом і фібринодними масами, зберігались депозити гемосидерину. Поверхня травмованих остеонів і кісткових трабекул по краях дефекту виглядала горбистою внаслідок утворення гетероморфних остеоїдних виростів. У складі таких виростів поряд із поодинокими остеокластами навколо окремих повнокровних гемокапілярів спостерігалась значна кількість остеобластів, які не утворювали суцільного фронту та не контактували між собою. При імуногістохімічному вивченні розподілу експресії Ki-67 ядра переважної більшості остеобластів містили мітку даного маркера, що вказувало на їх істотний проліферативний потенціал. На електронограмах навколо остеобластів спостерігалась відносно невелика кількість помірно впорядкованих пучків колагенових волокон, занурених у розвинутий органічний матрикс.

Наприкінці першого тижня експерименту в периферичних ділянках регенерату, що формувалась після утворення кров'яного згустку, спостерігались численні осередки перетинчастого остеогенезу зі щільним вмістом новоутворених примітивних гемокапілярів і гетероморфних клітин – фібробластів, остеобластів та їх попередників, прогеніторних недиференційованих клітин. При імуногістохімічному дослідженні активне накопичення мітки маркера Ki-67 в ядрах означених клітин свідчило про їхню активну проліферацію на периферії регенерату, а висока щільність CD34-позитивних структур вказувала на значну

активність процесів неоваскулогенезу в даній локалізації. Гематогенні клітини навколо гемокапілярів на периферії регенерату зустрічались рідко, остеокласти не виявлялись. На електронограмах навколо фібробластів і остеобластів в остеогенних острівцях розташовувались невпорядковані колагенові волокна з ознаками незрілості, які не утворювали організованих пучків. Остеоїд в осередках перетинчастого остеогенезу був збагачений на аморфний компонент. У глибоких ділянках посттравматичного детриту, що заповнював експериментальну шахту, клітини фібробластного ряду розташовувались дифузно поодинокі на значній відстані одна від одної; механоцити інших гістогенетичних рядів не виявлялись; мікросудини зустрічались вкрай рідко.

Протягом 2-го і 3-го тижнів після експериментальної травми в контрольній групі тварин запальні прояви у складі кісткової тканини та структурах пародонту поблизу зони дефекту поступово редукувались. Спостерігались морфологічні ознаки дезорганізації материнської кістки та гомогенізації кісткового матриксу навколо зони травми. Зберігались резорбційні порожнини з вмістом тканинного детриту, фібрину або гемосидерину. По краях ушкодженої материнської кістки на поверхні травмованих остеонів і кісткових трабекул спостерігались численні гетероморфні вирости остеїдної структури, які занурювались у репаративний регенерат між остеогенними острівцями. У складі виростів від трабекул материнської кістки спостерігались повнокровні гемокапіляри в оточенні незначної кількості остеокластів. Переважна більшість остеокластів була представлена компактними овальними формами з розмірами до 70 мкм. Остеобласти за чисельністю значно переважали над іншими клітинами і розташовувались поодинокі в товщі органічного матриксу остеїдних виростів від спікул і трабекул материнської кістки.

При визначенні експресії маркера проліферації Ki-67 переважна кількість імуногістохімічної мітки накопичувалась в ядрах остеобластів, у той час як ядра остеокластів, ендотеліоцитів і остеоцитів материнської кістки Ki-67 не експресували. Вивчення Calcitonin-SP17-клональних антитіл показало відсутність суттєвої резорбційної активності остеокластів. Застосування маркера CD34 виявило низький ступінь васкуляризації. На електронограмах остеїд у даній локалізації містив незначну кількість слабко орієнтованих пучків колагенових волокон навколо остеобластів з розвинутою зернистою ендоплазматичною сіткою та комплексом Гольджі.

Протягом 2-3-го тижнів у тварин контрольної групи на периферії кісткового регенерату осередки перетинчастого остеогенезу анастомозували з утворенням трабекул. В їх складі візуалізувались численні гемокапіляри в оточенні остеоб-

ластів, наближених один до одного і розташованих групами. У міжтрабекулярних просторах зосереджувались фібробласти у невеликій кількості та численні остеопрогеніторні клітини. Інтенсивне накопичення імуногістохімічної мітки маркера Ki-67 спостерігалось переважно в ядрах клітин-попередниць остеобластів; маркера CD34 – у мембранах і цитоплазмі ендотеліальних клітин на периферії регенерату. Остеокласти та інші гематогенні клітини зустрічались у незначній кількості. Calcitonin-SP17-позитивні клітинні елементи не виявлялися. За допомогою трансмісійної електронної мікроскопії у складі остеїду примітивних трабекул визначались різні за ступенем зрілості колагенові волокна та їх пучки з невпорядкованою орієнтацією. Волокнистий компонент у міжтрабекулярних просторах навколо фібробластів поступався за площею аморфному компоненту. У внутрішніх ділянках регенерату, який заповнював порожнину експериментального дефекту, спостерігався дуже низький ступінь васкуляризації. Поряд із помірними ознаками фіброзування визначались невеликі скупчення відокремлених хондробластів з утворенням осередків хрящового матриксу, який не містив мікросудин і волокон.

Через 4 і 5 тижнів після нанесення експериментальної травми у тварин контрольної групи будь-які запальні прояви у складі кісткової тканини та в структурах пародонту були відсутні. По краях дефекту новоутворені з боку материнської кістки трабекули орієнтувались переважно радіально відносно регенерату. Окремі трабекули і спікули занурювались в товщу регенерату та анастомозували з грубоволокнистою кістковою тканиною острівців десмального остеогенезу. Навколо повнокровних гемокапілярів, що відгалужувались від мікросудинного русла періосту, у ділянках компактної материнської кістки, які мали морфологічні ознаки посттравматичної дезорганізації та гомогенізації кісткового матриксу, спостерігалась поява активних остеокластів, що підтверджувалось при імуногістохімічному вивченні розподілу Calcitonin-SP17-клональних антитіл.

Резорбційні порожнини з вмістом тканинного детриту, фібрину або гемосидерину зустрічались рідко, проте поява лакун Гаушипа свідчила про початок відновлення ушкоджених внаслідок травми остеонів материнської кістки. Остеобласти за чисельністю переважали над іншими клітинами та розташовувались поодинокі або групами в товщі органічного матриксу трабекул поблизу ендосту материнської губчастої кістки, що поєднувалось з їх активним вrostанням всередину регенерату. Розподіл імуногістохімічної мітки Ki-67 вказував на високу проліферативну активність остеобластів, на відміну від інших сполучнотканинних клітин. При електронномікроскопічному дослідженні в цитоплазмі остеобластів спостерігались добре розвинуті синтетичні і сек-

реторні структури, проте остеоїд у даній локалізації містив обмежену кількість сформованих колагенових волокон або їх пучків.

У тварин контрольної групи на периферії кісткового регенерату спостерігались численні трабекули, які анастомозували між собою з утворенням губчастої гістоархітектури. Основою новоутворених трабекул була грубоволокниста кісткова тканина з розвинутою сіткою гемокапілярів, групами гетероморфних остеобластів поряд із низькодиференційованими остеогенними клітинами (рис. 1). Поодинокі остеокласти розташовувались поблизу острівців десмального остеогенезу та межували з фіброblastами (рис. 2).



Рис. 1. Електронна трансмісійна мікрофотографія периферичної ділянки регенерату нижньої щелепи кролика контрольної групи через 4 тижні після травми. 1 – остеобласт; 2 – низькодиференційована остеогенна клітина; 3 – позаклітинний матрикс. $\times 4000$.

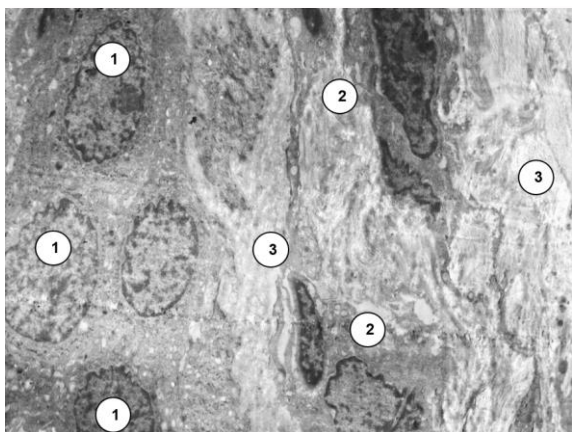


Рис. 2. Електронна трансмісійна мікрофотографія периферичної ділянки регенерату нижньої щелепи кролика контрольної групи через 4 тижні після травми. 1 – ядра остеокластів; 2 – фіброblast та його відростки; 3 – локус десмального остеогенезу. $\times 3000$.

Інтенсивна експресія маркера проліферації Ki-67 спостерігалась в ядрах остеобластів і їх клітин-попередниць у тих трабекулах, що формувалися за рахунок острівців десмального остеогенезу.

незу всередині регенерату, на відміну від поверхневих його ділянок. Розподіл маркера CD34 вказував на активне утворення гемокапілярного русла не лише на периферії регенерату, а й у глибоких зонах. Імуногістохімічне вивчення Calcitonin-SP17-реактивних елементів, поряд із появою резорбційних лакун, вказувало на початок ремоделювання ретикулофіброзної тканини кісткових трабекул, що спостерігалось через 5 тижнів експерименту в периферійних ділянках регенерату. На відміну від цього, у внутрішніх зонах регенерату на тлі обмеженої васкуляризації та фіброзування візуалізувались численні дрібні осередки хрящового остеогенезу, в яких були відсутні гемокапіляри та пучки колагенових волокон.

Наприкінці 5-го тижня у периферичних ділянках кісткового регенерату на електронограмах у складі остеоїду більшості новоутворених трабекул визначалися пучки щільно та хаотично упакованих колагенових волокон. В окремих випадках колагенові волокна утворювали паралельні комплекси з формуванням ламелярної конфігурації поблизу остеобластів, що свідчило про ініціацію ремоделювання грубоволокнистого матриксу в примітивні кісткові пластинки. На даному етапі експерименту спостерігалась поява первинних остеокитів з ознаками структурно-функціональної незрілості – зі значним об'ємом цитоплазми, недорозвинутими відростками, збереженим комплексом Гольджі та численними елементами гранулярної ендоплазматичної сітки. У широких просторах між новоутвореними трабекулами пухка сполучна тканина містила гемокапіляри переважно зі сформованими міжклеточними контактами, мієлоїдна тканина не виявлялась.

На восьмому тижні посттравматичної регенерації в ділянках материнської кістки, прилеглих до зони дефекту, спостерігались ознаки відновлення ушкоджених остеонів. На світлооптичному рівні осередків дезорганізації та гомогенізації кісткового матриксу не виявлялось, загальна тканинна структура періосту частково відновлювалась, активні остеокласти поблизу резорбційних лакун межували з невеликими групами остеобластів, остеокити остеонів мали звичайну форму і контактували один з одним своїми відростками. Вивчення розподілу імуногістохімічної мітки Ki-67 показало незначну проліферативну активність остеобластів і ендотеліальних клітин, що вказувало на відносну стабілізацію компактно організації зовнішньої кісткової пластинки коміркових відростків. Також обмежена проліферативна активність клітин спостерігалась у складі відновлених трабекул губчастої материнської кістки, частина яких анастомозувала з новоутвореними кістковими трабекулами регенерату.

На периферії кісткового регенерату новоутворені трабекули містили розгалужену сітку гемокапілярів, навколо яких візуалізувались чис-

ленні активні остеокласти, остеобласти і поодинокі остецити. У даних периферичних трабекулах спостерігались ознаки активного ремоделювання грубоволокнистої кісткової тканини з утворенням пластинок примітивних гетероморфних остеонів, геометрія яких широко варіювала та відрізнялась від зрілих остеонів материнської кістки. У міжтрабекулярних просторах візуалізувались поодинокі ділянки мієлоїдної тканини. Поблизу періосту спостерігались ознаки активної компактизації кісткової тканини. Інтеграція поверхні репаративного регенерату з материнською кісткою була частковою, переважно на рівні переходу її зрілих трабекул у новоутворену губчасту кістку регенерату. На електронограмах пластинчаста кісткова тканина в даній локалізації містила пучки щільно упакованих паралельних колагенових волокон, які межували з осередками невпорядкованих фібрил і збагачених на аморфний матеріал низької електронної щільності. Остецити між кістковими пластинками мали ознаки обмеженої структурно-функціональної зрілості (рис. 3).

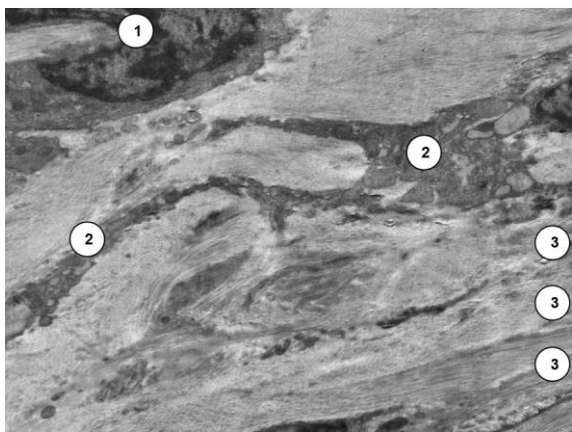


Рис. 3. Електронна трансмісійна мікрофотографія периферичної ділянки регенерату нижньої щелепи кролика контрольної групи через 8 тижнів після травми. 1 – ядра остеокластів; 2 – фібробласт та його відростки; 3 – локус десмального остеогенезу. $\times 4000$.

У більш глибоких ділянках регенерату розташовувались трабекули, які складались переважно з грубоволокнистої кісткової тканини та містили як осередки її ремоделювання, так і окремі залишки хрящового остеогістогенезу. Між такими трабекулами спостерігались скупчення фіброзної тканини з поодинокими фібробластиками. На відміну від попереднього терміну експерименту, в глибоких ділянках регенерату відбувалось активне вrostання ендотеліальних тяжів, що підтверджувалося імуногістохімічним визначенням CD34-позитивних структур між гіаліновими остриями, позбавленими мікросудинного і волокнистого вмісту. Імуногістохімічне вивчення Calcitonin-SP17-реактивних елементів показало, що не дивлячись на значну васкуляризацію грубо-

волокнистих трабекул і присутність істотної кількості остеокластів, інтенсивність ремоделювання глибоких ділянок регенерату була обмеженою. Трансмісійна електронна мікроскопія показала високий вміст хаотично розташованих колагенових волокон та їх пучків поблизу остеобластів, які мали ознаки значної синтетичної і секреторної активності.

Через 12 тижнів після експериментальної травми в контрольній групі тварин на світлооптичному рівні спостерігалось повне відновлення загальної тканинної структури періосту в зоні ушкодження та остеоцитарної лакуно-каналцевої системи у складі материнської кістки навколо експериментального дефекту. За гістоархітектурою та розподілом клітинних елементів, а також за досліджуваними імуногістохімічними і електронномікроскопічними характеристиками материнська кісткова тканина коміркової частини нижньої щелепи тварин контрольної групи не відрізнялась від групи інтактних тварин.

Кісткові трабекули в периферичних ділянках регенерату містили розвинену мікросудинну сітку та типові клітинні елементи, що складали основу пластинчастої кісткової тканини. Невелика кількість остеокластів і остеобластів поряд із численними зрілими остеоцитами свідчили про завершення процесів ремоделювання грубоволокнистої тканини в пластинчасту, проте за мікроархітектурою та формою остеони регенерату істотно відрізнялися від типової будови. Зокрема, при трансмісійній електронній мікроскопії мікрошаруватий композит колагенових фібрил сусідніх кісткових пластинок був роз'єднаний варіабельними за товщиною просторами аморфного матеріалу низької електронної щільності, що вказувало на незавершений або ушкоджений процес мінералізації кісткового матриксу остеонів. Крім того, упакування колагенових волокон у паралельні комплекси всередині остеонних пластинок було нерівномірним та розрізнялося між сусідніми остеонами компактної кістки регенерату.

Ділянки мієлоїдної тканини у міжтрабекулярних просторах візуалізувались лише на периферії репаративного регенерату. Інтеграція його поверхні з материнською кісткою була неповною, переважно за рахунок анастомозування між зрілими трабекулами материнської кістки і новоутвореною губчастою кісткою регенерату.

Через 12 тижнів експерименту глибокі ділянки регенерату містили трабекули з ознаками активного ремоделювання грубоволокнистої кісткової тканини з утворенням примітивних кісткових пластинок, геометрія яких широко варіювала та відрізнялась від зрілих остеонів материнської кістки. За допомогою електронної мікроскопії в пластинчастій кістковій тканині в даній локалізації візуалізувались різні за орієнтацією волокон пучки. Зокрема, щільно упаковані паралельні фібрили межували з осередками невпорядкованих

волокон, в яких зберігалась значна частка аморфного компонента новоутвореного остеїду. Остеоцити між кістковими пластинками в глибоких ділянках регенерату мали розвинену цитоплазму, майже не утворювали відростків, містили елементи комплексу Гольджі та гранулярного ретикулу.

У глибоких ділянках регенерату кісткові трабекули склалися з грубоволокнистої кісткової тканини або ділянок її ремоделювання. Острівці хрящового остеогістогенезу, на відміну від попереднього терміну експерименту, у таких трабекулах не виявлялись. Між гетероморфними за гістоархітектурою кістковими трабекулами спостерігались значні вогнища фіброзування, які містили поодинокі фібробласти та помірну кількість CD34-позитивних ендотеліальних елементів. Імуногістохімічне вивчення Calcitonin-SP17-реактивних остеокластів виявило значну активність резорбції грубоволокнистої тканини трабекул, причому розподіл маркера Ki-67 демонстрував обмеження проліферативного потенціалу ендотеліоцитів і остеобластів у даній локалізації.

Дослідження гістологічних препаратів демінералізованої нижньої щелепи через одну добу після утворення трепанційного отвору та імплантації матеріалу β-ТКФ виявило численні дрібні осередки крововиливів та тромбоутворення внаслідок руйнування стінок мікросудин. Були характерними прояви дезорганізації та гомогенізації пластинок остеонів материнської кістки з появою численних резорбційних лакун. Електронномікроскопічно виявлялись морфологічні ознаки активності поодиноких остеокластів, що підтверджувалось негативним імуногістохімічним забарвленням парафінових зрізів Calcitonin-SP17-клональними антитілами, а також прояви інтрацелюлярного набряку остеоцитів, інтерстиційного набряку та деструкції фібрил на тлі гомогенізації кісткового матриксу. З боку періосту навколо дефекту не виявлялись будь-які ознаки неоваскулогенезу, фіброзування або проліферації фібробластів. Визначення проліферативного маркера Ki-67 виявило обмежену кількість Ki-67-позитивних клітин у даній локалізації. Поблизу ендосту ушкоджених кісткових трабекул на межі з імплантованим матеріалом спостерігались примітивні гемокапіляри та ендотеліальні тяжі в супроводі фібробластів, що вказувало на формування 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 проявлялись у незначному ступені. Навпроти, ознаки дезорганізації материнської пластинчастої кістки посилювались у порівнянні з попереднім терміном спостереження. Як і в групі

контрольних тварин, спостерігалась гомогенізація кісткового матриксу та зростала площа резорбційних порожнин, заповнених детритом, фібрином або гемосидериновими депозитами. Травмовані остеони і кісткові трабекули по краях дефекту мали горбисту поверхню внаслідок утворення численних дрібних остеїдних виростів. У складі таких виростів поряд із поодинокими остеокластами навколо гемокапілярів спостерігалась значна кількість відокремлених один від одного остеобластів, які при імуногістохімічному забарвленні із застосуванням маркера Ki-67 інтенсивно накопичували мітку проліферації.

Наприкінці першого тижня експерименту в периферичних ділянках регенерату між фрагментами імплантованого матеріалу β-ТКФ виявлялись численні осередки десмального остеогенезу зі щільним вмістом новоутворених примітивних гемокапілярів і гетероморфних клітин – фібробластів, остеобластів та їх низькодиференційованих попередників. Активне накопичення імуногістохімічної мітки маркера Ki-67 в ядрах означених клітин свідчило про їхню активну проліферацію на периферії регенерату. Значна щільність CD34-позитивних структур у вигляді примітивних гемокапілярів і ендотеліальних тяжів вказувала на активний неоваскулогенез в даній локалізації. Гематогенні клітини навколо гемокапілярів зустрічались рідко, остеокласти не виявлялись. На електронограмах навколо фібробластів і остеобластів в острівцях десмального остеогенезу розташовувались невпорядковані 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 матеріалу β-ТКФ зберігались ознаки дезорганізації материнської кістки та гомогенізації кісткового матриксу навколо зони травми, невеликі резорбційні порожнини з вмістом тканинного детриту, фібрину або гемосидерину. По краях ушкодженої материнської кістки на поверхні травмованих остеонів і кісткових трабекул спостерігались численні гетероморфні вирости остеїдної структури, які занурювались у репаративний регенерат між остеогенними острівцями. У складі виростів від трабекул материнської кістки спостерігались повнокровні гемокапіляри в оточенні незначної кількості остеокластів. Переважна більшість остеокластів була представлена компактними овальними формами з розмірами до 70 мкм. Остеобласти за чисельністю значно переважали над іншими клітинами і розташовувались поодинокі в товщі органічного матриксу остеїдних виростів від спікул і трабекул материнської кістки. При визначенні експресії маркера проліферації Ki-67 переважна кількість імуногістохімічної мітки накопичувалась в ядрах остеобластів, у той час як ядра

остеокластів, ендотеліоцитів і остеоцитів материнської кістки молекул Ki-67 не експресували. Вивчення Calcitonin-SP17-клональних антитіл показало відсутність суттєвої резорбційної активності остеокластів. Застосування маркера CD34 виявило низький ступінь васкуляризації. На електронограмах остеїд у даній локалізації містив незначну кількість слабо орієнтованих пучків колагенових волокон навколо остеобластів з розвинутою зернистою ендоплазматичною сіткою та комплексом Гольджі.

Протягом 2-3-го тижнів після імплантації синтетичного кальційфосфатного матеріалу на периферії кісткового регенерату осередки перетинчастого остеогенезу, на відміну від групи контролю, візуалізувались у значно більшій кількості. Остеогенні остівці анастомозували з утворенням трабекул, а також об'єднувались з горбистими кістковими трабекулами материнської губчастої кістки. В їх складі візуалізувались численні гемокапіляри в оточенні остеобластів, які розташовувались поодинокі або утворювали групи. У міжтрабекулярних просторах зосереджувались фіброblastи у невеликій кількості та численні остеопрогеніторні клітини. За допомогою трансмісійної електронної мікроскопії у складі остеїду новоутворених трабекул визначались гетероморфні колагенові волокна та їх пучки з невпорядкованою орієнтацією, які суттєво поступалися за площею аморфному матриксу. У міжтрабекулярних просторах навколо фіброblastів фіброзний компонент регенерату поступався за площею аморфному компоненту. Ультраструктура остеобластів, що розташовувались поблизу межі з материнською кісткою, свідчила про певне обмеження їх синтетичної активності. Навпаки, ті остеобласти, що були зануреними у товщу керамічно-кісткового регенерату, містили розвинений комплекс Гольджі та численні елементи гранулярної ендоплазматичної сітки. Інтенсивне накопичення імуногістохімічної мітки маркера Ki-67 спостерігалось переважно в ядрах клітин-попередниць остеобластів; маркера CD34 – у мембранах і цитоплазмі ендотеліальних клітин на периферії регенерату. Остеокласти та інші гематогенні клітини зустрічались у незначній кількості, Calcitonin-SP17-позитивні клітинні елементи не виявлялися.

У внутрішніх ділянках кістково-керамічного регенерату, який заповнював порожнину експериментального дефекту, на демінералізованих гістологічних препаратах спостерігались ознаки активного неоваскулогенезу, що на третьому тижні спостережень проявлялось утворенням численних примітивних не заповнених еритроцитами мікросудин і ендотеліальних тяжів. Помірна кількість новоутворених гемокапілярів мала заповнений еритроцитами просвіт. Навколо таких функціонально спроможних мікросудин візуалізувались поодинокі острівці десмального остеогенезу.

На відміну від контрольної групи, в глибоких ділянках регенерату не виявлялись осередки хрящового матриксу, позбавленого мікросудин і волокон; осередки щільної неоформленої сполучної тканини були невеликими та зустрічались у незначній кількості.

Через 4 і 5 тижнів після імплантації матеріалу β-ТКФ по краях дефекту новоутворені з боку материнської кістки трабекули орієнтувались переважно радіально відносно регенерату. Окремі трабекули і спікули занурювались в товщу регенерату та анастомозували з грубоволокнистою кістковою тканиною новоутворених трабекул з формуванням спільного безперервного ендосту. У ділянках компактної материнської кістки, які зберігали залишкові ознаки посттравматичної дезорганізації та гомогенізації кісткового матриксу, навколо гемокапілярів спостерігалась поява активних остеокластів, що підтверджувалось при імуногістохімічному дослідженні розподілу Calcitonin-SP17-клональних антитіл. Наявність численних лакун Гаушипа свідчила про активне відновлення ушкоджених унаслідок травми остеонів материнської кістки. Остеобласти за чисельністю переважали над іншими клітинами та розташовувались ізольовано або групами в товщі органічного матриксу трабекул поблизу ендосту материнської губчастої кістки, що поєднувалось з їх активним вrostанням всередину регенерату. Розподіл імуногістохімічної мітки Ki-67 вказував на високу проліферативну активність остеобластів, на відміну від інших сполучнотканинних клітин даної локалізації. При електронномікроскопічному дослідженні в цитоплазмі остеобластів спостерігались добре розвинуті синтетичні і секреторні цитоплазматичні структури. На відміну від контрольної групи, остеїд у даній локалізації містив значну кількість сформованих колагенових волокон, об'єднаних у пучки, з їх суттєвим переважанням над аморфним матриксом (рис. 4).

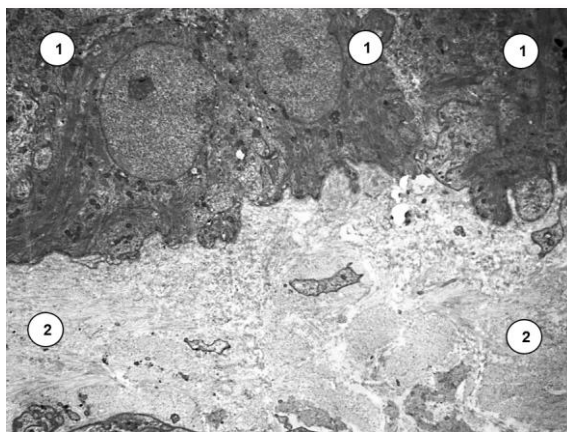


Рис. 4. Електронна трансмісійна мікрофотографія відновленої трабекули материнської кістки в ділянці заглиблення в регенерат нижньої щелепи кролика через 5 тижнів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом β-ТКФ. 1 – остеобласт; 2 – пучки колагенових волокон новоутвореного остеїду. ×3000.

На периферії кісткового регенерату спостерігались поліморфні грубоволокнисті кісткові трабекули з переважною радіальною орієнтацією, щільним анастомозуванням і поступовим переходом до губчастої архітектури при заглибленні в зону імплантації. В периферичних трабекулах кількісно переважали остеобласти. Помірна кількість остеоцитів значно перевищувала їх вміст при порівнянні з групою контролю. Остеокласти зустрічались переважно на межі кістково-керамічного регенерату з пластинчастою кістковою тканиною кортикальної пластинки материнської кістки, а також при переході відновлених трабекул материнської губчастої кістки в новоутворені грубоволокнисті трабекули регенерату. Поряд з тим фактом, що кількість остеокластів у даних ділянках була значно вищою, ніж у попередній термін експерименту і ніж у групі контрольних тварин, ультраструктурні ознаки активації остеокластів свідчили про початок ремоделювання периферичних ділянок грубоволокнистої кісткової тканини вже через 4 тижні після імплантації матеріалу β -ТКФ. На електроннограмах у складі більшості новоутворених трабекул визначалися щільно упаковані колагенові волокна з утворенням паралельних пучків і кісткових пластинок. Поряд із пластинками або між ними визначались гетероморфні великі за розмірами остеоцити з морфологічними ознаками обмеженої зрілості. Частина остеоцитів поблизу відновлених остеонів материнської кістки, навпаки, набувала характерних зрілих ознак, таких як зменшення маси цитоплазми, утворення відростків, редукція комплексу Гольджі та гранулярного ендоплазматичного ретикулуму.

У внутрішніх зонах кістково-керамічного регенерату виявлялись ділянки грубоволокнистої кісткової тканини, які містили щільну сітку примітивних гемокапілярів. Значна кількість остеобластів утворювала численні скупчення між островами десмального остеогенезу та мікросудинами. На відміну від периферичних трабекул, в ядрах остеобластів і їх клітин-попередниць спостерігалась інтенсивна експресія маркера проліферації Ki-67. Розподіл маркера CD34 вказував на активне утворення гемокапілярного русла в глибокій зоні регенерату, що, ймовірно, запобігало значному фіброзуванню даної зони, як це було характерно для контрольної групи.

На восьмому тижні посттравматичної регенерації після імплантації матеріалу β -ТКФ спостерігалось повне відновлення загальної тканинної структури періосту в зоні ушкодження та формування остеоцитарної лакуно-каналцевої системи у складі материнської кістки навколо експериментального дефекту. Загальна тканинна архітектура і розподіл клітинних субпопуляцій, а також досліджувані імуногістохімічні і ультраструктурні характеристики материнської кісткової тканини коміркової частини нижньої щелепи після остеопластики β -ТКФ не відрзнялись від групи

інтактних тварин.

На периферії кісткового регенерату новоутворені трабекули склалися переважно з пластинчастої кісткової тканини та містили розгалужену сітку мікросудин. Поліморфні кісткові пластинки примітивних остеонів межували з остеокластами, частина яких була представлена активними формами поблизу резорбційних лакун. Інша частина остеокластів інтенсивно накопичувала Calcitonin-SP17-мітку, що вказувало на гальмування їх резорбтивної активності. Застосування остеопластики матеріалом β -ТКФ супроводжувалось появою зрілих остеоцитів на периферії трабекул регенерату, а також у ділянках компактизації кісткових пластинок поблизу відновленого періосту. У заглиблених трабекулах губчастої кістки регенерату на тлі активного ремоделювання грубоволокнистої кісткової тканини з утворенням кісткових пластинок остеоцити мали ознаки структурно-функціональної незрілості. Зокрема, на електроннограмах в цитоплазмі великих безвідростчастих остеоцитів візуалізувались численні елементи комплексу Гольджі та гранулярної ендоплазматичної сітки. Навколо численних остеобластів пучки щільно упакованих паралельних колагенових волокон межували з осередками невпорядкованих фібрил та аморфним матеріалом низької електронної щільності.

Лакуно-каналцева система на периферії кістково-керамічного регенерату не виглядала сформованою. У міжтрабекулярних просторах новоутвореної губчастої кістки візуалізувались окремі ділянки мієлоїдної тканини. Інтеграція поверхні репаративного регенерату з материнською кісткою залишалась неповною.

У внутрішніх ділянках регенерату розташовувалась гетероморфна губчаста структура, яка складалася з примітивних кісткових пластинок, а також містила помітну кількість грубоволокнистої тканини. На відміну від групи контролю, після остеопластики з використанням β -ТКФ залишків хрящового остеогістогенезу не спостерігалось. Сполучнотканинні ділянки навколо мікросудин зустрічались рідко та мали вигляд тонких прошарків, збагачених на хаотично угруповані колагенові волокна. Серед остеогенних клітин переважали остеобласти, розташовані дифузно, в помірній кількості. Трансмісійна електронна мікроскопія показала високий вміст хаотично розташованих колагенових волокон та їх пучків поблизу остеобластів, які мали ознаки значної синтетичної і секреторної активності. На відміну від спостережень у контрольній групі, обмежена кількість активних остеокластів з низькою Calcitonin-SP17-реактивністю виявлялася лише у ділянках грубоволокнистої кісткової тканини незначної частини кісткових трабекул, що піддавались ремоделюванню.

Через 12 тижнів після імплантації матеріалу β -ТКФ поряд із повним відновленням структури

періосту в зоні ушкодження відбувалось формування остеокитарної лакуно-каналцевої системи з ознаками типової будови у зоні зовнішньої кісткової пластинки. На відміну від групи контролю, після застосування остеотропного матеріалу осередки незавершеного остеогенезу або неповного ремоделювання не виявлялись, остеони регенерату за своєю структурою та геометрією не відрізнялись від будови інтактної материнської кістки.

Кісткові трабекули в периферичних ділянках регенерату мали гладку поверхню без ознак новоутворення остеїду, містили розвинену мікросудинну сітку та суттєво меншу у порівнянні з попереднім терміном кількість остеогенних клітин. Низька інтенсивність імуногістохімічної мітки проліферативного маркера Ki-67, а також невелика кількість остеокластів і остеобластів поряд із численними зрілими остеокитами свідчили про завершення процесів ремоделювання периферичних трабекул регенерату. Проте, мікроархітектура та форма остеонів регенерату широко варіювали та помітно відрізнялись від типової будови інтактних остеонів. За допомогою електронної мікроскопії між пучками паралельних колагенових волокон сусідніх кісткових пластинок візуалізувались прошарки аморфного матеріалу низької електронної щільності, які варіювали за товщиною та опосередковано вказували на незавершений характер мінералізації кісткового матриксу.

Як і в контрольній групі, після застосування β -ТКФ спостерігалось утворення мієлоїдної тканини у міжтрабекулярних просторах на периферії репаративного регенерату, в той час як глибока зона регенерату осередків кровотворення не містила. Інтеграція поверхні кістково-керамічного регенерату з материнською кісткою була значно кращою, ніж у тварин групи контролю, проте на світлооптичному рівні демаркація в деяких ділянках зберігалась у вигляді варіативної за товщиною смужки неструктурованого матеріалу.

У глибокій зоні регенерату трабекули складались переважно зі сформованих кісткових пластинок, проте їх геометрія широко варіювала та відрізнялась від зрілих структур материнської кістки. При ультраструктурному дослідженні вони містили щільно упаковані паралельні фібрили з незначною часткою аморфного матеріалу новоутвореного остеїду. Переважна частина остеокитів між кістковими пластинками мала ознаки структурно-функціональної зрілості; окремі остеокити, навпаки, мали розвинуту цитоплазму, майже не утворювали відростків, містили елементи комплексу Гольджі та гранулярного ретикулumu (рис. 5).

В окремих глибоких ділянках регенерату зустрічались осередки грубоволокнистої кісткової тканини, які містили помірну кількість активних остеокластів. При імуногістохімічному вивченні розподілу Calcitonin-SP17-позитивних остеоклас-

тів виявлялась висока активність резорбції грубоволокнистої тканини трабекул у глибокій зоні регенерату, в той час як пластинчаста тканина більшості трабекул губчастої кістки регенерату містила остеокласти з обмеженою функціональною активністю. Між гетероморфними кістковими трабекулами у стані ремоделювання спостерігались дрібні вогнища фіброзування, які містили поодинокі фіброblastи та помірну кількість CD34-позитивних ендотеліальних елементів. При трансмісійній електронній мікроскопії в ділянках фіброзу візуалізувались функціонуючі гемокапіляри з суцільною ендотеліальною стінкою і замкнутими міжендотеліальними контактами в оточенні гетероморфних пучків зрілих колагенових волокон з хаотичною орієнтацією (рис. 6).

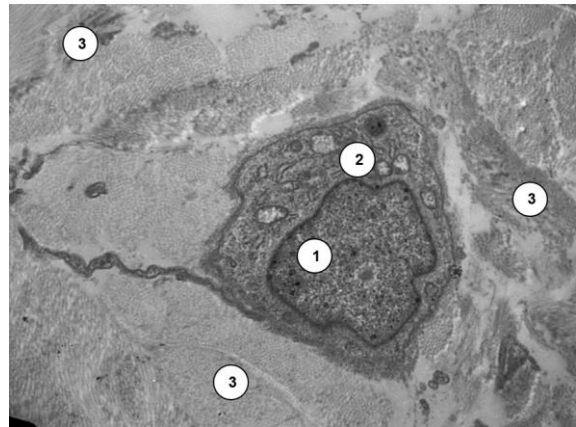


Рис. 5. Електронна трансмісійна мікрофотографія глибокої ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 12 тижнів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом β -ТКФ. 1 – ядро незрілого остеокита; 2 – залишки цитоплазми остеокита; 3 – пучки колагенових волокон примітивних кісткових пластинок. $\times 3000$.



Рис. 6. Електронна трансмісійна мікрофотографія глибокої ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 12 тижнів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом β -ТКФ. 1 – ядро ендотеліоцита; 2 – відросток фіброblastа; 3 – пучки колагенових волокон в осередку фіброзу. $\times 2500$.

За своєю загальною площею ділянки фіброзу помітно поступались контрольній групі. Аналіз

розподілу експресії маркера Ki-67 виявив помірний проліферативний потенціал ендотеліоцитів у трабекулах глибокої зони регенерату, в той час як істотна щільність Ki-67-позитивних ядер остеобластів, на відміну від групи контролю, свідчила про їх помірну проліферацію в глибокій зоні регенерату.

Висновки

1. Альтеративні зміни кісткової тканини коміркової частини нижньої щелепи після утворення трепанційного отвору супроводжуються формуванням гетероморфних остеїдних виростів на поверхні ушкоджених остеонів і кісткових трабекул починаючи з першого тижня після травми за рахунок проліферації остеобластів з наступним зростанням їх синтетичної активності. Впродовж перших трьох тижнів після травми загоєння дефекту під кров'яним згустком здійснюється через утворення численних острівців перетинчастого остеогенезу в грануляційній тканині на тлі інтенсивного неоваскулогенезу з паралельною міграцією й активацією остеопрогеніторних клітин з їх наступним цитодиференціюванням, що через три тижні експерименту призводить до формування та анастомозування примітивних кісткових трабекул на периферії регенерату. Обмежена васкуляризація глибокої зони експериментального дефекту в перші три тижні після травми супроводжується активним фіброзуванням та утворенням дрібних відокремлених осередків хрящового остеогенезу.

2. Через 5 тижнів у периферичних ділянках кісткового регенерату з боку трабекул материнської кістки ініціюється ремоделювання грубоволокнистого матриксу в примітивні кісткові пластинки з появою незрілих остеоцитів. У внутрішні ділянки регенерату поширюється губчаста структура новоутворених грубоволокнистих кісткових трабекул за рахунок інтенсивної проліферації остеобластів і активації ангиогенезу. Через 8 тижнів загоєння утворюється добре васкуляризована суцільна губчаста структура кісткового регенерату, глибока зона якого зберігає численні дрібні ділянки фіброзу. Через 12 тижнів репаративний регенерат частково інтегрований з материнською кісткою, переважно за рахунок анастомозування її зрілих трабекул з новоутвореною губчастою кісткою регенерату. Пластинчаста кісткова тканина на периферії регенерату широко варіює за гістоархітектурою та ступенем диференціювання остеобластів і остеоцитів, відрізняючись від зрілих остеонів материнської кістки. Глибока зона регенерату поряд із численними ділянками фіброзу містить трабекули з ознаками активного ремоделювання грубоволокнистої кісткової тканини, що призводить до утворення примітивних кісткових пластинок з переважанням незрілих остеоцитів.

3. Імплантація матеріалу β -ТКФ не впливає на характер і динаміку альтеративних змін материнської кісткової тканини коміркової частини

нижньої щелепи після травми, проте протягом 2-3-го тижнів експерименту зумовлює суттєве збільшення кількості і щільності осередків перетинчастого остеогенезу на периферії кісткового регенерату з їх подальшим анастомозуванням і об'єднанням з кістковими трабекулами материнської губчастої кістки. Реалізація остеокондуктивного потенціалу синтетичних гранул β -ТКФ відбувається через створення умов для активного неоваскулогенезу, міграції та цитодиференціювання остеогенних клітин, причому означені процеси розповсюджуються хвилеподібно від периферії до глибокої зони регенерату. Ультраструктура остеобластів поблизу межі з материнською кісткою свідчить про обмеження їх синтетичної активності, в той час як остеобласти у товщі керамічно-кісткового регенерату інтенсивно синтезують аморфний і волокнистий компоненти остеїду. В глибокій зоні імплантату поява функціонуючих мікросудин запобігає формуванню осередків хрящового матриксу та обмежує ступінь фіброзування, що супроводжується утворенням острівців десмального остеогенезу.

4. Через 5 тижнів після імплантації синтетичного β -ТКФ у периферичних ділянках кістково-керамічного регенерату відбувається інтенсивне ремоделювання грубоволокнистого матриксу в примітивні кісткові пластинки, причому відновлені остеони материнської кістки, прилеглої до зони імплантації, а також структури відновленого періосту стимулюють появу зрілих остеоцитів у новоутворених трабекулах регенерату. Імплантація синтетичного кальційфосфатного матеріалу суттєво прискорює розповсюдження хвилі ремоделювання кісткової тканини від периферії вглиб регенерату в період з 4-го до 12-го тижнів експерименту, проте не забезпечує повної остеointegraції імплантату на клітинному рівні та відновлення якості фібрилогенезу на ультраструктурному рівні, не запобігає частковому фіброзуванню глибокої зони регенерату та не забезпечує повного відновлення остеоцитарної лакуно-каналцевої системи.

Перспективи подальших досліджень пов'язані з порівняльним аналізом тканинних, клітинних і ультраструктурних характеристик процесів регенерації нижньої щелепи після її травматичного ушкодження із наступною імплантацією різних 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 імуністохімічні 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):2445-61. <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. Rolvien T, Barvencik F, Klatte TO, et al. β -TCP bone substitutes in tibial plateau depression fractures. *Knee*. 2017;24(5):1138-45. <https://doi.org/10.1016/j.knee.2017.06.010>
4. Shen C, Ma J, Chen XD, Dai LY. The use of beta-TCP in the surgical treatment of tibial plateau fractures. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2009;17(12):1406-11. <https://doi.org/10.1007/s00167-009-0726-z>
5. Scheer JH, Adolphsson LE. Tricalcium phosphate bone substitute in corrective osteotomy of the distal radius. *Injury*. 2009;40(3):262-7. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2008.08.013>
6. Szabó G, Huys L, Coulthard P, et al. A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: histologic and histomorphometric evaluation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20(3):371-81.
7. Stiller M, Kluk E, Bohner M, Lopez-Heredia MA, Müller-Mai C, Knabe C. Performance of β -tricalcium phosphate granules and putty, bone grafting materials after bilateral sinus floor augmentation in humans. *Biomaterials*. 2014;35(10):3154-63. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.068>
8. Trombelli L, Franceschetti G, Stacchi C, et al. Minimally invasive transcrestal sinus floor elevation with deproteinized bovine bone or β -tricalcium phosphate: a multicenter, double-blind, randomized, controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2014;41(3):311-9. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12210>
9. Bohner M, Santoni BLG, Döbelin N. β -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomater*. 2020;113:23-41. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.06.022>
10. Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Rossi F, Perale G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial?. *J Clin Periodontol*. 2019;46(21):92-102. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13058>
11. 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):232-43. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.73.BJR-2017-0270.R1>
12. Everts V, Niehof A, Tigchelaar-Gutter W, Beertsen W. Transmission Electron Microscopy of Bone. *Methods Mol Biol*. 2019;1914:617-29. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8997-3_32
13. 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>
14. 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>
15. Suvana 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>
16. 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
17. Nguyen T. *Immunohistochemistry: A Technical Guide to Current Practices*. Cambridge: Cambridge University Press; 2022. 272 p.
18. Glauret 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>
19. Hayat MA. *Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications* [4th ed.]. Cambridge : Cambridge University Press; 2000. 543 p.
20. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasburg: 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. Ремоделювання кістки нижньої щелепи після трансплантації β -трикальційфосфату: гістологічні, імуногістохімічні та ультраструктурні аспекти.

РЕФЕРАТ. У статті представлені результати дослідження гістологічних, імуногістохімічних та ультраструктурних характеристик кістково-керамічного регенерату після трансплантації β -трикальційфосфату (β -ТКФ) 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 β -ТКФ. **Методи.** Досліди виконано на 45 кроликах-самцях віком 6-7 міс, масою 2,5-3,0 кг. 20 тварин становили контрольну групу, 20 – експериментальну. 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. Експериментальну групу складали кролики, у яких кістковий дефект заповнювали матеріалом β -ТКФ. 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. **Результати та підсумок.** Імплантація матеріалу β -ТКФ не впливає на характер і динаміку альтеративних змін материнської кісткової тканини коміркової частини нижньої щелепи після травми, проте протягом 2-3-го тижнів експерименту зумовлює суттєве збільшення кількості і щільності осередків перетинчастого остеогенезу на периферії кісткового регенерату з їх подальшим анастомозуванням і об'єднанням з кістковими трабекулами материнської губчастої кістки. Реалізація остеокондуктивного потенціалу синтетичних гранул β -ТКФ відбувається через створення умов для активного неоваскулогенезу, міграції та цитодиференціювання остеогенних клітин, причому означені процеси розповсюджуються хвилеподібно від периферії до глибокої зони регенерату. Ультраструктура остеобластів поблизу межі з материнською кісткою свідчить про обмеження їх синтетичної активності, в той час як остеобласти у товщі керамічно-кісткового регенерату інтенсивно синтезують аморфний і волокнистий компоненти остеоїду. В глибокій зоні імплантату поява функціонуючих мікросудин запобігає формуванню осередків хрящового матриксу та обмежує ступінь фіброзування, що супроводжується утворенням острівців десмального остеогенезу. Через 5 тижнів після імплантації синтетичного β -ТКФ у периферичних ділянках кістково-керамічного регенерату відбувається інтенсивне ремоделювання грубоволокнистого матриксу в примітивні кісткові пластинки, причому відновлені остеони материнської кістки, прилеглі до зони імплантації, а також структури відновленого періосту стимулюють появу зрілих остецитів у новоутворених трабекулах регенерату. Імплантація синтетичного кальційфосфатного матеріалу суттєво прискорює розповсюдження хвилі ремоделювання кісткової тканини від периферії вглиб регенерату в період з 4-го до 12-го тижнів експерименту, проте не забезпечує повної остеоінтеграції імплантату на клітинному рівні та відновлення якості фібрилогенезу на ультраструктурному рівні, не запобігає частковому фіброзуванню глибокої зони регенерату та не забезпечує повного відновлення остеоцитарної лакуно-канальцевої системи.

Ключові слова: нижня щелепа, зубощелепний апарат, регенерація кісткової тканини, β -трикальційфосфат, гістоструктура, імуногістохімія, ультраструктура.

К.Л. Шамелашвілі

Дніпровський державний
медичний університет
Дніпро, Україна

Надійшла: 14.10.2024
Прийнята: 15.12.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.114-119>

УДК 46.719:54.024:577.151:616-006.69

АНТИОКСИДАНТНА І ПРОТИПУХЛИН- НА АКТИВНІСТЬ НАНОЛІПОСОМ ТА ТВЕРДИХ НАНОЧАСТОК, НАВАНТАЖЕ- НИХ РЕНІЙ-ПЛАТИНОВОЮ СИСТЕ- МОЮ У ЩУРІВ З КАРЦИНОМОЮ ГЕ- РЕНА

Shamelashvili K.L.   Antioxidant and antitumor activity of nanoliposomes and solid nanoparticles loaded with rhenium-platinum system in rats with Guerin carcinoma.

Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Despite significant progress in recent decades in the development of chemotherapeutic agents with high efficacy and tolerability, cancer treatment often continues to be challenging due to adverse effects and drug resistance developed by tumor cells. These problems still call for research into new treatments that combine good efficacy and selectivity. **Objective** of the work was to investigate the effect of the administration of rhenium(III) cluster compounds on the intensity of lipid peroxidation (LPO), the activity of erythrocyte antioxidant protection enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GP) in a model of tumor growth (Herren's carcinoma). **Methods** - experimental models of carcinogenesis (development of Geren's carcinoma). Photocolorimetric methods - to determine the content of TBC-active products and the activity of antioxidant protection enzymes (catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase) in the blood of rats. **Results.** Administration of Re tetraisobut alone in the form of nanoliposomes and solids was not effective in inhibiting the growth of Geren's carcinoma, however, it led to a significant decrease in the intensity of LPO in the blood plasma compared to the group of tumor-bearing rats, group T8. The introduction of the Re-Pt system led not only to a significant inhibition of tumor growth, but also to a significant decrease (normalization) of the concentration of LPO products. Encapsulation of the Re-Pt system in one nanoliposome or in a solid nanoparticle did not lead to the loss of anticarcinogenic and antioxidant properties of its components. The introduction of the Rhenium-Platinum system and its components led to an increase in the activity of SOD of erythrocytes and a decrease in the activity of CAT in comparison with the control and an increase in the activity of SOD in comparison with the group of tumor-bearing rats. It should be noted that the introduction of Re tetraisobut did not lead to the activation of CAT in comparison with the control group. When the Re-Pt system was introduced separately and in the system, an increase in the activity of HP was observed compared to the T8 group. **Conclusion.** Therefore, the normalization of the redox state of erythrocytes under the influence of Re tetraisobut in different forms of administration can be explained both by the activation of SOD, as a result of which the concentration of superoxide anion decreases, and by the activation of HP, which leads to a decrease in the concentration of hydrogen peroxide.

Key words: Guerin carcinoma, lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase.

Citation:

Shamelashvili KL. [Antioxidant and antitumor activity of nanoliposomes and solid nanoparticles loaded with rhenium-platinum system in rats with Guerin carcinoma]. Morphologia. 2024;18(4):114-9. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.114-119>

 Shamelashvili K.L. 0000-0001-5509-3011

 Shamelashvili2018@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Рак – смертельно небезпечне захворювання, що характеризується неконтрольованим зростанням та поширенням аномальних клітин, що призводить до 9,6 мільйонів смертей і посідає друге місце серед провідних світових причин смерті [1].

Останнім часом дедалі більше досліджень демонструють чітку кореляцію між окислювальним стресом та виникненням/розвитком раку [2,3,4]. Окислювальний стрес визначається як нефізіологічний стан організму, при якому спостерігається виражений дисбаланс між продукцією речовин з окисними властивостями та

функціонуванням ендогенних захисних систем з антиоксидантною здатністю. Речовин з окисними властивостями зазвичай класифікуються на активні форми кисню, азоту, сірки та хлору. Активні форми кисню (АФК) виробляються найчастіше і є найшкідливішими. До них відносяться супероксидний аніон-радикал ($O_2^{\bullet-}$), гідроксильний радикал ($OH^{\bullet}$), гідроксильний іон (OH^-), перекис водню (H_2O_2), синглетний кисень (1O_2) та озон (O_3) [5]. Вони можуть бути викликані екзогенними джерелами (наприклад, УФ-випромінюванням, токсичними речовинами, лікарськими засобами), фізіологічними змінами (наприклад, стресовими станами, хронічними запальними станами, старінням) або ендогенними джерелами (наприклад, побічними продуктами мітохондріального дихального ланцюга, трансмембран -оксидази, мієлопероксидазою у фагоцитах) [6]. В нормальних фізіологічних умовах оксидативний стрес контролюється достатньою присутністю кофакторів метаболічних шляхів з властивостями поглиначів вільних радикалів (наприклад, віт. С, віт. Е, CoQ10) та активністю антиоксидантних ферментів, таких як каталаза (КАТ), супероксиддисмутаза (СОД). Навпаки, неконтрольований оксидативний стрес відіграє ключову роль канцерогенезі; його дія відбувається через кілька шляхів, включаючи пряме окисне пошкодження ДНК, нестабільність генетичного матеріалу, втручання в сигнальні шляхи росту пухлини та запрограмовану загибель клітин, продукцію цитокінів, хемокінів та медіаторів імунної системи тощо [7].

Металоорганічні речовини представляють собою перспективний клас антиканцерогенних сполук, оскільки атом(и) металу у їхньому складі обумовлюють значно більший редокс-потенціал, ніж мають суто органічні молекули [8.], а регуляція редокс-стану ракової клітини і малігнізованих тканин відноситься до однієї з найперспективніших стратегій антиракової терапії [9].

У сучасних роботах, присвячених біохімії редокс системи клітини і організму, підкреслюється, що антиоксидантні властивості препаратів можуть відігравати вирішальну роль у кореляції патологічних станів, в тому числі і в протипухлинній активності. У наших попередніх дослідженнях показано що кластерні сполуки Ренію(III) містять унікальний почверний зв'язок, мають антиканцерогенну активність та знижують інтенсивність оксидативного стресу при канцерогенезі.

Таким чином метою роботи було дослідити вплив різних форм введення сполуки Ренію (наноліпосоми, тверді наночастки) окремо і разом з цисплатиною на інтенсивність ПОЛ та активність СОД, КАТ і глутатіонпероксидази (ГП) крові щурів-пухлиноносців.

Матеріали та методи

Кластерні сполуки Ренію(III) з органічними

лігандами та цисплатин (сРt) було синтезовано на кафедрі неорганічної хімії УДХТУ (м. Дніпро) [10]. У роботі використовували $Re_2(i-C_3H_7COO)_4Cl_2$ – дихлоротетра-μ-ізобутиратодиреній(III) ($Re_{tetraisobut}$). Експеримент з вивчення протипухлинної та антиоксидантної активності сполук Ренію проводили на щурах з карциномою Герена (Т8) згідно процедури, детально описаній в [11]. Кластерні сполуки Ренію і цисплатин вводили: 1 спосіб – введення окремо сполук Ренію у наноліпосомній формі ту у формі твердих наночастинок – групи $T8+[Re_{tetraisobut}]nl$, $T8+[Re_{tetraisobut}]np$; 2 спосіб – введення компонентів протипухлинної системи Реній-Платина (Re-Pt), де сполука Ренію у наноліпосомах та у формі твердих наночастинок та сРt у розчині вводилися окремо – групи $T8+[Re_{tetraisobut}]nl+cPt$, $T8+[Re_{tetraisobut}]np+cPt$; 3 спосіб – введення системи Re-Pt у вигляді змішаних наноліпосом та твердих наночастинок, де обидва цитостатики знаходилися всередині ліпідної нанокapsули у молярному співвідношенні 4:1, групи – $T8 + [Re_{tetraisobut} + cPt(4:1)] nl$, $T8 + [Re_{tetraisobut} + cPt(4:1)] np$, та 4:2 групи $T8 + [Re_{tetraisobut} + cPt(4:2)] nl$, $T8 + [Re_{tetraisobut} + cPt(4:2)] np$. На 21 день після трансплантації пухлини проводили декапітацію щурів під етерним наркозом та визначали масу пухлини, активність супероксиддисмутази (СОД), активності каталази (КАТ), глутатіонпероксидази (ГП) та концентрацію ТБК-активних продуктів у плазмі крові та еритроцитах, визначали еритроцитарну стійкість за загальноприйнятими та описаними раніше [11] методами.

Результати та обговорення

Обрана модель пухлинного росту – карцинома Герена (Т8) – характеризується інтенсивним ростом та на 21 день після трансплантації ракових клітин досягає маси 50 - 65 г, що складає 20 – 40 % маси тіла тварини (Табл. 1).

У групі Т8 спостерігалось значне підвищення (більш ніж у 6 разів) концентрації ТБК-активних продуктів, що свідчить про інтенсифікацію процесу ПОЛ, притаманну «радикальному вибуху» у цій моделі. При дії сРt (група сРt) маса пухлини на 21 добу у 3,5 рази менше порівняно з групою Т8. Також практично вдвічі знижується інтенсивність ПОЛ у плазмі крові щурів з карциномою Герена, яким вводили цисплатин, завдяки гальмуванню росту пухлини.

За введення $Re_{tetraisobut}$ внутрішньочеревно (групи $T8 + [Re_{tetraisobut}] nl$, $T8 + [Re_{tetraisobut}] np$,) маса пухлини зменшувалась в 1,3-1,8 рази, тобто, набагато менше, ніж за введення сРt. Вміст ТБК-активних продуктів в групах $T8 + [Re_{tetraisobut}] nl$, $T8 + [Re_{tetraisobut}] np$ зменшується в 2, 7 та 4,3 рази відповідно порівняно з групою Т8, та в групі $T8 + [Re_{tetraisobut}] np$ відбувається зменшення цього показника на 41% порівняно з групою де вводили лише сРt.

Таблиця 1

Маса пухлини, індекс гальмування пухлини та концентрація ТБК-активних продуктів в плазмі тварин за введення сполук Ренію з тетраізобутиратним лігандом ($\text{Re}_{\text{tetraisobut}}$) способом 1, $n = 8 - 10$

	Експериментальні групи	Маса пухлини, г	Гальмування, % до Т8	Вміст ТБК, мкмоль/л
1	Контроль	-	-	$7,69 \pm 0,38$
2	Т8	$63,27 \pm 3,16$	-	$52,88 \pm 2,64 \#$
3	cPt	$17,72 \pm 0,89^{**}$	$71,99 \pm 3,60$	$21,16 \pm 1,06 \#, *$
4	$\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraisobut}}] \text{ nl}$	$45,64 \pm 2,15^*$	$27,86 \pm 1,39^*$	$19,50 \pm 0,90^{**\#}$
5	$\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraisobut}}] \text{ np}$	$34,68 \pm 2,46^*$	$45,18 \pm 2,26^*$	$12,44 \pm 0,60^{**\#}$
6	$\text{T8} + \text{cPt} + [\text{Re}_{\text{tetraisobut}}] \text{ nl}$	$1,98 \pm 0,11^{***}$	$96,87 \pm 4,84^{***}$	$11,90 \pm 0,62^{***\#}$
7	$\text{T8} + \text{cPt} + [\text{Re}_{\text{tetraisobut}}] \text{ np}$	$0,93 \pm 0,05^{***}$	$98,53 \pm 4,93^{***}$	$8,65 \pm 0,43^{**}$
8	$\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraisobut}} + \text{cPt}(4:1)] \text{ nl}$	$1,38 \pm 0,07^{***}$	$97,82 \pm 4,89^{***}$	$7,53 \pm 0,38^{**}$
9	$\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraisobut}} + \text{cPt}(4:1)] \text{ np}$	$2,39 \pm 0,12^{***}$	$96,22 \pm 4,81^{***}$	$12,72 \pm 0,64^{**\#}$
10	$\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraisobut}} + \text{cPt}(4:2)] \text{ nl}$	$18,13 \pm 0,90^{**}$	$71,35 \pm 3,57^{**}$	$10,90 \pm 0,55^{**\#}$
11	$\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraisobut}} + \text{cPt}(4:2)] \text{ np}$	$30,03 \pm 1,51^*$	$52,54 \pm 2,63^*$	$26,44 \pm 1,22^{*\#}$

– $P < 0,05$ відносно контрольної групи,

* – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$ відносно групи Т8.

Отже, окреме введення $\text{Re}_{\text{tetraisobut}}$ шурам-пухлиноносійм показало помірну протипухлинну активність $\text{Re}_{\text{tetraisobut}}$, здатність цієї кластерної сполуки до гальмування оксидативного стресу крові тварин та перспективність використання твердих наночастинок у терапії для пошуку нових класів протипухлинних засобів.

Введення компонентів системи Re-Pt є зразком ефективного, практично повного гальмування росту перещепленої пухлини. В групах Т8 + $[\text{Re}_{\text{tetraisobut}}] \text{ nl}$, Т8 + $[\text{Re}_{\text{tetraisobut}}] \text{ np}$ ріст пухлини знижується в 34 та 68 рази порівняно з групою Т8. Слід зазначити, що введення компонентів системи Re-Pt призводить не тільки до значного гальмування росту пухлини, але й до значного зниження (нормалізації) концентрації продуктів ПОЛ. Тобто в групі Т8 + $[\text{Re}_{\text{tetraisobut}}] \text{ nl}$ вміст ТБК-активних продуктів зменшується в 4,4 рази порівняно з групою Т8, а в групі Т8 + $[\text{Re}_{\text{tetraisobut}}] \text{ np}$ в 6, 1 рази порівняно з тією же групою і наближується до рівня контролю.

Отримані результати з ефективності системи Re-Pt стали поштовхом для створення нових нанопорм, а саме розробки форм наноліпосом та на-

ночастинок, які б містили всередині ліпідної нанокapsули обидва цитостатики – cPt і $\text{Re}_{\text{tetraisobut}}$.

Як було відмічено в літературному огляді такі змішані наноліпосоми та тверді наночастки були синтезовані і охарактеризовані. Введення піддослідним тваринам комбінованої системи Re-Pt у змішаних наноліпосомах (Т8+ $[\text{Re}_{\text{tetraisobut}} + \text{cPt}(4:1)] \text{ nl}$) і наночастиках (Т8+ $[\text{Re}_{\text{tetraisobut}} + \text{cPt}(4:1)] \text{ np}$) виявилось також ефективним, як з точки зору протипухлинних властивостей (маса пухлини менша в 42 та 26 разів відповідно в порівнянні з групою Т8), так і антиоксидантних (вміст ТБК-активних продуктів знизився в 7 та 4 рази відповідно, порівняно з групою Т8), за виключенням експериментів, де було збільшено кількість цисплатини всередині нанокapsули (групи Т8+ $[\text{Re}_{\text{tetraisobut}} + \text{cPt}(4:2)] \text{ nl}$, Т8+ $[\text{Re}_{\text{tetraisobut}} + \text{cPt}(4:2)] \text{ np}$). Можливість варіювання вмістом цитостатиків всередині нанокapsули, на нашу думку, є значним кроком уперед в напрямку нанотехнологій та комбінаційної терапії у лікуванні раку.

Окрім вмісту ТБК-активних продуктів в плазмі крові, вивчався також вміст ТБК-активних продуктів в еритроцитах (Табл. 2).

Таблиця 2

Концентрація ТБК-активних продуктів в еритроцитах експериментальних тварин, $n = 8 - 10$

	Експериментальні групи	Вміст ТБК, мкмоль/л
1	Контроль	$7,54 \pm 0,38^{**}$
2	Т8	$50,74 \pm 2,54\#$
3	Т8 + cPt	$20,36 \pm 1,01^*$
4	$\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraisobut}}] \text{ nl}$	$19,75 \pm 0,99^*$
5	$\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraisobut}}] \text{ np}$	$13,19 \pm 0,66^*$
6	$\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraisobut}}] \text{ nl} + \text{cPt}$	$10,45 \pm 0,52^{**}$
7	$\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraisobut}}] \text{ np} + \text{cPt}$	$7,76 \pm 0,39^{**}$
8	$\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraisobut}} + \text{cPt}(4:1)] \text{ nl}$	$8,24 \pm 0,41^{**}$
9	$\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraisobut}} + \text{cPt}(4:1)] \text{ np}$	$13,68 \pm 0,68^*$

– $P < 0,05$ відносно контрольної групи,

* – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$ відносно групи Т8

Порівнюючи інтенсивність перекисного окиснення ліпідів в еритроцитах та в плазмі крові щурів можна побачити, що не має суттєвої різниці між вмістом ТБК-активних продуктів як в контрольних групах і групах щурів-пухлиноносіїв, так і за введення дослідних сполук Ренію. Тобто, не зважаючи на форму введення кластерних сполук Ренію відбувається зниження інтенсивності ПОЛ в еритроцитах щурів за розвитку карциноми Герена.

Якщо відомі антиоксиданти призводять до

зниження інтенсивності ПОЛ крові за різних патологій максимально у 1,5 – 2 рази, то ефективність гальмування процесу ПОЛ сполукою $\text{Re}_{\text{tetraiso-but}}$ набагато перевищує ефективність відомих антиоксидантів і досягає чотирьохкратної величини.

У наших експериментах розвиток оксидативного стресу (група Т8) призводить до зниження активності еритроцитарних СОД (на 14 %) та КАТ (на 59 %) у порівнянні з контролем (Табл. 3).

Таблиця 3

Активність ензимів антиоксидантного захисту еритроцитів експериментальних тварин (у % до контролю), $n = 8 - 10$

	Експериментальні групи	Активність СОД, %	Активність КАТ, %
1	Контроль	100,00	100,00
2	Т8	$85,92 \pm 5,20\#$	$41,08 \pm 2,05\#$
3	cPt	$291,49 \pm 6,62\#, *$	$66,70 \pm 3,34\#\#$
6	$\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraiso-but}}] \text{ nl}$	$294,00 \pm 10,24^{***\#}$	$90,46 \pm 5,02^*$
7	$\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraiso-but}}] \text{ np}$	$262,15 \pm 8,15^{***\#}$	$94,46 \pm 4,32^*$
10	$\text{T8} + \text{cPt} + [\text{Re}_{\text{tetraiso-but}}] \text{ nl}$	$280,15 \pm 7,56^{***\#}$	$68,14 \pm 3,26\#\#$
11	$\text{T8} + \text{cPt} + [\text{Re}_{\text{tetraiso-but}}] \text{ np}$	$246,18 \pm 6,16^{***\#}$	$82,14 \pm 4,12\#\#$
12	$\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraiso-but}} + \text{cPt}(4:1)] \text{ nl}$	$318,46 \pm 11,56^{***\#}$	$72,18 \pm 4,12\#\#$
13	$\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraiso-but}} + \text{cPt}(4:1)] \text{ np}$	$306,15 \pm 8,14^{***\#}$	$84,18 \pm 5,46\#\#$
16	$\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraiso-but}} + \text{cPt}(4:2)] \text{ nl}$	$261,18 \pm 8,14^{***\#}$	$62,16 \pm 4,14\#\#$
17	$\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraiso-but}} + \text{cPt}(4:2)] \text{ np}$	$274,15 \pm 8,45^{***\#}$	$60,12 \pm 3,96\#$

#– $P < 0,05$ відносно контрольної групи,

*– $P < 0,05$; **– $P < 0,01$; ***– $P < 0,001$ відносно групи Т8

Введення цисплатину (група cPt) призводить до значного підвищення активності (практично втричі) СОД і зменшення активності КАТ (в 1,5 рази) у порівнянні з контролем і підвищення активності СОД і КАТ у порівнянні з групою Т8. Введення $\text{Re}_{\text{tetraiso-but}}$ призводить до активації СОД у порівнянні з контролем (в 2-3,1 рази) та у порівнянні з групою пухлиноносіїв (в 2,1 – 3,3 рази) та цисплатиновою групою (на 5-9 % для груп $\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraiso-but}} + \text{cPt}(4:1)] \text{ nl}$, $\text{T8} + [\text{Re}_{\text{tetraiso-but}} + \text{cPt}(4:1)] \text{ np}$). Активність КАТ збільшується у групах, де вводили $\text{Re}_{\text{tetraiso-but}}$ в 1,5-2,3 рази у порівнянні з групою Т8 і та в 1,4 рази максимум у порівнянні з цисплатиновою групою, хоча не досягає контрольних значень.

Дані щодо різного впливу сполук Re та Pt на активність СОД і КАТ можна пояснити, по-перше, різним їх впливом на еритропоез. Зокрема, за канцерогенезу відбувається пригнічення Nrf-2 (еритроїд-похідного) ядерного фактору, який регулює експресію антиоксидантних ензимів; кластерні сполуки Ренію підтримують процес еритропоезу за розвитку новоутворення; цисплатин пригнічує еритропоез, формуються еритроцити із менш коротким строком життя, проте з більшою кількістю СОД.

З іншого боку, металоорганічні сполуки мо-

жуть безпосередньо взаємодіяти з ензимами антиоксидантного захисту еритроцитів. Однак, відомо, що цисплатин за безпосередньої взаємодії дезактивує ензими СОД і КАТ, зв'язуючись з тіоловими залишками цистеїну. В той же час для сполук Ренію безпосередня активація ензимів можлива.

Інтерпретація даних стосовно активності КАТ ускладнюється тим, що в еритроцитах існує ще один ензим, який розкладає гідроген пероксид – глутатіонпероксидаза. Оскільки активність КАТ зменшувалася в крові експериментальних щурів порівняно з контролем в усіх групах, то для деяких груп додатково було проведено дослідження активності ГП (Рис. 1).

В процесі росту перещепленої карциноми Герена активність ГП знижується на 50 %, порівняно з контролем. Причини зниження активності цього ензиму, вірогідно, такі самі, як і для інших ензимів антиоксидантного захисту. Введення cPt не вплинуло на активність ензиму у порівнянні з групою щурів-пухлиноносіїв (Т8), не дивлячись на значний протипухлинний ефект cPt. Оскільки ГП є глутатіон-залежним ензимом, то необхідно зазначити, що cPt безпосередньо взаємодіє з глутатіоном та специфічно зв'язується з селеновими і тіоловими групами в активному центрі ГП, що призводить до інактивації ензиму. Вірогідно, саме

тому за значного гальмування пухлини рівень активності ГП не зростає.

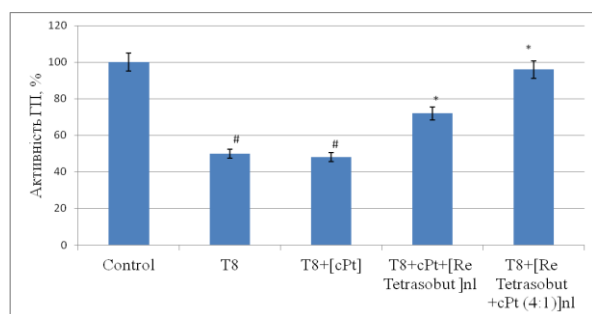


Рис. 1 Активність глутатіонпероксидази еритроцитів в деяких групах експериментальних тварин. #– $P < 0,05$ відносно контрольної групи, *– $P < 0,05$ відносно групи T8.

За введення системи Re-Pt окремо та у вигляді системи спостерігалось підвищення активності ензиму на 22-77 % порівняно з групою T8. Отже, нормалізація редокс-стану еритроцитів під дією $\text{Re}_{\text{Tetrasobut}}$ може бути пояснена як активацією СОД, внаслідок чого зменшується концентрація супероксидного аніону, так і активацією ГП, яка призводить до зниження концентрації гідроген пероксиду. Активація ензимів антиоксидантного захисту еритроцитів і зниження концентрації активних форм кисню обумовлює зниження інтенсивності процесу ПОЛ самої клітини і всього організму в цілому.

Активація еритроцитарної СОД за введення деяких сполук Ренію була пояснена нами їхньою СОД-подібною активністю або можливою взаємодією з молекулою СОД із наступною зміною конформації апоензиму та відповідним підсиленням швидкості реакції у активному центрі ензиму.

Висновки: регуляція оксидативного стресу крові щурів-пухлиноносіїв кластерними сполуками Ренію відбувається, в першу чергу, за допомогою унікального почверного зв'язку, здатного до гасіння радикальних реакцій, позитивного впливу на процес еритропоезу, можливий безпосередній взаємодії з ензимами антиоксидантного захисту і притаманній їм СОД-подібній активності.

Отже, досліджено вплив способу введення дихлоротетра- μ -ізобутиратодиренію(III) – (нано-

ліпосомах, твердих наночастках і разом з цисплатином – система Реній-Платина) на інтенсивність процесу перекисного окиснення ліпідів та активність ензимів антиоксидантного захисту еритроцитів у моделі пухлинного росту.

Встановлено зменшення вмісту ТБК-активних продуктів плазми за введення дихлоротетра- μ -ізобутиратодиренію(III) щурам-пухлиноносійм незалежно від способу та інтенсивності гальмування пухлини.

Показано ефективність зниження (до чотирьох разів) інтенсивності перекисного окиснення ліпідів за введення дихлоротетра- μ -ізобутиратодиренію(III), що значно перевищує ефективність відомих антиоксидантів.

Виявлено збільшення активності супероксиддисмутази (у середньому на 168 %) та зменшення активності каталази (у середньому на 20 %) еритроцитів за введення дихлоротетра- μ -ізобутиратодиренію(III) різними способами у порівнянні з контролем.

Показано перспективність використання кластерних сполук Ренію у медицині як нетоксичних ефективних антиоксидантів, здатних до дезактивації супероксидного радикалу.

Перспективи подальших розробок

Таким чином, подальше дослідження властивостей сполук Ренію і системи Реній-Платина є перспективним для розробки нових протипухлинних сполук які б не тільки пригнічували пухлинний ріст, а і володіли антиоксидантними властивостями для подолання оксидативного стресу

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 «Наноліпосоми та тверді наночастки, навантажені системою Реній-Платина у моделях гепато-, нефропатій та гемолітичних анемій» (номер державної реєстрації 0113U003034).

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. Mehboob Z, Sharif S, Lodhi MS, Shah AB, Romman M, Nayila I. Phytochemical profiling and anticancer potential of gardenia latifolia extracts against arsenic trioxide induced liver fibrosis in rat model. *Front Pharmacol.* 2024. doi: 10.3389/fphar.2024.1389024
2. Li Y, Yu Y, Yang L, Wang R. Insights into the Role of Oxidative Stress in Hepatocellular Carcinoma Development. *Front. Biosci.* 2023;28:286.

- doi: 10.31083/j.fbl2811286
3. Allameh A, Niayesh-Mehr R, Aliarab A, Sebastiani G, Pantopoulos K. Oxidative Stress in Liver Pathophysiology and Disease. *Antioxidants.* 2023;12:1653. doi: 10.3390/antiox12091653
4. Brahma MK, Gilgioni EH, Zhou L, Trépo E, Chen P, Gurzov EN. Oxidative stress in obesity-associated hepatocellular carcinoma: Sources, signaling and therapeutic challenges. *Oncogene.* 2021;40:5155–

5167.

5. Cristani M, Citarella A, Carnamucio F, Micale N. Nano-Formulations of Natural Antioxidants for the Treatment of Liver Cancer. *Biomolecules*. 2024;14(8):1031. doi: 10.3390/biom14081031

6. de Almeida AJPO, de Oliveira JCPL, Pontes LVdS, Júnior JFdS, Gonçalves TAF, Dantas SH, Feitosa MSdA, Silva AO, de Medeiros IA. ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and its Implications in Aging Pathways. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2022. doi: 10.1155/2022/1225578

7. Arfin S, Jha NK, Jha SK, Kesari KK, Ruokolainen J, Roychoudhury S, Rathi B, Kumar D. Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism. *Antioxidants*. 2021;10:642. doi: 10.3390/antiox10050642

8. Jungwirth U, Kowol C, Keppler B, Hartinger C, Berger W, Heffeter P. Anticancer activity of metal complexes: involvement of redox processes. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(4):1085–1127.

9. Davis A, Qiao S, Lesson J, Rojo de la Vega M, Park S, Seanez C, Gokhale V, Cabello C, Wondrak G. The Quinone Methide Aurin Is a Heat Shock Response Inducer That Causes Proteotoxic Stress and Noxa-dependent Apoptosis in Malignant Melanoma Cells. *J. Biol. Chem*. 2015;290:1623–1638.

10. Velychko OV, Golichenko OA, Neikovskiy SI, Shtemenko OV. [Syntez tsys-tetrakhlorody-μ-karboksylata dyreni³u (III) z 3-atsetilamino-1- adaman-tankarbonovoiu kyslotoiu.]. *Visnyk Odeskogo Natsionalnogo Universytetu. Khimiya*. 2012;17(3):5-12. Ukrainian.

11. Shamelashvili KL, Shtemenko NI, Leus IV, Babi SO, Shtemenko OV. Changes in oxidative stress intensity in blood of tumor-bearing rats following different modes of administration of rhenium-platinum system. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2016;88(4):29-39.

Шамелашвілі К. Л. Антиоксидантна і протипухлинна активність наноліпосом та твердих наночасток, навантажених реній-платиновою системою у щурів з карциномою Герена.

РЕФЕРАТ. Актуальність Незважаючи на значний прогрес останніх десятиліть у розробці хіміотерапевтичних препаратів з високою ефективністю та переносимістю, лікування раку часто продовжує бути складним через несприятливі ефекти та лікарську резистентність, що розвивається пухлинними клітинами. Ці проблеми все ще обумовлюють необхідність дослідження нових методів лікування, які поєднують хорошу ефективність і вибірковість. **Метою** роботи було дослідити вплив введення кластерних сполук Ренію(III) на інтенсивність процесу перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), активність ензимів антиоксидантного захисту еритроцитів супероксиддисмутази (СОД), каталази (КАТ) та глутатіонпероксидази (ГП) у моделі пухлинного росту (карцинома Герена). **Методи** - експериментальні моделі канцерогенезу (розвиток карциноми Герена). Фотоколориметричні методи – для визначення вмісту ТБК-активних продуктів та активності ферментів антиоксидантного захисту (каталази, супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази) в крові щурів. **Результати.** Введення окремо $\text{Re}^{\text{tetraiso-but}}$ у формах наноліпосом і твердих не було ефективним щодо пригнічення росту карциноми Герена, проте, призводило до значного зниження інтенсивності ПОЛ у плазмі крові порівнянні з групою щурів-пухлиноносіїв, група Т8. Введення системи Re-Pt призводило не тільки до значного гальмування росту пухлини, але й до значного зниження (нормалізації) концентрації продуктів ПОЛ. Інкапсулювання системи Re-Pt в одну наноліпосому або в тверду наночастку не призводило до втрати антиканцерогенних та антиоксидантних властивостей її компонентів. Введення системи Реній-Платина та її компонентів призводило до підвищення активності СОД еритроцитів і до зниження активності КАТ у порівнянні з контролем і підвищення активності СОД у порівнянні з групою щурів-пухлиноносіїв. Слід відмітити, що введення $\text{Re}^{\text{tetraiso-but}}$ не призводило до активації КАТ у порівнянні з контрольною групою. За введення системи Re-Pt окремо і в системі спостерігалось підвищення активності ГП порівняно з групою Т8. **Підсумок.** Отже, нормалізація редокс-стану еритроцитів під дією $\text{Re}^{\text{tetraiso-but}}$ за різних форм введення може бути пояснена як активацією СОД, внаслідок чого зменшується концентрація супероксидного аніону, так і активацією ГП, яка призводить до зниження концентрації гідроген пероксиду.

Ключові слова: карцинома Герена, перекисне окислення ліпідів, супероксиддисмутаза, каталаза та глутатіонпероксидаза.

A. Yanchyshyn

Bogomolets National
Medical University
Kyiv, Ukraine

Надійшла: 22.10.2024

Прийнята: 25.11.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.120-125>

UDC: 61:612.1:615.9.616.1:616-099

MICROSCOPIC ORGANISATION OF THE MYOCARDIUM OF EXPERIMENTAL RATS 1 AND 3 HOURS AFTER EXPOSURE TO THE VENOM OF THE SCORPION LEIURUS MACROCTENUS

Yanchyshyn A.   Microscopic organisation of the myocardium of experimental rats 1 and 3 hours after exposure to the venom of the scorpion *Leiurus macroctenus*.

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Animal venom toxins are characterised by significant variability in structure and biological effects. They are usually represented by proteins, numerous peptides that have undergone restructuring over many years of evolution, which influenced the mechanisms and features of their effect on the victim's body. Scorpion venom can cause myocardial damage, initiating many pathogenetic mechanisms. After bites from these animals, the development of myocardial infarction due to coronary spasms is quite often recorded. **Objective.** Study of microscopic changes in the heart of mature rats 1 and 3 hours after exposure to the venom of the scorpion *Leiurus macroctenus*. **Methods.** Experimental studies were conducted on 60 male rats (180 g $\pm$ 3 g), which were injected intramuscularly with 0.5 ml of venom solution (28.8 mg/ml) (LD₅₀=0.08 mg/kg). Heart samples of animals from all groups were taken for microscopic examination. Histological preparations of the heart were stained with hematoxylin and eosin, azan trichrome and iron hematoxylin. **Results and conclusion.** Administration of *Leiurus macroctenus* scorpion venom to rats resulted in the smoothing and homogenisation of cardiac muscle fibres and their moderate hypertrophy. Diapedetic haemorrhages and pronounced lymphohistiocytic infiltration were observed. After 3 hours of the experiment, the deepening of morphological changes in the rat myocardium was detected. Wave-like deformation of muscle fibres and their pronounced oedema was noted. Edematous changes, lymphocytic infiltration, and haemorrhages characterised the stroma of the cardiac muscle. Manifestations of desquamation of the endothelial lining of the vascular wall and perivascular lymphohistiocytic infiltration were observed.

Key words: venom, scorpions, myocardium, lymphohistiocytic infiltration, rats.

Citation:

Yanchyshyn A. Microscopic organisation of the myocardium of experimental rats 1 and 3 hours after exposure to the venom of the scorpion *Leiurus macroctenus*. *Morphologia*. 2024;18(4):120-5.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.120-125>

 Yanchyshyn A. 0000-0003-1598-8106

 Anatomynmu@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Introduction

Venomous animals are known to be distributed globally and represented by many biological species. Many of them belong to the kingdom Animalia [1, 2]. Venomous animals include both vertebrates and invertebrates. In their bodies, they constantly or periodically contain substances that are toxic to representatives of other animal species or humans who become victims of their bites. It has been established that even small doses of these compounds cause disorders of normal functioning and, in severe cases, death [3, 4, 5, 6]. Some species of venomous animals have special venom glands that produce the venom itself, while others accumulate toxic components from the external environment in various tissues of the body [7, 8,

9].

Animal venom toxins are characterised by significant variability in structure and biological effects [10]. They are usually represented by proteins, numerous peptides that have undergone restructuring over many years of evolution, which influenced the mechanisms and features of their effect on the victim's body [11, 12, 13]. These toxins use ion channels, receptors, and enzymes as targets while exhibiting extraordinary efficiency and selectivity of action [14, 15, 16]. Animal venoms are natural sources of biologically active molecules that exert various pharmacological effects [17, 18, 19]. They are classified according to their origin - snake, scorpion, spider venoms or according to the features of their action on the

victim's body - neurotoxins, hemo-vasotoxins, cardiotoxins, cytotoxins, etc. [20, 21, 22]. They are usually aqueous solutions containing many components of predominantly protein nature. The venom of one species of animal sometimes contains several hundred different toxins. As a rule, it includes enzymes (phospholipases, proteases, oxidases), proteins without enzymatic activity (for example, disintegrins), peptides, and metal ions [23, 24, 25]. Such a complex composition of animal venoms is the reason for the impact on all body systems and the development of severe clinical poisoning.

In modern conditions, scorpions significantly expand the territory of their existence, spreading even to those areas of the globe that were not previously characteristic of them. About thirteen families of these animals have been established, most of which are dangerous to humans. Their venom consists of salts, biogenic amines, nucleotides, enzymes (phospholipases, hyaluronidase, L-amino acid oxidases, metalloproteinases, serine proteases), peptides with low molecular weight [26]. These compounds affect almost all systems of the victim's body. They are also characterised by their extraordinary pharmacological properties, which allow them to use certain toxins for therapeutic purposes [27, 28].

Scorpion venom can cause myocardial damage, initiating many pathogenetic mechanisms. After bites from these animals, the development of myocardial infarction due to coronary spasm is quite often recorded [29, 30, 31]. It has been established that poisoning with scorpion toxins is associated with the release of vasoactive inflammatory and thrombogenic peptides and amines, such as histamine, bradykinin, serotonin, thromboxane, leukotrienes, which induce coronary artery spasm, facilitate platelet aggregation processes and the development of thrombosis. The venom can have a direct cardiotoxic effect with the development of myocarditis (toxic and adrenergic).

The study aimed to study microscopic changes in the hearts of mature rats 1 and 3 hours after exposure to *Leiurus macroctenus* scorpion venom.

Materials and methods

Experimental studies were conducted on 60 male rats (180 g $\pm$ 3 g), which were injected intramuscularly with 0.5 ml of a solution of poison (28.8 mg/ml) (LD₅₀=0.08 mg/kg) dissolved in saline (0.9%) [32]. The control group (13 rats) was injected with only 0.5 ml of saline (0.9%).

For microscopic examination, heart samples of animals from all groups were taken. The pieces were fixed in a 10% formalin solution for 1 day. Then, they were dehydrated in alcohols with increasing concentration and embedded in paraffin blocks. Histological preparations of rat hearts were stained with hematoxylin and eosin, azan trichrome, and iron hematoxylin. Histological preparations were studied using an SEO SCAN light microscope and photographed using a Vision CCD Camera with an image output system from histological preparations.

Results and discussion

The introduction of *Leiurus macroctenus* scorpion venom into rats was accompanied by morphological changes in the myocardium of the animals. In particular, the first changes were detected already 1 hour after venom injection. Loss of transverse striation of muscle fibres was observed in the myocardium, barely noticeable in individual fields of view. Cardiac muscle fibres were characterised by moderate hypertrophy and appeared as wave-like structures (Fig. 2). The cytoplasm of contractile cardiomyocytes was homogenised. The nuclei of these cells had a predominantly oval (elongated) shape and contained condensed chromatin, which was concentrated marginally. One or two nucleoli were noted in them. Due to oedema in individual cardiomyocytes, the nuclei contours were indistinct and bizarre (Fig. 1).

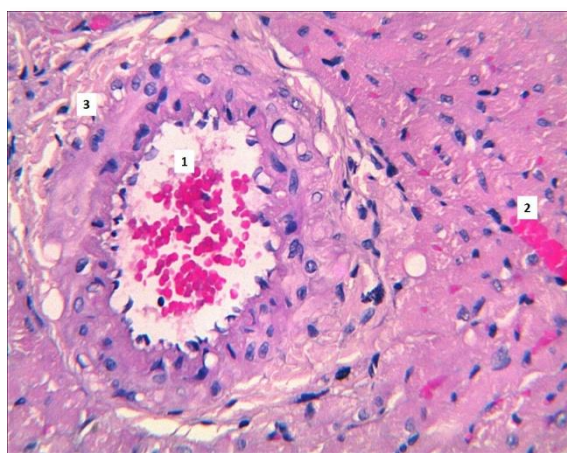


Fig.1. Histological changes in the rat heart 1 hour after exposure to the venom of the scorpion *Leiurus macroctenus*. The lumen of the myocardial blood vessel (1), the focus of haemorrhage (2), and the loosening of the outer membrane of the vessel wall (3). Staining with hematoxylin and eosin. $\times 200$.

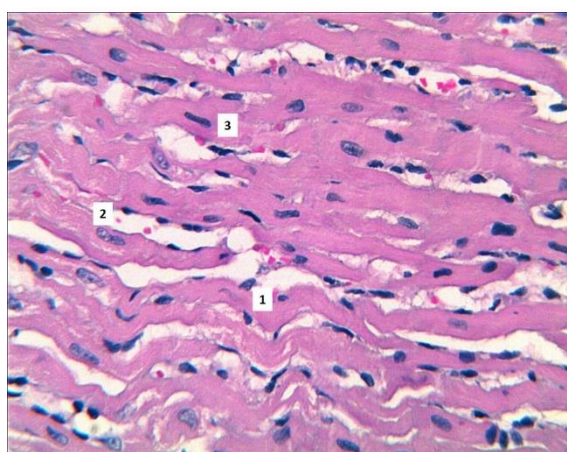


Fig. 2. Microscopic organisation of the rat heart 1 hour after exposure to the venom of the scorpion *Leiurus macroctenus*. Wave-like deformation of myocardial fibres (1), nuclei of contractile cardiomyocytes (2), and myocardial muscle fibres (3). Staining with hematoxylin and eosin. $\times 200$.

The spaces between the myocardial fibres were significantly expanded, showing the interstitial connective tissue oedema. Myosatellite cells were visible between the muscle fibres. The nuclei of the latter had an elongated shape and contained condensed chromatin. Significant diapedetic haemorrhages and accumulation of erythrocytes between the myocardial fibres were observed in all fields of view. The venous vessels of the heart muscle were markedly full-blooded, with conglomerates of erythrocytes in their lumens and adhesion of the latter to the vessel walls. Increased spaces distinguished the endothelial lining of the veins between the cells. The nuclei of the endothelial cells were oval and hyperchromic. The smooth myocytes of the tunica media of the vein walls were characterised by moderate oedema and contained rounded or elongated nuclei. Loosening and fibrilisation of the adventitia of the vessels were noted. Fibrin threads, foci of desquamation of endothelial cells from the basement membrane, and their invagination are also visible in the lumens of blood vessels. A characteristic histological finding under these conditions was pronounced lymphohistiocytic perivascular infiltration (Fig. 4). Numerous lymphocytes, macrophages, and occasionally plasma cells were observed around the myocardial vessels. Leukocyte and lymphohistiocytic infiltration was also noted in the conducting system of the rat heart (Fig. 2).



Fig. 3. Histological changes in the rat heart 1 hour after exposure to the venom of the scorpion *Leiurus macroctenus*. Muscle fiber (1), blood vessel lumen (2), contractile cardiomyocytes (3). Staining with iron hematoxylin. $\times 200$.

Three hours after the start of the experiment, microscopic studies of the rat myocardium revealed deepening morphological changes. This period was characterised by increased wave-like deformation of the heart muscle fibres. They were distinguished by significant oedema. The sarcoplasm of contractile cardiomyocytes was eosinophilic and somewhat enlightened. The nuclei of these cells increased in size, mainly were elongated, contained numerous vacuoles, and contained 1-2 nucleoli. Chromatin was distinguished because it formed lumps localised directly

under the karyolemma. It should be noted that vacuolisation and an increase in the volume of the nuclei of contractile cardiomyocytes indicate their oedema due to the influence of toxins from the venom of the scorpion *Leiurus macroctenus*. The striation of the muscle fibres of the myocardium under these conditions was not determined. Significant expansion of the spaces between the cardiac muscle fibres and edematous changes in the stroma were noted. Moderate lymphocytic infiltration was observed in the interstitium. In addition, areas of haemorrhage were detected. Signs of apoptotic changes in the nuclei were noted in some contractile cardiomyocytes (Fig. 5, 6).

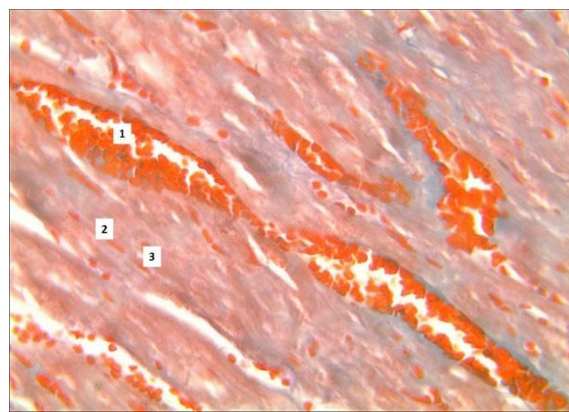


Fig. 4. Histological organisation of the rat heart 1 hour after exposure to the venom of the scorpion *Leiurus macroctenus*. The lumen of the myocardial blood vessel (1), muscle fibres (2), and contractile cardiomyocytes (3). Azan trichrome staining. $\times 200$.

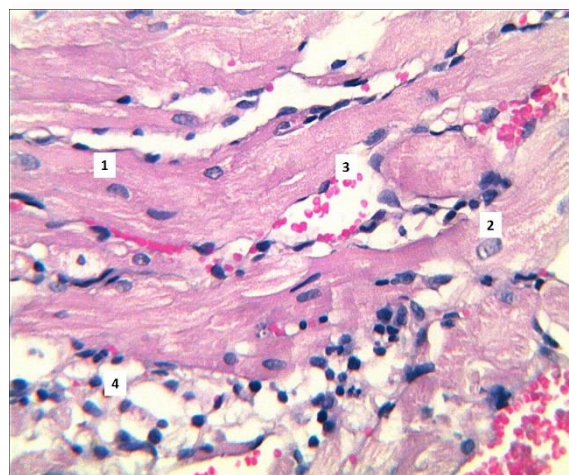


Fig. 5. Microscopic changes in the rat heart 3 hours after exposure to the venom of the scorpion *Leiurus macroctenus*. Hypertrophied myocardial muscle fibres (1), nuclei of contractile cardiomyocytes (2), areas of haemorrhage (3), oedema and lymphohistiocytic infiltration (4). Hematoxylin and eosin staining. $\times 200$.

Leading cardiomyocytes also underwent structural changes under conditions of acute intoxication with the venom of the scorpion *Leiurus macroctenus*. They increased in size; their shape was indefinite. The

cytoplasm of leading cardiomyocytes had a homogenised structure. The cell nuclei were shifted mainly to the poles. They were both hypochromic and hyperchromic and contained dispersed chromatin. The karyoplasm was sometimes lightened, with signs of oedema, and vacuolated.

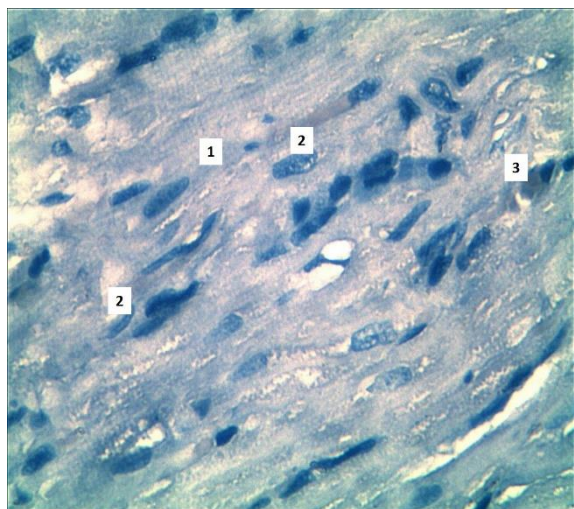


Fig. 6. Histological organization of the rat heart 3 hours after exposure to the venom of the scorpion *Leiurus macroctenus*. Contractile cardiomyocytes (1), nuclei of contractile cardiomyocytes (2), lumen of the myocardial blood vessel (3). Staining with iron hematoxylin. $\times 200$.

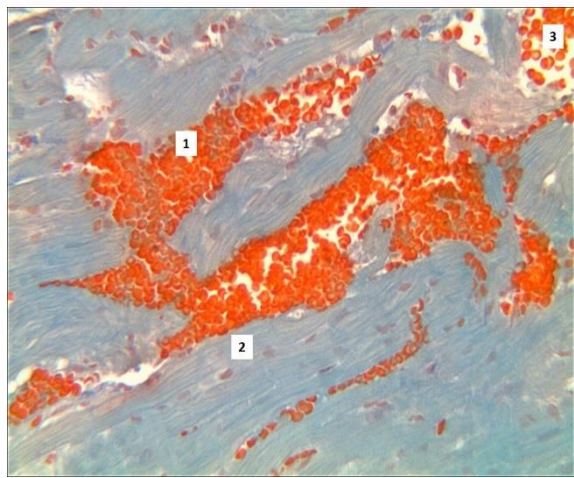


Fig. 7. Photo-optical changes in the rat heart 3 hours after exposure to the venom of the scorpion *Leiurus macroctenus*. Accumulation of erythrocytes in the myocardial stroma (1), myocardial muscle fibres (2), and lumen of the myocardial blood vessel (3). Azan trichrome staining. $\times 200$.

Photo-optical studies of the rat heart after 3 hours of the experiment also revealed specific changes in the typical organisation of the heart muscle vessels. It is worth noting the increased lymphohistiocytic infiltration of the vessel walls, compared with the group of animals after 1 hour from the beginning of the experiment. The lumens of the myocardial blood vessels were dilated and full-blooded. They revealed erythrocyte sludge, stasis, and fibrin threads. The endothelial layer of the inner membrane of the vessels was discontinuous; the gaps between the cells increased significantly, which probably increased the degree of haemorrhage. The nuclei of the endothelial cells had an elongated shape, were hyperchromic, and contained condensed chromatin. The endothelium was sometimes exfoliated from the basement membrane, and initial manifestations of cell desquamation into the lumen of the vessels were observed. Lymphohistiocytic perivascular infiltration was noted (Fig. 5, 7).

Conclusion

Administration of *Leiurus macroctenus* scorpion venom to rats resulted in smoothing and homogenising cardiac muscle fibres and their moderate hypertrophy. Diapedetic haemorrhages and pronounced lymphohistiocytic infiltration were observed.

After 3 hours of the experiment, morphological changes in the rat myocardium deepened. Wave-like deformation of muscle fibres and their pronounced oedema were noted. Edematous changes, lymphocytic infiltration, and haemorrhages characterised the cardiac muscle stroma. Manifestations of desquamation of the endothelial lining of the vascular wall and perivascular lymphohistiocytic infiltration were observed.

Prospects for further development are related to the study of histological changes in the myocardium of rats exposed to the venom of the scorpion *Leiurus macroctenus* at later stages of the experiment.

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. Martínez PA, Gutiérrez JM, Olalla-Tárraga MÁ, Amado TF. Venomous animals in a changing world. *Glob Chang Biol.* 2022;28(12):3750-3753. doi: 10.1111/gcb.16175
2. Von Reumont BM, Anderluh G, Antunes A, Ayvazyan N, Beis D, Caliskan F, et al. Modern venomomics – Current insights, novel methods, and future perspectives in biological and applied animal venom research. *Gigascience.* 2022;11:048. doi: 10.1093/gigascience/giac048

3. Chaisakul J, Hodgson WC, Kuruppu S, Prasongsook N. Effects of Animal Venoms and Toxins on Hallmarks of Cancer. *J Cancer*. 2016;7(11):1571-1578. doi: 10.7150/jca.15309
4. Coelho GR, da Silva DL, Beraldo-Neto E, Vigerelli H, de Oliveira LA, Sciani JM, Pimenta DC. Neglected Venomous Animals and Toxins: Under-rated Biotechnological Tools in Drug Development. *Toxins (Basel)*. 2021;13(12):851. doi: 10.3390/toxins13120851
5. Seifert SA, Armitage JO, Sanchez EE. Snake Envenomation. *N Engl J Med*. 2022;386(1):68-78. doi: 10.1056/NEJMr2105228
6. Warrell DA. Venomous Bites, Stings, and Poisoning: An Update. *Infect Dis Clin North Am*. 2019;33(1):17-38. doi: 10.1016/j.idc.2018.10.001
7. Abd El-Aziz FEA, El Shehaby DM, Elghazally SA, Hetta HF. Toxicological and epidemiological studies of scorpion sting cases and morphological characterization of scorpions (*Leiurus quinquestriatus* and *Androctonus crassicauda*) in Luxor, Egypt. *Toxicol Rep*. 2019;6:329-335. doi: 10.1016/j.toxrep.2019.03.004
8. Abroug F, Ouanes-Besbes L, Tilouche N, Elatrous S. Scorpion envenomation: state of the art. *Intensive Care Med*. 2020;46(3):401-410. doi: 10.1007/s00134-020-05924-8
9. Ahmadi S, Knerr JM, Argemi L, Bordon KCF, Pucca MB, Cerni FA, et al. Scorpion Venom: Detriments and Benefits. *Biomedicines*. 2020;8(5):118. doi: 10.3390/biomedicines8050118
10. Cid-Urbe JI, Veytia-Bucheli JI, Romero-Gutierrez T, Ortiz E, Possani LD. Scorpion venomomics: a 2019 overview. *Expert Rev Proteomics*. 2020;17(1):67-83. doi: 10.1080/14789450.2020.1705158
11. Abroug F, Souheil E, Ouanes I, Dachraoui F, Fekih-Hassen M, Ouanes Besbes L. Scorpion-related cardiomyopathy: Clinical characteristics, pathophysiology, and treatment. *Clin Toxicol (Phila)*. 2015;53(6):511-518. doi: 10.3109/15563650.2015.1030676
12. Schendel V, Rash LD, Jenner RA, Undheim EAB. The Diversity of Venom: The Importance of Behavior and Venom System Morphology in Understanding Its Ecology and Evolution. *Toxins (Basel)*. 2019;11(11):666. doi: 10.3390/toxins11110666
13. Yu C, Yu H, Li P. Highlights of animal venom research on the geographical variations of toxin components, toxicities and envenomation therapy. *Int J Biol Macromol*. 2020;165:2994-3006. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.190
14. Bakir F, Ozcan O, Alcigir ME, Vural SA. Effects of *Androctonus crassicauda* scorpion venom on the heart tissue. *J Anim Vet Adv*. 2012;11(14):2594-2599. DOI: 10.3923/javaa.2012.2594.2599
15. Bayar N, Küçükseymen S, Yüksel IO, Arslan S. Rapidly improving acute myocarditis after a scorpion sting. *Türk Kardiyol Dern Ars*. 2013;41(7):629-632. doi: 10.5543/tkda.2013.36459
16. Baykan AO, Gür M, Acele A, Şeker T, Çaylı M. Scorpion envenomation-induced acute thrombotic inferior myocardial infarction. *Türk Kardiyol Dern Ars*. 2016;44(1):82-86. doi: 10.5543/tkda.2015.88590
17. Ageitos L, Torres MDT, de la Fuente-Nunez C. Biologically Active Peptides from Venoms: Applications in Antibiotic Resistance, Cancer, and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2022;23(23):15437. doi: 10.3390/ijms232315437
18. Herzig V, Cristofori-Armstrong B, Israel MR, Nixon SA, Vetter I, King GF. Animal toxins - Nature's evolutionary-refined toolkit for basic research and drug discovery. *Biochem Pharmacol*. 2020;181:114096. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114096
19. Peigneur S, Tytgat J. Toxins in Drug Discovery and Pharmacology. *Toxins (Basel)*. 2018;10(3):126. doi: 10.3390/toxins10030126
20. Prasad R, Kumar A, Jain D, Das BK, Singh UK, Singh TB. Echocardiography versus cardiac biomarkers for myocardial dysfunction in children with scorpion envenomation: An observational study from tertiary care center in northern India. *Indian Heart J*. 2020;72(5):431-434. doi: 10.1016/j.ihj.2020.07.020
21. Reis MB, Rodrigues FL, Lautherbach N, Kanashiro A, Sorgi CA, Meirelles AFG, et al. Interleukin-1 receptor-induced PGE2 production controls acetylcholine-mediated cardiac dysfunction and mortality during scorpion envenomation. *Nat Commun*. 2020;11(1):5433. doi: 10.1007/s12012-021-09640-7
22. Torrez PPQ, Dourado FS, Bertani R, Cupo P, França FOS. Scorpionism in Brazil: exponential growth of accidents and deaths from scorpion stings. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019;52:e20180350. doi: 10.1590/0037-8682-0350-2018
23. Pourkhalili K, Kim E, Mashayekhy NR, Kamayab M, Hoseiny SM, Evazy R, et al. Cardiotoxic and Arrhythmogenic Effects of *Hemiscorpius lepturus* Scorpion Venom in Rats. *J Arthropod Borne Dis*. 2015;9(2):215-225. PMID: PMC4662793 PMID: 26623433
24. Sagarad SV, Kerure SB, Thakur B, Reddy SS, Joshi RM. Echocardiography guided therapy for myocarditis after scorpion sting envenomation. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(12):2836-2838. doi: 10.7860/JCDR/2013/6791.3693
25. Sagarad SV, Thakur BS, Reddy SS, Joshi RM, Kerure SB. NT-proBNP in Myocarditis after a Scorpion Sting Envenomation. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(1):118-121. doi: 10.7860/JCDR/2012/4858.2684
26. Vaucel JA, Larréché S, Paradis C, Courtois A, Pujo JM, Elenga N, et al. French Scorpionism (Mainland and Oversea Territories): Narrative Review of Scorpion Species, Scorpion Venom, and Envenoming Management. *Toxins (Basel)*. 2022;14(10):719. doi: 10.1093/jme/tjab109
27. Ghosh A, Roy R, Nandi M, Mukhopadhyay A. Scorpion Venom-Toxins that Aid in Drug Development: A Review. *Int J Pept Res Ther*.

2019;25(1):27-37. doi: 10.1007/s10989-018-9721-x
28. Matkivska R, Samborska I, Maievskiy O. Effect of scorpion venom toxins on structural and functional parameters of internal organs, including kidneys (Review). Wiad Lek. 2023;76(6):1491-1498. doi: 10.36740/WLek202306124

29. Ratnayake RM, Kumanan T, Selvaratnam G. Acute myocardial injury after scorpion (*Hottentotta tamulus*) sting. Ceylon Med J. 2016;61(2):86-87. doi: 10.4038/cmj.v61i2.8293

30. Vogt N. Venomous organoids. Nat Methods.

2020;17(4):360. doi: 10.1038/s41592-020-0806-z

31. Zuliani JP, Soares AM. Toxins of Animal Venoms and Inhibitors. Curr Top Med Chem. 2019;19(22):1950-1951. doi: 10.2174/156802661922191024125315

32. Gunas V, Maievskiy O, Raksha N, Vovk T, Savchuk O, Shchypanskyi S, Gunas I. Study of the Acute Toxicity of Scorpion *Leiurus macroctenus* Venom in Rats. The Scientific World Journal. 2024;(1):9746092. doi: 10.1155/2024/9746092

Янчишин А. Мікроскопічна організація міокарда експериментальних щурів через 1 та 3 години після впливу отрути скорпіонів *Leiurus macroctenus*.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Токсини тваринних отрут характеризуються значною варіабельністю структури та біологічних ефектів. Зазвичай вони представлені білками, чисельними пептидами, що піддавались перебудовам протягом багатьох років еволюції, які вплинули на механізми та особливості впливу їх на організм жертви. Отрута скорпіонів може викликати ураження міокарда, ініціюючи низку патогенетичних механізмів. Після укусів цих тварин доволі часто реєструють розвиток інфаркту міокарда внаслідок коронарного спазму. **Мета.** Вивчення мікроскопічних змін серця зрілих щурів через 1 та 3 години після впливу отрути скорпіонів *Leiurus macroctenus*. **Методи.** Експериментальні дослідження проводили на 60 щурах-самцях щурів (180 г $\pm$ 3 г), яким внутрішньом'язово вводили 0,5 мл розчину отрути (28,8 мг/мл) (LD50=0,08 мг/кг). Для мікроскопічного дослідження забирали зразки серця тварин всіх груп. Фарбування гістологічних препаратів серця здійснювали гематоксиліном та еозином, азан трихром і залізним гематоксиліном. **Результати та підсумок.** Введення щурам отрути скорпіонів *Leiurus macroctenus* призводило до згладжування та гомогенізації волокон серцевого м'язу, їх помірної гіпертрофії. Відмічали появу діapedезних крововиливів, виражену лімфогістіоцитарну інфільтрацію. Після 3 годин проведення експерименту виявляли поглиблення морфологічних змін міокарда щурів. Відмічали хвилеподібну деформацію м'язових волокон, їх виражений набряк. Строма серцевого м'язу характеризувалась едематозними змінами, лімфоцитарною інфільтрацією, геморагіями. Спостерігали прояви десквамації ендотеліального вистилення судинної стінки, периваскулярну лімфогістіоцитарну інфільтрацію.

Ключові слова: отрута, скорпіони, міокард, лімфогістіоцитарна інфільтрація, щури.

P.A. Kobeza

Dnipro State Medical
University
Dnipro, Ukraine

Надійшла: 14.10.2024
Прийнята: 15.12.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.126-132>

UDC 611.019

MORPHOMETRY. GENERAL METHOD FOR HISTOLOGY, CYTOLOGY AND EM- BRYOLOGY. OVERVIEW AND PROSPECTS OF INTEGRATION INTO THE EDUCA- TIONAL PROCESS

Kobeza P.A.  ✉ Morphometry. General method for histology, cytology and embryology. Overview and prospects of integration into the educational process.

Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Morphological analysis provides insights into the intricate architecture of cells and tissues, revealing how their specific configurations support their biological roles. The relevance of mastering morphometric techniques in modern scientific inquiry cannot be overstated. **Objective.** The primary aim of this article is to elucidate the significance of morphometry in the analysis of morphological structures within the framework of foundational courses in histology, cytology, and embryology. This analysis will emphasize its application in both normal physiology and pathological conditions, illustrating how morphometric data can inform clinical practice and research. **Methods.** Morphometry relies on precise measurements of the structural elements of tissues using light or electron microscopy, along with specialized software for image processing. **Results.** Described levels of organization and general approach to defining the morphofunctional unit. The structural-functional unit is a fundamental component of tissue, organs, or organ systems, characterized by a specific morphological organization that performs functions unique to that organ. This unit represents the minimal structural entity capable of independently executing biological processes inherent to a given organ or tissue, thereby sustaining vital activities across various levels of biological organization. **Conclusion.** In summary, the concept of structural-functional units is fundamental in histology, as it defines how tissues and organs are organized and function. The integration of morphometry with emerging technologies will undoubtedly pave the way for new insights into cellular behavior and disease mechanisms, reinforcing its pivotal role in the fields of medicine and biology.

Key words: morphometry, histology, cytology, embryology, educational process.

Citation:

Kobeza PA. Morphometry. General method for histology, cytology and embryology. Overview and prospects of integration into the educational process. *Morphologia*. 2024;18(4):126-32.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.126-132>

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

✉ kobeza.pavel@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Background

Morphology is the science that studies the form, structure, and spatial relationships of tissues and cells in living organisms. It serves as a foundational component of biological and medical sciences, as it enables an understanding of how structure is intimately linked to function at all levels of organization [1]. Morphological analysis provides insights into the intricate architecture of cells and tissues, revealing how their specific configurations support their biological roles. For instance, the arrangement of muscle fibers

in cardiac tissue is critical for efficient contraction and blood circulation, while the layered structure of the skin contributes to its protective functions. Within the fields of histology, cytology, and embryology, morphology examines tissues and cells under the microscope, revealing their structural features and interconnections. This microscopic analysis is fundamental for identifying cellular components, such as organelles and extracellular matrices, as well as understanding developmental processes during embryo-

genesis. The ability to observe and describe these features allows researchers to establish baselines for normal structure and identify deviations associated with pathological conditions. Morphometry, on the other hand, is a quantitative method for assessing morphological characteristics. It provides precise measurements of sizes, shapes, and proportions of structural elements within tissues, enabling researchers to generate statistically significant data that can be compared across different conditions and populations [2]. This quantitative approach is essential in modern research, allowing for objective evaluations of morphological parameters, which is crucial for a comprehensive understanding of both normal and pathological processes in cells and tissues.

By employing morphometric techniques, researchers can uncover subtle variations and relationships that contribute to our understanding of health and disease. For example, morphometric analysis can reveal changes in cell size and shape in response to injury or disease [3], offering insights into underlying mechanisms of pathology. Additionally, morphometric methods can assist in the identification of biomarkers and facilitate the assessment of therapeutic interventions by providing measurable outcomes. The integration of morphology and morphometry enhances our diagnostic and therapeutic strategies. Mastery of these techniques not only enriches our understanding of biological systems but also paves the way for innovations in clinical practices, contributing to improved patient care and outcomes. By emphasizing the importance of these methodologies in education and research [4,5], we can foster a new generation of scientists and clinicians equipped to tackle the complex challenges in health and disease.

Purpose

With the advancement of cutting-edge technologies and microscopy methods, there is an increasing demand for precise quantitative assessments of morphological structures. Traditional descriptive morphology often falls short in providing sufficient data to evaluate dynamic changes within tissues, particularly in the context of disease progression or embryonic development. In many instances, qualitative observations alone cannot capture the nuanced alterations that occur at cellular and tissue levels. Morphometry offers a solution by enabling researchers to obtain objective, quantitative data that can be systematically analyzed. This capability transforms the study of morphology from a predominantly descriptive science into a rigorous quantitative discipline, allowing for the identification of subtle morphological variations that may be critical in understanding pathological conditions. For instance, in cancer research, morphometric techniques can reveal changes in cell shape, size, and arrangement, providing insights into tumor behavior and prognosis.

The integration of morphometry into contemporary morphological research is indispensable, as it en-

hances the ability to track changes over time and under varying physiological or pathological conditions. As the landscape of biological research becomes increasingly complex, the precision afforded by morphometric analysis becomes essential. It not only contributes to the understanding of normal physiological processes but also plays a pivotal role in elucidating the mechanisms underlying various diseases. The application of morphometry is not limited to basic research; it extends to clinical settings where accurate morphological assessments can inform diagnosis and treatment strategies. For instance, in histopathology, quantitative analysis of tissue samples can assist pathologists in identifying disease states and determining the aggressiveness of tumors, ultimately guiding therapeutic decisions.

In summary, the relevance of mastering morphometric techniques in modern scientific inquiry cannot be overstated. As research progresses towards a more quantitative framework, the ability to provide detailed, objective analyses of morphological changes will be crucial in advancing our understanding of health and disease, thereby significantly impacting both basic and applied biomedical research.

Objective

The primary aim of this article is to elucidate the significance of morphometry in the analysis of morphological structures within the framework of foundational courses in histology, cytology, and embryology. Morphometry serves a dual purpose: it not only facilitates the description of tissue structure but also enables the quantitative assessment of its parameters, thus contributing to a more precise understanding of both normal and pathological processes. In a rapidly evolving scientific landscape, the ability to quantitatively analyze morphological characteristics is becoming increasingly vital. By employing morphometric techniques, researchers and students can delve deeper into the intricacies of tissue organization and cellular architecture. This quantitative approach allows for the identification of specific morphological features that may correlate with functional outcomes, thereby enhancing the interpretative power of histological observations. The objectives of this article include exploring the various morphometric methods available, discussing their applications in different biological contexts, and demonstrating how these techniques can be integrated into educational curricula. By highlighting specific case studies where morphometry has provided critical insights, we aim to underscore its importance as a complementary tool for traditional descriptive methods. Additionally, we will address the challenges and limitations associated with morphometric analyses, including issues related to measurement precision and the need for standardized protocols. Understanding these challenges is essential for ensuring the reliability and reproducibility of morphometric studies. Ultimately, this article seeks to advocate for the inclusion of morphometric techniques

in the training of future professionals in the biomedical field. By fostering an appreciation for the quantitative dimensions of morphology, we can empower students and researchers to make informed, data-driven conclusions that advance both scientific knowledge and clinical practice.

Overview of key concepts and definitions of morphometry. this section will provide a comprehensive introduction to the fundamental principles and terminology associated with morphometry, establishing a clear understanding of its relevance in biological and medical contexts. Analysis of historical development and contemporary approaches to morphometry. This objective will trace the evolution of morphometric techniques from their inception to the present day, highlighting key milestones and advancements that have shaped current methodologies. We will also explore modern approaches, including the integration of digital imaging and computational tools. Determination of the role of morphometry in tissue research. we will examine how morphometry contributes to the study of tissues, particularly in understanding structural and functional changes. This analysis will emphasize its application in both normal physiology and pathological conditions, illustrating how morphometric data can inform clinical practice and research.

Methods

Morphometry relies on precise measurements of the structural elements of tissues using light or electron microscopy, along with specialized software for image processing. The primary parameters measured in morphometric studies include cell dimensions, tissue thickness, surface area, volume, and the ratios of various tissue components [6]. The application of these techniques enables researchers to obtain quantitative data that can be statistically analyzed, enhancing the objectivity of morphological assessments. For instance, light microscopy allows for the visualization of tissue architecture at a cellular level, while electron microscopy provides insights into ultrastructural details that are critical for understanding the intricacies of tissue organization [7]. Specialized software tools facilitate the analysis of acquired images, enabling the extraction of morphometric data with high precision. These tools often include automated measurement capabilities, which reduce human error and increase the efficiency of data collection. By employing these methodologies, researchers can generate robust datasets that inform our understanding of the dynamic nature of tissues and their responses to various physiological and pathological stimuli.

The integration of advanced morphometric techniques into research and clinical practice is essential for elucidating the complexities of biological systems and enhancing our ability to address health-related challenges [8].

Light Microscopy. This foundational technique is widely used for the assessment of histological sections. Light microscopy allows researchers to visualize tissue architecture and cellular components,

providing essential insights into the organization and characteristics of various tissues. It is particularly useful for routine histopathological examinations, where stained tissue sections can reveal important morphological details.

Electron Microscopy. This advanced method provides highly detailed images of ultrastructural elements within tissues. Electron microscopy, including transmission and scanning techniques, allows for the examination of cellular structures at a much higher resolution than light microscopy. This capability is crucial for studying intricate features such as organelles, membrane structures, and the extracellular matrix, enabling a deeper understanding of cellular function and pathology.

Computer Image Analysis. This method involves the use of specialized software to perform precise measurements of morphological parameters from acquired images. Computer-assisted image analysis enhances the accuracy and efficiency of morphometric assessments by automating the process of data extraction. Parameters such as cell size, shape, and spatial relationships can be quantified, allowing for robust statistical analyses that can inform research conclusions.

The materials utilized in morphometric studies primarily consist of tissue samples from various organisms. These samples can be derived from healthy and diseased tissues, providing a comprehensive basis for comparative analysis [9]. By examining diverse tissue types—such as epithelial, connective, muscular, and nervous tissues—researchers can gain valuable insights into the structural variations that correlate with different physiological and pathological states.

In preparation for microscopic examination, tissue samples are typically fixed, embedded, and sectioned to appropriate thicknesses. Staining protocols may also be employed to enhance contrast and highlight specific structures, thereby facilitating more effective visualization under the microscope. By utilizing these materials and methods, researchers can systematically investigate morphological changes, contributing to the advancement of knowledge in both basic and applied biological sciences.

Results

The structural-functional unit is a fundamental component of tissue, organs, or organ systems, characterized by a specific morphological organization that performs functions unique to that organ [9]. This unit represents the minimal structural entity capable of independently executing biological processes inherent to a given organ or tissue, thereby sustaining vital activities across various levels of biological organization. The structural-functional unit possesses a well-defined architecture typical of a particular tissue or organ [10, 11]. Most commonly, it is represented by a cell or a group of closely associated cells specialized in carrying out specific functions. Additionally, it may include extracellular components that facilitate

the realization of these functions. For instance, in cardiac tissue, the structural-functional unit is the cardiomyocyte, a specialized cell responsible for contraction, which enables the heart to function as an effective pump. The primary role of the structural-functional unit lies in the execution of specific functions associated with the tissue or organ [12]. This function is dictated by the specialization of the cells and their morphology. For example, in nervous tissue, a neuron is responsible for transmitting nerve impulses, whereas in muscular tissue, the sarcomere performs the contraction function. The sarcomere is a structural-functional unit of striated muscle tissue, particularly found in cardiomyocytes and skeletal muscles. It constitutes the fundamental building block of the contractile system and is essential for generating mechanical force through the interaction of actin and myosin filaments [13]. This intricate relationship is crucial for muscle contraction and overall movement.

Histological Context. In histology, structural-functional units form the basis for understanding the organization and functional specialization of tissues. Histological studies investigate how cells and tissues are organized within organs to ensure the fulfillment of their specific functions. For instance, in the kidneys, the nephron serves not only as the primary structural unit but also as a functional one [14]. It is responsible for blood filtration, reabsorption of useful substances, and waste elimination, thus playing a critical role in maintaining the body's homeostasis. Morphometric analysis of nephrons enables the assessment of renal functional capacity under both normal and pathological conditions. By employing morphometric techniques, researchers can quantitatively evaluate the morphological characteristics of structural-functional units, thereby providing valuable insights into their physiological roles and contributions to health and disease [15]. This approach enhances our understanding of tissue organization and function, ultimately informing clinical practices and therapeutic interventions.

Levels of Organization. Structural-functional units can be organized at various levels:

1. **Cellular Level:** This is the most basic level of organization, where an individual cell acts as a functional unit. For example, an epithelial cell in the skin performs specific tasks essential for barrier protection and sensory perception [16]. The unique morphology of epithelial cells, such as their tight junctions and polarity, contributes to their specialized functions.
2. **Tissue Level:** At this level, groups of cells that interact closely together perform a common function. An example is epithelial tissue, which lines internal surfaces of organs and cavities [17]. The coordinated action of these cells facilitates processes such as absorption, secretion, and protection, highlighting the importance of cellular organization in maintaining homeostasis.
3. **Organ Level:** In complex organs, such as the

kidneys or liver, structural-functional units may encompass not only individual cells but also intricate complexes, like nephrons in the kidneys or hepatic lobules in the liver. These units integrate various cell types and extracellular matrices to perform specialized functions critical for the organ's overall performance, such as filtration and metabolic regulation [18].

Extracellular Matrix and Microenvironment. In histology, the significance extends beyond the cell as a structural-functional unit; the surrounding microenvironment also plays a crucial role [19]. The extracellular matrix (ECM) is vital for supporting cellular structure and regulating cellular functions. It consists of a complex network of proteins and carbohydrates that provide structural integrity and biochemical signals. For instance, in connective tissue, fibroblasts are the structural-functional units responsible for producing collagen and elastin fibers, which form the tissue framework. The interaction between fibroblasts and the ECM is essential for providing mechanical support to tissues and facilitating processes such as wound healing [20]. This relationship underscores the importance of the extracellular matrix in maintaining tissue architecture and promoting cellular functions. The microenvironment can influence cellular behavior, impacting processes such as differentiation, migration, and response to injury. Understanding the interplay between structural-functional units and their extracellular surroundings is essential for elucidating the mechanisms underlying tissue development, repair, and pathology [21]. This comprehensive perspective is crucial in advancing our knowledge of both normal physiology and disease states, paving the way for innovative therapeutic approaches in regenerative medicine and tissue engineering.

Morphometry and Quantitative Assessment. The application of morphometry to evaluate structural-functional units is critical for objective tissue analysis [22]. Morphometric studies quantitatively determine changes in size, shape, and quantitative ratios of structures, enabling conclusions about their functional activity. For instance, in cardiac research, morphometry can be employed to assess the density and orientation of sarcomeres in cardiomyocytes, which directly influences the contractile ability of cardiac muscle [23].

Examples of Structural-Functional Units in Various Systems.

1. **Epithelial Cells:** These are the primary structural-functional units in epithelial tissue, responsible for barrier functions and secretion. Their organization and morphology are vital for processes such as absorption and protection.
2. **Osteon:** This is the structural-functional unit of bone tissue, ensuring bone strength and its ability to withstand mechanical loads. The arrangement of osteons and their interaction with surrounding bone matrix is essential for skeletal integrity.
3. **Hepatocyte:** As the main cell type in the

liver, hepatocytes are responsible for metabolic and detoxification functions. Their structural adaptations facilitate various biochemical processes critical for maintaining homeostasis.

Dysfunction of structural-functional units often underlies the development of pathological conditions. For example, impaired function of sarcomeres in cardiomyocytes can lead to heart failure. Morphological changes in these structural-functional units during disease processes—such as hypertrophy, atrophy, or destruction—can be quantitatively assessed using morphometric methods for diagnosing and monitoring disease progression [24, 25].

The application of morphometry has enabled the acquisition of quantitative data regarding the structure of tissues and cells, which assists in the objective evaluation of their changes during normal development and pathological states. For instance, morphometric studies have revealed significant alterations in the sizes of cell nuclei associated with specific diseases, as well as changes in arterial wall thickness during the progression of atherosclerosis [26]. These findings underscore the critical role of morphometry in understanding disease mechanisms and developmental biology.

Discussion

This section includes a comparison of various morphometric methods and an evaluation of their effectiveness in tissue analysis. Common techniques such as light microscopy, electron microscopy, and image analysis software are discussed in terms of their strengths and limitations [27]. Each method offers unique insights, yet their reliability often hinges on factors such as the quality of sample preparation and the precision of measurements. Potential limitations include variability in results due to sample heterogeneity and the challenge of standardizing measurement protocols across different studies [28]. By addressing these aspects, the discussion highlights the importance of selecting appropriate morphometric techniques tailored to specific research questions and emphasizes the need for rigorous methodological

standards to ensure data integrity [29, 30]. This comprehensive approach not only enhances the validity of findings but also contributes to the overall advancement of morphometric applications in both basic and clinical research.

Conclusion

1. In summary, the concept of structural-functional units is fundamental in histology, as it defines how tissues and organs are organized and function. Studying these units provides insights into how cellular-level changes affect overall organism function, laying the groundwork for further investigation into pathological processes and the development of therapeutic strategies. By integrating morphometric analysis into research, we can deepen our understanding of normal physiology and disease mechanisms, ultimately enhancing clinical outcomes.

2. Morphometry serves as a crucial tool for the quantitative analysis of morphological characteristics of tissues, making it indispensable in modern histological and cytological research. It allows for precise measurements and objective evaluations of changes in tissues, thereby fostering a deeper understanding of both normal and pathological processes.

3. In future studies, the significance of morphometry is likely to increase further due to advancements in image processing technologies and automated tissue analysis. These innovations are expected to enhance the accuracy and efficiency of morphometric assessments, enabling researchers to uncover intricate details about tissue architecture and dynamics.

4. The integration of morphometry with emerging technologies will undoubtedly pave the way for new insights into cellular behavior and disease mechanisms, reinforcing its pivotal role in the fields of medicine and biology.

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. Weibel ER, Elias H. Introduction to stereology and morphometry. In: Quantitative Methods in Morphology/Quantitative Methoden in der Morphologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1967:3-19.
2. Anderson RH, Brown NA. The anatomy of the heart revisited. *Anat Rec*. 1996;246(1):1-7. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(199609)246:1<1::AID-AR1>3.0.CO;2-Y. PMID: 8876818
3. Larkin S, Ansorge O, authors; Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Kapoor N, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laffère B, Levy M, McGee EA, McLachlan R, New M, Purnell J, Sahay R, Shah AS, Singer F, Sperling MA, Stratakis CA, Trencé DL, Wilson DP, editors: Development And Microscopic Anatomy Of The Pituitary Gland. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2017.2000—. PMID: 28402619
4. Dogan KK, author: Histology and Embryology 4.0. Perspectives on Artificial Intelligence in Times of Turbulence: Theoretical Background to Applications. IGI Global; 2024:119-134.
5. Pawlina W, Drake RL. Anatomical models: don't banish them from the anatomy laboratory yet.

- Anat Sci Educ. 2013;6(4):209-210. doi: 10.1002/ase.1380. PMID: 23825081
6. Trelease RB, Nieder GL. Transforming clinical imaging and 3D data for virtual reality learning objects: HTML5 and mobile devices implementation. *Anat Sci Educ.* 2013;6(4):263-270. doi: 10.1002/ase.1330. Epub 2012 Dec 4. PMID: 23212750
7. Preece D, Williams SB, Lam R, Weller R. "Let's get physical": advantages of a physical model over 3D computer models and textbooks in learning imaging anatomy. *Anat Sci Educ.* 2013;6(4):216-224. doi: 10.1002/ase.1345. Epub 2013 Jan 24. PMID: 23349117
8. Khot Z, Quinlan K, Norman GR, Wainman B. The relative effectiveness of computer-based and traditional resources for education in anatomy. *Anat Sci Educ.* 2013;6(4):211-215. doi: 10.1002/ase.1355. Epub 2013 Mar 18. PMID: 23509000
9. Nguyen N, Nelson AJ, Wilson TD. Computer visualizations: factors that influence spatial anatomy comprehension. *Anat Sci Educ.* 2012;5(2):98-108. doi: 10.1002/ase.1258. Epub 2012 Jan 9. PMID: 22232125
10. Nguyen N, Nelson AJ, Wilson TD. Computer visualizations: factors that influence spatial anatomy comprehension. *Anat Sci Educ.* 2012;5(2):98-108. doi: 10.1002/ase.1258. Epub 2012 Jan 9. PMID: 22232125
11. Trelease RB, Rosset A. Transforming clinical imaging data for virtual reality learning objects. *Anat Sci Educ.* 2008;1(2):50-55. doi: 10.1002/ase.13. PMID: 19177381
12. Hisley KC, Anderson LD, Smith SE, Kavic SM, Tracy JK. Coupled physical and digital cadaver dissection followed by a visual test protocol provides insights into the nature of anatomical knowledge and its evaluation. *Anat Sci Educ.* 2008;1(1):27-40. doi: 10.1002/ase.4. PMID: 19177376
13. Khalil MK, Paas F, Johnson TE, Su YK, Payer AF. Effects of instructional strategies using cross sections on the recognition of anatomical structures in correlated CT and MR images. *Anat Sci Educ.* 2008;1(2):75-83. doi: 10.1002/ase.19. PMID: 19177385
14. Amalinei C, Timofte AD, Căruntu ID, Wierzbicki PM, Żmijewski MA, Sirmakessis S, Girela JL, Martínez-Ruiz N, Vizcaya-Moreno MF, Pérez-Cañaveras RM, Harizanov Z, Popova F, Colibaba C, Kmiec Z. Digital morphology network for effective teaching of cytology, histology and histopathology for medical and biology curriculum. VM3.0 Erasmus+ project. *Folia Histochem Cytobiol.* 2024;62(2):61-75. doi: 10.5603/fhc.100875. Epub 2024 Jun 24. PMID: 38912571
15. Triola MM, Holloway WJ. Enhanced virtual microscopy for collaborative education. *BMC Med Educ.* 2011;11:4. doi: 10.1186/1472-6920-11-4. PMID: 21269474; PMCID: PMC3037351
16. Megarani DV, et al. Comparative morphology and morphometry of blood cells in zebrafish (*Danio rerio*), common carp (*Cyprinus carpio carpio*), and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science.* 2020;59(6):673-680.
17. Neel JA, Grindem CB, Bristol DG. Introduction and evaluation of virtual microscopy in teaching veterinary cytopathology. *J Vet Med Educ.* 2007;34(4):437-444. doi: 10.3138/jvme.34.4.437. PMID: 18287470
18. Dee FR, Meyerholz DK. Teaching medical pathology in the twenty-first century: virtual microscopy applications. *J Vet Med Educ.* 2007;34(4):431-436. doi: 10.3138/jvme.34.4.431. PMID: 18287469
19. Heidger PM Jr, Dee F, Consoer D, Leaven T, Duncan J, Kreiter C. Integrated approach to teaching and testing in histology with real and virtual imaging. *Anat Rec.* 2002;269(2):107-112. doi: 10.1002/ar.10078. PMID: 12001217
20. Dehaan RL, Ebert JD. Morphogenesis. *Annu Rev Physiol.* 1964;26:15-46. doi: 10.1146/annurev.ph.26.030164.000311. PMID: 14147456
21. O'Rourke J, Bode G, authors; Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors: *Morphology and Ultrastructure. Helicobacter pylori: Physiology and Genetics.* Washington (DC): ASM Press; 2001. Chapter 6. PMID: 21290748
22. Duerr JS. Immunohistochemistry. *Worm-Book*; 2006:1-61. doi: 10.1895/wormbook.1.105.1. PMID: 18050446; PMCID: PMC4780882
23. Weibel ER, author: "Morphometry: stereological theory and practical methods." *Models of lung disease.* CRC Press; 2020:199-252.
24. Khan RH, Rhodes JS, Girard IA, Schwartz NE, Garland Jr T. Does Behavior Evolve First? Correlated Responses to Selection for Voluntary Wheel-Running Behavior in House Mice. *Ecological and Evolutionary Physiology.* 2024;97(2):97-117.
25. Ashburner J, Friston KJ. Voxel-based morphometry--the methods. *Neuroimage.* 2000;11(6):805-821. doi: 10.1006/nimg.2000.0582. PMID: 10860804
26. Goto M, Abe O, Aoki S, Kamagata K, Hori M, Miyati T, Gomi T, Takeda T. Combining Segmented Grey and White Matter Images Improves Voxel-based Morphometry for the Case of Dilated Lateral Ventricles. *Magn Reson Med Sci.* 2018;17(4):293-300. doi: 10.2463/mrms.mp.2017-0127. Epub 2018 Jan 18. PMID: 29343657; PMCID: PMC6196303
27. Diagone KV, Vicente WR, Pacheco MR, Mateus O. Oocyte morphometry in female dogs (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). *Anat Histol Embryol.* 2008;37(2):81-85. doi: 10.1111/j.1439-0264.2007.00801.x. PMID: 18333852
28. Chou SH, Vokes T. Vertebral Morphometry. *J Clin Densitom.* 2016;19(1):48-53. doi: 10.1016/j.jocd.2015.08.005. Epub 2015 Sep 6. PMID: 26349790

29. Sanf  lix-Genov  s J, Arana E, Sanf  lix-Gimeno G, Peir   S, Graells-Ferrer M, Vega-Mart  nez M. Agreement between semi-automatic radiographic morphometry and Genant semi-quantitative method in the assessment of vertebral fractures. *Osteoporos Int.* 2012;23(8):2129-2134. doi: 10.1007/s00198-011-1819-3. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22170523

30. G  mez-Torres FA, Sebastian R, Ru  z-Sauri A. Morphometry and comparative histology of sinus and atrioventricular nodes in humans and pigs and their relevance in the prevention of nodal arrhythmias. *Res Vet Sci.* 2020;128:275-285. doi: 10.1016/j.rvsc.2019.12.008. Epub 2019 Dec 5. PMID: 31869593

Кобеза П.А. Морфометрія. Загальний метод для гістології, цитології та ембріології. Огляд та перспективи інтеграції в освітній процес.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Морфологія — це наука, яка вивчає форму, структуру та просторові взаємовідносини тканин і клітин у живих організмах. Морфологічний аналіз надає уявлення про складну архітектуру клітин і тканин, показуючи, як їх специфічні конфігурації підтримують біологічні функції. **Мета.** Значення оволодіння морфометричними техніками в сучасних наукових дослідженнях важко переоцінити. Основна мета, проявити важливість морфометрії в аналізі морфологічних структур у рамках базових курсів гістології, цитології та ембріології. У цьому аналізі буде підкреслено її застосування як в нормальній фізіології, так і в патологічних умовах, ілюструючи, як морфометричні дані можуть впливати на клінічну практику та дослідження. **Методи.** Морфометрія ґрунтується на точних вимірюваннях структурних елементів тканин за допомогою світлової або електронної мікроскопії, а також спеціалізованого програмного забезпечення для обробки зображень. **Результати.** Описані рівні організації та загальний підхід до визначення морфофункціональної одиниці. Ця одиниця представляє собою мінімальну структурну одиницю, здатну самостійно виконувати біологічні процеси, властиві даному органу чи тканині, забезпечуючи життєво важливу діяльність на різних рівнях організації. **Висновок.** Морфометрія слугує важливим інструментом для кількісного аналізу морфологічних характеристик тканин, що робить її незамінною в сучасних гістологічних і цитологічних дослідженнях. Вона дозволяє проводити точні вимірювання та об'єктивні оцінки змін у тканинах, сприяючи глибшому розумінню як нормальних, так і патологічних процесів. Інтеграція морфометрії з новітніми технологіями безумовно відкриє нові можливості для вивчення клітинної поведінки та механізмів захворювань, підкреслюючи її ключову роль у медицині та біології.

Ключові слова: морфометрія, гістологія, цитологія, ембріологія, освітній процес.

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@dmu.edu.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)

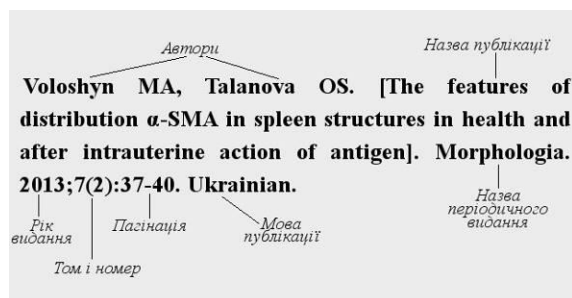
Всі літературні посилання, які наведені в роботі, обов'язково повинні бути представлені в списку першоджерел у порядку використання (посилань) у тексті. Скорочення назв журналів наводяться згідно зі стандартами Index Medicus (http://www.wsulibs.wsu.edu/general/journal_abbreviations.html). За достовірності 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.

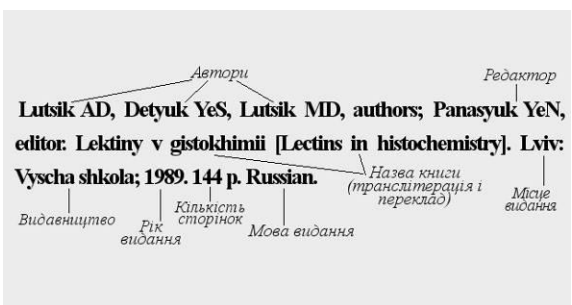
Коротка інструкція по оформленню типових літературних посилань відповідно до міжнародних вимог [Vancouver reference style \(NLM/PubMed\)](#).

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.

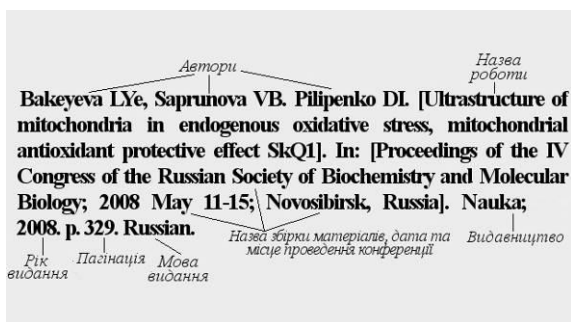
Оформлення посилання на книгу:



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 (perg.) 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.

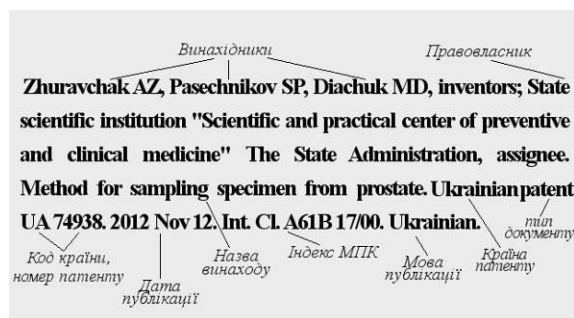
Оформлення посилання на матеріали конференції:



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 документа (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@dmu.edu.ua. In case of article acceptance a scanned copy of the "[Copy-right Agreement](#)" with the signature of the responsible author is sent to editorial office.

Appendix

References (Rules and examples of the list)

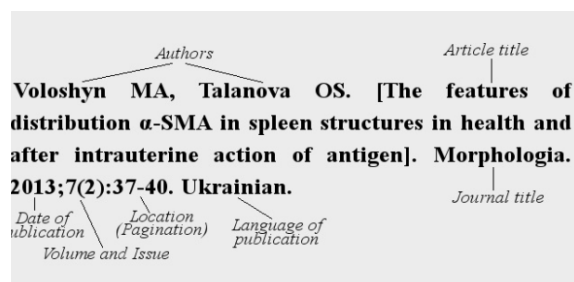
All references cited in the paper must be arranged in a list in order of their first mentioning in the text. Abbreviations of journal titles are provided in accordance with the standards of [Index Medicus](#). The author is responsible for the accuracy of the data provided in the bibliography.

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](#).

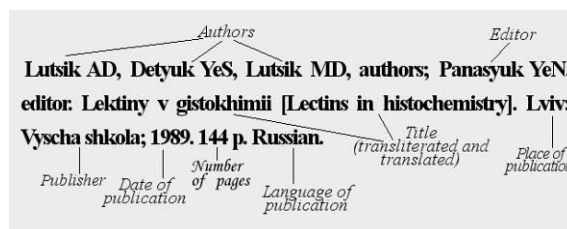
Reference to an article published in a periodical:



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

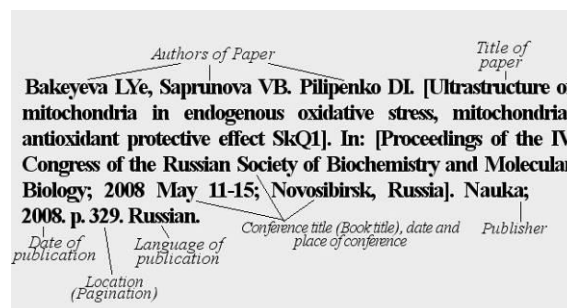
of the article put a dot and a space. For publications originally written in English title is not placed in square parentheses. Indicate journal title in English or by transliteration with symbols of the latin alphabet. It is possible to use the registered abbreviation of the periodical title. The title 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:

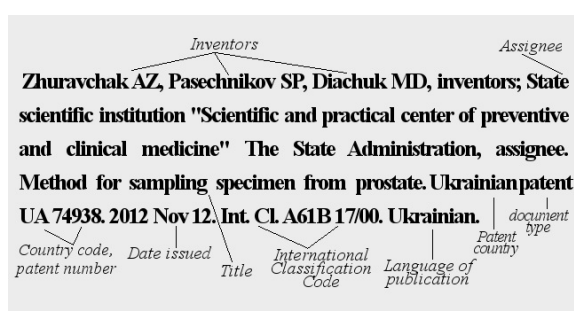


All authors should be indicated, separate them with a comma and a space. Initials are placed after the surnames, they are not separated by punctuation. Full names of the authors are not given. After the list of

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.

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:



All authors should be indicated, separate them with a comma and a space. Initials are placed after the

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.