

УДК 616.16+616.748]-091.8:616-005.1/4-092.9
DOI: 10.24061/1727-0847.22.3.2023.27

В. І. Луцик, П. Р. Сельський

*Кафедра патологічної анатомії з секційним курсом та судовою медициною (зав. – проф. П. Р. Сельський)
Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України*

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ МОРФОЛОГІЧНИХ ПОРУШЕНЬ ГЕМОМІКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА ТА СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ЗАДНІХ КІНЦІВОК ЩУРІВ ІЗ БІОХІМІЧНИМИ ЗМІНАМИ НА СИСТЕМНОМУ РІВНІ ПРИ ГОСТРІЙ ІШЕМІЇ-РЕПЕРFUЗІЇ ЗА УМОВ ГОСТРОЇ КРОВОВТРАТИ

Резюме. Гостру ішемію визначають як раптове зниження перфузії кінцівки, що створює потенційну загрозу її життєздатності. Ішемія та наступне реперфузійне пошкодження спричиняють зміни клітинного метаболізму. Морфологічні порушення істотно поглиблюються за умов гострої крововтрати.

Мета дослідження – встановити взаємозв'язок між ступенем морфологічних змін гемомікроциркуляторного русла і скелетних м'язів задніх кінцівок щурів та біохімічними змінами на системному рівні при ішемічно-реперфузійному ураженні на тлі гострої крововтрати із застосуванням нейромережевої кластеризації. Проведено біохімічне дослідження сироватки крові 30 статевозрілих білих щурів-самців, масою 200,0-240,0 г. У контрольній групі було 6 інтактних тварин. Моделювання ішемії виконували шляхом накладення гумових турнікетів SWAT (Stretch-Wrap-And-Tuck) на задні кінцівки тварин. Модель раннього постішемічного періоду була представлена підгрупами тварин із реперфузійними змінами через 2 години, 1 добу та 3 доби, а модель пізнього – через 7 та 14 діб після зняття турнікету. Для прогнозування прогресування структурних змін при розвитку ішемічно-реперфузійного синдрому на основі поєднаних змін біохімічних показників застосовано нейромережевий підхід із використанням надбудови NeuroXL Classifier для програми Microsoft Excel. У ранньому реперфузійному періоді структурні зміни проявлялися набряковим синдромом, дистрофічно-дегенеративними та деструктивними змінами у скелетних м'язах і фібрилярних структурах із запальною відповіддю на ішемічно-реперфузійне пошкодження за умов гострої крововтрати. У пізньому – сповільненням гострих проявів із неповним поверненням до вихідного стану. Зміни біохімічних показників були найбільш виражені в тварин моделі раннього періоду ішемічного ураження з термінами реперфузії 1 доба та 3 доби. Виявлено достовірне підвищення вмісту креатиніну на третю добу, який у цей період досяг свого максимуму, перевищуючи групу контролю на 33,09 % ($p < 0,01$). Встановлено зниження рівня загального білірубіну у перших трьох групах експериментальних тварин: через 2 години ішемії значення даного показника виявлялося нижчим на 3,07 % ($p > 0,05$), через 2 години реперфузії – на 14,89 % ($p > 0,05$), а через добу – на 25,06 % ($p < 0,05$) порівняно із значенням групи контролю. Виявлено статистично значуще підвищення рівня трансаміназ в сироватці крові щурів усіх досліджуваних груп. У тварин моделі пізнього постішемічного періоду (з терміном реперфузії 7 та 14 діб) спостерігалася тенденція до поступового повернення більшості біохімічних показників сироватки крові до контрольних рівнів, проте лише вміст тригліцеридів та загального білірубіну повністю зрівнявся із значенням групи контролю ($p > 0,05$). За допомогою кластерного портрета визначено, що на кластери із найвищим показником вираженості морфологічних порушень припали і вищі показники креатиніну, лужної фосфатази, АсАТ, АлаАТ та тригліцеридів, а також нижчі – загального білка і білірубіну.

Висновки. Структурні порушення мали односпрямований і прогресивний характер та наростали до кінця першої доби. Моделювання ішемічно-реперфузійного синдрому на тлі гострої крововтрати супроводжується значними змінами біохімічних показників сироватки крові вже у перші години після відновлення кровообігу із найбільшою вираженістю на першу та третю добу, що свідчить про посилене навантаження на органи системи гомеостазу та на системність уражень. Аналіз кластерних портретів при проведенні непромережевої кластеризації виявив, що при прогнозуванні прогресування структурних змін судинного русла та м'язих тканин кінцівок при розвитку ішемічно-реперфузійних уражень найвагомніше значення має поєднане підвищення рівнів лужної фосфатази, АсАТ та Ала Т.

Ключові слова: ішемія, гостра крововтрата, м'язова тканина, біохімічні показники, ішемічно-реперфузійний синдром.

Гостру ішемію визначають як раптове зниження перфузії кінцівки, що створює потенційну загрозу її життєздатності. Частота розвитку складає 140 випадків на 1 млн. населення у рік, а у структурі бойової травми пошкодження магістральних судин виявляють у 10 % випадків вогнестрільних поранень [1-3]. Ішемія та наступне реперфузійне пошкодження спричиняють зміни клітинного метаболізму, транспорту іонів і активацію протеїназ [4-6]. Морфологічні порушення істотно поглиблюються за умов гострої крововтрати [7-9]. Водночас, залишаються недостатньо вивченими динаміка цих змін у різні періоди ішемії-реперфузії, а також їх взаємозв'язок із ступенем ремоделювання гемомікроциркуляторного русла та м'яких тканин. Важливим є також оптимізація прогнозування розвитку морфологічних порушень у кінцівці при ішемічно-реперфузійному ураженні з метою ефективного прикладного використання на практиці.

Мета дослідження: встановити взаємозв'язок між ступенем морфологічних змін гемомікроциркуляторного русла і скелетних м'язів задніх кінцівок щурів та біохімічними змінами на системному рівні при ішемічно-реперфузійному ураженні на тлі гострої крововтрати із застосуванням нейромережевої кластеризації.

Матеріал і методи. Проведено біохімічне дослідження сироватки крові 30 статевозрілих білих щурів-самців, масою 200,0-240,0 г. У контрольній групі було шість інтактних тварин. Моделювання ішемії виконували шляхом накладення гумових турнікетів SWAT (Stretch-Wrap-And-Tuck) на задні кінцівки тварин, на рівні пахвинної складки впродовж 2-х годин під тіопентал-натрієвим знечуленням. Реперфузію моделювали шляхом зняття джгута і відновлення кровообігу у раніше ішемізованій кінцівці через 2 години після його накладання. Спостереження за тваринами здійснювали впродовж 14 діб.

Тварини експериментальної групи були розподілені на 6 підгруп дослідження, по 5 тварин у кожній. Досліджувалися морфологічні зміни м'язової тканини через дві години після накладання джгута без реперфузії (5 щурів). Модель раннього постішемічного періоду була представлена трьома підгрупами тварин із реперфузійними змінами через 2 години, 1 добу та 3 доби, а модель пізнього реперфузійного періоду – двома підгрупами тварин через 7 та 14 діб після зняття турнікету.

Моделювали гостру крововтрату шляхом пересікання стегнової вени. Після досягнення обсягу крововтрати ~ 25 % об'єму циркулюючої крові тваринам забезпечували гемостаз. При розрахунку

об'єму циркулюючої крові (ОЦК) за стандарт брали загальноприйнятну формулу у розмірі 7,8 % від загальної маси [10].

Евтаназію тварин здійснювали під тіопентал-натрієвим знечуленням (500 мг х кг¹ маси тіла внутрішньоочеревинно), шляхом декапітації, після чого проводили забір біологічного матеріалу. Дослідження проведені з дотриманням основних положень Закону України № 3447 – IV від 21.02.06 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006), Директиви Ради Європи 2010/63 ЕУ щодо експериментів на тваринах.

Гістологічне дослідження для визначення вираженості морфологічних порушень за моделювання раннього постішемічного періоду проводилося за загальноприйнятими методиками на кафедрі патологічної анатомії з секційним курсом та судовою медициною Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України (ТНМУ) [11]. Для морфологічного дослідження забирали фрагменти м'яких тканин задньої кінцівки тварин, нижче ділянки накладення турнікету на рівні середньої третини стегна. Вивчення препаратів здійснювали за допомогою мікроскопа Bresser Trino Researcher 40x-100x.

Кров для дослідження отримували із верхівки серця піддослідних тварин шляхом кардіотомії. Сироватку крові виділяли центрифугуванням. Біохімічні показники сироватки крові, а саме рівні загального білка, тригліцеридів, креатиніну, загального білірубіну, лужної фосфатази та трансаміназ (АлАт, АсАт) визначали у кожній піддослідній групі. Дослідження проводилось у центральній науково-дослідній лабораторії ТНМУ.

Статистична обробка матеріалу проводилася з використанням пакета програм «Microsoft Excel» (2010). Перевірку показників на нормальний розподіл здійснювали за тестом Колмогорова-Смірнова. За умов нормального розподілу статистична значущість різниці між середніми арифметичними оцінювалась за критерієм Ст'юдента-Фішера (t). При ненормальному розподілі у непарних групах визначення статистичної значущості отриманих результатів проводили за методом Манна-Уїтні (U).

З метою аналізу взаємозв'язку виявлених біохімічних змін на системному рівні із морфологічними порушеннями м'яких тканин задніх кінцівок та для прогнозування прогресування структурних змін при розвитку ішемічно-реперфузійного синдрому застосовано нейромережевий підхід із використанням надбудови NeuroXL Classifier для програми Microsoft Excel, що дозволило провести високоточну класифікацію із визначенням взаємозв'язків і трендів та встановити значення поєднаних змін показників [12, 13]

Результати дослідження та їх обговорення.

При гістологічному дослідженні м'язових волокон у перші дві години ішемії (1-а досліджувана група) спостерігалися фібрили із неоднорідною слабоеозинофільною саркоплазмою та пікнозом ядер. Поперечна посмугованість у багатьох випадках слабо візуалізувалася. Також мали місце ділянки розпаду саркоплазми та фрагментації самих волокон. Клітинних елементів виявлялося небагато і вони були представлені фібробластами, гістіоцитами та поодинокими лімфоцитами.

Через 2 години реперфузії (2-а група) ми констатували негативну динаміку патоморфологічних змін в усіх досліджених тканинах (рис. 1). При подібності із змінами на попередньому терміні негативні прояви набували системного характеру. У скелетних м'язах відмічена гомогенізація м'язових волокон, порушення їх звичайного прямолінійного розташування, набухання, розпад та зникнення характерної посмугованості. Такі структурні

зміни супроводжувалися клітинною інфільтрацією як між фрагментами зруйнованих волокон так і перифокально. В складі клітинних інфільтратів візуалізували скупчення лімфоцитів, макрофагів, гістіоцитів.

Увесь комплекс можливих структурних змін мікроскопічний аналіз скелетних м'язів показав на першу добу (3-а група дослідження). На поздовжніх зрізах м'язові волокна мали різну товщину, причому вона варіювала в межах одного волокна. Поперечна посмугованість прослідковувалася фрагментарно. Ядра втрачали своє лінійне розташування, частина виштовхувалася за межі волокна. Звичайними ставали ділянки деформації, фрагментації та розпаду волокон. Восковидна дегенерація змінювалася вакуольною дистрофією та міолізом. Характерними на цьому терміні були круглоклітинні запальні інфільтрати і крововиливи навколо та в товщі ділянок міолізу у поєднанні з проліферацією сполучнотканинних волокон.

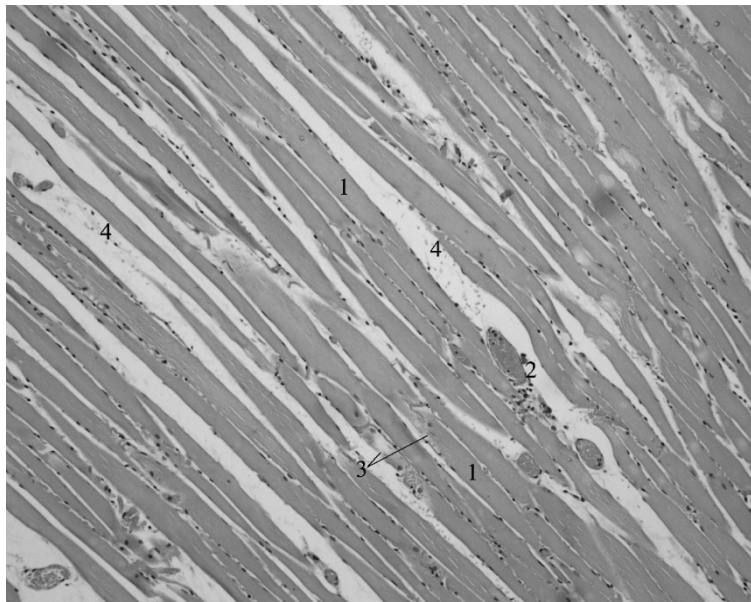


Рис. 1. Скелетний м'яз задньої кінцівки щура через 2 год ішемії на тлі крововтрати: 1 – м'язове волокно без поперечної посмугованості; 2 – повнокровна венула із стазом крові та лейкостазом, периваскулярний клітинний інфільтрат; 3 – осередки розпаду м'язових волокон; 4 – набряк ендомізію, позасудинні еритроцити. Забарвлення гематоксиліном і еозинном. $\times 100$

Аналіз мікроскопічного дослідження через 3 доби (4-а група) реперфузії показав деяку стабілізацію патоморфологічних змін, виявлених через 1 добу.

Поряд із порушеннями структури м'язових волокон виявлялися і структурні зміни у гемомікроциркуляторному руслі. Вже у перші дві години реперфузії (2-а група) в усіх полях зору у цей період характерним був спазм артеріол та нерівномірне розташування ендотелію на базальній мембрані. При цьому патологічні зміни розвивалися в усіх структурних елементах судинної стінки. Мали міс-

це нерівномірне розташування епітелію, порушення цілісності клітинних мембран та виражений набряк. Інтенсивність таких порушень наростала до кінця першої доби (3-а група). Характерною була також наявність інфільтратів поблизу судин з поширенням на перимізій та ендомізій.

Проведений аналіз мікроскопічного дослідження через 3 доби (4-а група) реперфузії показав деяку стабілізацію патоморфологічних змін, виявлених через 1 добу. Виявлялась також периваскулярна проліферація колагенових волокон та окремі периваскулярні крововиливи (рис. 2).

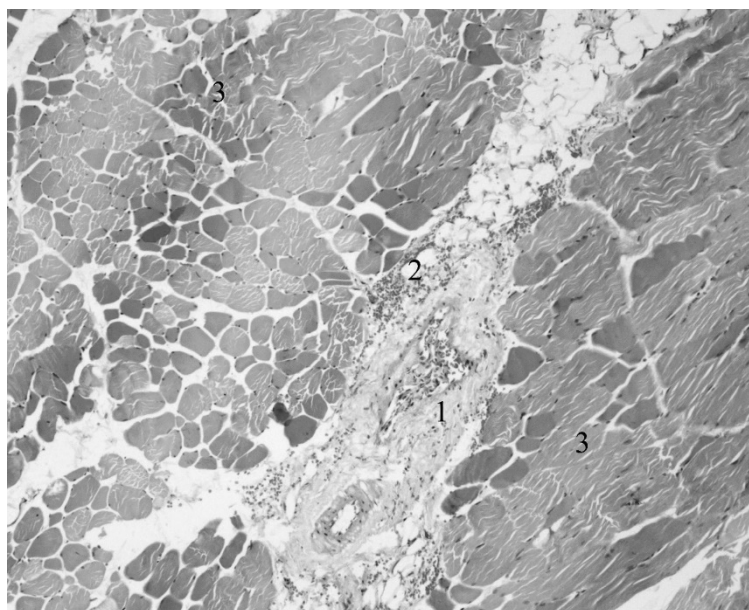


Рис. 2. Скелетний м'яз нижньої кінцівки щура із фрагментом мікроциркуляторного русла через 7 діб реперфузії: 1 – периваскулярна проліферація колагенових волокон; 2 – перивазальний крововилив; 3 – дистрофічно і некротично змінені м'язові волокна. Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 100$

Подібні структурні зміни м'язових волокон та гемомікроциркуляторного русла спостерігалися і до кінця першого тижня (5-а група дослідження), проте вони були менш інтенсивними та виявлялись локально. Через два тижні (6-а група дослідження) виявлялись лише локальні потовщення судин гемомікроциркуляторного

русла із проліферацією сполучнотканинних елементів та незначною перивазальною клітинною інфільтрацією.

Встановлено, що при моделюванні ішемії та реперфузії виникали системні порушення, що проявлялись зміною біохімічних показників сироватки крові (табл. 1).

Таблиця 1

Зміни біохімічних показників у сироватці крові білих щурів у різні періоди постішемичного періоду за умов гострої крововтрати ($M \pm m$)

Показник	Контроль	1-а група, без реперфузії	2-а група, реперфузія, 2 год	3-я група, реперфузія, 1 доба	4-а група, реперфузія, 3 доби	5-а група, реперфузія, 7 діб	6-а група, реперфузія, 14 діб
Загальний білок, г/л	54,68 $\pm 1,50$	50,82 $\pm 0,72^*$	49,28 $\pm 1,08^*$	44,38 $\pm 1,11^{****}$	43,18 $\pm 1,19^{***}$	49,22 $\pm 1,16^{**}$	48,21 $\pm 1,41^*$
Тригліцериди	0,65 $\pm 0,04$	0,62 $\pm 0,03$	0,58 $\pm 0,04$	0,69 $\pm 0,04^{**}$	0,75 $\pm 0,06$	1,02 $\pm 0,05^{***}$	0,73 $\pm 0,03^{****}$
Креатинін мкмоль/л	46,54 $\pm 1,27$	52,28 $\pm 1,29^*$	49,84 $\pm 1,37$	59,60 $\pm 1,66^{****}$	61,94 $\pm 1,87^{***}$	53,46 $\pm 1,30^{**}$	50,91 $\pm 1,10^*$
Загальний білірубін, мкмоль/л	4,23 $\pm 0,33$	4,10 $\pm 0,59$	3,60 $\pm 0,12$	3,17 $\pm 0,33^*$	3,42 $\pm 0,51$	4,10 $\pm 0,52$	3,81 $\pm 0,38$
АлАТ, од/л	61,30 $\pm 7,25$	62,26 $\pm 6,97$	80,10 $\pm 7,30$	146,82 $\pm 12,18^{****}$	117,42 $\pm 7,54^{****}$	122,26 $\pm 12,73^{***}$	101,16 $\pm 10,39^*$
АсАТ, од/л	90,38 $\pm 7,92$	96,20 $\pm 7,45$	127,50 $\pm 10,32^{***}$	210,0 $\pm 16,73^{****}$	246,60 $\pm 13,89^{***}$	158,90 $\pm 11,76^{****}$	127,08 $\pm 13,98^*$
ЛФ, од/л	123,28 $\pm 21,02$	132,10 $\pm 21,69$	108,09 $\pm 13,0$	299,78 $\pm 24,53^{****}$	335,8 $\pm 20,0^{***}$	282,2 $\pm 18,07^{***}$	232,02 $\pm 21,23^*$

Примітка 1.* – $p < 0,05$ порівняно з групою контролю.

Примітка 2.** – $p < 0,05$ порівняно з попередньою групою.

Примітка 3.*** – $p < 0,01$ порівняно з групою контролю.

Примітка 4.**** – $p < 0,01$ порівняно з попередньою групою

Рівень загального білка у сироватці крові експериментальних тварин через 2 години оклюзії без реперфузії (1-а група) був достовірно нижчим (на 7,60 %) порівняно з відповідним показником контрольної групи ($p < 0,05$).

Через 2 години після зняття джгута (2-а група) зазначений показник спостерігався незначно нижчим (на 3,13 %) у порівнянні з аналогічним показником першої групи ($p > 0,05$) та суттєво нижчим (на 10,96 %) порівняно з відповідним показником групи контролю ($p < 0,05$). Найнижчих значень у тварин моделі раннього постішемичного періоду вміст загального білка досяг через одну (3-а група) та три (4-а група) доби реперфузії, будучи відповідно на 23,21 % та 26,63 % нижчим відповідного показника контрольної групи ($p < 0,01$). При цьому показник загального білка у 3-ій групі виявлявся істотно нижчим також порівняно з аналогічним показником 2-ої досліджуваної групи (на 11,04 %; $p < 0,05$), проте між 3-ою і 4-ою групами експериментальних тварин рівні загального білка суттєво не різнилися ($p > 0,05$). У групах тварин моделі пізнього постішемичного періоду вміст загального білка залишався статистично достовірно нижчим порівняно з показником групи контролю ($p < 0,05$). При цьому, через сім діб експериментальної реперфузії (5-а група) спостерігалось значуще зростання зазначеного показника (на 12,27 %) порівняно з попередньою, 4-ою групою ($p < 0,05$). Водночас, рівні загального білка у сироватці крові експериментальних тварин через сім (5-а група) та чотирнадцять (6-а група) діб істотно не різнилися ($p > 0,05$).

Через 14 діб після декомпресії стегнової артерії вміст загального білка в сироватці крові істотно не відрізнявся від аналогічного показника першої та третьої груп тварин і був на 11,66 % нижчим порівняно з відповідним показником групи контролю, проте дана відмінність не виявилася статистично значущою ($p > 0,05$).

Рівень тригліцеридів у сироватці крові експериментальних тварин через 2 години оклюзії без реперфузії (1-а група) виявлявся незначно нижчим (на 4,84 %) порівняно з відповідним показником контрольної групи ($p > 0,05$). Через 2 години після зняття джгута (2-а група) зазначений показник спостерігався нижчим порівняно з аналогічним показником першої та контрольної груп (на 6,90 % та на 12,07 % відповідно), проте статистично достовірної відмінності не виявлялось ($p > 0,05$). У 3-ій групі тварин моделі раннього реперфузійного періоду відмічено статистично достовірне підвищення вмісту тригліцеридів у сироватці крові порівняно із попередньою групою (на 18,97 %; $p < 0,05$). Аналогічно мало місце підвищення даного по-

казника й у 4-ій групі дослідження порівняно із попередньою групою (на 8,70 %), проте статистично достовірної відмінності не спостерігалось ($p > 0,05$). Через 7 діб реперфузії показник рівня тригліцеридів у сироватці крові щурів (5-а група) досяг максимального рівня і був на 36,0 % вищим порівняно з відповідним показником попередньої групи ($p < 0,05$) та на 56,92 % вищим відповідного показника контрольної групи ($p < 0,01$). Через 14 діб (6-а група) вміст тригліцеридів істотно зменшився відносно попередньої групи (на 39,7 %; $p < 0,01$), проте залишався незначно вищим (на 12,31 %) порівняно з аналогічним показником контрольної групи ($p > 0,05$).

Виявлялось істотне збільшення вмісту креатиніну в сироватці крові у першій групі щурів (на 12,33 %; $p < 0,05$) порівняно з тваринами групи контролю. У другій групі рівень креатиніну залишався на тому ж рівні ($p > 0,05$). У третій групі тварин вміст креатиніну збільшився на 19,58 % у порівнянні з попередньою групою та на 28,06 % більше у порівнянні з групою контролю ($p < 0,01$). Вміст креатиніну продовжував збільшуватися у тварин моделі раннього реперфузійного періоду та у четвертій групі досяг свого максимуму, перевищуючи групу контролю на 33,09 % ($p < 0,01$). Упродовж пізнього реперфузійного періоду рівень даного показника поступово зменшувався, хоч і перевищував у тварин п'ятої та шостої груп аналогічний показник контрольної групи на 14,87 % та 9,39 % відповідно ($p < 0,05$).

Відмічено зниження рівня загального білірубину у перших трьох групах експериментальних тварин. Так, у першій групі значення даного показника виявлялося нижчим на 3,07 % ($p > 0,05$), у другій – на 14,89 % ($p > 0,05$), а у третій – на 25,06 % ($p < 0,05$), порівняно із значенням групи контролю. Через три доби (4-а група) мало місце зростання даного показника (на 7,89 % вище порівняно із попередньою групою), проте він все ще був нижчим аналогічного показника контрольної групи на 19,15 % ($p > 0,05$). На сьому добу у тварин моделі пізнього реперфузійного періоду (5-а група) спостерігалась така ж тенденція – зростання рівня загального білірубину (на 19,88 % вище порівняно із попередньою групою), проте він залишався нижчим аналогічного показника контрольної групи на 3,07 % ($p > 0,05$). Через 14 діб (6-а група) показник загального білірубину незначно знизився порівняно із аналогічним показником попередньої досліджуваної групи (на 7,61 %) без статистично достовірної відмінності ($p > 0,05$).

Мало місце зростання показника активності АлАТ у перших трьох досліджуваних групах експериментальних тварин. При цьому, у першій

групі (без реперфузії) значення даного показника лише на 1,57 % перевищувало відповідне значення групи контролю ($p > 0,05$), проте вже через 2 години реперфузії (2-а група) рівень АлАТ перевищував аналогічний у контрольній групі на 30,67 % ($p > 0,05$). Максимального значення показник активності АлАТ досяг у третій групі тварин раннього реперфузійного періоду (реперфузія через 1 добу), що було на 101,68 % вищим аналогічного показників другої групи та на 130,78 % – групи контролю ($p < 0,01$). У четвертій досліджуваній групі рівень АлАТ суттєво знизився у порівнянні з попередньою групою (на 40,8 %; $p < 0,05$), проте все ж залишався статистично достовірно вищим порівняно із групою контролю (на 89,98 %; $p < 0,01$). В пізньому реперфузійному періоді даний показник через 7 діб реперфузії залишався на тому ж рівні, перевищуючи аналогічний показник групи контролю на 99,45 % ($p < 0,01$). На 14-у добу у тварин шостої групи показник АлАТ дещо знизився у порівнянні з попередньою групою (на 20,86 %; $p > 0,05$), проте все ще істотно перевищував рівень показника контрольної групи щурів (на 65,02 %; $p < 0,05$).

У ранньому реперфузійному періоді у перших чотирьох досліджуваних групах щурів мало місце зростання активності АсАТ. у першій групі (без реперфузії) значення даного показника перевищувало відповідне значення групи контролю на 6,44 % ($p > 0,05$), через 2 години реперфузії (2-а група) – на 41,07 % ($p < 0,05$), а через 1 добу реперфузії (3-а група) – на 132,35 % ($p < 0,01$). Рівень АсАТ продовжував підвищуватися у тварин моделі раннього реперфузійного періоду та у четвертій групі досяг свого максимуму, перевищуючи групу контролю на 172,85 % ($p < 0,01$). В пізньому реперфузійному періоді даний показник через 7 діб реперфузії суттєво знизився, порівняно із попередньою досліджуваною групою (на 55,19 %; $p < 0,05$), проте продовжував істотно перевищувати аналогічний показник групи контролю (на 75,81 %; $p < 0,01$). У тварин шостої групи рівень АсАТ дещо знизився у порівнянні з попередньою групою (на 25,04 %; $p > 0,05$), проте все ще залишався значно вище показника контрольної групи щурів (на 40,60 %; $p < 0,05$).

Показник активності ЛФ у першій та другій досліджуваних групах спостерігався на рівні контрольної групи дослідних тварин ($p > 0,05$). На першу добу реперфузії (3-а група) виявлено статистично значуще підвищення активності ЛФ, рівень якої був на 177,34 % вищим порівняно з аналогічним показником попередньої групи та на 143,17 % вищим у порівнянні з групою контролю ($p < 0,01$). Максимальна активність ЛФ мала місце у четвер-

тій досліджуваній групі з реперфузією 3 доби. Зазначений показник спостерігався на 12,02 % вищим порівняно з аналогічним показником попередньої групи ($p > 0,05$) та на 172,39 % вищим порівняно з відповідним показником групи контролю ($p < 0,01$). У п'ятій групі дослідних тварин рівень активності ЛФ незначно знизився порівняно з показником попередньої групи (на 19,07 %; $p > 0,05$), проте на 128,91 % залишався вищим порівняно з аналогічним показником групи контролю ($p < 0,01$). У шостій групі дослідних тварин рівень активності ЛФ продовжив знижуватись порівняно з показником попередньої групи (на 21,63 %; $p > 0,05$), проте все ще залишався суттєво вищим порівняно з аналогічним показником групи контролю (на 88,21 %; $p < 0,05$).

З метою встановлення значення поєднаних змін тих чи інших параметрів для прогнозування розвитку ішемічно-реперфузійних пошкоджень було здійснено нейромережеву кластеризацію результатів біохімічного аналізу (рис. 3) на основі показників сироватки крові білих щурів у різні періоди гострої ішемії-реперфузії: загальний білок (1), креатинін (2), лужна фосфатаза (3), АсАТ (4), АлАТ (5), загальний білірубін (6), тригліцериди (7) та S (8) – тяжкість, вираженість морфологічних змін у різні періоди після зняття турнікету. При цьому значення S визначалося щодо кожної піддослідної тварини 1-ої групи як «1», 2-ої – «2», 3-ої (найбільш виражені морфологічні порушення) – «3» та 4-ої – «2».

Для алгоритму нейромережевої кластеризації обрано параметри, запропоновані програмою, та кількість кластерів, рівну трьом. На рисунку 3 а, б наведено результати виконання програмою кластеризації показників дослідження тварин різних груп. До першого кластеру віднесено 50,0 % піддослідних тварин, до другого – 10,0 %, а до третього – 40,0 % тварин.

Як вказано на рисунку 3а, найвище значення показника вираженості морфологічних змін у задніх кінцівках щурів при розвитку ішемії-реперфузії (S) виявлялося у другому та третьому кластерах. При цьому за допомогою кластерного портрета можна визначити, що на другий і третій кластери припали і вищі показники креатиніну (8,38 % та 8,76 % відповідно), лужної фосфатази (68,52 % та 39,31 % відповідно), АсАТ (32,29 % та 34,72 % відповідно), АлАТ (23,82 % та 31,52 % відповідно) та тригліцеридів (3,03 % та 10,61 % відповідно), а також нижчі – загального білка (6,53 % та 6,72 % відповідно) і білірубину (8,3 % та 7,67 % відповідно) у порівнянні з аналогічними показниками у першому кластері.

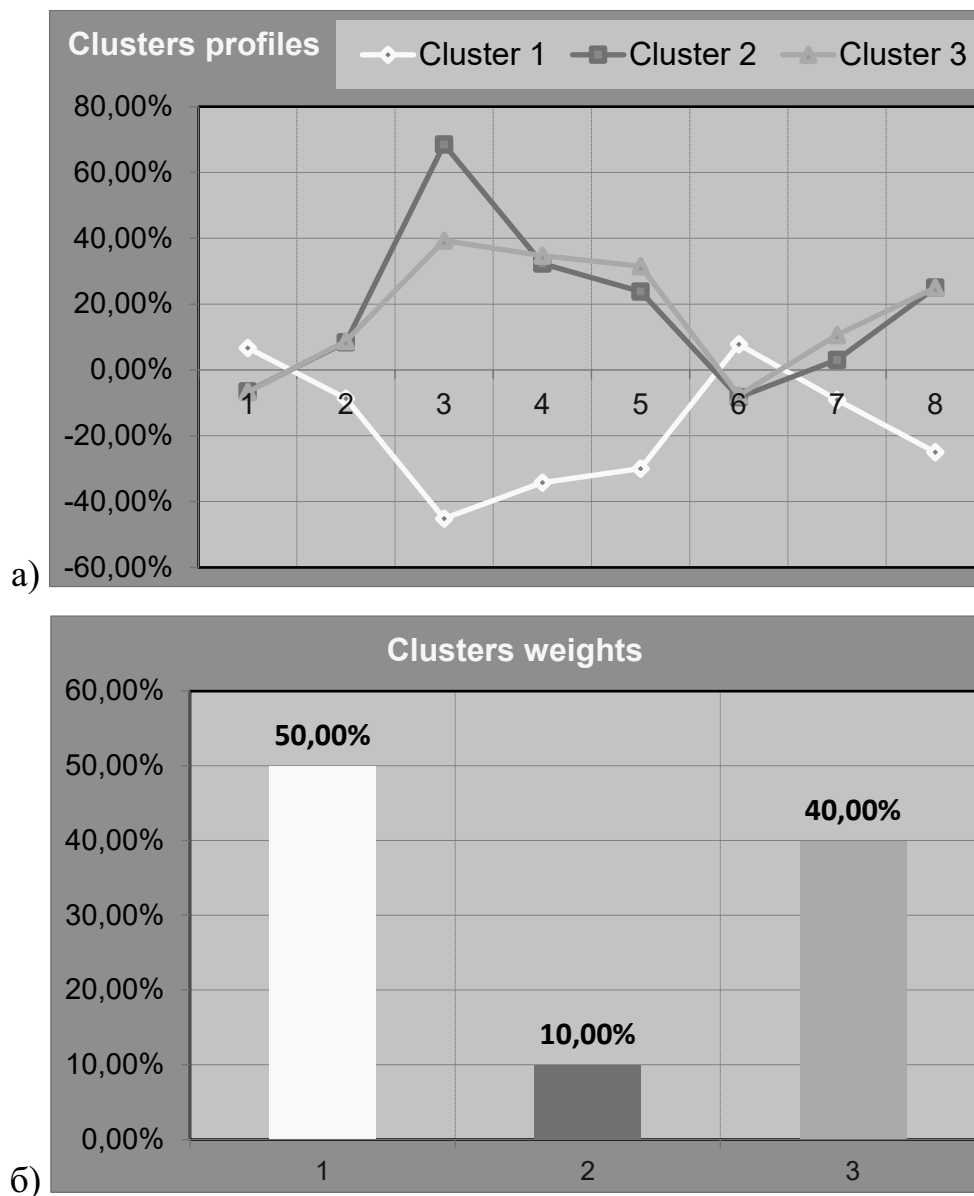


Рис. 3. Результати кластеризації біохімічних показників сироватки крові підослідних тварин у різні періоди розвитку ішемії-реперфузії за умов гострої крововтрати: а) кластерний портрет – значення параметрів, включно із біохімічними показниками та показником вираженості морфологічних змін у різні періоди після зняття турнікету; б) частки кластерів – відсотки підослідних тварин, які потрапили у певний кластер

Висновки. 1. У ранньому реперфузійному періоді структурні зміни проявлялися набряковим синдромом, дистрофічно-дегенеративними та деструктивними змінами у скелетних м'язах і фібрилярних структурах із запальною відповіддю на ішемічно-реперфузійне пошкодження за умов гострої крововтрати. Структурні порушення мали односпрямований і прогредієнтний характер та наростали до кінця першої доби. 2. У пізньому реперфузійному періоді ремоделювання структурних компонентів виявлялося сповільненням гострих проявів із неповним поверненням до вихідного стану. 3. Моделювання ішемічно-реперфузійного синдрому на тлі гострої крововтрати супроводжу-

ється значними змінами біохімічних показників сироватки крові вже безпосередньо у перші години після відновлення кровообігу, що свідчить про посилене навантаження на органи системи гомеостазу та на системність уражень. Зміни біохімічних показників сироватки крові були найбільш виражені в третій та четвертій групах тварин моделі раннього періоду ішемічного ураження з термінами реперфузії 1 доба та 3 доби. 4. Виявлено достовірне підвищення вмісту креатиніну у четвертій досліджуваній групі, який у цей період (на третю добу) досяг свого максимуму, перевищуючи групу контролю на 33,09 % ($p < 0,01$). 5. Встановлено зниження рівня загального білірубину у перших

трьох групах експериментальних тварин: у першій групі значення даного показника виявлялося нижчим на 3,07 % ($p > 0,05$), у другій – на 14,89 % ($p > 0,05$), а у третій – на 25,06 % ($p < 0,05$), порівняно із значенням групи контролю. 6. Виявлено статистично значуще підвищення рівня трансаміназ в сироватці крові щурів усіх досліджуваних груп. Максимального значення показник активності АлАТ досяг у третій групі тварин раннього реперфузійного періоду (1 доба), що було на 130,78 % вище групи контролю ($p < 0,01$), а рівень АсАТ спостерігався найвищим у четвертій групі (3 доби), перевищуючи групу контролю на 172,85 % ($p < 0,01$). 7. У тварин моделі пізнього постішемичного періоду (п'ята і шоста групи з терміном реперфузії 7 та 14 діб) спостерігалася тенденція до поступового повернення більшості біохімічних показників сироватки крові до контрольних рівнів, проте лише вміст тригліцеридів та загального білірубину повністю зрівнявся із значенням групи контролю ($p > 0,05$). 8. Аналіз кластерних портретів

при проведенні нейромережевої кластеризації на основі біохімічних показників сироватки крові білих щурів у поєднанні з показником вираженості морфологічних порушень у рині періоди ішемії-реперфузії при гострій крововтраті виявив, що при прогнозуванні прогресування структурних змін судинного русла та м'яких тканин кінцівок при розвитку ішемічно-реперфузійних уражень найсуттєвіше значення мають поєднані зміни підвищення рівня креатиніну, лужної фосфатази, АсАТ, АлАТ та тригліцеридів, а також зниження – загального білка і білірубину. При цьому найвагомніше значення має поєднане підвищення рівнів лужної фосфатази, АсАТ та АлАТ.

Перспективи подальших досліджень. Виявлені закономірності та тенденції біохімічних змін можуть бути використані для подальших досліджень та розробки нових напрямків корекції структурно-функціональних порушень мікоциркуляторного русла та м'яких тканин нижніх кінцівок при різних видах компресійної травми.

Список використаної літератури

1. Elsharawy MA, Elsaid A, Elsharawi I. Reperfusion of Delayed Acute Occlusive Limb Ischemia: Is It Worthwhile? *World J Cardiovasc Dis.* 2014;4:580-5. DOI: 10.4236/wjcd.2014.412070.
2. Dick F, Li J, Giraud MN, Kalka C, Schmidli J, Tevæearai H. Basic control of reperfusion effectively protects against reperfusion injury in a realistic rodent model of acute limb ischemia. *Circulation.* 2008 Nov 4;118(19):1920-8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.787754.
3. Хоменко ІП, Король СО, Матвійчук БВ. Клінічно-організаційні особливості надання травматологічної допомоги пораненим із дефектами м'яких тканин при вогнепальних та мінно-вибухових ушкодженнях кінцівок. *Травма.* 2018;19(5):125-9.
4. Мальченко ОА. Патогенетичне обґрунтування підходів до корекції пошкоджень тканин кінцівки при експериментальному реперфузійному синдромі: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня кандидата мед. наук. Київ; 2016. 24 с.
5. Генік СМ, Симчич АВ. Реферфузійний синдром після ревазуляризації ішемії нижніх кінцівок. *Серце і судини.* 2016;3:104-8.
6. Григор'єва ІІ, Джімашвілі ДГ, Денисов ВА. Морфологічні зміни в м'язовій тканині після гострої кровотечі: експериментальне дослідження. *Медичний альманах.* 2019;22(2):79-82.
7. Коновчук ВМ. Геморагічний гіповолемічний шок та розвиток поліорганного ушкодження. *Буковинський медичний вісник.* 2009;13(1):12-6.
8. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem.* 2018;46(4):1650-67. doi: 10.1159/000489241.
9. Drew B, Bennett BL, Littlejohn L. Application of current hemorrhage control techniques for backcountry care: part one, tourniquets and hemorrhage control adjuncts. *Wilderness Environ Med.* 2015 Jun;26(2):236-45. doi: 10.1016/j.wem.2014.08.016.
10. Горбань ІІ, Гудима АА, Максимів РВ. Динаміка показників цитолізу за умов гострої крововтрати, ускладненої ішемією-реперфузією кінцівки, та їх корекція карбацетамом. *Медична та клінічна хімія.* 2020;2:23-30.
11. Багрій ММ, Діброва ВА, редактори. *Методики морфологічних досліджень: монографія.* Вінниця: Нова книга; 2016. 328 с.
12. Du KL. Clustering: a neural network approach. *Neural Netw.* 2010 Jan;23(1):89-107. doi: 10.1016/j.neunet.2009.08.007.

13. Selskyy PR, Vakulenko DV, Televiak AT, Veresiuk TO. On an algorithm for decision-making for the optimization of disease prediction at the primary health care level using neural network clustering. *Family Medicine & Primary Care Review*. 2018;20(2):171-5.

References

1. Elsharawy MA, Elsaid A, Elsharawi I. Reperfusion of Delayed Acute Occlusive Limb Ischemia: Is It Worthwhile? *World J Cardiovasc Dis*. 2014;4:580-585. DOI: 10.4236/wjcd.2014.412070.
2. Dick F, Li J, Giraud MN, Kalka C, Schmidli J, Tevæarai H. Basic control of reperfusion effectively protects against reperfusion injury in a realistic rodent model of acute limb ischemia. *Circulation*. 2008 Nov 4;118(19):1920-8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.787754.
3. Khomenko IP, Korol' SO, Matviychuk BV. Klinichno-orhanizatsiyni osoblyvosti nadannya travmatolohichnoyi dopomohy poranenyim iz defektamy m"yakykh tkanyn pry vohnepal'nykh ta minno-vybukhovyykh ushkodzhennyakh kintsivok. *Travma*. 2018;19(5):125-9. [in Ukrainian].
4. Mal'chenko OA. Patohenetychne obgruntuvannya pidkhodiv do korektsiyi poshkodzen' tkanyn kintsivky pry eksperymental'nomu referfuziynomu syndromi: avtoref. dys. na zdobuttya nauk. stupenya kandydata med. nauk. Kyiv; 2016. 24 s. [in Ukrainian].
5. Henyk SM, Symchych AV. Referfuziynyy syndrom pislya revaskulyaryzatsiyi ishemiyyi nyzhnykh kintsivok. *Sertse i sudyny*. 2016;3:104-8. [in Ukrainian].
6. Hryhor"yeva II, Dzhimashvili DH, Denysov VA. Morfolohichni zminy v m"yazoviyi tkanyni pislya hostroyi krovotechi: eksperymental'ne doslidzhennya. *Medychnyy al'manakh*. 2019;22(2):79-82. [in Ukrainian].
7. Konovchuk VM. Hemorahichnyy hipovolemichnyy shok ta rozvytok poliorhannoho ushkodzhennya. *Bukovyns'kyy medychnyy visnyk*. 2009;13(1):12-6. [in Ukrainian].
8. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(4):1650-67. doi: 10.1159/000489241.
9. Drew B, Bennett BL, Littlejohn L. Application of current hemorrhage control techniques for backcountry care: part one, tourniquets and hemorrhage control adjuncts. *Wilderness Environ Med*. 2015 Jun;26(2):236-45. doi: 10.1016/j.wem.2014.08.016.
10. Horban' II, Hudyma AA, Maksymiv RV. Dynamika pokaznykiv tsytolizu za umov hostroyi krovovraty, uskladnenoyi ishemiyyu-reperfuziyyu kintsivky, ta yikh korektsiya karbatsetatom. *Medychna ta klinichna khimiya*. 2020;2:23-30. [in Ukrainian].
11. Bahriy MM, Dibrova VA, redaktyr. *Metodyky morfolohichnykh doslidzen': monohrafiya*. Vinnytsya: Nova knyha; 2016. 328 s. [in Ukrainian].
12. Du KL. Clustering: a neural network approach. *Neural Netw*. 2010 Jan;23(1):89-107. doi: 10.1016/j.neunet.2009.08.007.
13. Selskyy PR, Vakulenko DV, Televiak AT, Veresiuk TO. On an algorithm for decision-making for the optimization of disease prediction at the primary health care level using neural network clustering. *Family Medicine & Primary Care Review*. 2018;20(2):171-5.

COMPARATIVE ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL DISORDERS IN THE HEMOMICROCIRCULATORY BED AND SKELETAL MUSCLES OF THE HIND LIMBS IN RATS WITH BIOCHEMICAL CHANGES AT THE SYSTEMIC LEVEL DURING ACUTE ISCHEMIA-REPERFUSION UNDER CONDITIONS OF ACUTE BLOOD LOSS.

Abstract. Acute ischemia is defined as a sudden decrease in limb perfusion, which poses a potential threat to its viability. Ischemia and subsequent reperfusion injury cause changes in cellular metabolism. Morphological disorders are significantly aggravated by acute blood loss. The aim of study was to establish relationship between the degree of morphological changes in the hemomicrocirculatory bed and skeletal muscles of the hind limbs of rats and biochemical changes at the systemic level in ischemia-reperfusion injury against the background of acute blood loss using neural network clustering. Biochemical study of blood serum from 30 mature white male rats weighing 200-240 g was performed. There were 6 intact animals in the control group. Ischemia was modelled by applying SWAT (Stretch-Wrap-And-Tuck) rubber tourniquets to the hind limbs of animals. The model of the early postischemic period was represented by subgroups of animals with reperfusion changes 2 hours, 1 day, and 3 days, and the model of the late postischemic period was represented by subgroups of animals with reperfusion changes 7 and 14 days after removal of the tourniquet. To predict

progression of structural changes in the development of ischemia-reperfusion syndrome based on combined changes in biochemical parameters, a neural network approach was applied using the NeuroXL Classifier add-in for Microsoft Excel. In the early reperfusion period, structural changes were manifested by edema syndrome, dystrophic degenerative and destructive changes in skeletal muscle and fibrillar structures with inflammatory response to ischaemic reperfusion injury under conditions of acute blood loss. In the late stage, the acute manifestations were slowed down with incomplete return to the initial state. Changes in biochemical parameters were most pronounced in animals of the early period of ischemic injury with reperfusion periods of 1 day and 3 days. Significant increase in creatinine content was detected on the third day, which reached its maximum during this period, exceeding the control group by 33.09 % ($p < 0.01$). Decrease in the level of total bilirubin was found in the first three groups of experimental animals: after 2 hours of ischemia, the value of this indicator was 3.07 % ($p > 0.05$) lower, after 2 hours of reperfusion – by 14.89 % ($p > 0.05$), and after one day – by 25.06 % ($p < 0.05$), compared with the control group. A statistically significant increase in the level of transaminases in the blood serum of rats at all studied groups was found. In the animals of the late postischemic period model (with reperfusion period of 7 and 14 days), there was a tendency to a gradual return of most biochemical parameters of the blood serum to control levels, but only the content of triglycerides and total bilirubin was completely equal to the control group ($p > 0.05$). Using the cluster portrait, it was determined that the clusters with the highest severity of morphological disorders also had higher values of creatinine, alkaline phosphatase, AST, ALT and triglycerides, and lower values of total protein and bilirubin. Conclusions. Structural disorders were unidirectional and progressive in nature and increased by the end of the first day. Modelling of ischemia-reperfusion syndrome in the setting of acute blood loss is accompanied by significant changes in serum biochemical parameters during the first hours after blood circulation recovery with the greatest severity on the first and third days, indicating an increased load on the organs of homeostasis system and on the systemic nature of lesions. Analysis of cluster portraits using neural network clustering revealed that in predicting the progression of structural changes in the vascular bed and soft tissues of the extremities in the development of ischemia-reperfusion injuries, the most important is the combined increase in the levels of alkaline phosphatase, ALP and ALT.

Key words: ischemia, acute blood loss, muscle tissue, biochemical indicators, ischemia-reperfusion syndrome.

Відомості про авторів:

Луцик Віталій Ігорович – аспірант кафедри патологічної анатомії з секційним курсом та судовою медициною Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, м. Тернопіль;

Сельський Петро Романович – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри патологічної анатомії з секційним курсом та судовою медициною Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, м. Тернопіль.

Information about the authors:

Lutsyk Vitalii I. – Postgraduate Student of the Department of Pathological Anatomy with a section course and forensic medicine of the Ternopil National Medical University named after I. Ya. Gorbachevskiy Ministry of Health of Ukraine, Ternopil;

Selskyy Petro R. – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy with a sectional course and forensic medicine of the Ternopil National Medical University named after I. Ya. Gorbachevskiy Ministry of Health of Ukraine, Ternopil.

Надійшла 19.07.2023 р.

Рецензент – проф. Т. В. Хмара (Чернівці)