

DOI 10.17721/1728.2748.2022.90.1-40

Наведено експериментальні дані про особливості будови, розвитку та функціонування рослинних і тваринних організмів, флору та фауну України, одержані на основі досліджень, що проводять науковці ННЦ "Інститут біології та медицини" у галузях фізіології рослин і тварин, генетики, ботаніки, зоології, мікробіології, вірусології. Викладено нові дані стосовно біохімічних і біофізичних основ регуляції у клітинах і органах у нормі та після впливу різноманітних фізико-хімічних факторів. Подано результати нових методичних розробок.

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів.

Collection of articles written by the scientists of ESC "Institute of biology and medicine" contains data on research in molecular biology, physiology, genetics, microbiology, virology, botanics, zoology concerning the structure, development and function of the plant and animal organisms, flora and fauna of Ukraine. Results of newly developed biophysical methods of biological research, biochemical data regarding metabolic regulation under the influence of different factors are presented.

For scientists, professors, aspirants and students.

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ	Л. Остапченко, д-р біол. наук, проф. (м. Київ, Україна) Є. Торгалло, канд. біол. наук (заст. відп. ред.) (м. Київ, Україна); Р. Мневесь, лікар (м. Київ, Україна); Шарміла Фагуні, канд. біол. наук (м. Турин, Італія); Вадим Гапоненко, канд. техн. наук, проф. (м. Чикаго, США); Кет Козирицька, канд. техн. наук (м. Бостон, США); Юрій Мандрик, канд. мед. наук (м. Кобленц, Німеччина); Ніколета Лугонія, канд. хім. наук (м. Белград, Сербія); Шандор Макай, д-р біол. наук, проф. (м. Сомбатхей, Угорщина); Абенаволі Людовіко, д-р мед. наук (м. Катандзаро, Італія); Іван Бубряк, канд. мед. наук (Оксфорд, Велика Британія); В. Мартинюк, д-р біол. наук, проф. (м. Київ, Україна); М. Макачук, д-р біол. наук, проф. (м. Київ, Україна); Н. Таран, д-р біол. наук, проф. (м. Київ, Україна); А. Сиволюб, д-р біол. наук, проф. (м. Київ, Україна); В. Джаган, канд. біол. наук, доц. (м. Київ, Україна); В. Хоперія, д-р мед. наук, проф. (м. Київ, Україна); Т. Берегова, д-р біол. наук, проф. (м. Київ, Україна); М. Держинський, д-р біол. наук, проф. (м. Київ, Україна); О. Жолос, д-р біол. наук, проф. (м. Київ, Україна)
Адреса редколегії	ННЦ "Інститут біології та медицини"; просп. акад. Глушкова, 2 а, м. Київ, 03127, Україна ☎ (38044) 521-35-98; https://bio.visnyk.knu.ua/
Затверджено	Вченою радою ННЦ "Інститут біології та медицини" 11.10.22 (протокол № 3)
Атестовано	Вищою атестаційною комісією України. Постанова Президії ВАК України № 1-05/3 від 14.04.10
Зареєстровано	Міністерством юстиції України. Свідоцтво про державну реєстрацію КВ № 16053-4525 ПР від 09.11.09
Засновник та видавець	Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет". Свідоцтво внесено до Державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02
Адреса видавця	ВПЦ "Київський університет", б-р Тараса Шевченка, 14, м. Київ, 01601, Україна, ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28
Журнал входить до наукометричних баз:	Index Copernicus (із 2012 р. ICV – 2019 = 71.39); Cite Factor (із 2014 р.); Research Bible (із 2013 р.); Academic Keys (із 2013 р.); DOAJ (із 2013 р.); EBSCO.EJS (із 2012 р.); Free medical journals list of Geneva Foundation for Medical Education and Research (із 2014 р.); HINARI (із 2013 р.); Medical Journals Links (із 2013 р.); OAJI (із 2012 р.); The Knowledge Network (із 2014 р.); Ulrich's Periodicals Directory (із 2012 р.); WorldCat (із 2013 р.); "Наукова періодика України" в Національній бібліотеці України імені В. І. Вернадського та в Національному депозитарії академічних текстів

DOI 10.17721/1728.2748.2022.90.1-40

Collection of articles written by the scientists of ESC "Institute of biology and medicine" contains data on research in molecular biology, physiology, genetics, microbiology, virology, botanics, zoology concerning the structure, development and function of the plant and animal organisms, flora and fauna of Ukraine. Results of newly developed biophysical methods of biological research, biochemical data regarding metabolic regulation under the influence of different factors are presented.

For scientists, professors, aspirants and students.

Наведено експериментальні дані про особливості будови, розвитку та функціонування рослинних і тваринних організмів, флору та фауну України, одержані на основі досліджень, що проводять науковці ННЦ "Інститут біології та медицини" у галузях фізіології рослин і тварин, генетики, ботаніки, зоології, мікробіології, вірусології. Викладено нові дані стосовно біохімічних і біофізичних основ регуляції у клітинах і органах у нормі та після впливу різноманітних фізико-хімічних факторів. Подано результати нових методичних розробок.

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів.

EDITOR-IN-CHIEF	Lyudmila Ostapchenko, Dr. Hab., Prof. (Kyiv, Ukraine)
EDITORIAL BOARD	Elizabeth Torgalo, PhD, researcher (Deputy editor-in-chief) (Kyiv, Ukraine); Ruslan Mnevets, Dr. (technical secretary) (Kyiv, Ukraine); Sharmila Fagoonee, PhD (Turin, Italy); Vadim Gaponenko, PhD, Prof. (Chicago, United States); Kat Kozrytska, PhD (Boston, United States); Yuriy Mandryk, PhD (Koblentz, Germany); Nikoleta Lugonja, PhD (Belgrade, Republic of Serbia); Sandor Makai, Prof., Dr. Hab. (Szombathely, Hungary); Ludovico Abenavoli, PhD, Associate Prof. (Catanzaro, Italy); Ivan Boubriak, Prof. (Oxford, United Kingdom); Viktor Martynyuk, Dr. Science, Prof. (Kyiv, Ukraine); Mykola Makarchuk, Dr. Science, Prof. (Kyiv, Ukraine); Nataliya Taran, Dr. Science, Prof. (Kyiv, Ukraine); Andriy Syvolob, Dr. Science, Prof. (Kyiv, Ukraine); Veronika Dzhagan, PhD, Associate Prof. (Kyiv, Ukraine); Viktoriya Hoperia, Dr. Science, Prof. (Kyiv, Ukraine); Tetyana Beregova, Dr. Science, Prof. (Kyiv, Ukraine); Mykola Dzerzhynsky, Dr. Science, Prof. (Kyiv, Ukraine); Oleksandr Zholos, Dr. Science, Prof. (Kyiv, Ukraine)
Editorial address	ESC "Institute of Biology and Medicine", 2a, acad. Glushkov av., Kyiv, 03127, Ukrainian ☎ (38044) 521 35 98; https://bio.visnyk.knu.ua/
Approved by	The Academic Council of the ESC "Institute of Biology and Medicine" 11.10.22 (Protokol № 3)
Attested by	Higher Attestation Commission of Ukraine HAC Presidio decree № 1-05/3 (April 14th, 2010)
Registered by	Ministry of Justice of Ukraine. Registration certificate KV № 16053-4525 ПП (November 9th, 2009)
Founded and Published	Taras Shevchenko National University of Kyiv, Publishing house "Kyiv University". Certificate included in the State Register ДК № 1103 від 31.10.02
Publisher's Address	Publishing and Polygraphic Center "Kyiv University", 14, Taras Shevchenko blvd., Kyiv, 01601, Ukraine, ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; fax 239 31 28
Abstracted and Indexed:	Academic Keys, CiteFactor, Directory of Open Access Journals (DOAJ), E-Library.ru, Hinari, Geneva Foundation for Medical Education and Research, DRJI, Open Academic Journal Index (OAJI), Quality Open Access Market (QOAM), ResearchBib, Ulrich's Periodicals, WorldCat, Ukrainian scientific journals; V. I. Vernadsky National Library of Ukraine, The journal uses CLOCKSS digital archiving policy as well as an electronic archive of Vernadsky National Library of Ukraine.

Бородін С., Короткий О., Юет А., Дворщенко К. Перекисне окиснення ліпідів у синовіальній рідині хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції.....	5
Омельяненко І., Фалалєєва Т., Цирюк О., Сулаєва О. Цитологічна діагностика тонкогілкових пункційних біопсій щитоподібної залози в Україні: зіставлення з даними міжнародної практики	9
Пожилов І., Снігур Г. Захворюваність та поширення вірусів злакових культур у 2020–2021 роках в Україні.....	14
Креницька Д., Рачковська А., Савчук О., Карбовський В. Біохімічні параметри функціонування нирок у донорів за наявності анти-SARS-CoV-2 IgG у кровотоці	20
Шевченко Т., Бедерак Р., Тагер К., Снігур Г., Шевченко О. Змішані інфекції овочевих культур в Україні.....	26
Мариненко Т., Галенова Т. Окремі параметри системи гемостазу та показники обміну триптофану в пацієнтів з ішемічною хворобою серця	30
Калмикова О., Шеметова Г., Скрипник Н., Савчук О., Держинський М. Мелатонін покращує гістофізіологію селезінки щурів з індукованим ожирінням: хронотерапевтичний підхід	34

CONTENTS

Borodin S., Korotkyi O., Huet A, Dvorshchenko K. Lipid peroxidation in the synovial fluid of patients with osteoarthritis after SARS-CoV 2-infection	5
Omelianenko I., Falalyeyeva T., Tsyryuk O., Sulaieva O. Cytological diagnosis of fine-needle puncture biopsies of the thyroidgland in Ukraine: comparis on with international practice.....	9
Pozhylov I., Snihur H. Incidence and spread of cereals viruses in 2020-2021 in Ukraine	14
Krenytska D., Rachkovska A., Savchuk O., Karbovskiy V. Biochemical parameters of kidney function in donors under the presence of anti- SARS-CoV-2 IgG in blood	20
Shevchenko T., Bederak R., Taher K., Snihur H., Shevchenko O. Mixed viral infections in vegetables in Ukraine	26
Marynenko T., Halenova T. Certain parameters of the hemostasis system and indicators of tryptophane metabolism in patients with coronary heart disease	30
Kalmukova O., Shemetova H., Skrypnyk N., Savchuk O., Dzerzhynsky N. Melatonin improves spleen histophysiology of rats with diet-induced obesity: chronotherapy approach.....	34

ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У СИНОВІАЛЬНІЙ РІДИНІ ХВОРИХ НА ОСТЕОАРТРИТ ПІСЛЯ SARS-CoV2-ІНФЕКЦІЇ

Коронавірусна хвороба 2019 року (Coronavirus disease 2019, COVID-19) становить велику загрозу для здоров'я людства. Інфекція SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) є респіраторним захворюванням, що характеризується розвитком важких ускладнень, небезпечних для життя людини. Захворювання на COVID-19 має більшу схильність до тяжкого, а іноді й летального перебігу, особливо у літніх людей із супутніми захворюваннями. Актуальним питанням є прогнозування перебігу хронічних захворювань у людей, що перехворіли на коронавірусну інфекцію. У літературі повідомляється про все більшу кількість випадків артриту, пов'язаного з COVID-19, що робить цей стан вартим для подальшого вивчення. Відомо, що розвиток остеоартритів пов'язаний з окисним стресом та надлишковим продукуванням активних форм кисню. Продукти перекисного окиснення ліпідів можуть служити маркером інтенсивності вільнорадикальних процесів.

Метою роботи було визначити концентрацію продуктів перекисного окиснення ліпідів у синовіальній рідині хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. Усі учасники дослідження були поділені на дві групи. Перша група (n=22) – пацієнти з остеоартритом колінних суглобів II–III ступеня, друга (n=14) – пацієнти з остеоартритом колінних суглобів II–III ступеня, які перенесли легку та середньотяжку форму COVID-19 шість – дев'ять місяців тому. Було здійснене оцінювання продуктів перекисного окиснення ліпідів у синовіальній рідині пацієнтів усіх дослідних груп. Концентрації дієвих кон'югатів визначали в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометричним методом, шифрових основ – флуориметричним методом, ТБК-активних продуктів – за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК). Обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики.

Установлено, що у синовіальній рідині пацієнтів з остеоартритом колінних суглобів, які перехворіли на COVID-19, концентрація продуктів перекисного окиснення ліпідів зростає порівняно із групою хворих на остеоартрит (дієвих кон'югатів – у 1,7 раза, ТБК-активних сполук – у 1,5 раза, шифрових основ – у 1,3 раза). Виявлені зміни свідчать про порушення окисно-антиоксидантної рівноваги. Це може вказувати на превалювання вільнорадикальних процесів і розвиток окисного стресу безпосередньо в суглобі. Отримані результати свідчать, що у хворих на остеоартрит після інфікування COVID-19 можливий розвиток більш важкого ураження суглобів та виникнення ускладнень.

Ключові слова: SARS-CoV-2, остеоартрит, синовіальна рідина, перекисне окиснення ліпідів, окисний стрес.

Вступ. Швидке глобальне поширення важкого гострого респіраторного синдрому (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2, SARS-CoV-2) становить велику загрозу для людей. Передусім коронавірусна хвороба 2019 (Coronavirus disease 2019, COVID-19) – захворювання дихальної системи, що вражає паренхіму легенів [1]. Однак нещодавні дослідження показали, що COVID-19 може вражати кілька систем органів, викликати розвиток позалегенових симптомів та ускладнювати стан пацієнтів із коморбідними захворюваннями, що небезпечно для їхнього здоров'я [2].

У важких випадках вірус активує імунну систему, що призводить до системного запалення та імунної дисрегуляції. Ускладнення включають ниркову недостатність, дисфункцію міокарда, тромботичні явища та порушення роботи травної системи [3]. Через новизну цього захворювання картина наслідків після перенесеної COVID-19 досі залишається невивченою. Одним із таких наслідків є розвиток артралгії, яка виражається болем у суглобах і є одним із симптомів, що виникають у пацієнтів із COVID-19. Установлено, що артралгія наявна в 14,9 % випадків у хворих на коронавірусну інфекцію [4], проте даних про ревматичні та запальні вияви ураження суглобів (напр. остеоартрит) за умов коронавірусної інфекції дуже мало. Отже, незважаючи на те, що з початку пандемії було зроблено багато кроків уперед у розумінні патогенності вірусу, багато віддалених наслідків, пов'язаних із інфекцією, ще потрібно з'ясувати. У літературі повідомляється про все більшу кількість випадків артриту, пов'язаного із COVID-19, що робить цей стан вартим для подальшого вивчення [5–8]. Повні клінічні та лабораторні дані, ретельне спостереження за пацієнтом і вивчення механізмів патогенезу мають першорядне значення для проведення ретельної диференціальної діагностики та кращого визначення ознак запального ураження суглобів, пов'язаного з інфекцією SARS-CoV2.

Відомо, що розвиток остеоартритів пов'язаний з окисним стресом та надлишковим продукуванням активних форм кисню (АФК). За фізіологічних умов АФК регулюють внутрішньоклітинні сигнальні процеси, старіння і апоптоз хондроцитів, синтез і деградацію позаклітинного матриксу, а за патології – синовіальне запалення і дисфункцію субхондральної кістки. Наслідком надмірного утворення АФК на біохімічному рівні є ушкодження біологічних молекул: білків, ліпідів та нуклеїнових кислот. Серед них продукти перекисного окиснення ліпідів можуть служити маркером інтенсивності вільнорадикальних процесів у досліджуваному органі. Тому метою роботи було визначити концентрацію продуктів перекисного окиснення ліпідів у синовіальній рідині хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції.

Об'єкт та методи досліджень. У дослідженні брали участь 36 пацієнтів у віці від 39 до 70 років, які перебували на стаціонарному або амбулаторному лікуванні в ортопедичному спеціалізованому медичному центрі "Ортоклініка" (Тернопіль, Україна) із приводу остеоартриту. У пацієнтів був встановлений діагноз "остеоартрит колінних суглобів II–III ступеня" на підставі клінічних та рентгенологічних критеріїв. На етапі відбору всім хворим робили рентгенографію колінних суглобів у прямій (передньо-задній) та бокових проекціях. Оцінювання інтенсивності болю і функціонального стану колінних суглобів хворих проводили за допомогою розрахунку індексу WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index), який підраховується в результаті самотійного проходження пацієнтом тесту, що включає

24 запитання, які відображають вираженість больових відчуттів (5 запитань), скутості (2 запитання) та функціональної активності (17 запитань) [9].

Усі учасники дослідження надалі були поділені на такі групи. Перша група (n=22) – пацієнти з остеоартритом колінних суглобів II–III ступеня, друга (n=14) – пацієнти з остеоартритом колінних суглобів II–III ступеня, які перенесли легку та середньотяжку форми COVID-19 шість – дев'ять місяців тому. Діагноз COVID-19 був підтверджений молекулярним аналізом (RT-PCR) мазка з носоглотки. Усі учасники, що добровільно погодилися взяти участь у цьому дослідженні, ознайомилися і підписали відповідну форму інформованої згоди. Дослідження виконані з дотриманням основних положень "Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини", затверджених Гельсінською декларацією (1964–2013), ICH GCP (1996), Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р. та схвалені комітетами з етики медичного центру "Ортоклініка" (Тернопіль, Україна) і Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка (Київ, Україна). Ужито всіх заходів для забезпечення анонімності пацієнтів.

Збір біологічного матеріалу проводили на базі спеціалізованого медичного центру "Ортоклініка", м. Тернопіль, Україна. У проведених дослідженнях оцінювали продукти перекисного окиснення ліпідів у синовіальній рідині пацієнтів усіх дослідних груп. Синовіальну рідину збирали у стерильні пробірки з гепарином шляхом артроцентезу колінного суглоба відповідно до стандартних протоколів обробки. Ураховуючи, що найбільші порожнини колінного та кульшового суглобів мають максимальний об'єм синовіальної рідини до 3,5 мл, збір біологічного матеріалу в умовно здорових людей є небезпечним і може призвести до порушення структурно-функціонального стану суглоба. У зв'язку із цим у дослідженнях група умовно здорових людей відсутня.

У синовіальній рідині визначали такі показники. Концентрації дієнових кон'югатів визначали в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометричним методом, шифрових основ – флуориметричним методом [10, 11], концентрацію ТБК-активних продуктів – за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [12]. Отримані дані тестували на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро – Уїлка з використанням програмного пакету "GraphPad Prism 8.4.3" ("GraphPad Software Inc.", США). Подальший обрахунок результатів відбувався за допомогою Н-критерію Крускала – Уолліса із посттестом

Данна. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного $\pm$ стандартна похибка середнього. Результати вважали значущими, коли $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Важливою складовою функціонування суглоба в межах фізіологічної норми є склад і особливості метаболізму синовіальної рідини. Синовій виконує цілу низку важливих функцій: трофічна забезпечує поживними речовинами суглобові хрящі, метаболічна – видалення старих клітин, амортизаційна – зниження навантаження на суглобові поверхні та їх легке ковзання, захисна – утворення бар'єра між суглобовими структурами й пошкоджувальними агентами. Тому дослідження параметрів стану синовіальної рідини є важливим критерієм для розуміння розвитку патологічного процесу в суглобі, встановлення діагнозу та моніторингу лікування захворювань суглобів.

Порушення окисно-антиоксидантної рівноваги у бік інтенсифікації вільнорадикальних процесів має важливе значення у патогенезі запальних процесів. Зокрема, у синовіальному середовищі суглоба вільнорадикальні процеси виконують значну роль у розвитку запальної відповіді, ліпопероксидації та старінні клітин суглобового хряща – хондроцитів. Перекиси ліпідів є окисненими продуктами ненасичених жирних кислот, які можуть служити індикаторами окисного стресу.

У проведених нами дослідженнях встановлено, що у групі пацієнтів, хворих на остеоартрит колінних суглобів, у синовіальній рідині концентрація первинних продуктів перекисного окиснення ліпідів – дієнових кон'югатів – становила $11,24 \pm 1,08$ ммоль $\times$ л⁻¹. При дослідженні концентрації цього показника у синовіальній рідині суглобів групи пацієнтів з остеоартритом, які перехворіли COVID-19, концентрація дієнових кон'югатів збільшується в 1,7 раза відносно групи хворих на остеоартрит. Показано, що в синовіальній рідині хворих на остеоартрит концентрація вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів – ТБК-активних сполук – становила $2,71 \pm 0,25$ ммоль $\times$ л⁻¹. При вивченні концентрації досліджуваного показника у синовіальній рідині суглобів пацієнтів з остеоартритом, які перенесли легку та середньотяжку форми COVID-19, концентрація ТБК-активних сполук зростала в 1,5 раза відносно групи хворих на остеоартрит. Концентрація ж кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів – шифрових основ – у синовіальній рідині групи хворих на остеоартрит становила $1,19 \pm 0,98$ ум. од. $\times$ л⁻¹. Установлено, що концентрація цього показника у синовіальній рідині суглобів пацієнтів з остеоартритом, які перехворіли на COVID-19, зростала в 1,3 раза відносно групи хворих лише на остеоартрит (табл. 1).

Таблиця 1. Концентрація продуктів перекисного окиснення ліпідів у синовіальній рідині колінних суглобів дослідних груп (M $\pm$ m)

Показник \ Групи людей	Остеоартрит (n = 22)	Остеоартрит + COVID-19 (n = 14)
Дієнові кон'югати, ммоль $\times$ л ⁻¹	11,24 $\pm$ 1,08	18,83 $\pm$ 1,72*
ТБК-активні продукти, ммоль $\times$ л ⁻¹	2,71 $\pm$ 0,25	4,02 $\pm$ 0,36*
Шиффові основи, ум. од. $\times$ л ⁻¹	1,19 $\pm$ 0,98	1,57 $\pm$ 0,14*

* – $p < 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом.

Отримані нами результати свідчать про накопичення продуктів ліпідної пероксидації у синовіальній рідині хворих на остеоартрит, які перехворіли на COVID-19, що підтверджує порушення окисно-антиоксидантної рівноваги. Це вказує на превалювання вільнорадикальних процесів і розвиток окисного стресу безпосередньо в суглобі.

З одного боку, утворені продукти перекисного окиснення ліпідів спричиняють накопичення токсичних сполук (альдегідів, кетонів тощо) і подальше ушкодження інших біомолекул (ліпідів, білків, нуклеїнових кислот). Зокрема, вторинний продукт перекисного окиснення ліпідів – малоновий діальдегід – здатний реагувати з ДНК, утворюючи ДНК-аддукти. Також за рахунок взаємодії з ε -NH₂-групами лізину або N-кінцевими амінокислотами білків, NH₂-групами фосфоліпідів і глікозамінів малоновий діальдегід формує містки всередині молекул та між ними з утворенням шифрових основ. Це призводить до порушення структурно-функціонального стану біомолекул [13]. Наприклад, у дослідженнях канадських учених на моделі *in vitro* показано, що малоновий альдегід окиснює білки хрящового матриксу. Це, у свою чергу, зумовлює зміни біохімічних та біофізичних властивостей хрящової тканини [14].

Розвиток окисного стресу в синовіальній рідині пацієнтів, хворих на остеоартрит, був показаний низкою дослідників [15, 16]. Ними встановлено підвищення продуктування активних форм кисню (H₂O₂, NO[•]) та інтенсифікацію процесів перекисного окиснення ліпідів (збільшення вмісту малонового діальдегіду). При цьому вони виявили пригнічення активності ферментів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, каталази, глутатіон-S-трансферази, глутатіонпероксидази) на тлі зниження вмісту відновленого глутатіону. Інтенсифікація вільнорадикального окиснення і посилення прооксидантних властивостей синовіальної рідини хворих на остеоартрит залежали від вираженості патологічного процесу, тяжкості оперативного втручання при артроскопії, сприяли поглибленню деструктивно-дистрофічних змін суглобового хряща та підвищенню рівня апоптозу і некрозу хондроцитів.

З іншого боку, ліпідні радикали збільшують набряк та вироблення простагландинів, що посилює розвиток запалення. Вважають, що простагландини, які виявляються в підвищених кількостях у синовіальній рідині та синовіальній оболонці, відіграють ключову роль у розвитку вазодилатації, екстравазації рідини та болю в синовіальних тканинах. Більше того, з'являється все більше доказів того, що простагландини (особливо простагландин E₂) є медіаторами, які беруть участь у складних взаємодіях, що призводять до розвитку ерозій суглобового хряща та навколосуглобової кістки [17]. Саме тому інгібітори синтезу простагландинів (інгібітори циклооксигенази-2 та нестероїдні протизапальні препарати) широко використовують при лікуванні артритів.

Отже, окисний стрес відіграє важливу роль при розвитку остеоартриту, викликаючи запалення та деградацію хрящового матриксу в суглобах. Продуктування АФК і подальше перекисне окиснення ліпідів пов'язані з антиоксидантною здатністю хондроцитів, виконуючи ключову роль у їх загибелі та деградації хряща [18, 19].

Таким чином, для кращого пояснення етіології та розвитку остеоартриту важливими є показники руйнування суглобів, які є одними з найважливіших характеристик у прогресуванні захворювання. Вивчення різних факторів і сигнальних шляхів, що беруть участь у катаболічному пошкодженні хряща, має першорядне значення для розуміння розвитку остеоартриту. Зокрема, серед цих факторів показники інтенсивності вільнорадикальних про-

цесів (АФК, продукти перекисного окиснення ліпідів і білків) є важливими параметрами оцінювання структурно-функціонального стану суглоба.

За літературними даними відомо, що вірусні інфекції можуть бути причиною розвитку гострої артралгії та артрити. Наприклад, моноартикулярний артрит може виникнути після інфікування різними збудниками, включаючи такі, як вірус гепатиту В, вірус гепатиту С, вірус Епштейна – Барра, вірус імунodefіциту людини, парвовірус та низку інших вірусів [20]. Також респіраторні вірусні інфекції у осіб похилого віку та жінок призводять до зростання кількості випадків розвитку ревматоїдного артрити [21]. Вважають, що ці симптоми переважно виникають унаслідок запальних та/або імунних реакцій, у розвиток яких залучені прозапальні цитокіни (інтерлейкіни 1, 6, 17, фактор некрозу пухлин α), що вивільняються при альвеолярному та скелетно-м'язовому запаленні [22, 23]. Особливо чутливі до розвитку реактивних артритів, викликаних інфекційними агентами, хворі, які мають до цього схильність. Зокрема, особливу групу становлять пацієнти, у яких вже діагностовано остеоартрит. Ураховуючи отримані нами результати, важливим вважаємо подальше дослідження перебігу остеоартриту у пацієнтів, які перенесли COVID-19.

Висновки. Установлено, що у хворих на остеоартрит колінних суглобів після SARS-CoV2-інфекції у синовіальній рідині збільшується концентрація продуктів перекисного окиснення ліпідів порівняно з пацієнтами, у яких діагностовано остеоартрит. Отримані нами результати та проведений аналіз літературних даних клініцистів із різних частин світу свідчить, що у хворих на остеоартрит після інфікування COVID-19 можливі розвиток більш важкого ураження суглобів та виникнення ускладнень. Тому повні клінічні та лабораторні дані, ретельне спостереження за пацієнтом і вивчення механізмів патогенезу мають першорядне значення для проведення персоналізованої ретельної диференціальної діагностики та чіткого визначення ознак ураження суглобів, пов'язаного з інфекцією SARS-CoV2.

Список використаних джерел

- Forchette L., Sebastian W., Liu T. A Comprehensive Review of COVID-19 Virology, Vaccines, Variants, and Therapeutics. *Curr Med Sci.* 2021 Dec;41(6):1037-1051. doi: 10.1007/s11596-021-2395-1. Epub 2021 Jul 9.
- Finsterer J., Scorza F.A., Scorza C.A., Fiorini A.C. Extrapulmonary onset manifestations of COVID-19. *Clinics (Sao Paulo)*. 2021 Jul 5;76:e2900. doi: 10.6061/clinics/2021/e2900. eCollection 2021.
- Gupta A., Madhavan M.V., Sehgal K., et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat. Med.* 2020;26:1017–32. doi: 10.1038/s41591-020-0968-3. Epub 2020 Jul 10.
- Jiang F., Deng L., Zhang L., Cai Y., Cheung CW, Xia Z. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382: 1708-1720. doi: 10.1007/s11606-020-05762-w.
- Ono K., Kishimoto M., Shimasaki T., Uchida H., Kurai D., Deshpande G.A., Komagata Y., Kaname S. Reactive arthritis after COVID-19 infection. *RMD Open*. 2020 Aug;6(2):e001350. doi: 10.1136/rmdopen-2020-001350.
- Gasparotto M., Framba V., Piovella C., Doria A., Iaccarino L. Post-COVID-19 arthritis: a case report and literature review. *Clin. Rheumatol.* 2021 Aug;40(8):3357-3362. doi: 10.1007/s10067-020-05550-1.
- Mukarram M.S., Ishaq Ghauri M., Sethar S., Afsar N., Riaz A., Ishaq K. COVID-19: An Emerging Culprit of Inflammatory Arthritis Case Rep. *Rheumatol.* 2021 Apr 26;2021:6610340. doi: 10.1155/2021/6610340. eCollection 2021.
- Bo Langhoff Hønge, Marie-Louise From Hermansen, Merete Storgaard Reactive arthritis after COVID-19 *BMJ Case Rep.* 2021 Mar 2;14(3):e241375. doi: 10.1136/bcr-2020-241375.
- McConnell S., Kolopack P., Davis A.M. The Western Ontario and McMaster universities osteoarthritis index (WOMAC): a review of its utility and measurement properties. *Arthritis Care Res.* 2001;45(5):453–61. doi: 10.1002/1529-0131(200110)45:5<453::aid-art365>3.0.co;2-w.
- Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов. *Лабораторное дело*. 1988. № 2. С. 60–63.

11. Колесова О.Е., Маркин А.А., Федорова Т.Н. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах. *Лабораторное дело*. 1984. № 9. С. 540–546.
12. Rowley D., Gutteridge J.M.C., Blake D., Farr M., Halliwell B. Lipid peroxidation in rheumatoid arthritis: thiobarbituric acid-reactive material and catalytic iron salts in synovial fluid from rheumatoid patients. *Clin Sci* 1984;66:691-5. doi: 10.1042/cs0660691.
13. Jové M., Mota-Martorell N., Pradas I., Martín-Gari M., Ayala V., Pamplona R. The Advanced Lipoxidation End-Product Malondialdehyde-Lysine in Aging and Longevity. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Nov; 9(11): 1132. doi: 10.3390/antiox9111132
14. Abusarah J., Bentz M., Benabdoune H., Rondon P.E., Shi Q., Fernandes J.C., Fahmi H., Benderdour M. An overview of the role of lipid peroxidation-derived 4-hydroxynonenal in osteoarthritis. *Inflamm Res*. 2017 Aug;66(8):637-651. doi: 10.1007/s00011-017-1044-4.
15. Ostalowska A., Birkner E., Wiecha M., Kasperczyk S., Kasperczyk A., Kapolka D., Zon-Giebel A. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006 Feb;14(2):139-45. doi: 10.1016/j.joca.2005.08.009.
16. Wu Q., Zhong Z.M., Zhu S.Y., Liao C.R., Pan Y., Zeng J.H., Zheng S., Ding R.T., Lin Q.S., Ye Q., Ye W.B., Li W., Chen J.T. Advanced oxidation protein products induce chondrocyte apoptosis via receptor for advanced glycation end products-mediated, redox-dependent intrinsic apoptosis pathway. *Apoptosis*. 2016 Jan;21(1):36-50. doi: 10.1007/s10495-015-1191-4.
17. Crofford L.J., Wilder R.L., Ristimäki A.P., et al. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 β , phorbol ester, and corticosteroids. *Journal of Clinical Investigation*. 1994;93(3):1095–1101. doi: 10.1172/JCI117060.

18. Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* 2020 Apr 7;323(13):1239-1242. doi: 10.1001/jama.2020.2648.
19. Wichmann D. et al. Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19. *Ann. Intern. Med.* (2020). <https://doi.org/10.7326/M20-2003>.
20. Siva C., Velazquez C., Mody A., Brasington R. Diagnosing acute monoarthritis in adults: a practical approach for the family physician. *Am. Fam. Physician*. 2003; 68: 83-90.
21. Joo Y.B., Lim Y.H., Kim K.J., Park K.S., Park Y.J. Respiratory viral infections and the risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2019; 21: 199. doi: 10.1186/s13075-019-1977-9.
22. Darif D., Hammi I., Kihel A., El Idrissi Saik I., Guessous F., Akarid K. The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: What goes wrong? *Microb. Pathog.* 2021 Apr; 153: 104799. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104799.
23. Montazersaheb S., Hosseiniyan Khatibi S.M., Hejazi M.S., Tarhriz V., Farjami A., Ghasemian Sorbeni F., Farahzadi R., Ghasemnejad T. COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. *Virol. J* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=%22Virol+J%22%5Bjour%5D>. 2022 May 26;19(1):92. doi: 10.1186/s12985-022-01814-1.

Надійшла до редколегії 12.08.2022
Отримано виправлений варіант 13.09.2022
Підписано до друку 13.09.2022

Received in the editorial 12.08.2022
Received version on 13.09.2022
Signed in the press on 13.09.2022

S. Borodin, PhD Stud.,
O. Korotkyi, Dr. Sci.,
A. Huet, PhD,
K. Dvorshchenko, Dr. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

LIPID PEROXIDATION IN THE SYNOVIAL FLUID OF PATIENTS WITH OSTEOARTHRITIS AFTER SARS-CoV 2-INFECTION

The 2019 coronavirus disease (Coronavirus disease 2019, COVID-19) poses a great threat to the health of people in all countries of the world. Infection with SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) is a respiratory disease characterized by the development of severe life-threatening complications. COVID-19 is more likely to be severe and sometimes fatal, especially in older people with co-morbidities. A topical issue is predicting the course of chronic diseases in people who have contracted a coronavirus infection. An increasing number of cases of arthritis associated with COVID-19 have been reported in the literature, making this condition worthy of further study. It is known that the development of osteoarthritis is associated with oxidative stress and excessive production of reactive oxygen species. Lipid peroxidation products can serve as a marker of the intensity of free radical processes.

The aim of the study was to determine the concentration of lipid peroxidation products in the synovial fluid of patients with osteoarthritis after SARS-CoV2 infection. All study participants were divided into two groups. The first group (n=22) is patients with osteoarthritis of knee joints II-III degree. The second group (n=14) is patients with osteoarthritis of the knee joints II-III degree, who suffered a mild and moderate form of COVID-19 6–9 months ago. In the conducted studies, the products of lipid peroxidation in the synovial fluid of patients of all research groups were evaluated. The content of diene conjugates was determined in the heptane-isopropanol extract by the spectrophotometric method, Schiff bases by the fluorimetric method. The content of TBA-active products was determined by the reaction with thiobarbituric acid (TBA). The processing of the research results was carried out using generally accepted methods of variational statistics.

It was established that in the synovial fluid of patients with osteoarthritis of the knee joints who contracted COVID-19, the concentration of lipid peroxidation products increases compared to the group of patients with osteoarthritis (diene conjugates – by 1.7 times, TBA-active compounds – by 1.5 times, Schiff bases – 1.3 times). The detected changes indicate a violation of the oxidative-antioxidant balance. This indicates the prevalence of free radical processes and the development of oxidative stress directly in the joint. The results obtained by us indicate that patients with osteoarthritis may develop more severe joint damage and complications after infection with COVID-19.

Keywords: SARS-CoV-2, osteoarthritis, synovial fluid, lipid peroxidation, oxidative stress.

УДК616.441:574:477
DOI 10.17721/1728.2748.2022.90.9-13

І. Омеляненко¹, асп.,
Т. Фалалєєва¹, д-р біол. наук,
О. Цирюк¹, д-р біол. наук,
О. Суласва², д-р мед. наук
¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
²Медична лабораторія CSD, Київ, Україна

ЦИТОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ТОНКОГОЛКОВИХ ПУНКЦІЙНИХ БІОПСІЙ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ В УКРАЇНІ: ЗІСТАВЛЕННЯ З ДАНИМИ МІЖНАРОДНОЇ ПРАКТИКИ

Рак щитоподібної залози – один з небагатьох раків, які діагностуються за допомогою цитологічного дослідження тонкогілкової пункційної біопсії вузлових утворень. Для досягнення стандартизації діагностичної термінології, морфологічних критеріїв та ризику злоскісності в усьому світі використовують шестирівневу систему Бетезда. Метою цієї роботи були аналіз результатів цитологічних досліджень тонкогілкових аспіраційних пункційних біопсій (ТАПБ) вузлів щитоподібної залози за міжнародною системою Бетезда за останні три роки і зіставлення їх зі світовою практикою. Було проведено 5687 досліджень, де відсоток жінок становив 87,9, а чоловіків 12,1. Найпоширенішим цитологічним висновком був клас II (доброякісне утворення) – 3061 дослідження (57 %). Кількість випадків, інтерпретованих як клас III, увійшла в межі референтних значень (8,2 %). Четвертий клас становить 8,2 %, п'ятий – 3,5 %, шостий – 5 %. Загалом наведені три класи становлять 17,2 %. Порівняно з референтними значеннями та даними інших лабораторій наш аналіз виявив зіставні результати. Аналіз структури результатів цитологічних досліджень за Бетездою визначив високий відсоток першого класу (неінформативний), що свідчить про потребу більш тісної взаємодії між клініцистами та цитологами.

Ключові слова: щитоподібна залоза, рак, пункційна біопсія, міжнародна система Бетезда.

Вступ. В усьому світі спостерігається тенденція до зростання ендокринних захворювань. На сьогодні найактуальнішою проблемою є тиреоїдна патологія, тому діагностика та лікування вузлових утворень щитоподібної залози (ЩЗ) є пріоритетним напрямом в онкопатології.

Рак щитоподібної залози (РЩЗ) становить 2 % у структурі всіх онкологічних захворювань. У жінок він шостий за розповсюдженістю, що у чотири рази більше порівняно із чоловіками. Близько 2 % припадає на дітей [1]. Вживаність пацієнтів із РЩЗ залежить від низки факторів, включаючи стадію, на якій було діагностовано карциному, вік, а також гістологічний тип пухлини. Хоча п'ятирічна виживаність при папілярному РЩЗ становить 98 %, цей показник значно нижчий при медулярних та анапластичних карциномах. Наприклад, для локалізованого анапластичного РЩЗ п'ятирічна виживаність становить лише 31 % [2].

РЩЗ належить до одного з небагатьох видів раків, що діагностуються за допомогою цитологічного дослідження, яке проводять при вузловій патології ЩЗ. В усьому світі визначено, що цитологічне дослідження тонкогілкової пункційної аспіраційної біопсії вузлових утворень ЩЗ є "золотим стандартом" і точним та економічно доцільним методом.

Важливо, що, окрім диференційної діагностики між різними патологічними процесами та типами пухлин ЩЗ, цитологічне дослідження тонкогілкових аспіраційних пункційних біопсій (ТАПБ) під контролем ультразвукової діагностики (УЗД) надає важливу інформацію щодо подальшого менеджменту пацієнтів.

Для досягнення стандартизації діагностичної термінології, морфологічних критеріїв та ризику злоскісності було створено шестирівневу систему The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology (BSRTC) [3, 4]. Категорії та ризик злоскісності в ній описано у табл. 1.

Таблиця 1. Ризики злоскісності відповідно до класів міжнародної класифікації Bethesda

Діагностичний клас	Ризик злоскісності (2017)	Менеджмент пацієнта
I – недіагностичний матеріал	5–10 %	Повторне ТАБ під УЗД
II – доброякісне ураження	0–3 %	Клінічне та сонографічне спостереження
III – атипія невизначеного значення / фолікулярне ураження незрозумілого ґенезу	6–18 %	Повторне ТАБ, молекулярне тестування або гемітиреоїдектомія
IV – фолікулярна неоплазія / підозра на фолікулярну неоплазію	10–40 %	Молекулярне тестування, гемітиреоїдектомія
V – підозра на злоскісне новоутворення	45–60 %	Гемітиреоїдектомія
VI – злоскісне новоутворення	94–96 %	Тиреоїдектомія, гемітиреоїдектомія

Примітка: ТАПБ – тонкогілкова аспіраційна пункційна біопсія; УЗД – ультразвукова діагностика.

Класи III, IV, V вважають "сірою зоною" у цитологічній діагностиці, оскільки їх визначення значно варіює за морфологічними виявами та демонструє високий відсоток розбіжностей між цитологами [5]. Це визначає важливість регулярного моніторингу пацієнтів та отримання спільної думки фахівців, а також комплексний аналіз результатів клінічного обстеження, цитоморфологічних даних і молекулярного тестування для прийняття рішень щодо подальшої оптимізації лікування пацієнта та

призначення персоналізованих додаткових досліджень. Остання версія класифікації Bethesda була затверджена у 2017 році. Лише із 2018 року відбулася її імплементація в Україні. Проте якою мірою результати цитологічних досліджень в Україні відповідають світовій практиці, достеменно не відомо.

Тому **метою роботи** було проаналізувати результати цитологічних досліджень ТАПБ новоутворень ЩЗ за міжнародною класифікацією Bethesda за останні три роки.

Матеріали і методи. Було проведено ретроспективне дослідження із залученням бази даних пацієнтів, які користувались послугою цитологічних досліджень ТАПБЩЗ у медичній лабораторії CSD у період 2019–2021 років. Дослідження включало результати цитологічних аналізів різних вікових груп і статі у період з 1 січня 2019 року по 31 грудня 2021 року. Для візуалізації клітин використовувався метод забарвлення за Папенгеймом.

Було проаналізовано: 1) цитологічний висновок за міжнародною класифікацією Bethesda; 2) стать пацієнта; 3) вік пацієнта. Для цитологічного дослідження використовувався метод світлової мікроскопії (Leica Microsystems, DM2000). Для описової статистики використовували показники середнього та стандартне відхилення. Порівняння двох незалежних вибірок проводили за Т-критерієм Стьюдента. Для зіставлення даних у трьох і більше підгрупах застосовували ANOVA. При аналізі категоріальних даних використовували критерій хі-квадрат. Розбіжності вважали статистично значущими при $p < 0,05$. Обробку даних проводили за допомогою MS Excel та статистичної програми Med Calc (Med Calc Software Inc, Бельгія).

Результати досліджень та їх обговорення. За досліджуваній період (2019–2021) загальна кількість випадків становила 5687, серед них 4999 (87,9 %) жінок і 688 (12,1 %) чоловіків, середній вік яких відповідно був $46,6 \pm 0,19$ (95 % ДІ 46,2 – 47,01) та $47,07 \pm 0,50$ (95 % ДІ 46,08–48,06) ($p=0,587$). Ми не виявили статистично значущих розбіжностей у віковій категорії. Переважання жінок добре відомо для більшості захворювань ЩЗ. Це стосується дисфункції ЩЗ, або вузлових новоутворень, включаючи РЩЗ [6]. Наші дослідження показують, що

жінки зверталися до лікарів у 7,2 раза частіше, ніж чоловіки. Логічно припустити, що таку різницю може обумовлювати гормональний фон. Однак деякі дослідження не показують прямої залежності між кількістю гормонів і злоскісними утвореннями ЩЗ [7]. Роль статевих гормонів у високій частоті зобів жінок можна визначити за дуже частим збільшенням ЩЗ під час вагітності, що вказує на роль естрогенів у проліферації тироцитів [8, 9]. Картина ще більше ускладнюється гендерними особливостями поведінки, що призводять до пізньої діагностики та більших пухлин у чоловіків. Якщо подивитися на покази до проведення УЗД ЩЗ, яке зрештою приводить до діагностики карциноми органа, то виявляється, що у жінок первісні симптоми або причини медичних обстежень найчастіше невідомі або не пов'язані із захворюванням ЩЗ. Іншими словами, жінки частіше, ніж чоловіки, проходять обстеження ЩЗ, незалежно від причини звернення до лікаря, включаючи регулярні візити до гінеколога [8, 10].

Обізнаність пацієнтів і звернення щодо діагностики стану ЩЗ зростали за період спостережень. Наприклад, у 2019 році було 12,35 % досліджень чоловіків від їхньої загальної кількості, а у 2021 році кількість досліджень збільшилась на 41,28 %, що становило 53,63 %. У жінок цей відсоток за два роки збільшився на 39,77 %. Отже, загальна кількість цитологічних досліджень ЩЗ збільшилась у 3,9 раза із 2019 по 2021 рік.

Маючи на меті зрозуміти, яка кількість досліджень припадає на кожний із класів міжнародної класифікації Bethesda, ми проаналізували всі цитологічні висновки ТАПБЩЗ за цією системою у період з 2019 по 2021 рік (табл. 2, 3). Із загального оцінювання 5687 випадків була визначена кількість за 6 класами за системою Bethesda.

Таблиця 2. Розподіл цитологічних досліджень щитоподібної залози у чоловіків за класифікацією Bethesda по класах у період із 2019 по 2021 рік

Діагностична категорія Bethesda	2019	2020	2021	p
	N досл.	N досл.	N досл.	
I – неінформативний	17 2,2 %	61 3,2 %	61 2,0 %	0,018
II – доброякісне ураження	48 6,3 %	104 5,5 %	180 5,9 %	0,157
III – атипія невизначеного ґенезу / фолікулярне ураження неясного ґенезу	3 0,4 %	13 0,7 %	42 1,4 %	0,009
IV – фолікулярна неоплазія / підозра на фолікулярну неоплазію	6 0,8 %	31 1,6 %	33 1,1 %	0,139
V – підозра на злоскісне новоутворення	6 0,8 %	14 0,7 %	13 0,4 %	0,225
VI – злоскісне новоутворення	5 0,7 %	11 0,6 %	40 1,3 %	0,019

При порівнянні частоти виявлення різних класів у чоловіків за Bethesda визначено статистично значущі розбіжності щодо частоти I ($p=0,18$), III ($p=0,009$) та

VI ($p=0,019$) класів. При цьому варто зауважити, що всі показники були в межах референтних значень.

Таблиця 3. Розподіл цитологічних досліджень щитоподібної залози у жінок за класифікацією Bethesda по класах у період з 2019 по 2021 рік

Діагностична категорія Bethesda	2019	2020	2021	p
	N досл.	N досл.	N досл.	
I – неінформативний	110 14,32 %	310 16,5 %	440 14,5 %	0,096
II – доброякісне ураження	436 56,8 %	898 47,8 %	1575 51,8 %	0,001
III – атипія невизначеного ґенезу / фолікулярне ураження неясного ґенезу	31 4,0 %	122 6,5 %	255 8,4 %	<0,001
IV – фолікулярна неоплазія / підозра на фолікулярну неоплазію	61 7,9 %	179 9,5 %	174 5,7 %	0,001
V – підозра на злоскісне новоутворення	19 2,5 %	59 3,1 %	89 2,9 %	0,615
VI – злоскісне новоутворення	26 3,4 %	77 4,1 %	138 4,5 %	0,317

Частота визначення II ($p=0,001$), III ($p < 0,001$), IV ($p=0,001$) класів у жінок варіювала при порівнянні статистичних даних за 2019, 2020 та 2021 роки, що може бути пов'язане як із гетерогенністю обстеженої популяції, так і з розбіжностями щодо репортування між цитопатологами. Проте частота репортів із V ($p=0,615$), VI ($p=0,317$) класів, які напряду пов'язані з менеджментом пацієнтів, не мала статистично значущих змін у динаміці.

Перший клас системи Bethesda описується як недиагностичний через недостатню кількість фолікулярних клітин, велику кількість еритроцитів, занадто товсті та погано фіксовані мазки. Щоб зразок ЩЗ був задовільним для оцінювання, йому потрібно принаймні шість груп добре збережених фолікулярних клітин, причому бажано, щоб усі шість груп фолікулярних клітин були на одному предметному склі і кожна група складалася щонайменше з десяти клітин. Відповідно до рекомендацій показник недиагностичного препарату має бути до 10 %. Проте за даними метааналізу, проведеного за результатами досліджень іноземних лабораторій, відсоток недиагностичних репортів коливався від 1,8 до 23,6 із середнім значенням 12,9 [11, 12]. Згідно з нашим аналізом, неінформативними були загалом 17,5 % досліджень (табл. 4). Показник є досить високим і свідчить про наявність проблем на преаналітичному етапі дослідження. До отримання недиагностичних препаратів можуть призводити попадання голки в судину, у результаті препарат міститиме велику кількість еритроцитів. При пункції кістозних вузлів у препараті переважає рідина, а детрит – за малої кількості тироцитів, що також унеможливило проведення дослідження. Так само дослідження, засновані на проведенні ТАПБЩЗ, показали, що вузли з більш ніж 50 %-ю кістозною частиною підвищують імовірність недиагностичного результату [13]. При неінформативному висновку пацієнту пропонують зробити повторне ТАПБ, що є передусім травматичним процесом. Тому комунікація між цитопатологом і клініцистом має бути продуктивною і результативною, хоча б для уникнення непотрібного хірургічного втручання.

Другий клас описується як доброякісне утворення. Доброякісні аспірати ЩЗ зазвичай містять рясні колоїдні та одношарові шари фолікулярного епітелію, що мають стільниковий вигляд. Ядра доброякісних фолікулярних клітин невеликі (еквівалентні розміру еритроцитів), округлі й однорідні, з тонким хроматином і гладкою ядерною мембраною. Велика кількість запальних клітин, особливо лімфоцитів, також сприяє доброякісному тироїдиту.

Діагностична термінологія доброякісних уражень ЩЗ, що використовується в літературі, включає вузловий зоб, хронічний лімфоцитарний тироїдит, аденоматоїдний вузол і колоїдний вузол [11, 12]. Метааналіз показує,

що другий клас є найпоширенішим з усіх існуючих, що і підтверджують результати наших досліджень. Так, на доброякісні ураження припадає 57 % від усіх досліджень (табл. 3). У чоловіків було зафіксовано 332 (5,84 %) випадки, у жінок – 2909 (51,15 %). Такі випадки переважно вказують на вузлові, кістозні зоби з відсутністю атипії фолікулярного епітелію, переважанням колоїду і невеликою кількістю еритроцитів, гемосидерофагів.

Третій діагностичний клас – це гетерогенна категорія, що включає випадки, які не можна класифікувати ні як доброякісні, ні як злоякісні. Результати випадків, віднесених до категорії "атипія невизначеного ґенезу", не є переконливо доброякісними, проте ступінь клітинної або архітектурної атипії недостатній для інтерпретації неоплазії чи підозри на злоякісний процес. Указана діагностична категорія заснована на цитоморфологічній інтерпретації, отже, є дуже суб'єктивною. У будь-якому випадку з діагнозом "атипія невизначеного ґенезу" один патолог може вважати атипію реактивною за природою, тоді як інший вважатиме, що ступінь атипії є діагностикою папілярної карциноми ЩЗ. Клас III було виявлено у 58 (1,02 %) випадках у чоловіків та 408 (7,17 %) – у жінок. Фактичні значення (табл. 3) становили 8,2 %. За даними літератури, частота класу III зросла з 4 до 8 % і навіть досягла піку 12 % в останній аналізований рік [14]. У більшій кількості аналізів діагностика цього класу коливалася в межах 0,8–28 % [15].

Клас IV був виявлений у 70 (1,2 %) досліджених чоловіків і 414 (7,28 %) жінок. Цей клас характеризується як гіперклітинний аспірат, що, порівняно з більшістю аспіратів доброякісних колоїдних вузлів, демонструють групи фолікулярних клітин із мінімальною кількістю колоїду або його відсутністю. Клітини зазвичай розташовані у тривимірних синцитіальних групах і мікрофолікулах, які визначаються як < 15 фолікулярних клітин, розташованих по колу, що становить щонайменше дві третини, з помітним перекриттям ядер і скупченням. Ядра збільшені й часто переповнені грубим хроматином і помітними ядерцями. Зазвичай більшість вузлів згодом діагностують як доброякісні, але злоякісність цього класу коливається в межах 15–30 % [16].

До категорії V відносять підозри на папілярну карциному, медулярну карциному, інші злоякісні новоутворення (напр. лімфоми, метастатичні карциноми) або новоутворення через повний некроз уражених клітин (анapластична карцинома), тоді як VI категорія підтверджує наявність злоякісного процесу [12, 17]. Ці класи показують найбільший відсоток малігнізації. За три роки у чоловіків ці класи разом становили 89 (1,56 %) випадків, а в жінок – 408 (7,17 %).

Таблиця 4. Результати цитологічних досліджень тонкоголкової пункційної біопсії щитоподібної залози за системою Bethesda в Україні порівняно з референтними значеннями та іншими світовими лабораторіями

Діагностична категорія Bethesda	Референтні значення	Дані інших лабораторій [12]	Фактичні значення	χ^2
I – неінформативний	до 10 %	1,8–23,6 %	17,5 %	0,214
II – доброякісне ураження	40–70 %	39–73 %	57,0 %	0,887
III – атипія невизначеного значення / фолікулярне ураження неясного ґенезу	до 12 %	26,6–37,8 %	8,2 %	0,805
IV – фолікулярна неоплазія / підозра на фолікулярну неоплазію	6 %	1,2 – 25,3 %	8,5 %	0,782
V – підозра на злоякісне новоутворення	1,5–6 %	1,4 – 6,3 %	3,5 %	0,718
VI – злоякісне новоутворення	2–10 %	2 –16,2 %	5,2 %	1

Висновки. У дослідженні було проаналізовано 5687 результатів цитологічних аналізів у період із 2019 по 2021 рік. Частота звернення жінок була у 7,4 раза більша за чоловіків, що підтверджує дані інших досліджень. Структура цитологічних висновків не мала статистично значущих розбіжностей із референтними значеннями за Bethesda.

Аналіз структури результатів цитологічних досліджень за Bethesda виявив високий відсоток першої категорії, що дає привід звернути увагу на преаналітичний етап і комунікацію між цитопатологами і клініцистами. Зменшення недіагностичних препаратів спричинить зменшення повторного травматичного втручання у пацієнта. З усіх випадків найпоширенішим цитологічним висновком був клас II (доброякісне утворення) – 3061 дослідження (57 %). Результати підтверджують міжнародну статистику у переважанні зазначеної категорії з усіх шести класів міжнародної системи Bethesda. Третій клас увійшов у межі референтних значень (8,2 %). Оскільки цей клас вважається гетерогенним, то цитопатологам слід із особливою уважністю діагностувати аналіз. Тактика ведення пацієнта надалі передбачає ще одне втручання, а саме повторне ТАПБ. Класи четвертий, п'ятий та шостий загалом становлять 17,2 %. Порівняно з референтними значеннями та даними інших лабораторій наш аналіз показує аналогічні результати. Також паралельно із цитологічним дослідженням рекомендується проходити молекулярне тестування для більш детальної діагностики новоутворень ЩЗ.

Список використаних джерел

1. Epidemiology, incidence and mortality of thyroid cancer and the irrelationship with the human development index in the world: anecology study in 2018 / E. Goodarzi, A. Moslem, H. Feizhadad et al. // *Adv. Hum. Biol.* – 2019. – Vol. 9, № 2. – P. 162–167.
2. ASCO. Thyroid Cancer: Statistics [cited 2020 April 22]. Available from: <https://www.cancer.net/cancer-types/thyroid-cancer/statistics>
3. Ultrasonographic risk factors of malignancy in thyroid nodules / A. Rios, B. Torregrosa, J. M. Rodriguez et al. // *Langenbecks Arch Surg.* – 2016. – Vol. 401, № 6. – P. 839–849.
4. Ali S. Z. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology / S. Z. Ali, E. S. Cibas. – New-York, NY : Springer, 2010.
5. Yousefi E. The gray zone of thyroid nodules: Using a nomogram to provide malignancy risk assessment and guide patient management / E. Yousefi, G. H. Sura, J. Somma // *Cancer Med.* – 2021. – Vol. 10. – P. 2723–2731.
6. Sexual Dimorphism of Thyroid Function in New borns with Congenital Hypothyroidism / D. Eugène, A. Djemli, G. Van Vliet et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2005. – Vol. 90. – P. 2696–2700.
7. Chernenko O. Papillary thyroid cancer and thyroid stimulating hormone: does sex matter? / O. Chernenko, O. Sulaieva // *Fiziol. Zh.* – 2019. – P. 81–87.
8. Zhou W. GWAS of thyroid stimulating hormone highlights pleiotropic effects and inverse association with thyroid cancer / W. Zhou, B. Brumpton, O. Kabil et al. // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11. – P. 3981.
9. Sex Bias in Differentiated Thyroid Cancer // V. Suteau, M. Munier et al. // *International journal of molecular sciences.* – 2022. – Vol. 23, № 12. – P. 2021.
10. Ultrasound requested by general practitioners or for symptoms unrelated to the thyroid gland may explain higher prevalence of thyroid nodules in females / A. Germano, W. Schmitt, P. Almeida et al. // *Clin. Imaging.* – 2018. – Vol. 50. – P. 289–293.
11. Bongiovanni M. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: a meta-analysis / M. Bongiovanni // *Acta Cytol.* – 2012. – № 56. – P. 333–339.
12. Howard H. Wu. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: into the clinic / H. Wu Howard, Swadley Matthew J. // *Pathology and Laboratory Medicine International.* – 2015. – Vol. 7, № 7. – P. 47–54.
13. Predictors of non-diagnostic cytology in surgeon-performed ultrasound guided fine needle aspiration of thyroid nodules / Isaac et al. // *Journal of Otolaryngology. – Head and Neck Surgery.* – 2014. – Vol. 43. – P. 48.

14. Kholová I. Thyroid atypia of undetermined significance or follicular lesion of undetermined significance: An indispensable Bethesda 2010 diagnostic category or wastegarbage? / I. Kholová, M. Ludvíková // *Acta Cytol.* – 2014. – Vol. 58. – P. 319–329.
15. Geramizadeh B. Cytomorphologic, Imaging, Molecular Findings, and Outcome in Thyroid Follicular Lesion of Undetermined Significance / B. Geramizadeh, S. Bos-Hagh, Z. Maleki // *A typical Cell of Undetermined Significance (AUS/FLUS): A Mini-Review. Acta Cytol.* – 2019. – Vol. 63. – P. 1–9.
16. Mc Fadden D. G. Genetics, Diagnosis, and Management of Hürthle Cell Thyroid Neoplasms / D. G. Fadden Mc, P. M. Sadow // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2021. – Vol. 12. – P. 696386.
17. Schmitt F. Role of ancillary studies in fine-needle aspiration from selected tumors / F. Schmitt, H. Barroca // *Cancer Cytopathol.* – 2012. – Vol. 120. – P. 145–160.

References

1. Epidemiology, incidence and mortality of thyroid cancer and the irrelationship with the human development index in the world: anecology study in 2018 / E. Goodarzi, A. Moslem, H. Feizhadad et al. // *Adv. Hum. Biol.* – 2019; Vol. 9, № 2. – P. 162–167.
2. ASCO. [Internet] Thyroid Cancer: Statistics. [cited 2020 April 22]. Available from: <https://www.cancer.net/cancer-types/thyroid-cancer/statistics>.
3. Rios A. Ultrasonographic risk factors of malignancy in thyroid nodules / A. Rios, B. Torregrosa, J.M. Rodriguez et al. // *Langenbecks Arch Surg.* – 2016. – Vol. 401, № 6. – P. 839–849.
4. Ali S.Z., Cibas E.S. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. New York, NY: Springer; 2010.
5. Yousefi E., Sura G.H., Somma J. The gray zone of thyroid nodules: Using a nomogram to provide malignancy risk assessment and guide patient management. *Cancer Med.* – 2021. – Vol. 10. – P. 2723–2731.
6. Sexual Dimorphism of Thyroid Function in New borns with Congenital Hypothyroidism / D. Eugène, A. Djemli, G. Van Vliet et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2005. – Vol. 90. – P. 2696–2700.
7. Chernenko O., Sulaieva O. Papillary thyroid cancer and thyroid stimulating hormone: does sex matter? // *Fiziol. Zh.* – 2019. – P. 81–87.
8. Zhou, W. GWAS of thyroid stimulating hormone highlights pleiotropic effects and inverse association with thyroid cancer / Zhou, W.; Brumpton, B.; Kabil, O. et al. // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11. – P. 3981.
9. Suteau V. Sex Bias in Differentiated Thyroid Cancer // V. Suteau, M. Munier et al. // *International journal of molecular sciences.* – 2022. – Vol. 23, № 12. – P. 2021.
10. Germano A. Ultrasound requested by general practitioners or for symptoms unrelated to the thyroid gland may explain higher prevalence of thyroid nodules in females / Germano A.; Schmitt, W.; Almeida, P. et al. // *Clin. Imaging.* – 2018. – Vol. 50. – P. 289–293.
11. Bongiovanni M. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: a meta-analysis // *Acta Cytol.* – 2012. – № 56. – P. 333–339.
12. Howard H. Wu, Matthew J. Swadley. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: into the clinic // *Pathology and Laboratory Medicine International.* – 2015. – Vol. 7, № 7. – P. 47–54.
13. Predictors of non-diagnostic cytology in surgeon-performed ultrasound guided fine needle aspiration of thyroid nodules / Isaac et al. // *Journal of Otolaryngology. – Head and Neck Surgery.* – 2014. – Vol. 43. – P. 48.
14. Kholová I.; Ludvíková M. Thyroid atypia of undetermined significance or follicular lesion of undetermined significance: An indispensable Bethesda 2010 diagnostic category or wastegarbage? // *Acta Cytol.* – 2014. – Vol. 58. – P. 319–329.
15. Geramizadeh B. Cytomorphologic, Imaging, Molecular Findings, and Outcome in Thyroid Follicular Lesion of Undetermined Significance / B. Geramizadeh; S. Bos-Hagh, Z. Maleki // *Atypical Cell of Undetermined Significance (AUS/FLUS): A Mini-Review. Acta Cytol.* – 2019. – Vol. 63. – P. 1–9.
16. McFadden DG, Sadow PM. Genetics, Diagnosis, and Management of Hürthle Cell Thyroid Neoplasms // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2021. – Vol. 12. – P. 696386.
17. Schmitt F. Role of ancillary studies in fine-needle aspiration from selected tumors / F. Schmitt, H. Barroca // *Cancer Cytopathol.* – 2012. – Vol. 120. – P. 145–160.

Надійшла до редакції 12.08.2022

Отримано виправлений варіант 13.09.2022

Підписано до друку 13.09.2022

Received in the editorial 12.08.2022

Received version on 13.09.2022

Signed in the press on 13.09.2022

I. Omelianenko¹, PhD Stud.,

T. Falalyeyeva¹, Dr. Sci.

O. Tsyryuk¹, Dr. Sci.

O. Sulaieva², Dr. Med. Sci.

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,

²Medical Laboratory CSD, Kyiv, Ukraine

CYTOLOGICAL DIAGNOSIS OF FINE-NEEDLE PUNCTURE BIOPSIES OF THE THYROIDGLAND IN UKRAINE: COMPARIS ON WITH INTERNATIONAL PRACTICE

Thyroid cancer is one of the few cancers that can be diagnosed by cytological examination of fine-needle biopsy of nodular formations. Bethesda's 6-level system is used to achieve standardization of diagnostic terminology, morphological criteria, and risk of malignancy worldwide. The purpose of the work was to analyze the results of cytological studies of fine-needle aspiration puncture biopsies (TAPB) of thyroid nodules according to the international Bethesda system over the past three years and compare them with world practice. As a result, 5,687 studies were conducted, where the percentage of women was 87.9 %, and men 12.1 %. Of all cases, the most common cytological conclusion was class II (benign mass) – 3061 studies (57 %). The number of cases interpreted as Class III was within the reference values, namely 8.2 %. The fourth class is 8.2 %, the fifth – 3.5 %, the sixth – 5. %. In total, these three classes make up 17.2 %. When compared with reference values and data from other laboratories, our analysis revealed comparable results. Analysis of the structure of the results of cytological studies according to Bethesda determined a high percentage of the first class (non-informative), which indicates the need for closer interaction between clinicians and cytologists.

Keywords: thyroid gland, cancer, puncture biopsy, international Bethesda system.

UDC 633.11: 632.9
DOI 10.17721/1728.2748.2022.90.14-19

I. Pozhylov¹, PhD Stud.,
H. Snihur^{1,2}, PhD

¹ESC "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
²Laboratory of plant viruses, D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

INCIDENCE AND SPREAD OF CEREALS VIRUSES IN 2020–2021 IN UKRAINE

Cereals play a significant role in the Ukrainian economy and agriculture. Viral diseases can cause a serious reduction in yields. Aim. The aim of the work was to identify and determine the spread of grain viruses in the main cereal-growing regions of Ukraine in the period 2020–2021 using different methods of virus detection. **Methods.** Enzyme-linked immunosorbent assay was used to identify viruses using commercial test systems by for wheat streak mosaic virus (WSMV), barley stripe mosaic virus (BSMV), brome mosaic virus (BMV), wheat dwarf virus (WDV), High Plainswheat mosaic virus (HPWMoV), barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV), barley yellow dwarf virus-MAV (BYDV-MAV), and cereal yellow dwarf virus-RPV (CYDV-RPV). Transmission electron microscopy was used for direct virus detection. Reverse transcription polymerase chain reaction was performed to identify viruses by molecular methods. **Results.** Summarizing the results obtained by different methods, we can say about the circulation of WSMV, HPWMoV, BSMV, BYDV-PAV, and BYDV-MAV in the Ukrainian agrocoenoses in 2020–2021. Significant prevalence and the dominant role of WSMV have been shown, with the degree of damage to symptomatic plants reaching 52 %. The spread of HPWMoV in Kyiv and Poltava regions has been established, although previously the virus was detected only in the eastern part of our country. WSMV was more likely to induce monoinfection (70 %). **Conclusions.** During the testing of symptomatic plants in the agrocoenoses of Ukraine in 2020–2021 the most common were WSMV and HPWMoV (52 % and 19 %, respectively), also found BYDV-PAV in winter wheat and BYDV-MAV in oats.

Keywords: cereals, virus, detection, enzyme – linked immunosorbent assay, polymerase chain reaction.

Cereals play a significant role in the Ukrainian economy and agriculture. In particular, 6.5 million hectares of winter wheat had been expected to be sown in 2022, while spring wheat had less attention from Ukrainian farmers – only 174 thousand hectares in 2021. In 2020, Ukraine exported wheat to 55 countries (mostly in Africa and Asia) for 4.61 billion US dollars, which accounted for 8.76 % of total Ukrainian exports. There are currently 7.9 billion people in the world, but by the end of the 21st century there may be 3 billion more of us, so the demand for wheat is only growing.

Yields of wheat (*Triticum aestivum*, L) in Ukraine are at the world average (about 4 t/ha), while in some Western European countries this figure reaches 10 t/ha. Viral diseases can cause a serious reduction in yields. Examples of this is HPWMoV (High Plains wheat mosaic virus, *Emaravirus tritici*, *Emaravirus*, *Fimoviridae*), which poses a particular risk of co-infection with other viruses spread by wheat curl mite (*Aceria triticea*, Keifer), WSMV (wheat streak mosaic virus, *Tritimovirus*, *Potyviriidae*), and TriMV, (*Triticum mosaic virus*, *Poacevirus*, *Potyviriidae*) together forming the so-called "WSMD complex" [1]. Viruses of this complex lead to a loss of an average of 2–3 % of the crop, and sometimes up to 10 % [2]. Mixed infection can occur from 2 % [3] to 40 % of cases [4].

In Ukraine, according to the literature, it is known about the detection of viruses in cereals that cause mosaic symptoms, in particular, WSMV (*Tritimovirus*, *Potyviriidae*) [5–8, 9], HPWMoV [10, 11], barley stripe mosaic virus (*Hordeivirus*, *Virgaviridae*) [6, 8, 12], brome mosaic virus (*Bromovirus*, *Bromoviridae*) [12–14] and barley yellow mosaic virus (*Bymovirus*, *Potyviriidae*) [14, 15]. It is also known about the spread of viruses in the agrocoenoses of our country, which cause symptoms of leaf yellowing/reddening and plant stunting: wheat dwarf virus (*Mastrevirus*, *Geminiviridae*) [17–21] and barley yellow dwarf virus PAV (BYDV-PAV) [14, 15, 23–26], barley yellow dwarf virus MAV (BYDV-MAV) [8, 24] and cereal yellow dwarf virus RPV (CYDV-RPV) [8], belonging to the group barley/cereal yellow dwarf viruses (B/CYDVs). It should be noted that in 2021 the taxonomy of viruses that cause yellow dwarf disease has changed, in particular, BYDV-PAV, BYDV-MAV, barley yellow dwarf virus PAS (BYDV-PAS), barley yellow dwarf virus kerII, and barley yellow dwarf virus kerIII belong to the genus *Luteovirus* of the family *Tombusviridae* [27]; cereal yellow dwarf virus RPS (CYDV-RPS)

and CYDV-RPV belong to the genus *Polerovirus* of the family *Solemoviridae*; Barley yellow dwarf virus GPV (BYDV-GPV) and barley yellow dwarf virus SGV (BYDV-SGV) are not included in the family *Solemoviridae* [27, 28].

The aim of the work was to identify and determine the spread of cereal viruses in the main grain-growing regions of Ukraine in the period 2020–2021 using different methods of virus detection.

Materials and methods. To detect grain viruses during May–June 2020–2021, a survey of grain crops (*Triticum aestivum* L., *Secale cereale* L., *Avena sativa* L., × *Triticosecal* esp.) for the presence of plants with typical viral symptoms in agrocoenoses of major grain-growing regions of Ukraine, in particular, Vinnytsia, Zaporizhzhia, Kyiv, Poltava, Kharkiv, Cherkasy and Chernihiv regions was conducted. Selected plants with symptoms of viral infection were divided into two groups, the first group included plants with symptoms of various mosaics, and the second – plants with symptoms of leaf yellowing/reddening and plant stunting.

Identification of viruses in selected samples was performed using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in various modifications using commercial test systems. Double Antibody Sandwich-ELISA (DAS-ELISA) was performed using Loewe Biochemica test systems (Germany), Triple Antibody Sandwich-ELISA (TAS-ELISA) was performed using Agdia test systems (USA); two ELISA modifications were performed according to standard procedures following the manufacturer's recommendations [27, 28]. Antibodies conjugated to alkaline phosphatase using p-nitrophenyl phosphate substrate (Loewe Biochemica GmbH, Sauerlach, Germany). Absorption values were measured at 405 nm using a Thermo Lab systems Opsys MR microtiter plate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with Dynex Revelation Quicklink software. Absorption values that exceeded the negative controls more than three times and were ≥ 0.2 were considered positive.

Samples were tested for the presence of the most relevant viruses for Ukraine based on literature data. Samples from the first group (with mosaic symptoms) were tested for WSMV, HPWMoV, BSMV, and BMV. Samples from the second group (with symptoms of leaf yellowing/reddening and plant stunting) were tested for WDV, BYDV-PAV, BYDV-MAV, and CYDV-RPV.

Transmission electron microscopy (TEM) was used to detect causative agents of viral diseases in cereals and to determine the morphology and size of viral particles. Preparations were contrasted with 2 % aqueous uranyl acetate for 10 min [31]. Samples were observed under JEOL Ltd., Japan (JEM-1400) transmission electron microscope in the Centre of collective usage NAS of Ukraine at D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NASU.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to identify viruses by molecular methods. Total RNA was extracted from 0.5 g of symptomatic or healthy leaf tissues using a Gene JET RNA

Purification kit (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. RT-PCR was performed in two steps. Reverse transcription was performed using RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific™) with 10 mMdNTP Mix (Thermo Scientific™) and specific primers (Table 1). Total RNA extracted from healthy wheat plants was used as a negative control. PCR was performed using DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific™) according to the manufacturer's instructions. Amplification was performed using PTC-150 Mini Cycler (MJ Research).

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers used in this work.

Virus	Region	Name	Sequence	Product size	Reference
WSMV	capsid protein gene	forward WS-8166F	GAGAGCAATACTGCGTGT ACG	750 bp	[32]
		reverse WS-8909R	GCATAATGGCTCGAAGTGATG		
HPWMoV	nucleoprotein gene	forward HPV-F1	TTTATGGCTCTTTGTATTGG	339 bp	[33]
		reverse HPV-R1	TATGTTTCCCCTCTTTGTG		
BSMV	Alpha a protein gene	forward	GTGAGGAGGTGATGGGTAAT	417 bp	[14]
		reverse	TTCCAGTCTTTTCAAGTCTCTC		
BYDVs	coat protein gene and the intergenic region	forward BYcpF	CCACTAGAGAGGTGGTGAATG	641 bp	[34]
		reverse BYcpR	CCGGTGTGAGGAGTCTACC		

Reactions were performed under the following conditions: initial denaturation for 3 min at 94°C, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C/53°C/58°C/58°C (for WSMV/HPWMoV/BSMV/BYDVs accordingly) for 30 s, and extension at 72°C for 1 min. The final extension was at 72°C for 7 min. PCR products with DNA markers CSL-MDNA-100BP (Cleaver Scientific), were separated in a 1.5 % agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under UV light [35].

Results and discussion. Crops of cereals were visually inspected during May-June 2020–2021 in seven regions of Ukraine and plants with typical virus-like symptoms were selected and examined by ELISA. During the visual inspection, plants with different mosaic symptoms, from moderate striped mosaics to streak mosaics of different widths of light green stripes were observed, and some plants had growth retardation. Summarizing the results of serological diagnosis of viruses in these samples of winter wheat, we can say that WSMV is undoubtedly the main viral threat to cereals in Ukraine, as it affected the largest number of symptomatic samples in 2020 and 2021 (Table 2). WSMV was detected in 6/7 of the surveyed regions, with a total incidence of 52 % in symptomatic plants (27/52). Interestingly, HPWMoV, in addition to the central-eastern regions of Ukraine (Zaporizhzhya and Kharkiv regions), where we detected this virus in previous years [10], was first

identified in Kyiv and Poltava regions. HPWMoV was detected in 19 % of collected wheat samples (10/52). Importantly, screening of symptomatic wheat samples for WSMV and HPWMoV allowed to assess the occurrence of mono- and mixed viral infections that induce striped mosaic in winter wheat, as these pathogens have one vector – the mite *Aceria tritici* Keifer (also known as *Aceria tritici*, *Acarina: Eriophyidae*) [36]. It should be noted that WSMV caused symptoms of distinct fine streak mosaic on winter wheat plants, while mosaic-like yellowing was caused by HPWMoV. then, the mixed infection caused the symptoms of streak mosaic, formed by broad yellow and green bands on winter wheat leaves (Fig. 1). In 2020, WSMV monoinfection was recorded for 70 % of symptomatic wheat plants, while 15 % of samples were infected only with HPWMoV and 15 % had co-infection (WSMV + HPWMoV). In 2021, also 70 % of wheat plants were monoinfected with WSMV, 20 % of wheat plants were monoinfected with HPWMoV, while mixed infection was registered in only 10 % of tested plants (Fig. 2). Unlike WSMV and HPWMoV, BSMV was found in only one sample from the Kyiv region in 2020, which is 2 % of the total number of tested samples. Symptoms of BSMV on winter wheat plants were in the form of a distinct striped mosaic (Fig. 1). It should be noted that BMV was not identified in both 2020 and 2021 (Table 2).

Table 2. Detection of wheat viruses that cause mosaic symptoms in agrocenoses of Ukraine in 2020–2021

Year	Region	District	ELISA*			
			WSMV	HPWMoV	BSMV	BMV
2020	Vinnitsia	Bershad	2 (2)	0 (2)	0 (2)	0 (2)
	Zaporizhzhya	Vasyliv	1 (1)	1 (1)	0 (1)	0 (1)
	Kyiv	Kyiv-Sviatoshyn	4 (7)	1 (7)	1 (7)	0 (7)
	Poltava	Poltava	1 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
	Kharkiv	Vovchansk	2 (6)	1 (6)	0 (6)	0 (6)
		Kharkiv	1 (3)	1 (3)	0 (3)	0 (3)
2021	Vinnitsia	Bershad	2 (2)	0 (2)	0 (2)	0 (2)
	Zaporizhzhya	Vasyliv	2 (2)	1 (2)	0 (2)	0 (2)
	Kyiv	Kyiv-Sviatoshyn	3 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)
	Poltava	Poltava	5 (10)	4 (10)	0 (10)	0 (10)
	Kharkiv	Kharkiv	2 (4)	1 (4)	0 (4)	0 (4)
	Cherkasy	Cherkasy	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
	Chernihiv	Pryluky	2 (6)	0 (6)	0 (6)	0 (6)
Total percent			27 (52) 52 %	10 (52) 19 %	1 (52) 2 %	0 (52) 0 %

* number of positive samples (number of tested samples).

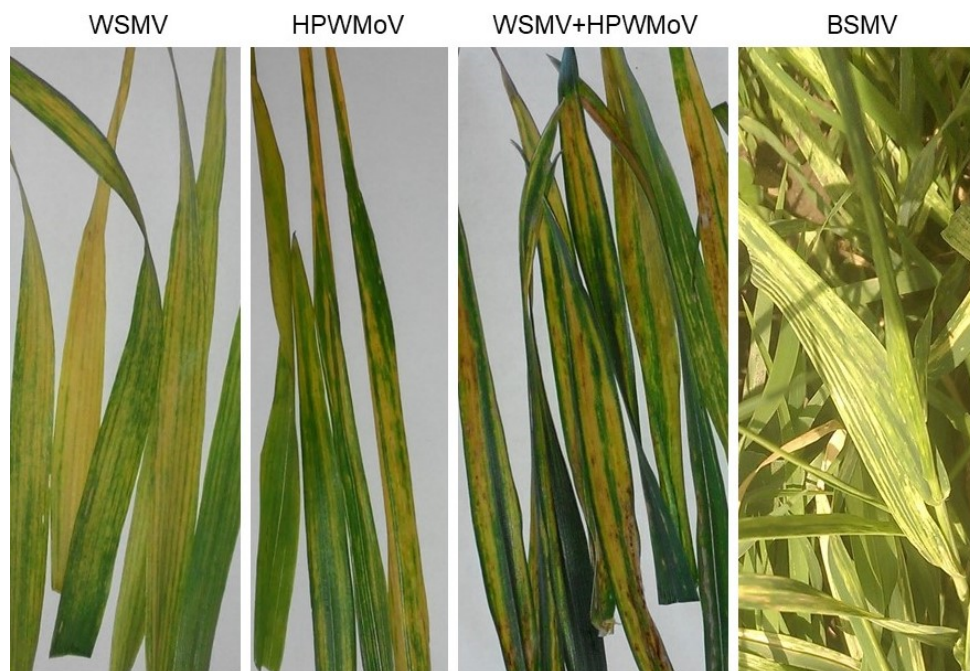


Fig. 1. Symptoms of mosaic on naturally infected winter wheat plants

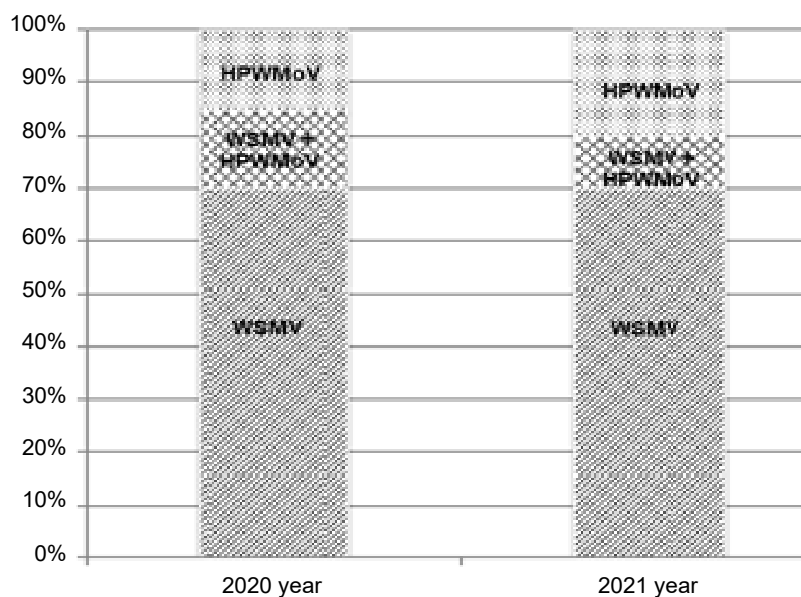


Fig. 2. Incidence of winter wheat WSMV and HPWMoV in mono- and co-infection in 2020–2021

The data obtained on the detection of mosaic pathogens in winter wheat were confirmed by electron microscopy studies. Filamentous viral particles about 700 nm and 12–13 nm in diameter, which is characteristic of the genus *Tritimovirus*, represented by WSMV were found in the sap of diseased plants. Viral particles 120–150 nm long and 20 nm in diameter were also found, which are characteristic for BSMV, a member of the genus *Hordeivirus* (Fig. 3).

When testing samples with symptoms of yellowing/reddening of leaf blades and growth retardation

for B/CYDVs and WDV, BYDV-PAV in winter wheat in 2020 and 2021 was detected. In addition, BYDV-MAV in oats in 2020 was detected; it is important that we first identified BYDV-MAV in oats in our country. It should be noted that the polyclonal test system for the detection of BYDV-PAV by Loewe, apart from BYDV-PAV, also detects BYDV-MAV, because these viruses belong to the genus *Luteovirus* of the family *Tombusviridae*. Interestingly, CYDV-RPV and WDV were not detected in plants with typical symptoms for these viruses (Table 3).

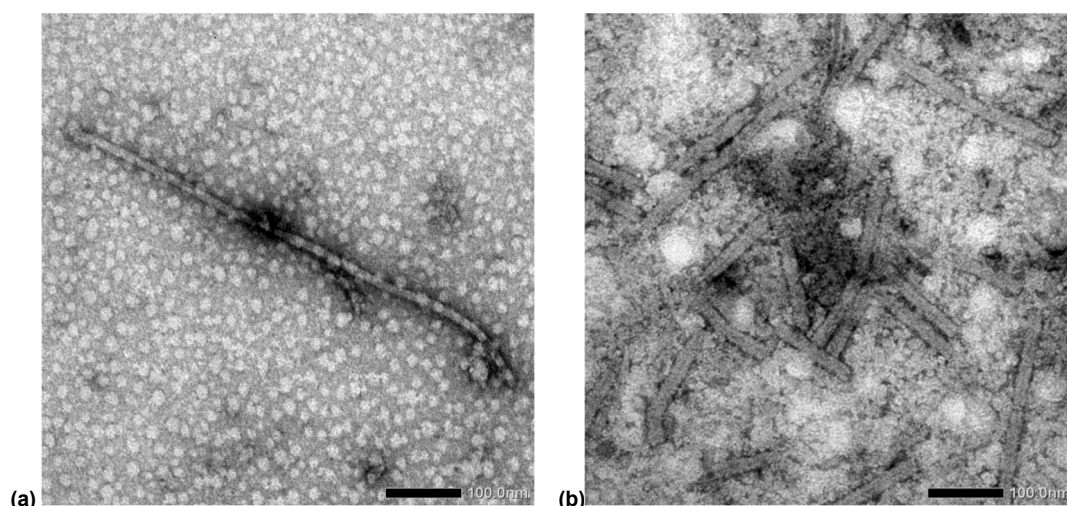


Fig. 3. Morphology of viruses detected in wheat sap with symptoms of striped mosaic using TEM: WSMV (a), BSMV (b). Bars are indicated on images

Table 3. Detection of cereal viruses that cause symptoms of yellowing/redness and growth retardation in crops of Kyiv region in 2020–2021 by ELISA

Year	Plant	O.D. at 405/630 nm*				
		BYDV-PAV Loewe	BYDV-PAV Agdia	BYDV-MAV Agdia	CYDV-RPV Agdia	WDV Loewe
2020	winter wheat	3,585	0,455	0,181	0,160	0,154
	winter wheat	2,146	0,364	0,149	0,154	0,107
	rye	0,164	0,198	0,127	0,094	0,203
	spring wheat	0,114	0,201	0,121	0,176	0,180
	oats	2,059	0,143	0,594	0,116	0,165
2021	triticale	0,135	0,106	0,118	0,112	0,129
	winter wheat	2,592	1,038	0,233	0,086	0,092
	winter wheat	0,194	0,173	0,201	0,193	0,093
controls**	oats	0,189	0,204	0,198	0,182	0,194
	k +	3,276	1,365	1,967	0,794	0,861
	k- 1	0,182	0,141	0,186	0,165	0,137
	k- 2	0,094	0,036	0,065	0,058	0,043

* optical density, average value

** "k +" – positive control; "k-1" – negative control, sap of virus-free plants; "k-2" – negative control, buffer.

As a result of total RNA extraction and RT-PCR with the application of specific primers to the gene fragment of viruses detected in ELISA, their identification by molecular research methods was confirmed. was obtained DNA

fragments of the expected size for all viruses that were detected in ELISA: WSMV, HPWMoV, BSMV, BYDV-PAV, and BYDV-MAV (Fig. 4).

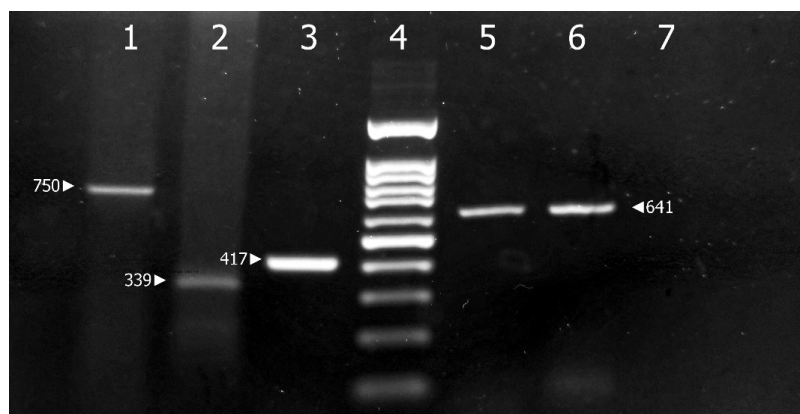


Fig. 4. Visualization of PCR products in the agarose gel under UV light for cereal viruses. Tracks: 1, 2, 3, 5, 6 – WSMV, HPWMoV, BSMV, BYDV-PAV, and BYDV-MAV amplicons of expected size, respectively; 4 – DNA marker CSL-MDNA-100BP (Cleaver Scientific); 7 – negative control

Conclusions. Summarizing the results of serological screening, direct detection, and molecular detection we can say about the circulation in the agroecosystems of Ukraine at least five cereal viruses, in particular, WSMV, HPWMoV, BSMV, BYDV-PAV, and BYDV-MAV in 2020–2021. Significant spread and the dominant role of WSMV have been shown, with the degree of damage to symptomatic plants reaching 52 %. The spread of HPWMoV in Kyiv and Poltava regions has been established, although previously the virus was detected only in the eastern part of our country [10; 37]. The difference in the symptoms of diseases, associated with the most common pathogens, WSMV and HPWMoV, in mono-infection and in their co-infection, was shown. The EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Plant Health considered that HPWMoV fulfills the criteria that are within the remit of EFSA to assess for it to be regarded as a potential Union quarantine pest [38]. WSMV was more likely to induce monoinfection (70 % of virus-positive plants), while HPWMoV was detected in both monoinfection and mixed WSMV infection in the ration average ~1:1 (Fig. 1), which may indicate prolonged WSMV circulation in Ukrainian agroecosystems, but probably recent distribution of HPWMoV. The obtained results regarding the significant spread of WSMV and BYDV in agroecosystems of Ukraine coincide with other studies of Ukrainian scientists [5; 7; 9; 12; 16; 23]. However, we managed to determine which types of yellow dwarf viruses affected cereal crops in Ukraine in 2020–2021.

Acknowledgments. The authors wish to thank the staff of the Center for Collective Usage at the Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine for their invaluable help with TEM studies.

References

- Tatineni S, Hein GL. High Plains wheat mosaic virus: An enigmatic disease of wheat and corn causing the High Plains disease. *Molecular Plant Pathology*. 2021; 22(10): 1167–1179.
- Chuang WP, Rojas LMA, Khalaf LK, Zhang G, Fritz AK, Whitfield AE, Smith CM. Wheat genotypes with combined resistance to wheat curl mite, wheat streak mosaic virus, wheat mosaic virus, and triticum mosaic virus. *Journal of economic entomology*. 2017; 110(2): 711–718.
- Redila CD, Prakash V, Nouri S. Metagenomics Analysis of the Wheat Virome Identifies Novel Plant and Fungal-Associated Viral Sequences. *Viruses*. 2021; 13(12): 2457.
- Mahmood T, Hein GL, Jensen SG. Mixed infection of hard red winter wheat with high plains virus and wheat streak mosaic virus from wheat curl mites in Nebraska. *Plant disease*. 1998; 82(3): 311–315.
- Mishchenko LT. Viral disease of winter wheat. Kyiv: Phytosociocenter; 2009. 352p. (in Ukrainian).
- Snihur H, Shevchenko O. Diagnostics of seed-borne cereal viruses in agroecosystems of Ukraine. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series 'Biology'*. 2013; 3 (65): 77 – 80.
- Mishchenko LT, Dunich AA, Mishchenko IA, Petrenkova VP, Mukha TI. Monitoring of Economically Important Wheat Viruses under Weather Conditions Change in Ukraine and Investigation of Seed Transmission of Wheat Streak Mosaic Virus. *Bulg. J. Agri. Sci.* 2018; 24:660–669.
- Snihur H, Petrenko S, Kot T, Shevchenko O, Polischuk V. Widespread viral diseases endangering cereal crops in Ukraine. *Mikrobiolohichni Zhurnal*. 2018; 80(3): 103–114. doi: <https://doi.org/10.15407/mikrobiolj.80.03.103>
- Mishchenko, L. T., Dunich, A. A., Skrypina, I. Y., & Kozub, N. O. (2019). Phylogenetic analysis of two Ukrainian isolates of Wheat streak mosaic virus. *Biopolymers and Cell*.
- Snihur H, Pozhylov I, Budzanivska I, Shevchenko O. First report of occurrence of High Plains wheat mosaic virus on different hosts in Ukraine. *Journal of Plant Pathology*. 2020; 102(2): 545–546.
- Pasichnyk L, Shihur H, Shevchenko OV, Budzanivska IG et al. Wheat diseases in agricultural systems. Suszanowicz D, Pasichnyk L, editors. Opole: Wydawnictwo Uniwersytetu Opolskiego; 2020. 141 p.
- Shevchenko GP, Helman LV, Nedbyga OE et al. Virusni ta mikoplazmovi khvoroby poljovih kultur. K.: Uroжай, 1995. 304s. Ukrainian.
- Snihur HO, Budzanivska IH, Polishchuk VP. Monitoring of cereal viruses in agroecosystems of Ukraine. *Mikrobiolohichnyi zhurnal*; 2005; 67(6): 88–95. Ukrainian.
- Snihur HO. Епідеміологія вірусів зернових культур в агроценозах України: автореферат на здобуття наук. ступ. канд. біол. наук. Київ; 2006. 20 p. Ukrainian.
- Snihur HO, Bosiuk VJ, Petrenko SM, Shevchenko OV, Polischuk VP. Spread of cereal viruses in some agroecosystems of Ukraine. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2009; 31. 1 Suppl. S-49.
- Omelchenko LI, Simonenko VK, Bondarenko IR. Virus geltoji mosaiki yachmena na yuhe Ukrainy. *Microbiol. gurnal*. 1996;58(2):58-61.
- Hulciaeva II, Shevchenko OV, Snihur HO, Bisov AS, Milkus BN. [Distribution of dwarf wheat dwarfs at the publishers of Ukraine]. *Mikrobiolohiia ta biotekhnolohiia*. 2011; 3:71–77. Ukrainian.
- Shevchenko O, Tobias I, Palkovics L, Bysov A, Snihur H, Petrenko S. Spread and phylogenetic relationships of Wheat dwarf virus isolated in Ukraine and Hungary. *Bulletin of Taras Shevchenko' Kyiv National University*. 2011; 59:22-26.
- Tobias I, Shevchenko O, Kiss B, Bysov A, Snihur H, Polischuk V, Salanki K, Palkovics L. Comparison of the Nucleotide Sequences of Wheat Dwarf Virus (WDV) isolates from Hungary and Ukraine. *Polish Journal of Microbiology*. 2011;60(2):125-131. DOI: 10.33073/pjm-2011-017
- Mishchenko, L., Dunich, A., Mishchenko, I., Dashchenko, A., Boyko, O., Skufinskiy, O., Kyrychenko A., Kozub N. & Mukha, T. Wheat dwarf virus and its impact on the 2020 harvest in some regions of Ukraine. *Quarantine and plant protection*, 2021, (1), 3-9.
- Mishchenko, L. T., Dunich, A. A., Mishchenko, I. A., Dashchenko, A. V., Kozub, N. O., Kyslykh, T. M., & Molodchenkova, O. O. Wheat dwarf virus in Ukraine: occurrence, molecular characterization and impact on the yield. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2022, 129(1), 107-116.
- Iukhymenko AI, Budzanivska IH, Snihur HO, Hirko VS, Boiko AL, Polishchuk VP. Zhovta karlykovist yachmeniu. Deaki osoblyvosti urazhennia ozymoi pshenytsi virusom. *Zakhyst roslyn*. 2003; 5:5-6. Ukrainian.
- Iukhymenko AI, Voloshchuk SI, Dubovy VI, Snihur HO, Polishchuk VP. Pshyrennia ta shkodochynnist virusu zhovtoi karlykovosti yachmeniu. *Visnyk aharnoi nauky*. 2008; 2:35-39. Ukrainian.
- Neplii LV, Babaiaants OV, Snihur HO. Shtamy virusu zhovtoi karlykovosti yachmenia (VZhKla) na pivdni Ukrainy i yikh perenosnyky v 2008 – 2009 rokakh. *Karantyn i zachyst roslyn*. 2009; 55:54-60. Ukrainian.
- Hulciaeva II, Snihur HO, Polishchuk VP, Milkus BN. Virusni khvoroby zernovykh v Odeskii oblasti. *Karantyn i zachyst roslyn*. 2013; 7:5-7. Ukrainian.
- Walker PJ, Siddell SG, Lefkowitz J. et al. Changes to virus taxonomy and to the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*. 2021; 166:2633–2648. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05156-1>
- Sömer M, Fargette D, Hébrard E, Sarmiento C, the ICTV Report Consortium, ICTV Virus Taxonomy Profile: Solemoviridae, J. Gen. Virol. 2021; 102(12):001707. doi: 10.1099/jgv.0.001707. PMID: 34951396; PMCID: PMC8744267.
- Clark MF, Adams AN. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol*. 1977; 34 (3):475–483.
- Ward E, Foster SJ, Fraaije BA, McCartney HA. Plant pathogen diagnostics: Immunological and nucleic acid-based approaches. *Ann. Appl. Biol*. 2004; 145:1-16.
- Richert-Pöggeler KR, Franzke K, Hipp K, Kleespies RG. Electron Microscopy Methods for Virus Diagnosis and High Resolution Analysis of Viruses. *Front. Microbiol*. 2019; 9 (3255):1-8 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03255>
- Kudela O, Kudelova M, Novakova S, Glasa M. First report of Wheat streak mosaic virus in Slovakia. *Plant Disease*, 2008, 92 (9):1365. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-92-9-1365C>
- Lebas BSM, Ochoa-Corona FM, Elliott DR, Tang Z, Alexander BJR. Development of an RT-PCR for High Plains virus indexing scheme in New Zealand post-entry quarantine. *Plant Dis*, 2005; 89: 1103-1108.
- Kundu JK. First Report of barley yellow dwarf virus-PAS in wheat and barley grown in the Czech Republic. *Plant Dis*. 2008; 92(11):1587. doi: 10.1094/PDIS-92-11-1587B.
- Uyeda I, Masuta Ch. Plant Virology Protocols: New Approaches to Detect Viruses and Host Responses. In *Methods in Molecular Biology*, 3rd ed. Humana Press, 2015; 292 p.
- Navia D, de Mendonca RS, Skoracka A, Szydlow W, Knihinicki D, Hein GL, da Silva Pereira PRV, Truol G, Lau D. Wheat curl mite, *Aceria tosichella*, and transmitted viruses: an expanding pest complex affecting cereal crops. *Experimental and Applied Acarology*. 2013; 59(1–2):95–143.
- Pozhylov I, Snihur H, Shevchenko T, Budzanivska I, Liu W, Wang X, Shevchenko O. Occurrence and Characterization of Wheat Streak Mosaic Virus Found in Mono- and Mixed Infection with High Plains Wheat Mosaic Virus in Winter Wheat in Ukraine. *Viruses*. 2022; 14(6):1220. <https://doi.org/10.3390/v14061220>
- EFSA Panel on Plant Health (PLH), Bragard C, Baptista P, et al. Pest categorisation of High Plains wheat mosaic virus. *EFSA journal*. European Food Safety Authority. 2022; 20(5):e07302. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2022.7302>

Надійшла до редколегії 12.08.2022
Отримано виправлений варіант 13.09.2022
Підписано до друку 13.09.2022

Received in the editorial 12.08.2022
Received version on 13.09.2022
Signed in the press on 13.09.2022

І. Пожилов¹, асп.,

Г. Снігур^{1,2}, канд. біол. наук

¹ННЦ "Інститут біології та медицини", Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,

²Лабораторія вірусів рослин, Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України, Київ, Україна

ЗАХВОРЮВАНІСТЬ ТА ПОШИРЕННЯ ВІРУСІВ ЗЛАКОВИХ КУЛЬТУР У 2020–2021 РОКАХ В УКРАЇНІ

Зернові культури займають значну частку в українській економіці та сільському господарстві. Вірусні хвороби можуть бути причиною серйозного зменшення врожаю. Тому метою пропонованої роботи було ідентифікувати та визначити поширення вірусів зернових культур в основних зерносіючих регіонах України в період 2020–2021 років, використовуючи різні методи детекції вірусів. Для ідентифікації вірусів використовували імуноферментний аналіз із застосуванням комерційних тест-систем до вірусів смугастої мозаїки пшениці (WSMV), штрихуватої мозаїки ячменю (BSMV), мозаїки бромусу (BMV), карликовості пшениці (WDV), мозаїки пшениці Високих рівнин (HPWMoV), жовтої карликовості ячменю-PAV (BYDV-PAV), жовтої карликовості ячменю-MAV (BYDV-MAV) і жовтої карликовості злакових RPV (CYDV-RPV). Для прямої детекції вірусів застосовували трансмісійну електронну мікроскопію. Для ідентифікації вірусів молекулярними методами проводили полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскрипцією. Узагальнюючи результати різних методів, можна сказати про циркуляцію в агроценозах України WSMV, HPWMoV, BSMV, BYDV-PAV і BYDV-MAV у 2020–2021 роках. Показано значне розповсюдження та домінуюча роль WSMV, ступінь ураження яким симптоматичних рослин сягав 52 %. Установлено поширення HPWMoV у Київській і Полтавській областях, хоча раніше цей вірус був виявлений лише у східній частині нашої країни. WSMV частіше індукував моноінфекцію (70 %). Отже, в агроценозах України у 2020–2021 роках при дослідженні симптоматичних рослин найбільш поширеними були WSMV і HPWMoV (відповідно 52 і 19 %), також виявлено BYDV-PAV на озимій пшениці та BYDV-MAV – на вієсі.

Ключові слова: зернові культури, вірус, виявлення, імуноферментний аналіз, полімеразна ланцюгова реакція.

УДК 577.122.8

DOI 10.17721/1728.2748.2022.90.20-25

Д. Креницька¹, асп.,
А. Рачковська¹, студ.,
О. Савчук¹, д-р біол. наук,
В. Карбовський², канд. біол. наук
¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
²ТОВ "Біофарма Плазма", Біла Церква, Україна

БІОХІМІЧНІ ПАРАМЕТРИ ФУНКЦІОНУВАННЯ НИРОК У ДОНОРІВ ЗА НАЯВНОСТІ АНТИ-SARS-CoV-2 IgG У КРОВOTOЦІ

Пандемія, спричинена швидким розповсюдженням вірусу SARS-CoV-2 у світі, негативно впливає на економіко-соціальне життя та систему охорони здоров'я. Пацієнти, які захворіли на COVID-19, страждають від наслідків цієї хвороби ще тривалий час після одужання через те, що SARS-CoV-2 викликає системне ураження організму. На тлі порушень роботи респіраторної системи можуть виникати проблеми з боку травлення, згортання крові, гуморальної і нервової систем. Зокрема, клінічні дослідження підтверджують зміни функціонального стану нирок у госпіталізованих пацієнтів, які хворіють на COVID-19, унаслідок чого має місце розвиток патологій нирок у пост-COVID-19 періоді. Наше дослідження було зосереджене на аналізі змін концентрацій альбуміну, креатиніну, сечовини та сечової кислоти у плазмі крові донорів, у кровотоці яких є різні титри анти-SARS-CoV-2 IgG. Було виділено групи донорів, у яких спостерігали максимальні та мінімальні значення досліджуваних параметрів відносно контрольної групи – донорів, у кровотоці яких відсутні анти-SARS-CoV-2 IgG. Установлено, що для групи донорів з мінімальним титром анти-SARS-CoV-2 IgG – 10 ± 3 Index (S/C) – характерні максимальні концентрації креатиніну, сечовини та сечової кислоти, тоді як у групи донорів із титром анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Index (S/C) зафіксовано мінімальні концентрації альбуміну, креатиніну, сечовини і сечової кислоти. Такі результати ми пов'язуємо з потенційним впливом вірусу SARS-CoV-2 на клітини нирок і наслідками імунної відповіді на інфекційний процес, спричинений захворюванням на COVID-19. Вважаємо, що наше дослідження може бути корисним у лікуванні COVID-19, що передбачатиме клінічну терапію, спрямовану не тільки на знешкодження вірусу в організмі, але й на зменшення негативного навантаження на нирки для запобігання розвитку патологічних станів у пост-COVID-19 періоді.

Ключові слова: анти-SARS-CoV-2 IgG, альбумін, креатинін, сечовина, сечова кислота.

Вступ. За даними ВООЗ зареєстровано близько 535 млн випадків зараження SARS-CoV-2 з моменту проголошення глобальної пандемії COVID-19 у світі. SARS-CoV-2 належить до підгрупи β -коронавірусів, куди відносять також віруси SARS-CoV та MERS-CoV, з якими SARS-CoV-2 має схожість приблизно на 80 та 50 %, відповідно [1]. Низка клінічних спостережень підтверджує [2, 3], що COVID-19 відрізняється від раніше описаних інфекційних процесів, викликаних SARS-CoV та MERS-CoV. Дисбаланс роботи дихальної системи – основний клінічний вияв COVID-19, що спричиняє поширення гострого респіраторного дистрес-синдрому (ГРДС), унаслідок чого зростає імовірність розвитку небезпечних для життя ускладнень [4]. Наразі встановлено, що у пацієнтів, які перехворіли на COVID-19, може розвиватися пост-COVID-19 синдром, коли страждають легеневі та поза-легеневі системи органів, зокрема нирки [5].

Вважається, що патогенез захворювання нирок у пацієнтів із COVID-19 є багатофакторним, що включає безпосередню цитопатичну дію, пошкодження ендотелію, відкладання імунних комплексів і накопичення вірус-індукованих цитокінів або медіаторів [6]. Хоча є незначна частка даних про ураження нирок, проте вчені наголошують на тому, що нирки досить вразливі до інфекції SARS-CoV-2, яка може напряму пошкоджувати органоди через рецептор ACE2 [7], унаслідок чого існує ризик порушень функціонування нирок у пост-COVID-19 періоді. Крім цього, дослідження показали, що ACE2 в нирках експресується переважно клітинами проксимальних канальців нирок (≈ 82 %), а також меншою мірою – клітинами збиральної протоки, ниркових дистальних трубчастих клітин, клубочкових парієтальних клітин епітелію [8]. Інші дослідження продемонстрували наявність білка нуклеокапсиду SARS-CoV-2 у ниркових трубчастих структурах і вірусоподібних частинок у подоцитах та епітеліальних клітинах ниркових канальців [9, 10]. Окрім наявності вірусних частинок у цитоплазмі клітин ниркових канальців, виявлено нагромадження CD68⁺ макрофагів та C5b-9 у деяких місцях ниркової тканини. Припускають, що накопичення таких прозапальних факторів бере участь у патогенезі тубулоінтерстиціального пошкодження [11].

У переважній більшості клінічних спостережень було виявлено високу частку раннього порушення функціонування нирок у хворих, інфікованих SARS-CoV-2 і госпіталізованих у відділення інтенсивної терапії. Швидкість клубочкової фільтрації та кліренсу креатиніну знизилась у 22 та 24 % пацієнтів, відповідно. У цьому дослідженні також було висловлено припущення про зв'язок між раннім порушенням функцій нирок і важким перебігом захворювання COVID-19 [12]. Інше дослідження демонструє зростання концентрації креатиніну й азоту сечовини у крові. При цьому у 43,9 % пацієнтів описана протеїнурія, а у 26,7 % – гематурія [13]. Крім цього, у пацієнтів, які ще не пройшли терапію проти COVID-19, спостерігається значно більше порушень функціонування нирок порівняно з пацієнтами, які перебувають на лікуванні у відділенні інтенсивної терапії. Частота мікрогематурії та протеїнурії також була вищою у таких хворих [14]. Дані, наведені вище, підтверджують, що COVID-19 негативно впливає на функції нирок і корелює зі ступенем важкості захворювання.

Таким чином, наразі накопичується інформація щодо впливу SARS-CoV-2 на функціонування нирок під час перебігу інфекційного процесу в організмі. Тому наше дослідження спрямоване на оцінювання стану біохімічних параметрів нирок у донорів, які перехворіли на COVID-19 та у кровотоці яких є різного титру анти-SARS-CoV-2 IgG.

Метою роботи було дослідити потенційні зміни біохімічних параметрів функціонування нирок, таких як альбумін, креатинін, сечовина, сечова кислота у плазмі крові всіх дослідних груп донорів.

Матеріали і методи. У дослідженні брали участь люди, які перехворіли на COVID-19 та після повного одужання погодилися бути донорами плазми крові. За допомогою тест-системи Abbott SARS-CoV-2 IgG, принцип роботи якої ґрунтується на хемілюмінесцентному імуноаналізі на мікрочастинках, усі донори були розділені на групи залежно від титру анти-SARS-CoV-2 IgG. У результаті були сформовані такі групи донорів із титрами анти-SARS-CoV-2 IgG: 10 ± 3 ; 55 ± 5 ; 65 ± 5 ; 75 ± 5 ; 85 ± 5 ; 95 ± 5 ; 125 ± 5 ; 175 ± 5 Index (S/C). За контрольну групу було обрано донорів, у кровотоці яких не виявлено анти-

SARS-CoV-2 IgG. Усі донори добровільно погодилися на участь у клінічному експерименті та надали письмову згоду.

Концентрацію альбуміну, креатиніну, сечовини та сечової кислоти визначали спектрофотометрично на біохімічному аналізаторі Humalyser 3000 з використанням стандартних тест-наборів [15].

Концентрацію альбуміну визначали реакцією бромкрезолового зеленого з альбуміном, у результаті якої утворювався забарвлений комплекс. Абсорбцію комплексу вимірювали у біхроматній реакції (600/800 нм). Інтенсивність забарвлення реакційної суміші прямо пропорційна концентрації альбуміну у пробі.

Принцип визначення концентрації креатиніну полягає у тому, що спочатку креатинкіназа гідролізує креатинін до креатину. Утворений креатин гідролізується креатиназою до саркозину та сечовини. Саркозиноксидаза каталізує окиснювальне деметилування саркозину до гліцину, формальдегіду та перекису водню. У присутності пероксидази пероксид водню забезпечує реакцію кількісного окиснювального конденсування N-(3-сульфопропіл)-3-метокси-5-метиламіну та 4-аміноантипурину до утворення блакитного пігменту. Концентрація креатиніну прямо пропорційна зміні абсорбції при 600/700 нм.

Концентрацію сечовини визначали за рахунок її здатності гідролізуватися у присутності води до амоніаку та вуглекислого газу. Амоніак, утворений у ході реакції, реагує із 2-оксоглутаратом та НАДН у присутності глутаматдегідрогенази із формуванням глутамату і НАД⁺. Зниження поглинання НАДН в одиниці часу пропорційно концентрації сечовини у пробі.

Визначення сечової кислоти відбувалося під дією урикази, яка розкладає сечову кислоту на алантоїн і пероксид водню. Перекис водню реагує із 3,5-дихлоро-2-гідроксибененсульфоновою кислотою та 4-амінофеназоном у присутності пероксидази з утворенням червоно-фіолетового хіноніміну, накопичення якого визначається біхроматично при 660/800 нм. Інтенсивність забарвлення реакційної суміші прямо пропорційна концентрації сечової кислоти у пробі.

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики з використанням комп'ютерної програми STATISTICA. Перевірку гіпотези нормального розподілу вибірки здійснювали за допомогою критеріїв Шапіро – Уїлка та Колмогорова – Смірнова. Було встановлено, що експериментальні групи донорів не підпорядковуються закону нор-

мального розподілу, тому відмінності між вибірками визначали за допомогою критерію Краскела – Уоліса.

Результати досліджень та обговорення. У дослідженні було проаналізовано потенційні зміни біохімічних параметрів нирок: альбумін, креатинін, сечовина, сечова кислота. Ми відокремили групи донорів із титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, де спостерігали мінімальні та максимальні значеннями досліджуваних параметрів.

У переважній більшості донорів за наявності у кровотоці анти-SARS-CoV-2 IgG концентрація альбуміну зменшувалась порівняно із групою донорів, у кровотоці яких не було анти-SARS-CoV-2 IgG. При цьому в донорів із титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Index (S/C) вміст альбуміну зростав відносно контрольної групи та був максимальним серед усіх експериментальних груп ($N=57,54$; $p < 0,00001$). Мінімальний вміст альбуміну характерний для донорів із титром анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Index (S/C) (рис. 1). Альбумін, окрім основних функцій (підтримки онкотичного тиску, pH крові, транспорту катіонів металів), забезпечує зв'язування активних форм кисню і активних форм азоту під час запалення, перешкоджаючи клітинному пошкодженню [16]. Накопичення нейтрофілів у гострій фазі запальної реакції супроводжується зростанням вмісту активних форм кисню. Передбачається, що надмірний окиснювальний стрес, який можна спостерігати при перебігу COVID-19, може викликати пошкодження альбуміну у крові [17]. Відповідно до результатів експерименту ми спостерігаємо збільшення вмісту альбуміну в донорів із найменшим титром анти-SARS-CoV-2 IgG, чого не скажеш про інші дослідні групи. Ми прогнозуємо, що у групі донорів із титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Index (S/C) гострого окиснювального дисбалансу вдалось уникнути за рахунок дії альбуміну як антиоксиданту, про що свідчить підвищення концентрації останнього. Дослідження підтверджують, що зростання вмісту альбуміну мінімізує імовірність розвитку гострого респіраторного дистрес-синдрому (ГРДС) [18]. Щодо інших груп донорів, то із збільшенням титру анти-SARS-CoV-2 IgG передбачається поширення окиснювального стресу в організмі, що й викликало пошкодження сироваткового альбуміну. Із клінічних досліджень відомо, що низький вміст альбуміну в пацієнтів із COVID-19 асоціюється із критичними станами або поліорганною дисфункцією. Гіпоальбумінемія, яка спостерігається у переважній більшості донорських груп, може бути маркером білкової недостатності, що є причиною ускладнень перебігу хвороби.

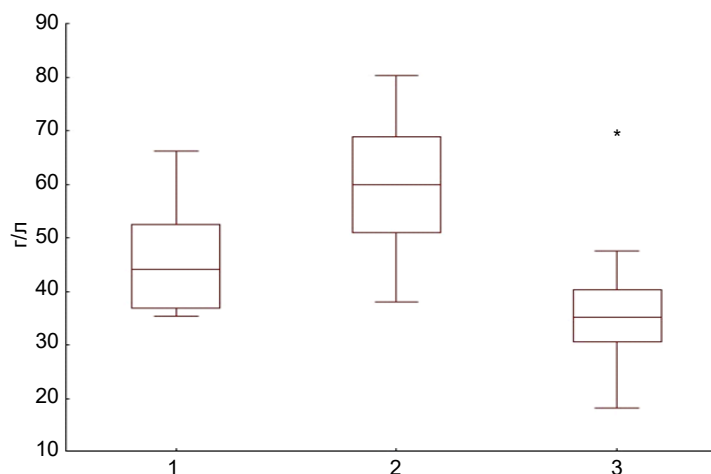


Рис. 1. Вміст альбуміну у плазмі крові донорів із титром анти-SARS-CoV-2 IgG: 1 – 0 Index (S/C); 2 – 10 ± 3 Index (S/C); 3 – 75 ± 5 Index (S/C)

Ми проаналізували зміни концентрацій креатиніну як предиктора функціонального стану нирок серед донорських груп. Відповідно до результатів досліджень можна поділити донорів, у яких присутні анти-SARS-CoV-2 IgG у кровотоці, на дві підгрупи – зі зниженою та з підвищеною концентрацією креатиніну ($H = 57,59$; $p < 0,00001$). При цьому максимальна концентрація креатиніну характерна для групи донорів із титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Index (S/C), мінімальна – 75 ± 5 Index (S/C) (рис. 2). Висока концентрація креатиніну може бути сигналом порушення функціонального стану нирок, викликаного інфікуванням SARS-CoV-2. З літератури відомо, що у пацієнтів із COVID-19 зростання концентрації креатиніну у крові та зростання вмісту альбуміну у сечі свідчать про мікроальбумінурію, що становить ризик виникнення ниркових ускладнень при

несвоєчасному лікуванні [19]. У такому випадку ми підкреслюємо потребу проведення додаткової клінічної діагностики для уникнення розвитку зазначених патологічних станів нирок. Крім того, зафіксовані й випадки порушень функцій нирок у пацієнтів зі зниженою концентрацією креатиніну під час COVID-19 [20]. Однак зниження концентрації креатиніну швидше виникає внаслідок м'язової атрофії під час поширення запального процесу при інфікуванні SARS-CoV-2 [21]. Оскільки креатинін не зв'язується з білками плазми крові, не запасається і не метаболізується в організмі, а швидко виводиться через фільтрацію у ниркових клубочках, то будь-які зміни концентрацій креатиніну за межами норми можуть попереджати про можливу небезпеку розвитку дисфункції нирок. Також особливу увагу варто приділити функціональному стану м'язової тканини [22].

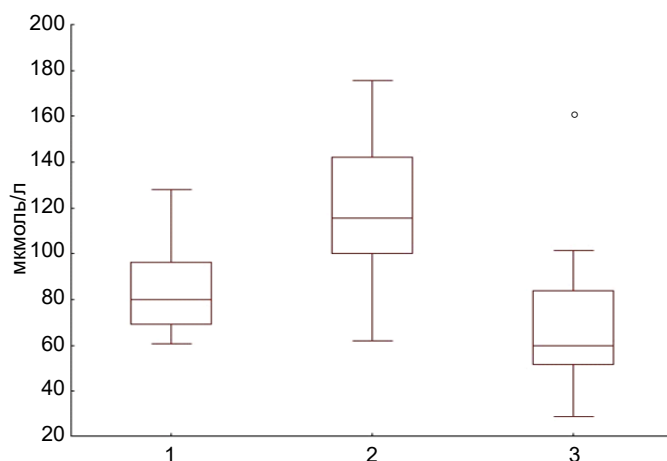


Рис. 2. Концентрація креатиніну у плазмі крові донорів із титром анти-SARS-CoV-2 IgG: 1 – 0 Index (S/C); 2 – 10 ± 3 Index (S/C); 3 – 75 ± 5 Index (S/C)

У ході експерименту було виявлено зміни концентрації сечовини в донорських групах, у кровотоці яких були присутні певного титру анти-SARS-CoV-2 IgG, порівняно з контрольною групою донорів ($H=49,84$; $p < 0,00001$). Концентрація сечовини у переважній більшості експериментальних груп була більшою, ніж у контрольній групі. Лише в донорів із титром анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Index (S/C) концентрація сечовини зменшувалась серед усіх дослідних груп. Зазначимо, що максимальна концентрація сечовини була характерна для донорів із титром анти-SARS-CoV-2 IgG 95 ± 5 Index (S/C) (рис. 3). Збільшення концентрації сечовини може відображати складний взаємозв'язок між станом харчування, білковим

обміном і функціонуванням нирок пацієнтів. З літератури відомо, що SARS-CoV-2 може активувати ренін-ангіотензин-альдостерон та викликати ниркову вазоконстрикцію, уповільнення каналцевого потоку та гіпофільтрацію ниркових клубочків, що призводить до зниження виведення сечовини і підвищення всмоктування води та іонів натрію у ниркових каналцях і пасивної реабсорбції сечовини [23, 24]. Відповідно до цього ми припускаємо, що зростання концентрації сечовини в переважній більшості груп донорів пов'язане з негативним впливом SARS-CoV-2 на функціонування нирок, що спричиняє зміни водно-сольового та білкового балансу в організмі.

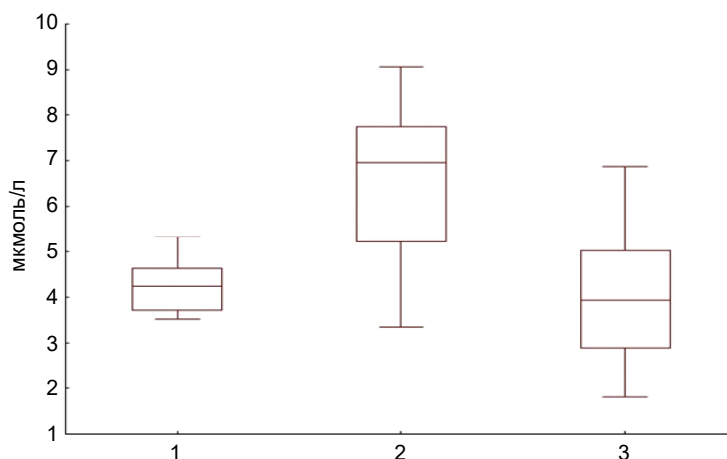


Рис. 3. Концентрація сечовини у плазмі крові донорів із титром анти-SARS-CoV-2 IgG: 1 – 0 Index (S/C); 2 – 85 ± 5 Index (S/C); 3 – 75 ± 5 Index (S/C)

До того ж було проаналізовано потенційні зміни концентрації сечової кислоти у групах донорів, у кровотоці яких були анти-SARS-CoV-2 IgG, порівняно з контрольною групою ($H=40,08$; $p < 0,00001$). Відповідно до результатів досліджень зміни були неоднозначними серед дослідних груп. Тим не менш ми з'ясували, що найбільша концентрація сечової кислоти характерна для донорів із титром анти-SARS-CoV-2 IgG у кровотоці 10 ± 3 Index (S/C), а найменша – для 75 ± 5 Index (S/C) (рис. 4). З літератури відомо, що близько 50 % антиоксидантної дії зумовлено активністю сечової кислоти [25]. Нагадаємо, що у групи донорів із титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Index (S/C) було зафіксовано й максимальну концентрацію альбуміну, що, імовірно, також виконує антиоксидантну дію під час перебігу COVID-19. Такі зміни дозволяють припустити, що в цієї групи донорів було вдало нейтралізовано вірусні частинки SARS-CoV-2 ще на початкових етапах перебігу хвороби

за рахунок активізації первинної ланки імунітету, де головну роль виконують нейтрофіли, а сечова кислота забезпечує захист від поширення окиснювального стресу в організмі, про який повідомлялося вище. Проте не виключаємо впливу високих концентрацій сечової кислоти на погіршення функціонального стану нирок. Як відомо, зростання концентрацій сечової кислоти у крові свідчить про зниження швидкості клубочкової фільтрації [26]. Таким чином, гострий запальний процес, викликаний негативною дією SARS-CoV-2, призводить до зростання концентрацій сечової кислоти або за рахунок активізації антиоксидантних властивостей, або внаслідок пригнічувального впливу на функціональний статус нирок. Тоді ж у донорів з більшими титрами анти-SARS-CoV-2 IgG спостерігалось різке зниження концентрації сечової кислоти порівняно з контрольною групою, що свідчить про можливий розвиток ускладнень на тлі інтенсивного запального процесу, зумовленого шкідливим впливом вірусних частинок.

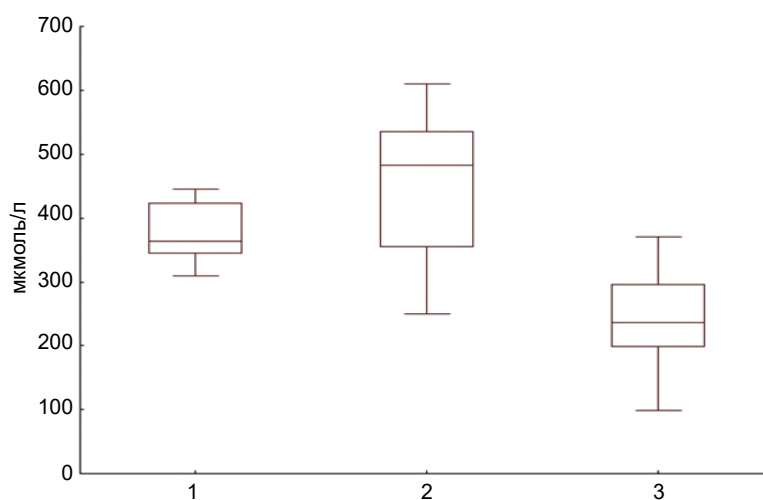


Рис. 4. Концентрація сечової кислоти у плазмі крові донорів із титром анти-SARS-CoV-2 IgG: 1 – 0 Index (S/C); 2 – 10 ± 3 Index (S/C); 3 – 75 ± 5 Index (S/C)

Таким чином, результати проведених досліджень демонструють, що у донорів з мінімальним титром анти-SARS-CoV-2 – 10 ± 3 Index (S/C) спостерігається максимальна концентрація альбуміну, креатиніну та сечової кислоти. Ми припускаємо, що вказані біохімічні параметри задіяні в механізмах нейтралізації вірусних часток, однак не виключається висока ймовірність негативного впливу SARS-CoV-2 та гострої фази запального процесу на розвиток захворювань нирок. Зменшення концентрацій альбуміну, креатиніну, сечовини та сечової кислоти в донорів із титром анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Index (S/C) може вказувати на низьку імунну активність унаслідок руйнівного впливу вірусу SARS-CoV-2. Крім цього, такі процеси спричинятимуть дисфункцію роботи нирок.

Висновки. Наше дослідження підтверджує зміни біохімічних параметрів функціонування нирок у пацієнтів, які перехворіли на COVID-19 та у кровотоці яких наявні різні титри анти-SARS-CoV-2 IgG. Ми припускаємо, що зміна вмісту альбуміну може бути біомаркером розвитку окиснювального стресу в організмі, а креатинін, сечовина та сечова кислота – потенційними предикторами дисфункцій нирок у людей, що хворіли на COVID-19. Отримані результати дозволяють зробити висновок про те, що SARS-CoV-2 безпосередньо впливає на функціонування нирок, унаслідок чого виникає потреба проведення лабораторних досліджень щодо змін біохімічних

параметрів функціонування нирок у пацієнтів, які хворіють або перебувають у пост-COVID-19 періоді.

Список використаних джерел

1. COVID-19, SARS and MERS: are they closely related / N. Petrosillo, G. Viceconte, O. Ergonul et al. // Clin Microbiol Infect. – 2020. – Vol. 26, № 6. – P. 729–734.
2. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster / J. F. Chan, S. Yuan, K. H. Kok et al. // Lancet. – 2020. – Vol. 395. – P. 514–523.
3. Acute renal impairment in coronavirus-associated severe acute respiratory syndrome / K. H. Chu, W. K. Tsang, C. S. Tang et al. // Kidney International. – 2005. – Vol. 67, № 2. – P. 698–705.
4. Acute kidney injury in patients with SARS-CoV-2 infection / A. Joseph, L. Zafrani, A. Mabrouki et al. // Annals of Intensive Care. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 117.
5. Al-Aly Z. High-dimensional characterization of post-acute sequelae of COVID-19 / Z. Al-Aly, Y. Xie, B. Bowe // Nature. – 2021. – Vol. 594. – P. 259–264.
6. Kidney function on admission predicts in-hospital mortality in COVID-19 / S. Trabulus, C. Karaca, I. I. Balkan et al. // PLoS One. – 2020. – Vol. 15, № 9.
7. Monteil V. Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2 / V. Monteil // Cell. – 2020. – Vol. 181. – P. 905–913.
8. Single-cell RNA sequencing of 13 human tissues identifies cell types and receptors of human coronaviruses / F. Qi, S. Qian, S. Zhang, Z. Zhang // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2020.
9. Identification of a potential mechanism of acute kidney injury during the COVID-19 outbreak: a study based on single-cell transcriptome analysis / X. W. Pan, D. Xu, H. Zhang et al. // Journal of Intensive Care Medicine. – 2020. – Vol. 46, № 6. – P. 1114–1116.
10. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China / H. Su, M. Yang, C. Wan et al. // Kidney International. – 2020.

11. Human Kidney is a Target for Novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection / B. Diao, Z. Feng, C. Wang et al. // *MedRxiv*. – 2020. – Vol. 2.

12. Early kidney injury predicts disease progression in patients with COVID-19: a cohort study / T. Xia, W. Zhang, Y. Xu et al. // *BMC Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 21, № 1.

13. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19 / Y. Cheng, R. Luo, K. Wang et al. // *Kidney International*. – 2020. – Vol. 97, № 5. – P. 829–838.

14. Altered kidney function in duced by SARS-CoV-2 infection and acute kidney damage marker spredict survival out comes of COVID-19 patients: a prospective pilot study / M. Z. Temiz, I. Hacıbey, R. O. Yazar // *Renal Failure*. – 2022. – Vol. 44, № 1. – P. 233–240.

15. Збірник методичних рекомендацій з використання тест-наборів фірми-виробника "Human". – Режим доступу до ресурсу : http://www.human.de/en/productNew/Clinical_Chemistry/Reagents_and_Consumables/Multipurpose_Reagents.php.

16. Neutrophil-mediated oxidative stress and albumin structural damage predict COVID-19-associated mortality / M. A. Badawy, B. A. Yasseen, R. M. El-Messierey et al. // *Elife*. – 2021. – Vol. 10.

17. Low serum albumin and the risk of hospitalization in COVID-19 infection: A retrospective case-control study / R. Acharya, D. Poudel, A. Patel // *PLoS One*. – 2021. – Vol. 16, № 4.

18. Subramanian K. Albumin as a Prognostic Indicator in Pre-Intubated Patients With SARS-CoV-2: A Retrospective, Multi-Institutional Study / K. Subramanian, G. Brandeis // *Cureus*. – 2021. – Vol. – 6, № 13.

19. Can microalbumin in uria bean indicator of renal involvement in pediatric Covid 19 patients? / S. G. Özlü, Z. Aydın, B. N. Bozelli et al. // *Infection*. – 2022. – Vol. 50, № 3. – P. 719–724.

20. Komaru Y. Does a slight change in serum creatinine matter in corona virus disease 2019 (COVID-19) patients? / Y. Komaru, K. Doi // *Kidney Research and Clinical Practice*. – 2021. – Vol. 40, № 2. – P. 177–179.

21. Thong prayon C. The Association of Low Admission Serum Creatinine with the Risk of Respiratory Failure Requiring Mechanical Ventilation: A Retrospective Cohort Study / C. Thongprayoon, W. Cheungpasitporn, A. Chewcharat et al. // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9, № 1.

22. Diago C. A. A. Should we pay more attention to low creatinine levels? / C. A. A. Diago, J. A. A. Señaris // *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*. – 2020. – Vol. 67, № 7. – P. 486–492.

23. Predictive values of blood urea nitrogen/creatinine ratio and other routine blood parameters on disease severity and survival of COVID-19 patients / F. Ok, O. Erdogan, E. Durmus et al. // *Journal of Medical Virology*. – 2021. – Vol. 93, № 2. – P. 786–793.

24. Blood Urea Nitrogen to Serum Albumin Ratio (BAR) Predicts Critical Illness in Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) / D. Huang, H. Yang, H. Yu et al. // *International Journal of General Medicine*. – 2021. – Vol. 14. – P. 4711–4721.

25. The association of blood urea nitrogen levels upon emergency admission with mortality in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease / L. Chen, L. Chen, H. Zheng et al. // *Chronic Respiratory Disease*. – 2021. – Vol. 18.

26. Uric Acid as a Marker of Kidney Disease: Review of the Current Literature / C. Giordano, O. Karasik, K. King-Morris, A. Asmar // *DisMarkers*. – 2015.

Reference

1. Petrosillo N, Viceconte G, Ergonul O, Ippolito G, Petersen E. COVID-19, SARS and MERS: are they closely related? *Clin Microbiol Infect*. 2020; 729-734. doi: 10.1016/j.cmi.2020.03.026.

2. Chan JF, Yuan S, Kok KH, To KK, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*. 2020;395:514–523. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30154-9.

3. Chu KH, Tsang WK, Tang CS, Lam MF, Lai FM, To KF, Fung KS, Tang HL, Yan WW, Chan HW, Lai TS, Tong KL, Lai KN. Acute renal impairment in coronavirus-associated severe acute respiratory syndrome. *Kidney Int*. 2005;67(2):698-705. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.67130.x.

4. Joseph A, Zafrani L, Mabrouki A, Azoulay E, Darmon M. Acute kidney injury in patients with SARS-CoV-2 infection. *Ann Intensive Care*. 2020;10(1):117. doi: 10.1186/s13613-020-00734-z.

5. Al-Aly Z, Xie Y, Bowe B. High-dimensional characterization of post-acute sequelae of COVID-19. *Nature*. 2020; 594(7862):259-264. doi: 10.1038/s41586-021-03553-9.

6. Trabulus S, Karaca C, Balkan II, Dincer MT, Murt A, Ozcan SG, Karaali R, Mete B, Bakir A, Kuskucu MA, Altıparmak MR, Tabak F, Seyahi N. Kidney function on admission predicts in-hospital mortality in COVID-19. *PLoS One*. 2020; 15(9). doi: 10.1371/journal.pone.0238680.

7. Monteil V, Kwon H, Prado R, Hagelkrüys A, Wimmer RA, Stahl M, Leopoldi A, Garreta E, Hurtado Del Pozo C, Prosper F, Romero JP, Wirsberger G, Zhang H, Slutsky AS, Conder R, Montserrat N, Mirazimi A, Penninger JM. Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. *Cell*. 2020; 181(4):905-913. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.004.

8. Qi F, Qian S, Zhang S, Zhang Z. Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses.

BiochemBiophys Res Commun. 2020; 526(1):135-140. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.044.

9. Pan XW, Xu D, Zhang H, Zhou W, Wang LH, Cui XG. Identification of a potential mechanism of acute kidney injury during the COVID-19 outbreak: a study based on single-cell transcriptome analysis. *Intensive Care Med*. 2020;46(6):1114-1116. doi: 10.1007/s00134-020-06026-1.

10. Su H, Yang M, Wan C, Yi LX, Tang F, Zhu HY, Yi F, Yang HC, Fogo AB, Nie X, Zhang C. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int*. 2020; 98(1):219-227. doi: 10.1016/j.kint.2020.04.003.

11. Diao B, Wang C, Wang R, Feng Z, Zhang J, Yang H, Tan Y, Wang H, Wang C, Liu L, Liu Y, Liu Y, Wang G, Yuan Z, Hou X, Ren L, Wu Y, Chen Y. Human kidney is a target for novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *Nat Commun*. 2021; 12(1):2506. doi: 10.1038/s41467-021-22781-1.

12. Xia T, Zhang W, Xu Y, Wang B, Yuan Z, Wu N, Xiang Y, Li C, Shan Y, Xie W, Wang Y, Zhang Y, Bai L, Li Y. Early kidney injury predicts disease progression in patients with COVID-19: a cohort study. *BMC Infect Dis*. 2021; 21(1):1012. doi: 10.1186/s12879-021-06576-9.

13. Cheng Y, Luo R, Wang K, Zhang M, Wang Z, Dong L, Li J, Yao Y, Ge S, Xu G. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. *Kidney Int*. 2020; 97(5):829-838. doi: 10.1016/j.kint.2020.03.005.

14. Temiz, M. Z., Hacıbey, I., Yazar, R. O., Sevdı, M. S., Kucuk, S. H., Alkurt, G., Doganay, L., Dinler Doganay, G., Dincer, M. M., Yuruk, E., Erkalp, K., & Muslumanoglu, A. Y. Altered kidney function induced by SARS-CoV-2 infection and acute kidney damage markers predict survival outcomes of COVID-19 patients: a prospective pilot study. *Renal failure*. 2022; 44(1), 233–240. <https://doi.org/10.1080/0886022X.2022.2032743>.

15. Збірник методичних рекомендацій з використання тест-наборів фірми-виробника "Human". – Режим доступу до ресурсу : http://www.human.de/en/productNew/Clinical_Chemistry/Reagents_and_Consumables/Multipurpose_Reagents.php.

16. Badawy MA, Yasseen BA, El-Messierey RM, Abdel-Rahman EA, Elkhodiry AA, Kamel AG, El-Sayed H, Shedra AM, Hamdy R, Zidan M, Al-Raawi D, Hammad M, Elsharkawy N, El Ansary M, Al-Halfawy A, Elhadad A, Hatem A, Abouelnaga S, Dugan LL, Ali SS. Neutrophil-mediated oxidative stress and albumin structural damage predict COVID-19-associated mortality. *Elife*. 2021;10. doi: 10.7554/eLife.69417.

17. Acharya R, Poudel D, Patel A, Schultz E, Bourgeois M, Paswan R, Stockholm S, Batten M, Kafle S, Atkinson A, Sarwar H. Low serum albumin and the risk of hospitalization in COVID-19 infection: A retrospective case-control study. *PLoS One*. 2021;16(4). doi: 10.1371/journal.pone.0250906.

18. Subramanian K, Brandeis G. Albumin as a Prognostic Indicator in Pre-Intubated Patients With SARS-CoV-2: A Retrospective, Multi-Institutional Study. *Cureus*. 2021;13(10). doi: 10.7759/cureus.18532.

19. Özlü SG, Aydın Z, Bozelli BN, Avcı B, İnözü M, Çaycı FŞ, Gülhan B, Sezer S, Bayrakçı US. Can microalbuminuria be an indicator of renal involvement in pediatric Covid 19 patients? *Infection*. 2022; 50(3):719-724. doi: 10.1007/s15010-021-01745-z.

20. Komaru Y, Doi K. Does a slight change in serum creatinine matter in coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients? *Kidney Res Clin Pract*. 2021;40(2):177-179. doi: 10.23876/j.krccp.21.108.

21. Thongprayoon C, Cheungpasitporn W, Chewcharat A, Mao MA, Thirunavukkarasu S, Kashani KB. The Association of Low Admission Serum Creatinine with the Risk of Respiratory Failure Requiring Mechanical Ventilation: A Retrospective Cohort Study. *Sci Rep*. 2019;9(1). doi: 10.1038/s41598-019-55362-w.

22. Diago CAA, Señaris JAA. Should we pay more attention to low creatinine levels? *Endocrinol Diabetes Nutr (Engl Ed)*. 2020;67(7):486-492. doi: 10.1016/j.endinu.2019.12.008.

23. Ok F, Erdogan O, Durmus E, Carkci S, Canik A. Predictive values of blood urea nitrogen/creatinine ratio and other routine blood parameters on disease severity and survival of COVID-19 patients. *J Med Virol*. 2021;93(2):786-793. doi: 10.1002/jmv.26300.

24. Huang D, Yang H, Yu H, Wang T, Chen Z, Liang Z, Yao R. Blood Urea Nitrogen to Serum Albumin Ratio (BAR) Predicts Critical Illness in Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Int J Gen Med*. 2021;14:4711–4721. doi: 10.2147/IJGM.S326204.

25. Chen L, Chen L, Zheng H, Wu S, Wang S. The association of blood urea nitrogen levels upon emergency admission with mortality in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Chron Respir Dis*. 2021. doi: 10.1177/14799731211060051.

26. Giordano C, Karasik O, King-Morris K, Asmar A. Uric Acid as a Marker of Kidney Disease: Review of the Current Literature. *Dis Markers*. 2015. doi: 10.1155/2015/382918.

Надійшла до редколегії 15.08.2022

Отримано виправлений варіант 16.09.2022

Підписано до друку 16.09.2022

Received in the editorial 15.08.2022

Received version on 16.09.2022

Signed in the press on 16.09.2022

D. Krenytska¹, PhD Stud.,

A. Rachkovska¹, Stud.,

O. Savchuk¹, Dr. Hab.,

V. Karbovskiy², PhD

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,

²LLC BIOPHARMA PLASMA, Bila Tserkva, Ukraine

BIOCHEMICAL PARAMETERS OF KIDNEY FUNCTION IN DONORS UNDER THE PRESENCE OF ANTI-SARS-CoV-2 IgG IN BLOOD

Pandemic caused by SARS-CoV-2 virus in the world influences negatively on economic and social life, health care system. Contracted COVID-19 patients suffered from outcome this disease after recovery because of SARS-CoV-2 has affected system disorder of body. Problems of digestion, blood coagulation, humoral and nervous systems could be discovered background disorder of respiratory system working. Besides, the clinical researches agree the changes of functioning kidneys in hospitalized patients suffered by SARS-CoV-2 virus. Therefore the pathological status of kidneys could develop in post-COVID-19 period. Our research is aimed to analysis of changes of concentration albumin, creatinine, urea and urea acid in blood plasma of donors with different titers of anti-SARS-CoV-2 IgG. Groups of donors were selected, in which the maximum and minimum values of the studied parameters were observed relative to the control group – donors without anti-SARS-CoV-2 IgG in blood. We determined that donor group with minimum titer of anti-SARS-CoV-2 IgG – 10 ± 3 Index (S/C) – have been characterized the maximum concentration of creatinine, urea and urea acid. Moreover the donor group with titer of anti-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Index (S/C) had the minimum concentration of albumin, creatinine, urea and urea acid. Obtained results could be linked with the potential influence of SARS-CoV-2 virus to kidney cells and consequents of immune response to infection caused by COVID-19 disease. Our research could be useful for treatment of COVID-19, which would involve the clinical therapy aimed not only at neutralizing the virus in the body, but also at reducing the negative load on the kidneys to prevent the development of pathological conditions in the post-COVID-19 period.

Keywords: anti-SARS-CoV-2, albumin, creatinine, urea, urea acid.

MIXED VIRAL INFECTIONS IN VEGETABLES IN UKRAINE

Aim. Screening of vegetable crops for mixed viral infections caused by 8 viruses, and evaluation of relative share for different combinations of pathogens using serological methods for plant virus diagnostics. **Methods.** Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) was performed for detection of viral antigens. **Results.** For this study, the samples from plants with virus-like symptoms were collected from the agroecosystems in 4 regions of Ukraine during three vegetative seasons in 2019–2021. Plant samples were tested for presence of the following viruses: cucumber mosaic virus (CMV), watermelon mosaic virus 2 (WMV2), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), tomato mosaic virus (ToMV), tobacco rattle virus (TRV), potato virus Y (PVY), potato virus X (PVX), and tomatospottedwiltvirus (TSWV). Among the screened plants with virus-like symptoms, three viruses were the most common: CMV, WMV2 and ZYMV, with the incidence rate of 32 %, 33 % and 29 %, respectively. Apart from monoinfected plants, several patterns of mixed infections were shown typically induced by two and less commonly by three viruses (CMV+WMV2+ZYMV). From these patterns of mixed infections, five groups of pathogens were registered. **Conclusions.** In this work, we have analyzed cucurbit and solanaceous vegetable crops with virus-like symptoms for viral infections caused by 8 pathogens, and established virus combinations inducing mixed infections in the field. Five groups of pathogens were demonstrated as such combinations: CMV+ToMV, CMV+PVY, CMV+WMV2, CMV+ZYMV, and WMV2+ZYMV, with CMV+ToMV being the most common for tested plants. Also, there was one group of pathogens formed by three viruses CMV+WMV2+ZYMV. CMV has been shown present in every group of mixed viral infections in plants from both families, Cucurbitaceae and Solanaceae. The incidence rate for these combinations differed from 4 to 8 %. The presented results are important in the context of ecology and epidemiology of viral diseases of vegetables.

Keywords: viruses, mixed infections, vegetable crops, Ukraine.

Introduction. Viral plant diseases can be caused by either monoinfection or mixed infection involving two or more viruses. Simultaneous infection caused by different viruses or different strains of the same virus is not uncommon in nature [1, 2]. In plants, simultaneous infection with different viruses can lead to a phenomenon described as neutrality, when viruses do not interfere with replication, accumulation and transmission of each other [3]. Sometimes this can also lead to antagonism when one virus reduces the infection or accumulation of another virus [4], or synergism when a mixed infection leads to increased symptoms and/or elevated virus content. Synergistic interactions between plant viruses can lead to increased disease rate in crops that are susceptible to different viral combinations [5, 6]. In addition, viral synergies can lead to resistance or limited spread of another virus. A significant increase in symptoms' severity in case of dual infection as compared to a single infection has been observed in several studies involving a combination of potyviruses and viruses belonging to other genera [7].

In nature, synergistic interactions affect the level of vector transmission, which can lead to changes in the ecology and epidemiology of the pathogens involved. Studies show that the level of vector transmission often positively correlates with mixed infections, due to increased titers of viruses in the plant [8], or to changes in tropism, and in some cases, due to the fact that plants with mixed infections are more attractive to insect vectors (probably due to the weakening of phloem transport and the accumulation of sugars in the areas affected by the two viruses).

Infections of cucurbit species induced by such viruses as ZYMV, WMV-2 or CMV are very common and cause significant damage worldwide in the form of severe epidemics, either in single or double infection. Synergism is often observed between WMV-2 and other viruses infecting cucurbits, which can be expressed either by higher rate of virus replication or more severe symptoms. This was demonstrated, in particular for mixed infection caused by WMV-2 and poleroviruses, such as cucumber aphid-born virus (CABYV) [9].

The interaction between WMV-2 and ZYMV, two closely related viruses from *Potyviridae* family, is of particular

interest because these genetically distinct viral species belong to the same subgroup and occupy similar ecological niches, suggesting that competition between these viruses may be important factor influencing their evolution. WMV-2 and ZYMV have similar host ranges (primarily cucurbits), cause similar symptoms and are mostly transmitted by the same aphid species, although with a different efficiency. Mixed infection of WMV-2 and ZYMV in the same host populations and in individual plants is equally common for both cultured and wild host species. Such mixed infection, however, does not cause such severe synergistic effects as reported for double infections induced by potyviruses and viruses from other genera like cucumoviruses (*Bromoviridae* family) or potexviruses (*Alphaflexiviridae* family) [10].

The aim of the study. Screening of vegetable crops for mixed viral infections caused by 8 viruses, and evaluation of relative share for different combinations of pathogens using serological methods for plant virus diagnostics.

Materials and Methods. Samples of vegetable plants from *Cucurbitaceae* and *Solanaceae* families were collected basing on visual screening of crops for virus-like symptoms in several parts of Ukraine: Vinnytsia, Kyiv, Poltava, and Cherkasy regions.

Plant samples were tested for presence of the following viruses: cucumber mosaic virus (CMV), watermelon mosaic virus 2 (WMV2), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), tomato mosaic virus (ToMV), tobacco rattle virus (TRV), potato virus Y (PVY), potato virus X (PVX), and tomato spotted wilt virus (TSWV). For virus diagnostics, a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) was used [11, 12] with specific diagnostic kits from Loewe Biochemica GmbH (Germany) and following the manufacturer's recommendations. Absorbance values at 405 nm were measured using a BioTek µQuant microtiter plate reader (USA). Absorbance values greater than three times those of the negative controls, were considered positive. Mathematical processing of experimental data (mean values, standard deviation) was carried out using Origin 9.1 software. Variation statistics methods were used for statistical analysis of the obtained results. Significance of differences between the values was determined by Student's t-test at $p = 0.05$.

Results and Discussion. For this study, the samples from plants with virus-like symptoms were collected from the agroecosystems in 4 regions of Ukraine during three vegetative seasons in 2019–2021. The screening included cucurbit and solanaceous plants with the symptoms of dark green mosaic along the leaf veins, yellow-green interveinal mosaic of leaf blades, deformation of leaf blades and fruits (Fig. 1). The manifestation of symptoms was different, from a barely noticeable mosaic to a severe deformation in the

form of filamentous leaves. Taking into account the available data [2, 7], such a variety of symptoms could be the result of a mixed viral infection. Thus, collected experimental samples were tested by DAS-ELISA to determine the species composition of viruses that could cause such symptoms. In total, 161 plant samples were tested for eight viruses characterized either by a wide (CMV, PVY, TRV, PVX, TSWV, ToMV) or narrow host range (ZYMV, WMV2).



Fig. 1. Virus-like symptoms on leaves of pumpkin (a), custard squash (b), squash (c), melon (d), sweet pepper (e), and tomato (f)

Among the total number of 161 samples of vegetable plants analyzed for virus infections, 135 samples were collected from plants belonging to *Cucurbitaceae* family and 26 samples – from plants of *Solanaceae* family. Given the different number of samples by family and the different species composition of viruses for which different plants

were analyzed, it is not the number of positive samples that is considered informative, but their percentage values. Thus, among plants with virus-like symptoms, the three most common viruses were CMV, WMV2 and ZYMV, which were detected in 32 %, 33 % and 29 % of the samples, respectively (Table 1).

Table 1. Virus detection in vegetable crops by DAS-ELISA

Virus	CMV	PVX	PVY	ToMV	TRV	TSWV	WMV2	ZYMV
Number of positive samples	52	1	3	7	2	1	44	39
Percent of positive samples, %	32	4	12	27	8	4	33	29
Number of samples	161	26	26	26	26	26	135	135

Apart from monoinfected plants, several patterns of mixed infections were shown for tested samples. Such mixed infections were induced by two and less commonly by three viruses (CMV+WMV2+ZYMV). From these patterns of mixed infections, five groups of double infections were registered: CMV+ToMV, CMV+PVY, CMV+WMV2, CMV+ZYMV, and WMV2+ZYMV. The incidence rate for these virus combinations in plants from both families, *Cucurbitaceae* and *Solanaceae*, differed from 4 to 8 % (Fig. 2).

CMV has been shown present in all but one group of mixed viral infections. These data can be explained by the fact that CMV belongs to viruses with an extremely wide host range and therefore may persist in the same agriecosystem despite the crop rotation and other measures. CMV was found in mixed infection among the representatives of both *Cucurbitaceae* and *Solanaceae* families (Fig. 2).

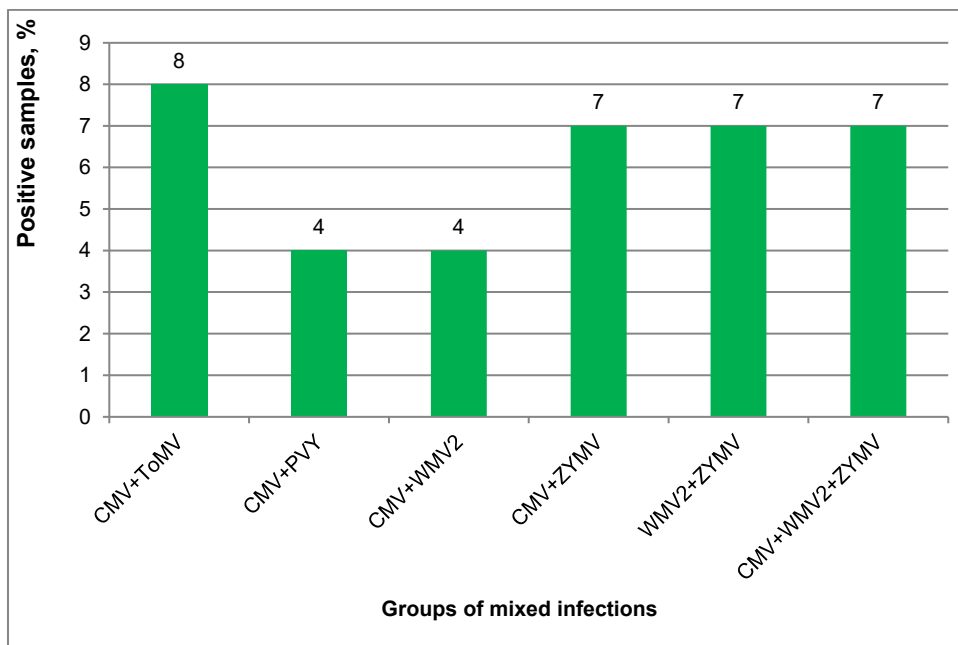


Fig. 2. Mixed infections found in solanaceous (CMV+ToMV and CMV+PVY) and cucurbit (CMV+WMV2, CMV+ZYMV, WMV2+ZYMV, and CMV+WMV2+ZYMV) crops

In general, mixed CMV and ZYMV infections characterized with more severe symptoms. According to the literature, the co-infection of CMV and ZYMV is an example of synergism, as it leads to a stronger manifestation of symptoms [2, 6].

The occurrence of mixed infection caused by CMV and PVY on tomatoes is confirmed by literature data, which leads to an increase in the concentration of both viruses in the plant and is important for the epidemiology of these viruses [13].

Despite the fact that CMV and ToMV have wide host ranges and in our studies they were detected with a incidence of 32 % and 27 %, respectively, the studies on mixed infections caused by these viruses on tomato and pepper have been published only recently. Particularly, when these crops were cultivated in one of the provinces in Turkey, the percentage of mixed infection on tomato and pepper was 5.31 % and 1.11 %, correspondingly, which is lower than in our studies [14].

The interaction of WMV and ZYMV is significantly different from that of ZYMV and CMV, because the former are the members of the same genus and have a similar ecological niche. This suggests that competition between viruses may be an important factor influencing their evolution. WMV and ZYMV have overlapping host ranges, cause similar symptoms on the plants, and are transmitted non-persistently mostly by the same aphid species, although with different efficiency. As already mentioned, WMV and ZYMV are often found in the same populations of host plants and in individual plants, which is

characteristic of both cultivated and wild plants, and leads to more severe symptoms [15].

ZYMV isolates replicate at a similar rate at mono- and mixed infection, whereas WMV isolates accumulate to much lower levels in presence of ZYMV. In addition, ZYMV induces changes in leaf coloration and the production of volatile substances enhancing the attraction of aphids to infected plants. In contrast, WMV does not have a strong effect on the plant-aphid interactions. However, WMV can take advantage of a mixed infection and be easily transmitted to other plants in such case [16].

Plants affected by three viruses (CMV, WMV-2, and ZYMV) were also found. The incidence of such plants was 7 %. Dark green mosaic, leaf blade deformation, and blistering were observed on melons and pumpkins, some of them were fruitless.

According to the results of the study, CMV was the most common virus found in collected samples of vegetable crops of *Cucurbitaceae* and *Solanaceae* families. This may be due to the fact that, unlike ZYMV and WMV-2, CMV can be transmitted not only by aphids but also by dodder and seed. To date, it has been confirmed that various species of wild flora may be the source of CMV in Ukraine [17], serving as additional risk factor for agricultural plants. In addition, there is evidence of CMV interaction with members of *Potyvirus* family. According to it, when found in mixed infection in some plants, CMV titer will increase compared to mono-infection, while the titer of the second pathogen may remain unchanged, which increases the efficiency of vector transmission of CMV. Wide spread of ZYMV in the screened

regions can be explained by the fact that despite a rather narrow host range, the virus does not cause severe symptoms on plants that do not belong to *Cucurbitaceae* family. Therefore, this virus can survive in natural reservoirs unnoticed. Given the wide host range of WMV-2, it may be preferable for it to switch to other hosts rather than competing with ZYMV, which has a limited ability to reproduce in plants outside *Cucurbitaceae* family and hence is forced to maintain its niche more aggressively.

Conclusion. In this work, we have analyzed cucurbit and solanaceous vegetable crops with virus-like symptoms for viral infections caused by 8 pathogens, and established virus combinations inducing mixed infections in the field. Five groups of pathogens were demonstrated as double combinations: CMV+ToMV, CMV+PVY, CMV+WMV2, CMV+ZYMV, and WMV2+ZYMV, with CMV+ToMV being the most common for tested plants. Also, there was one group of pathogens formed by three viruses CMV+WMV2+ZYMV. CMV has been shown present in every group of mixed viral infections in plants from both families, *Cucurbitaceae* and *Solanaceae*. The incidence rate for these combinations differed from 4 to 8 %. The presented results are important in the context of ecology and epidemiology of viral diseases of vegetables.

Acknowledgments. This work was partly funded by the Ministry of Education and Science of Ukraine (project 0121U109863).

References

1. Moreno A. B. & López-Moya J. J. When Viruses Play Team Sports: Mixed Infections in Plants. *Phytopathology*. 2020;110(1):29–48. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-19-0250-FI>
2. Faiza A. Fattouh. Double Infection of a Cucurbit Host by Zucchini Yellow Mosaic Virus and Cucumber Mosaic Virus. *Plant Pathology Journal*. 2003; 2:85–90. DOI:10.3923/ppj.2003.85.90 URL: <https://scialert.net/abstract/?doi=ppj.2003.85.90>
3. Singhal P., Nabi S.U., Yadav M.K. et al. Mixed infection of plant viruses: diagnostics, interactions and impact on host. *J Plant Dis Prot*. 2021;128:353–368. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00384-0>
4. Cho J.D. Ultra structural aspects of water melon necrosis disease caused by mixed infection with water melon mosaic potyvirus and cucumber green mottle mosaic tobamovirus. A thesis for the degree of Master of Science. Seoul National University; Korea; 1998.
5. Zeng R., Liao Q., Feng J., Li D. & Chen J. Synergy between cucumber mosaic virus and zucchini yellow mosaic virus on Cucurbitaceae hosts tested

by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2007;39(6):431–437. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00292.x>

6. Wang, Y., Gaba V., Yang J., Palukaitis P., Gal-On A. Characterization of synergy between Cucumber mosaic virus and potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathology*. 2002;92:51–58.
7. Wang Y., Lee, K., Gaba, V. et al. Breakage of resistance to *Cucumber mosaic virus* by co-infection with *Zucchini yellow mosaic virus*: enhancement of CMV accumulation independent of symptom expression. *Arch Virol*. 2004;149:379–396. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0240-4>
8. Wintermantel W. M., Cortez A. A., Anchieta A. G., Gulati-Sakhuja A. & Hladky L. L. Co-infection by two criniviruses alters accumulation of each virus in a host-specific manner and influence efficiency of virus transmission. *Phytopathology*. 2008;98(12): 1340–1345. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-12-1340>
9. Bourdin D. and Lecoq H. Increase in cucurbit aphid-borne yellows virus concentration by co-infection with sap-transmissible viruses does not increase its aphid transmissibility. *Phytopathology*. 1994;141: 143–152.
10. Brian W.J., Mahy, Marc H.V. van Regenmortel. *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology*. Academic Press; 2009:632.
11. Crowther J.R. ELISA. Theory and practice. Humana Press; 1995: 223.
12. Clark M. F., & Adams A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *The Journal of general virology*. 1977;34(3):475–483.
13. Mascia T., Cill F., Fanelli V., Finetti-Sialer M. M., De S. A., Palukaitis P., and Gallitelli D. Characterization of the interactions between *Cucumber mosaic virus* and *Potato virus Y* mixed infections in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 2010;23:1514–1524.
14. Akdura N., Kiliç H.C. Genetic Diversity of CMV and ToMV Isolates in Tomato and Pepper Production Areas in Hakkari, Turkey. *Research Square*; 2022; DOI: 10.21203/rs.3.rs-1451598/v1
15. Fletcher J. D., Wallace A. R. & Rogers B. T. Potyviruses in New Zealand buttercup squash (*Cucurbit maxima* Duch.): Yield and quality effects of ZYMV and WMV 2 virus infections. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 2000;28(1):17–26. DOI: 10.1080/01140671.2000.9514118
16. Salvaudon L., De Moraes CM, Mescher MC. Out comes of co-infection by potyviruses: implications for the evolution of manipulative strategies. *Proc Biol Sci*. 2013;280:20122959. Published 2013 Feb 13. doi:10.1098/rspb.2012.2959.
17. Kyrychenko A., Snihur H., Shevchenko T. First report of cucumber mosaic virus infecting *Alliaria petiolata* in Ukraine. *J Plant Pathol*. 2022; <https://doi.org/10.1007/s42161-022-01107-0>

Надійшла до редколегії 17.08.2022
Отримано виправлений варіант 19.09.2022
Підписано до друку 19.09.2022

Received in the editorial 17.08.2022
Received version on 19.09.2022
Signed in the press on 19.09.2022

Т. Шевченко, д-р біол. наук,
Р. Бедрак, студ.,
К. Тагер, студ.,
Г. Снігур, канд. біол. наук,
О. Шевченко, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ЗМІШАНІ ІНФЕКЦІЇ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР В УКРАЇНІ

Проаналізовано овочеві культури на змішані вірусні інфекції, що можуть бути спричинені вірусами, і встановлення їх відсоткового значення для різних груп комбінації вірусів з використанням серологічних методів ідентифікації вірусів рослин. Детекцію вірусів у рослинах овочевих культур проводили з використанням імуноферментного аналізу у модифікації DAS-ELISA. Для досліджень відбирали зразки рослин з агроценозів із чотирьох областей протягом трьох вегетаційних сезонів у період із 2019 по 2021 рік включно тільки з вірусоподібними симптомами. Зразки рослин тестували на наявність таких вірусів: *cucurbitmosaicvirus* (CMV), *watermelonmosaic virus 2* (WMV2), *zucchiniyellowmosaicvirus* (ZYMV), *tomatmosaicvirus* (ToMV), *tobaccorattlevirus* (TRV), *potatovirusY* (PVY), *potatovirusX* (PVX) and *tomatospottedwiltvirus* (TSWV). Серед проаналізованих рослин з вірусоподібними симптомами найчастіше зустрічались три віруси: CMV, WMV2 та ZYMV, які детектувались у 32, 33 та 29 %, відповідно, серед дослідних зразків. У протестованих зразках овочевих культур, окрім моноінфекції, зустрічалась змішана інфекція, викликана двома вірусами з переліку вірусів, на які тестували рослини, і навіть була одна група змішаних інфекцій, яка складалась із трьох вірусів, а саме CMV+WMV2+ZYMV. Серед змішаних інфекцій, які містили два віруси, було п'ять груп. У ході виконання досліджень було проаналізовано овочеві культури родин *Cucurbitaceae* та *Solanaceae* з вірусоподібними симптомами на наявність вірусних інфекцій, спричинених вірусами, та ідентифіковано комбінації вірусів, що викликають змішані вірусні інфекції. Установлено, що серед змішаних інфекцій, які містили два віруси, було п'ять груп: CMV+ToMV, CMV+PVY, CMV+WMV2, CMV+ZYMV та WMV2+ZYMV. CMV зустрічається у вигляді змішаної інфекції серед представників двох родин: *Cucurbitaceae* та *Solanaceae*. Найбільший відсоток мала змішана інфекція, викликана CMV+ToMV. Одна група змішаних інфекцій складалась із трьох вірусів, а саме CMV+WMV2+ZYMV. Частота ідентифікації цих груп серед дослідних рослин овочевих культур родин *Cucurbitaceae* та *Solanaceae* була в діапазоні від 4 до 8 %. Результати цієї роботи є актуальними з еколого-епідеміологічного погляду.

Ключові слова: віруси, змішані інфекції, овочеві культури, Україна.

УДК 577.112.083:616.127
DOI 10.17721/1728.2748.2022.90.30-33

Т. Мариненко, здобувач,
Т. Галенова, канд. біол. наук
ННЦ "Інститут біології та медицини",
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОКРЕМІ ПАРАМЕТРИ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ ТА ПОКАЗНИКИ ОБМІНУ ТРИПТОФАНУ В ПАЦІЄНТІВ З ІШЕМІЧНОЮ ХВОРОБОЮ СЕРЦЯ

В основі функціонування системи гемостазу лежить збалансована взаємодія між її коагуляційною, антикоагуляційною та фібринолітичною ланками. За даними сучасної наукової літератури, дестабілізація гемоваскулярного гомеостазу належить до основних механізмів прогресування ішемічної хвороби серця. Роль тригерів серцево-судинних захворювань поряд із загальноприйнятими факторами, такими як ожиріння, артеріальна гіпертензія, цукровий діабет і тютюнопаління, можуть виконувати біологічно активні речовини ендогенного походження. Установлення природи факторів генезу та механізмів прогресування серцево-судинних симптомів підвищить імовірність позитивного прогнозу для пацієнтів з ішемічною хворобою серця, яка залишається найпоширенішою причиною смертності населення розвинених країн світу. Метою цього дослідження було з'ясувати рівень деяких біологічно активних речовин, серед яких окремі фактори коагуляційного каскаду та системи фібринолізу, показники обміну триптофану та білки теплового шоку (HPS 60 та HPS 70) у пацієнтів з ішемічною хворобою серця. У дослідженні взяли участь 66 пацієнтів: у 20 з них був підтверджений діагноз "стабільна стенокардія", у 28 – "прогресуюча нестабільна стенокардія", у 18 – "інфаркт міокарда". Результати дослідження показали підвищене продукування протромботичних медіаторів (фактора Віллебранда, серотоніну) у плазмі крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця. Також було зазначено порушення балансу між тканинним активатором плазміногену та його інгібітором, що може бути основним фактором зниження фібринолітичного потенціалу плазми крові на тлі кардіоваскулярних подій. Установлено, що для пацієнтів з ішемічною хворобою серця, незалежно від форми захворювання, характерне вірогідне підвищення вмісту плазматичного білка теплового шоку, а саме HPS 60. Такі результати нашою думку про можливе залучення цього білка до патологічних реакцій і можливість його використання як біомаркера серцево-судинних захворювань.

Ключові слова: інфаркт міокарда, стенокардія, ішемічна хвороба серця, тканинний активатор плазміногену, інгібітор активатора плазміногену, фактор Віллебранда, серотонін, триптофан, моноаміноксидаза, білки теплового шоку.

Вступ. Ішемічна хвороба серця (ІХС) – найпоширеніша форма серцево-судинних захворювань, яка часто є причиною постійної чи тимчасової втрати працездатності серед соціально активного населення країн усього світу [1]. Незважаючи на певні досягнення у розумінні патогенезу ІХС, певні аспекти цього захворювання залишаються нерозкритими до кінця, а його медико-соціальне значення щорічно зростає [2]. Така невтішна динаміка обумовлена, з одного боку, неухильним зростанням показників захворюваності, а з іншого – значними витратами на діагностику і лікування. Успішне розв'язання проблеми ІХС залежить від розуміння механізмів її розвитку та можливості прогнозування ускладнень, що визначає стратегію лікування і вибір схеми терапії. Своєчасна діагностика й ефективне лікування знижують імовірність розвитку коронарних ускладнень і позитивно впливають на клінічний перебіг захворювання, що, загалом, покращує якість життя пацієнтів.

На сьогоднішній день накопичено масив експериментальних та клінічних даних щодо механізмів розвитку ішемії вінцевих судин, формування і прогресування атеросклерозу та серцевої недостатності. Установлено, що важлива роль у порушенні вінцевої гемодинаміки в місцях атеросклеротичного звуження судин серця належить ендотелію вінцевих судин [3], його взаємодії із форменими елементами крові, зокрема тромбоцитами, та іншими біологічно активними гуморальними факторами крові, що залучені у підтримання коагуляційного гемостазу та модуляції запальних реакцій [4, 5].

Порушення гемоваскулярного гомеостазу, що виражається у ендотеліальній дисфункції, посиленні агрегаційної активності тромбоцитів, гіперкоагуляції та депресії фібринолітичної системи, визнано основним фактором прогресування ІХС. Ендотеліальні клітини беруть участь у регуляції процесів звуження та розширення судин, регуляції гемостазу, ангиогенезу, імунної відповіді тощо. Регуляторні ефекти ендотелію є наслідком його високої біосинтетичної активності. Так, ендотеліоцити синтезують та секретують низку медіаторів проліферації та

запалення, речовин з про- та антикоагуляційною функцією, регуляторів процесу фібринолізу [3, 6, 7]. За фізіологічної норми ендотелій переважно секретує судинорозширюючі фактори та демонструє антитромботичну активність. Разом із тим, за умов дії певних регуляторних чинників, ендотелій може змінювати свій антитромботичний потенціал на тромбогенний. Дисфункція ендотелію є супутнім розладом атеросклерозу і відображає високий ризик розвитку мікро- і макросудинних ускладнень [8]. Поряд з ендотеліальними клітинами джерелом біологічно активних речовин з ефекторною функцією за відношенням до компонентів гемоваскулярного гомеостазу є тромбоцити. Результати певних досліджень зазначали посилення не лише агрегаційної функції тромбоцитів у пацієнтів з ІХС, а й гіперпродукування ними медіаторів, які підвищують ризик тромботичних ускладнень [9].

Отже, незважаючи на низку фактів, що підтверджують взаємозв'язок між дисбалансом у системі гемостазу та прогресуванням атеросклерозу й ініціацією судинних ускладнень при ІХС, інтерес до зазначеного питання відродився в останні роки через нові експериментальні дані в розумінні процесів і механізмів тромбоутворення. Метою нашої роботи було дослідити рівень деяких біологічно активних речовин, серед яких окремі фактори коагуляційного каскаду та системи фібринолізу, показники обміну триптофану та білки теплового шоку у пацієнтів з ішемічною хворобою серця.

Матеріали та методи. У дослідження було залучено 66 пацієнтів (віком від 46 до 75 років), що перебували на лікуванні в кардіологічному відділенні Київської міської лікарні № 12. У 20 пацієнтів був підтверджений діагноз "стабільна стенокардія", у 28 – "прогресуюча нестабільна стенокардія", у 18 – "інфаркт міокарда". Контрольну групу становили 20 відносно здорових донорів, без виявів ІХС в анамнезі, які за віком і статтю відповідали групам пацієнтів. Усі пацієнти та донори були ознайомлені із протоколом експерименту та добровільно погодилися взяти участь у дослідженні, підписавши інформовану згоду.

Забір крові для біохімічних досліджень здійснювали у день їхньої госпіталізації, до моменту призначення відповідного лікування. Фракції серотоніну та триптофану із крові отримували, використовуючи іонно-обмінну хроматографію (Bio Rad, Biologic LP, Richmond, USA) [10]. Концентрацію серотоніну та триптофану визначали спектрофлуориметрично (Shimadzu RF-1501, Японія) за довжини хвилі збудження ($\lambda_{\text{збудж}}$) 295 нм та випромінювання ($\lambda_{\text{випр}}$) 550 нм [11, 12]. Визначення моноаміноксидазної (MAO) активності проводили за методом, що описано у роботі [13]. Вміст білка визначали методом Bradford [14].

Рівень деяких факторів системи гемостазу (PAI-1, tPA, фактора Віллебранда) та білків теплового шоку (HSP 60 та HSP 70) у плазмі крові визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу згідно зі стандартним протоколом. Плазму крові розводили 50 мМ трис-HCl буферним розчином, pH 7,4, у співвідношенні 1 : 100 та інкубували при +4 °C впродовж ночі. Несорбований матеріал видаляли триразовим промиванням лунок 50 мМ трис-HCl буферним розчином, pH 7,4, що містить 0,05 % твін-20. Для блокування вільних місць неспецифічного зв'язування використовували 5 %-й розчин знежиреного молока. Відповідні первинні (Sunta Cruz, США) та вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому (Sigma, США), готували згідно з рекомендаціями фірм-виробників, інкубацію проводили за +37 °C упродовж 1 год. Візуалізацію реакції проводили, використовуючи хромогенний субстрат – о-фенілєндіамін (BioRad, США). Оптичну щільність проб визначали за довжини хвилі 405 нм за допомогою мікропланшетного спектрофотометра μ Quant (Bio Tek Instruments, США).

Математичну обробку та аналіз отриманих експериментальних даних проводили за допомогою комп'ютерного пакету для обробки й аналізу статистичної інформації Statistica 8.0. Для перевірки гіпотез щодо рівності генеральних середніх двох незалежних, незв'язаних вибірок використовували t-критерій Стюдента з попередньою перевіркою нормальності розподілу змінних. Різницю між показниками вважали статистично значущою при $p < 0,05$. Отримані результати наведені у вигляді $M \pm SD$ (середнє арифметичне $\pm$ стандартна (середньоквадратична) похибка середнього).

Результати та їх обговорення. За фізіологічної норми ендотелій підтримує рівновагу в системі гемостазу шляхом збалансованого продукування ендотеліоцитами речовин як із про- та антикоагулянтними, так і фібринолітичними властивостями [3, 6–8], наприклад простагліну, тканинного активатора плазміногену (t-PA), інгібіторів активаторів плазміногену (PAI-1 та PAI-2), тромбомодуліну, фактора Віллебранда, антитромбіну III та ін. Тканинний активатор плазміногену (t-PA) є основним фізіологічним активатором фібринолізу у просвіті судини [15].

За природою t-PA належить до високоспецифічних серинових протеаз, єдиним доведеним субстратом його є плазміноген. Переважним місцем синтезу t-PA є ендотелій, однак існують додаткові джерела, зокрема моноцити, мегакаріоцити, мезотеліальні клітини, м'язові клітини судин, фіброласти серця тощо. Переважна більшість плазмового t-PA зв'язана з його основним інактиватором – інгібітором активатора плазміногену першого типу (PAI-1). Останній переважно продукується ендотеліальними клітинами і тромбоцитами. Саме дисбаланс між активністю/вмістом t-PA і PAI-1 відіграє ключову роль у патологічному порушенні фібринолізу, тим самим суттєво збільшує ризик розвитку тромботичних ускладнень.

Ми дослідили вміст t-PA та PAI-1 у плазмі крові пацієнтів з ІХС залежно від форми захворювання. Установлено, що рівень PAI-1 зростає за умов усіх форм ІХС. Найвищі показники плазмового рівня PAI-1 спостерігали за прогресуючої нестабільної стенокардії, де вони перевищували показники відносно здорових донорів у три рази. Посилена секреція PAI-1 ендотеліоцитами може бути викликана впливом на клітини ліпопротеїнів дуже низької щільності, окиснених ліпопротеїдів і деяких цитокінів (напр. ІЛ-1, ФНП- α), рівень яких зростає при запаленні, атеросклерозі та кардіоваскулярних патологіях. У свою чергу, високий рівень PAI-1 у плазмі може пригнічувати фібринолітичну активність крові та сприяти зсуву гемостатичного балансу в бік тромбогенного. Згідно з отриманими результатами, тромбогенний потенціал плазми найбільшою мірою виявлявся у пацієнтів з інфарктом міокарда, у яких на тлі підвищених показників PAI-1 зазначали знижені показники рівня t-PA (табл. 1).

Ендотелій, поряд із тромбоцитами та мегакаріоцитами, є джерелом фактора Віллебранда, який належить до основних прокоагулянтних речовин плазми. При пошкодженні судинної стінки фактор Віллебранда взаємодіє насамперед із колагеном і мікрофібрилами субендотелію, забезпечуючи адгезію тромбоцитів, відіграючи роль своєрідного містка між тромбоцитом і оголеним субендотеліальним шаром [16]. Більше того, фактор Віллебранда залучений до коагуляційної ланки гемостазу: взаємодіючи із фактором VIII системи згортання крові, він захищає його від протеолізу.

У ході проведених досліджень ми не зазначили статистично достовірних відхилень середнього показника рівня фактора Віллебранда у плазмі пацієнтів з ІХС від рівня середнього показника у групі відносно здорових донорів (табл. 1). Однак необхідно наголосити, що 30 % ($n=6$) у групі пацієнтів із хронічною стабільною стенокардією та 25 % ($n=7$) у групі пацієнтів із прогресуючою нестабільною стенокардією мали підвищені показники рівня плазмового фактора Віллебранда ($0,18 \pm 0,02$ та $0,16 \pm 0,02$, відповідно).

Таблиця 1. Рівень деяких факторів системи гемостазу у плазмі крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця

Досліджувана група	PAI-1, ум. од./мл	t-PA, ум. од./мл	Фактор Віллебранда, ум. од./мл
донори ($n=20$)	$0,15 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,02$
хронічна стабільна стенокардія ($n=20$)	$0,33 \pm 0,15^*$	$0,21 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,04$
прогресуюча нестабільна стенокардія ($n=28$)	$0,45 \pm 0,10^*$	$0,23 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,03$
інфаркт міокарда ($n=18$)	$0,35 \pm 0,15^*$	$0,16 \pm 0,05^*$	$0,13 \pm 0,02$

* – зміни достовірні порівняно з показниками відносно здорових донорів, $p < 0,05$.

Питання оцінювання показників обміну триптофану в пацієнтів з ІХС становить науковий інтерес, оскільки серотонін, один з метаболітів цієї ланки, є принципово важливим медіатором функціонування тромбоцитів як у

нормі, так і за умов розвитку патологічних станів, зокрема патологій серцево-судинної системи.

У плазмі крові пацієнтів з ІХС залежно від форми захворювання спостерігали зміни показників обміну триптофану. Концентрація серотоніну різною мірою зростала

за різних форм ІХС. Найвищі показники зазначали у плазмі крові пацієнтів з інфарктом міокарда. Концентрація триптофану, амінокислоти-попередника синтезу серотоніну, у плазмі крові пацієнтів із прогресуючою нестабільною стенокардією та інфарктом міокарда перевищувала показники відносно здорових донорів у чотири та три рази, відповідно, тоді як за умов хронічної стабільної стенокардії зазначали лише тенденцію до зростання концентрації плазматичного триптофану, однак середній

показник статистично не відрізнявся від показника відносно здорових донорів (табл. 2). Моноаміноксидаза (КФ 1.4.3.4) є принципово важливим ферментом у метаболізмі серотоніну, оскільки він забезпечує катаболізм останнього шляхом окиснювального дезамінування. Отримані результати свідчать, що за різних форм ІХС спостерігається зниження MAO активності, що може бути причиною підвищеного рівня серотоніну в плазмі за умов серцево-судинної патології.

Таблиця 2. Концентрація серотоніну та триптофану, а також моноаміноксидазна (MAO) активність у плазмі крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця

Досліджувана група	Серотонін, мкг/мл	Триптофан, мкг/мл	MAO, ум. од./мг білка
Донори (n=20)	1,7 ± 0,3	16,1 ± 2,5	5,1 ± 2,0
хронічна стабільна стенокардія	11,1 ± 2,6*	23,8 ± 9,5	1,1 ± 0,4*
прогресуюча нестабільна стенокардія (n=28)	7,4 ± 1,3*	65,6 ± 12,8*	0,7 ± 0,3*
інфаркт міокарда (n=18)	19,7 ± 5,1*	53,2 ± 12,6*	1,2 ± 0,6*

* – зміни достовірні порівняно з показниками відносно здорових донорів, p < 0,05.

Білки теплового шоку (heatshockproteins – HSPs) – висококонсервативні білки, посилений синтез яких в організмі спостерігається за наявності стресових умов, зокрема при гострому та хронічному запаленні. Сьогодні доведено, що вони залучені у патогенез практично всіх захворювань, однак інформація щодо їх рівня за умов ІХС і можливої ролі у розвитку та прогресуванні серцево-судинних ускладнень відсутня.

У ході проведених досліджень показано, що рівень HSP 60 зростав у пацієнтів із хронічною стабільною стенокардією та інфарктом міокарда, тоді як за умов прогресуючої нестабільної стенокардії ми не зазначали статистично значущих змін цього показника відносно показника групи донорів. Також було встановлено, що вміст HSP 70 не змінювався у плазмі пацієнтів з ІХС незалежно від форм захворювання і залишався на рівні середнього показника відносно здорових донорів (табл. 3).

Таблиця 3. Рівень білків теплового шоку (HSP 60 та HSP 70) у плазмі крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця

Досліджувана група	HSP 60, ум. од./мл	HSP 70, ум. од./мл
Донори (n=20)	0,202 ± 0,021	0,168 ± 0,020
хронічна стабільна стенокардія (n=20)	0,257 ± 0,030*	0,165 ± 0,016
прогресуюча нестабільна стенокардія (n=28)	0,200 ± 0,036	0,137 ± 0,024
інфаркт міокарда (n=18)	0,259 ± 0,024*	0,157 ± 0,010

* – зміни достовірні порівняно з показниками відносно здорових донорів, p < 0,05.

Висновки. Незважаючи на наявність великого наукового і практичного матеріалу щодо основних принципів і закономірностей перебігу ішемічної хвороби серця, багато питань, пов'язаних із механізмом патогенезу цього захворювання, залишаються нез'ясованими. Вивчення факторів ґенезу та механізмів прогресування серцево-судинних симптомів значною мірою визначає перспективи щодо формування точного прогнозу можливих ускладнень і навіть смертності. У нашому дослідженні проведено аналіз деяких показників системи гемостазу, обміну триптофану та білків теплового шоку в сироватці крові пацієнтів з різними формами ІХС. Установлено підвищення рівня протромбогенних медіаторів (фактора Вільбранда, серотоніну), що може обумовлювати високий ризик тромботичних ускладнень за умов серцево-судинної патології. Зниження показників співвідношення t-PA/PAI-1 у пацієнтів з ІХС є доказом пригніченого фібринолітичного потенціалу плазми та може бути додатковим фактором зсуву балансу в системі гемостазу в бік тромбогенного. Показано підвищення вмісту білка теплового шоку, а саме HSP 60, у плазмі пацієнтів з ішемічною хворобою серця. Однак його потенційна роль у розвитку серцево-судинної патології потребує додаткового вивчення. Отримані нами результати можуть стати підставою для вдосконалення стратегії діагностики та моніторингу ефективності терапії ІХС.

Список використаних джерел

1. A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics / A. K. Malakar, D. Choudhury, B. Halder et al. // J. Cell Physiol. – 2019. – Vol. 234, № 10. – P. 16812–16823. doi: 10.1002/jcp.28350.
2. Coronary Artery Disease: From Mechanism to Clinical Practice / C. Shao, J. Wang, J. Tian et al. // Adv Exp Med Biol. – 2020. – Vol. 1177. – P. 1–36. doi: 10.1007/978-981-15-2517-9_1.
3. Kinlay S. Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy / S. Kinlay, P. Ganz // Am J. Cardiol. – 1997. – Vol. 80. – P. 11–16. doi: 10.1016/s0002-9149(97)00793-5.
4. Coronary Atherosclerosis: Pathophysiologic Basis for Diagnosis and Management / K. D. Boudoulas, F. Triposciadis, P. Geleris et al. // Prog Cardiovasc Dis. – 2016. – Vol. 58, № 6. – P. 676–692. doi: 10.1016/j.pcad.2016.04.003.
5. Inflammation in Coronary Atherosclerosis and Its Therapeutic Implications / N. J. Montarello, M. T. Nguyen, D. T. L. Wong et al. // Cardiovasc Drugs Ther. – 2022. – Vol. 36, № 2. – P. 347–362. doi: 10.1007/s10557-020-07106-6.
6. Galley H. F. Physiology of the endothelium / H. F. Galley, N. R. Webster // Br J. Anaesth. – 2004. – Vol. 93, № 1. – P. 105–113. doi: 10.1093/bja/aeah163.
7. The endothelium and its role in regulating vascular tone / A. Sandoz, J. J. van Zanten, G. S. Metsios et al. // Open Cardiovasc Med J. – 2010. – Vol. 4. – P. 302–312. doi: 10.2174/1874192401004010302.
8. Endothelial dysfunction over the course of coronary artery disease / E. Gutiérrez, A. J. Flammer, L. O. Lerman et al. // Eur Heart J. – 2013. – Vol. 34, № 41. – P. 3175–3181. doi: 10.1093/eurheartj/ehs351.
9. Ho-Tin-Noe B. Platelets and vascular integrity: how platelets prevent bleeding in inflammation / B. Ho-Tin-Noe, Y. Boulaftali, E. Camerer // Blood. – 2018. – Vol. 131, № 3. – P. 277–288. doi: 10.1182/blood-2017-06-742676.
10. Максименко Е. Г. Уровень триптофана и серотонина в условиях судорожной активности головного мозга / Е. Г. Максименко, В. Н. Савченко // Вісник Харків. нац. ун-ту ім. В. Н. Каразіна. Медицина. – 2000. – Т. 1, № 494. – P. 40–43.

11. Gaitonde M. K. A fluorimetric method for the determination of tryptophan in animal tissues / M. K. Gaitonde // Biochem. J. – 1974. – № 139. – P. 625–631.
12. Weissbach H. A simplified method for measuring serotonin in tissue; simultaneous assay of both serotonin and histamine / H. Weissbach, T. P. Waalkes, S. Udenfriend // J. Biol. Chem. – 1958. – Vol. 230, № 2. – P. 865–871.
13. Ali B. H. Inhibition of monoamine oxidase by furazolidone in the chicken and the influence of the alimentary flora thereon / B. H. Ali, A. L. Bartlet // British Journal of Pharmacology. – 1980. – Vol. 71, № 1. – P. 219–224.
14. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 72, № 7. – P. 248–254.
15. Gebbink M. F. Tissue-type plasminogen activator-mediated plasminogen activation and contact activation, implications in and beyond haemostasis / M. F. Gebbink // J. Thromb Haemost. – 2011. – Vol. 9. – P. 174–181.
16. Sadler J. E. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor / J. E. Sadler // Annu Rev Biochem. – 1998. – Vol. 67. – P. 395–424.

Reference

1. Malakar AK, Choudhury D, Halder B, et al. A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics. J Cell Physiol. 2019;234(10):16812-16823. doi: 10.1002/jcp.28350.
2. Shao C, Wang J, Tian J, et al. Coronary Artery Disease: From Mechanism to Clinical Practice. Adv Exp Med Biol. 2020;1177:1-36. doi: 10.1007/978-981-15-2517-9_1.
3. Kinlay S, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. Am J Cardiol. 1997;80(9A):111-161. doi: 10.1016/s0002-9149(97)00793-5.
4. Boudoulas KD, Triposciadis F, Geleris P, et al. Coronary Atherosclerosis: Pathophysiologic Basis for Diagnosis and Management. Prog Cardiovasc Dis. 2016;58(6):676-692. doi: 10.1016/j.pcad.2016.04.003.
5. Montarello NJ, Nguyen MT, Wong DTL, et al. Inflammation in Coronary Atherosclerosis and Its Therapeutic Implications. Cardiovasc Drugs Ther. 2022;36(2):347-362. doi: 10.1007/s10557-020-07106-6.

6. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. Br J Anaesth. 2004;93(1):105-13. doi: 10.1093/bja/aei163.
7. Sandoz A, van Zanten JJ, Metsios GS, et al. The endothelium and its role in regulating vascular tone. Open Cardiovasc Med J. 2010;4:302-312. doi: 10.2174/1874192401004010302.
8. Gutiérrez E, Flammer AJ, Lerman LO, et al. Endothelial dysfunction over the course of coronary artery disease. Eur Heart J. 2013;34(41):3175-3181. doi: 10.1093/eurheartj/ehs351.
9. Ho-Tin-Noe B, Boulafali Y, Camerer E. Platelets and vascular integrity: how platelets prevent bleeding in inflammation. Blood. 2018;131(3):277-288. doi:10.1182/blood-2017-06-742676
10. Maksimenko EG, Savchenko VN. The level of tryptophan and serotonin in the convulsive readiness conditions of cerebrum. Visnyk of V. N. Karazin Kharkiv National University. 2000;1(494): 40-43.
11. Gaitonde MK. A fluorimetric method for the determination of tryptophan in animal tissues. Biochem. J. 1974;139:625-631.
12. Weissbach H, Waalkes TP, Udenfriend S. A simplified method for measuring serotonin in tissue; simultaneous assay of both serotonin and histamine. J. Biol. Chem. 1958;230(2):865-871.
13. Ali BH, Bartlet AL. Inhibition of monoamine oxidase by furazolidone in the chicken and the influence of the alimentary flora thereon. British Journal of Pharmacology. 1980;71(1):219-224.
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976;72(7):248-254.
15. Gebbink MF. Tissue-type plasminogen activator-mediated plasminogen activation and contact activation, implications in and beyond haemostasis. J Thromb Haemost. 2011;9 (Suppl 1):174-181.
16. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. Annu Rev Biochem. 1998;67:395-424.

Надійшла до редколегії 22.08.2022
Отримано виправлений варіант 26.09.2022
Підписано до друку 26.09.2022

Received in the editorial 22.08.2022
Received version on 26.09.2022
Signed in the press on 26.09.2022

T. Marynenko, applicant,
T. Halenova, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

CERTAIN PARAMETERS OF THE HEMOSTASIS SYSTEM AND INDICATORS OF TRYPTOPHANE METABOLISM IN PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE

The hemostasis system is a functional system of the human body that ensures the integrity and patency of the vessels of the circulatory system, prevents or stops bleeding, and also maintains the blood in a liquid state. The functioning of the hemostasis system is based on a balanced interaction between its coagulation, anticoagulation and fibrinolytic links. According to modern concepts, destabilization of hemovascular homeostasis is one of the main mechanisms of progression of coronary heart disease (CHD). Biologically active substances of endogenous origin can play the role of triggers of cardiovascular events, along with generally accepted factors such as obesity, arterial hypertension, diabetes and smoking. Establishing the nature of genesis factors and mechanisms of progression of cardiovascular symptoms will increase the probability of a positive prognosis for patients with coronary heart disease, which remains the most common cause of mortality in the population of developed countries. The purpose of this study was to find out the level of some biologically active substances, including certain factors of the coagulation cascade and the fibrinolysis system, parameters of tryptophan metabolism and heat shock proteins (namely, HPS 60 and HPS 70), in patients with coronary artery disease. 66 patients diagnosed with coronary artery disease took part in the study: 20 of them had a confirmed diagnosis of stable angina, 28 had progressive unstable angina, and 18 had myocardial infarction. The results of the study showed an increased production of prothrombotic mediators (Willebrand factor, serotonin) in the blood plasma of patients with coronary artery disease. An imbalance between tissue plasminogen activator and its inhibitor was also noted, which may be the main factor in reducing the fibrinolytic potential of blood plasma under cardiovascular events. It has been established that patients with coronary heart disease, regardless of the form of the disease, are characterized by a significant increase in the plasma content of heat shock protein, namely HPS 60. Such results suggest the possible involvement of this protein in the pathological reactions that occur during coronary heart disease, and the possibility of its use as a biomarker of cardiovascular diseases.

Keywords: myocardial infarction, angina, coronary heart disease, tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor, Willebrand factor, serotonin, tryptophan, monoamine oxidase, heat shock proteins.

MELATONIN IMPROVES SPLEEN HISTOPHYSIOLOGY OF RATS WITH DIET-INDUCED OBESITY: CHRONOTHERAPY APPROACH

One of the most common characteristics of obesity is the development of a systemic low-grade proinflammatory state in the entire body, including the immune organs. Spleen enlargement during diet-induced obesity contributes to the development of chronic inflammation. Melatonin due to immunomodulatory, antioxidant, and systemic metabolic roles is proposed to be an effective candidate for anti-obesity therapy. As immune systems demonstrate pronounced circadian rhythmicity and immune cells have different types of melatonin receptors, a chronotherapeutic approach might be used to choose the most effective regimes of melatonin administration for the correction of obesity-provoked damage to the spleen. Thus, the main goal of our research was the analysis of the rats' spleen histophysiology during the development of high-calorie diet-induced obesity (HCD) after administering melatonin daily at different times (morning or evening). Melatonin was administered by gavage for 7 weeks in the dose of 30 mg/kg 1 h before lights-off (HCD ZT11, M ZT11, evening), or 1 h after lights-on (HCD ZT01, M ZT01, morning). For assessment of the morpho-functional state of the spleen, the histopathological evaluation of red and white pulp in different zones of lymphoid follicles was implemented. It was observed that obesity development was accompanied by hyperemia and vessel dilatation in the red pulp; while in the white pulp notable deformation of germinal centers and destroyed borders between zones of lymphoid follicles were noticed. The HCD group demonstrated a decrease in the relative amount of the white pulp, the cross-sectional area of germinal centers, and the cross-sectional area of the marginal zone; while the increased relative amount of red pulp and marginal zone/germinal centers ratio were detected compared with control. Melatonin administration to obese rats increases the relative amount of the white pulp (HCD ZT11 group), the cross-sectional area of germinal centers (HCD ZT01 and HCD ZT11 groups), and the cross-sectional area of the marginal zone (HCD ZT11 group), and decreases marginal zone/germinal centers ratio (HCD ZT01 group) in comparison with the HCD group. Also, it was demonstrated that a choice between the morning or evening regimes of the melatonin treatment did not affect the histophysiology of the spleen in rats receiving the standard diet (M ZT01 and M ZT11 groups). These results indicate that melatonin can be considered to be a powerful potential therapeutic agent for the amelioration of obesity-induced changes in the spleen.

Keywords: chronobiology, high-calorie diet-induced obesity, white pulp, red pulp, germinal centers, marginal zone.

Introduction

The morphological state of the spleen depends on metabolic disorders in the body [16]. Previous studies have reported an association between obesity and an enlarged spleen or non-alcoholic fatty liver disease [3, 27]. The spleen, as a peripheral organ of the immune system, reacts to any immunopathological process in the body, ensures erythrocyte homeostasis, participates in the effector phase of the humoral immune response and hematopoiesis, metabolism, and it is one of the main blood depots [14]. The spleen affects glucose-induced insulin secretion from pancreatic islets and simultaneously modulates glucose tolerance [20]. Clinical data show that the incidence of diabetes is significantly higher in patients who have undergone partial pancreatectomy and splenectomy than in those who have undergone pancreatectomy alone. In addition, the spleen affects glucose homeostasis in obesity [11]. The mechanism of splenomegaly in obesity remains unclear [26, 5, 12]. One explanation for this is that the spleen, as an organ of the immune system, can become enlarged as a result of the chronic inflammation associated with obesity [2, 15]. This inflammatory state is the result of overproduction of inflammatory mediators such as tumor necrosis factor- α and interleukin-6 and a decrease in the production of anti-inflammatory interleukin-10 [1, 13, 8, 9]. With an unbalanced diet and failure to maintain a healthy lifestyle, a significant decrease in lymphocytes, coarsening of the reticular fibers of the spleen stroma, and mucoid swelling of the vessel walls of the microcirculatory bed are observed [25]. An excess of dietary unsaturated fatty acids in the range of 800-1200 mg/kg causes significant oxidative stress, which provides a possible pathway for splenocyte apoptosis [22]. The degree of the detected disruptions depends on the strength of the high-calorie load and is a manifestation of the body's general

adaptive response. In addition, an increase in the mass of the spleen, but a decrease in the cellularity of the organ, was found in animals that consumed a high-calorie diet [17]. Splenomegaly without an increase in the cellularity in obesity may be a consequence of a prolonged efferent phase during the activation of antibody production [28, 24]. Such indicators may indicate possible exhaustion of compensatory and adaptive mechanisms and homeostatic imbalance.

Melatonin is a multifunctional signal molecule with a pronounced immunomodulatory function [6]. The best-characterized function of melatonin is the regulation of the circadian rhythm of the whole body. Desynchronization of an endogenous circadian rhythm with external conditions leads to depression, decreased immunity, and, as a result, neurological, autoimmune, metabolic, endocrine, and oncological diseases. The basis of the development of all these diseases is the failure of endocrine, neuronal, and immune regulatory mechanisms. Currently, melatonin is receiving special attention in the search for effective and safe pharmacological correctors for pathological conditions, in particular, obesity [4]. Its biological significance is determined by its regulatory influence on all types of biological rhythms that underlie life processes and occur at all levels of organization: cellular, tissue, organ, and system. Melatonin regulates the rhythmicity of lymphoid organs through the activation of nuclear and membrane melatonin receptors [19].

Therefore, the main aim of our research was to analyze the histophysiology of rat's spleen (relative amount of white and red pulp, the cross-sectional area of germinal centers and marginal zone in the white pulp, marginal zone/germinal centers ratio) after different melatonin regimens (morning and evening) during the development of high-calorie-diet-induced obesity.

Materials and methods

White nonlinear male rats (110 ± 10 g bodyweight) were used in this study. The light cycle was set as 12-h light and 12-h darkness, with light off at 19:00 (ZT12). All experiments on animals were carried out in compliance with the international principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes (European Convention, Strasbourg, 1986), Article 26 of the Law of Ukraine "On the Protection of Animals from Cruelty" (No.3447-IV, February 21, 2006) as well as all norms of bioethics and biological safety.

During the first week, all animals received standard rodent chow ($15,3 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$). Food and water were available *ad libitum*. Animals were kept under standard housing conditions with constant temperature and humidity. On the 8th day, rats were divided into two groups: control animals received standard chow for 13 weeks and experimental rats received a high-calorie diet (HCD, $22,4 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$), consisting of standard chow (60 %), lard (10 %), eggs (10 %), sugar (9 %), peanut (5 %), dry milk (5 %) and vegetable oil (1 %) [10]. To confirm the development of obesity, animals were weighed once a week until the average body weight gain reached a significant difference of at least 30 %. Then animals were classified as having normal body mass (Control) and those with developed obesity (HCD). Rats of control and HCD groups were further divided into three subgroups each:

1. Control group – no administration of melatonin, standard diet ($15,3 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$);
2. Group M ZT01 – melatonin in the morning (1 hour after light-on), standard diet ($15,3 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$);
3. Group M ZT11 – melatonin in the evening (1 hour before light-off), standard diet ($15,3 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$);
4. Group HCD – no administration of melatonin, high-calorie diet ($22,4 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$);
5. Group HCD ZT01 – melatonin in the morning (1 hour after light-on), high-calorie diet ($22,4 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$);
6. Group HCD ZT11 – melatonin in the evening (1 hour before light-off), high-calorie diet ($22,4 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$).

Melatonin (Alcon Biosciences, USA) was diluted in drinking water and administered daily by single oral 2 mL gavage in the dose of 30 mg/kg bodyweight. The administration lasted for 7 weeks. Melatonin treatment began during the 6th week after the induction of obesity.

For the treatment of many experimental disease models [23] and also in the case of clinical trials [7], the use of different doses, methods, and times of melatonin administration had been employed. In our experiments, the lowest dose of melatonin was chosen, at which it was observed both a simultaneous decrease in weight gain of obese rats and the appearance of beige adipocytes, as we are interested in obesity therapy through beige and brown adipocyte activation.

On the last day of the experiment, the animals were sacrificed by carbon dioxide asphyxiation and decapitated, and then spleen tissue samples were isolated and weighted.

A histopathological examination was performed to characterize the morphology and functional status of the spleen. Fragments of the spleen in the size of 5×5 mm were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 72 h, dehydrated, embedded into the paraffin, and cut into 7 μm sections according to standard procedures. Slides were stained with Bemer's hematoxylin and eosin (H&E).

Quantitative determination was performed using digital microphotographs. All captures were obtained using a light microscope BX41 (Olympus, Japan) with a4 $\times$ objective lens. Microphotographs were taken using the DP20 (Olympus,

Japan) digital camera and analyzed with the QuickPHOTO MICRO software (Promicra, Czech Republic).

Histological evaluation was performed by accounting relative amount of the white and red pulp, the cross-sectional area of germinal centers, and the marginal zone in the white pulp, marginal zone/germinal centers ratio. All parameters were measured with the ImageJ software (National Institutes of Health, USA). For morphometric analyses we analyzed 2 slides from each experimental animal. The number of observations for each group was 50 per each morphometric parameter.

Statistical data analysis was performed using Statistica 6.0 (StatSoft, USA) and Microsoft Excel 2010 software (Microsoft, USA). The obtained data were presented as means $\pm$ standard error of the mean (SEM). The distribution of data was assessed with the Shapiro-Wilk normality W-test. Since the analyzed distributions were considered normal, we used one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison-test to evaluate the differences between the means. The differences with the probability of the null hypothesis of $p < 0.05$ were considered significant.

Results and Discussion

Normally (**Fig. 1, control group**), the spleen of rats is surrounded by a capsule of fibrous, dense connective tissue. It has numerous elastic and collagen fibers, and smooth muscle cells, and it is covered with mesothelium on the outside. Trabeculae depart from the capsule into the inner part of the organ, and blood vessels are located in their thickness. In the spleen of rats, two functional zones can be clearly distinguished – the white and red pulp. The white pulp is represented by spherical formations that are made of lymphocytes surrounding arterioles. Clusters of T-lymphocytes form a periarteriolar lymphocyte sheath. B-lymphocytes form lymphoid follicles that have clearly defined germinal centers and mantle zone surrounded by a loosely distributed marginal zone. The red pulp is made up of sinusoidal capillaries and splenic cords located between them, which anastomose with each other. Splenic cords are clusters of blood cells: erythrocytes, macrophage cells, and leukocytes, including T- and B-lymphocytes at various stages of differentiation. The stroma of the red pulp is made of reticular tissue.

In the HCD group (**Fig. 1**), the share of the white pulp volume decreases, and the number of cells in it also decreases. The mass of the spleen increases as a result of swelling of the parenchyma and the overfilling of vessels with the blood. The number of secondary lymphoid nodules in the part of the white pulp increases, and the germinal centers are deformed; the boundaries between the zones become unclear. In the organ parenchyma, the number of macrophages, monocytes, plasma cells, and myeloid cells increases. Macrophages are in an active state, the cytoplasm is filled with remnants of cells, hemosiderin, and erythrocytes. In the red pulp of obese rats, vascular disorders manifested in the form of swelling of the splenic stroma and blood vessels, dilation of the marginal sinuses, and hyperemic blood vessels are also observed. In the white pulp, the zone of lymphoid follicles becomes looser and lighter than normal, and the number of lymphoid elements decreases compared to the control group.

Melatonin administration to rats on a standard diet (group M ZT01 and M ZT11) did not induce morphological changes in any applied regime.

Melatonin administration to rats with a high-calorie diet (group HCD ZT01 and HCD ZT11) improved the morphological state of both white and red pulp of the spleen: the

amount of blood in the venous sinuses of the spleen decreased. Macrophages that are completely filled with hemosiderin and elements of other cells are less common. The nuclear envelope of lymphocytes had clear contours,

but the cytoplasm was clear and did not contain organelles with any signs of swelling and damage. The lumen of the capillaries was narrowed, and the wall of the venous sinuses was not thickened.

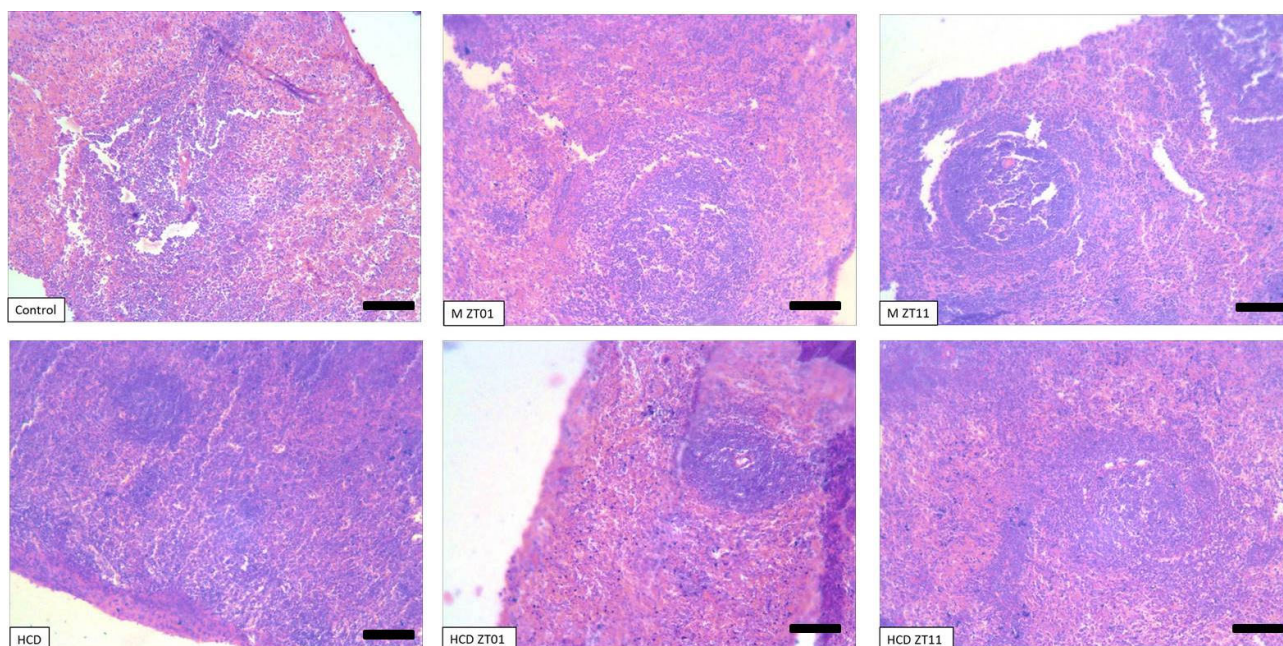


Fig. 1. Microphotographs of rats' spleen sections: H&E staining; scale bar: 50 μ m

Morphometric analysis of the obtained data demonstrated a significant decrease by 34% in the relative amount of the white pulp in obese rats after consuming a high-calorie diet compared to the control (Fig. 2). Melatonin administration during HCD-induced obesity prevented the decrease of the relative amount of the white pulp after evening interventions: this parameter increased by 22% in comparison to the

HCD group, but it was still low in comparison with control – in HCD ZT11 it decreased by 20% and in the HCD ZT01 – by 26%. The relative amount of the white pulp in the M ZT01 and M ZT11 groups did not differ from the control value. There was no observed difference in the relative amount of white pulp between morning and evening regimes of melatonin administration in the HCD ZT11 and HCD ZT01 groups.

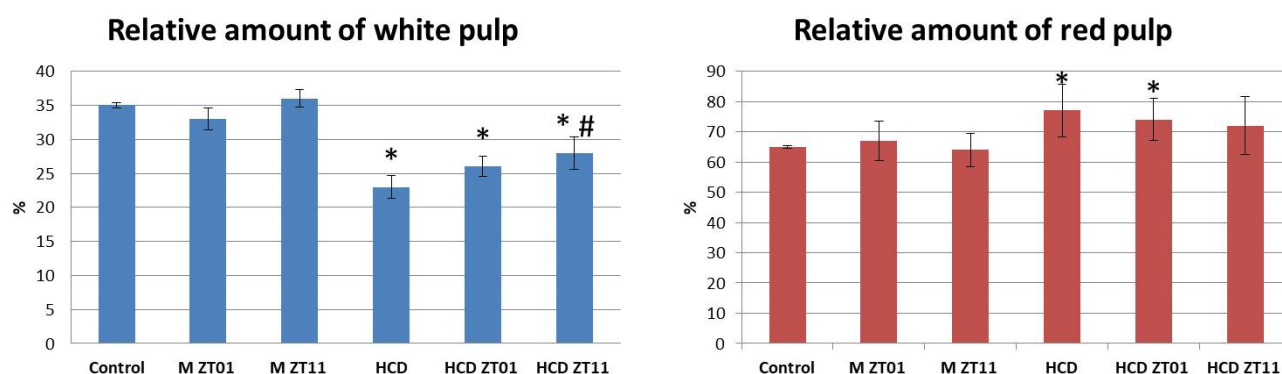


Fig. 2. Relative amount of the white and red pulp of the spleen

Notes: * – difference between the control and experimental groups are significant at $p \leq 0.05$;

– difference between the HCD group and HCD ZT01, HCD ZT11 is significant at $p \leq 0.05$;

The number of observations for each group was 50

HCD-induced development of obesity resulted in a significant increase of the relative amount of the red pulp by 19%, compared to the control group (Fig. 2). High level of the relative amount of red pulp also was fixed in HCD ZT01: it increased by 14% in comparison with the control group. The relative amount of the red pulp in the HCD ZT11 group

has an intermediate value: its level did not significantly differ from the control and the HCD groups. Also, morning and evening melatonin regimes did not influence the relative amount of the red pulp in rats consuming a standard diet. There was no observed difference in the relative amount of

red pulp between morning and evening regimes of melatonin administration in the HCD ZT11 and HCD ZT01 groups.

Also, morphometric parameters of lymphoid follicles have been analyzed (Fig. 3). The cross-sectional area of germinal centers in obese rats (HCD group) decreased by 64% in comparison with the control. Administration of melatonin in both morning and evening regimes to rats with HCD (groups HCD ZT01 and HCD ZT11) resulted in a 2-fold

increase in the cross-sectional area of germinal centers in comparison with the HCD group. Their values reached the control level. Interestingly, the morning administration of melatonin to rats with a standard diet increased the cross-sectional area of germinal centers by 74% in comparison with the control, while evening administration of melatonin to rats without obesity did not influence this parameter.

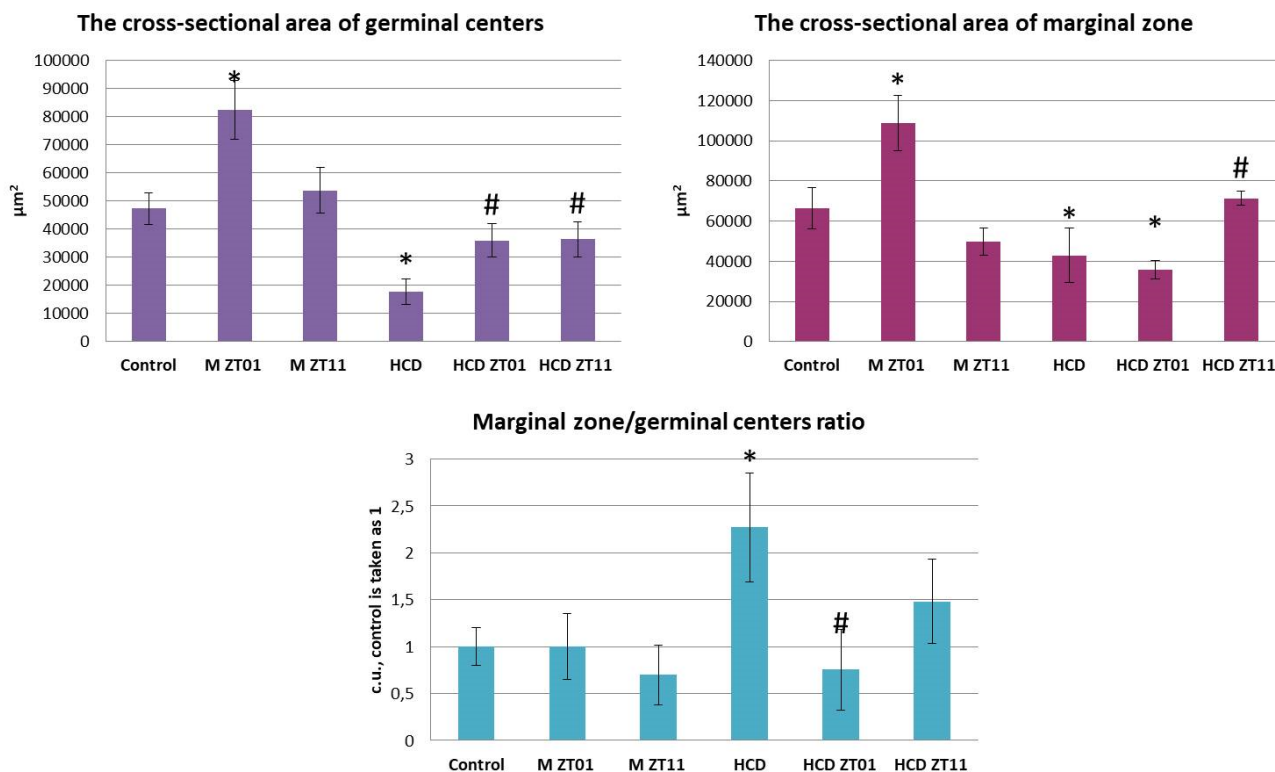


Fig. 3. Morphometric parameters of lymphoid follicles: the cross-sectional area of germinal centers, the cross-sectional area of marginal zone, and marginal zone/germinal centers ratio

Notes: * – difference between the control and experimental groups is significant at $p \leq 0.05$;

– difference between the HCD group and HCD ZT01, HCD ZT11 is significant at $p \leq 0.05$;

The number of observations for each group was 50

The cross-sectional area of the marginal zone (Fig. 3) in the HCD group increased by 46% compared to the control. In case of the cross-sectional area of the marginal zone different regimes of melatonin administration affected obese rats differently: the morning regime (HCD ZT01 group) did not cause any rise in this parameter, but it is still decreased by 47% in comparison with the control. However, the evening regime of melatonin administration induced an increase of the cross-sectional area of the marginal zone by 66% compared with HCD and did not significantly differ from the control. Like in the case with the cross-sectional area of germinal centers, the morning regime of melatonin administration affected the cross-sectional area of the marginal zone in rats with a standard diet (group M ZT01) increasing it by 63% compared to the control. Evening melatonin administration regimes did not affect the cross-sectional area of the marginal zone in rats consuming a standard diet.

The marginal zone/germinal centers ratio parameter (Fig. 3) demonstrates interrelation between the different zones of lymphoid follicles and changes in a mixed population with T-, B- lymphocytes and macrophages. The

marginal zone/germinal centers ratio in the HCD group increased 2.3-fold compared to the control. The morning regime of melatonin administration in obese rats decreased the marginal zone/germinal centers ratio by 67% compared with the HCD group and reached control level. While the marginal zone/germinal centers ratio in the HCD ZT11 group has an intermediate value: its level did not significantly differ from both control and the HCD group. Also, morning and evening melatonin regimes did not affect the marginal zone/germinal centers ratio in rats consuming a standard diet (groups M ZT01 and M ZT11). There was no observed significant difference in the marginal zone/germinal centers ratio between morning and evening regimes of melatonin administration in the HCD ZT11 and HCD ZT01 groups.

Taking into account the results of morphological observations and morphometric analysis, melatonin was shown to have the corrective effect on the spleen histophysiology during obesity development without any negative influence on the spleen of rats consuming a standard diet.

The potential mechanisms of melatonin action on amelioration spleen function during obesity development are

reduction of oxidative stress and activation of splenocyte proliferation [21]. Lymphocyte proliferation can be transduced through membrane melatonin receptors Mel1b, Mel1c, and nucleus receptors ROR α /ROR γ for T-lymphocyte; and through membrane melatonin receptors Mel1a, Mel1c, and ROR α B-lymphocyte proliferation [29]. In Alloxan-model of diabetes it was shown that melatonin (melatonin treatment intraperitoneally at a dose of 10mg/kg⁻¹ per day for 15 days) inhibited the production of proinflammatory cytokines (serum IL-1 β) and tissue mast cell accumulation in the spleen, thymus, and lymph node [18]. Also melatonin induces M2 polarization of macrophages through STAT3 pathway [30].

Conclusions

Daily administration of exogenous melatonin (30 mg/kg for 7 weeks) in different regimes improves the morpho-functional state of the spleen during high-calorie diet-induced obesity that manifested in decreased swelling of the parenchyma and hyperemic blood vessels in the red pulp, reorganization of the different zones of white pulp. This effect develops without any pathological influence on the spleen of rats that consumed a standard diet. It is shown that the morning administration of melatonin induced the cross-sectional area of the germinal center and the marginal zone/germinal centers ratio were restored back to the control values; while evening administration induced changes of the cross-sectional area of the marginal zone, the cross-sectional area of the germinal center, and the relative amount of the white pulp as compared with obese rats.

Reference

1. Abd-Elhakim YM, Hashem MMM, Abo-El-Sooud K, et al. Involvement of tumor necrosis factor- α , interferon gamma- γ , and interleukins 1 β , 6, and 10 in immunosuppression due to long-term exposure to five common food preservatives in rats. *Gene*. 2020;742:144590. doi:10.1016/j.gene.2020.144590
2. Barrea L, Di Somma C, Muscogiuri G, et al. Nutrition, inflammation and liver-spleen axis. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018;58(18):3141-3158. doi:10.1080/10408398.2017.1353479
3. Buchan L, St Aubin CR, Fisher AL, et al. High-fat, high-sugar diet induces splenomegaly that is ameliorated with exercise and genistein treatment. *BMC Res Notes*. 2018;11(1):752. Published 2018 Oct 22. doi:10.1186/s13104-018-3862-z
4. Cho JH, Bhutani S, Kim CH, Irwin MR. Anti-inflammatory effects of melatonin: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Brain Behav Immun*. 2021;93:245-253. doi:10.1016/j.bbi.2021.01.034
5. El-Aziz A, Naguib M, Rashed LA. Spleen size in patients with metabolic syndrome and its relation to metabolic and inflammatory parameters. *The Egyptian Journal of Internal Medicine*. 2018;30(2): 78-82. DOI: 10.4103/ejim.ejim_86_17
6. Ferlazzo N, Andolina G, Cannata A, et al. Is Melatonin the Cornucopia of the 21st Century?. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(11):1088. Published 2020 Nov 5. doi:10.3390/antiox9111088
7. Foley HM, Steel AE. Adverse events associated with oral administration of melatonin: A critical systematic review of clinical evidence. *Complement Ther Med*. 2019;42:65-81. doi:10.1016/j.ctim.2018.11.003
8. Gotoh K, Inoue M, Masaki T, et al. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced inflammation in white adipose tissue and liver. *Diabetes*. 2012;61(8):1994-2003. doi:10.2337/db11-1688
9. Gotoh K, Inoue M, Shiraishi K, et al. Spleen-derived interleukin-10 downregulates the severity of high-fat diet-induced non-alcoholic fatty pancreas disease. *PLoS One*. 2012;7(12):e53154. doi:10.1371/journal.pone.0053154
10. Halenova T, Raksha N, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L, Prylutsky Y, et al. Effect of C60 fullerene nanoparticles on the diet-induced obesity in rats. *International Journal of Obesity*. 2018; 42:1987–1998. doi: 10.1038/s41366-018-0016-2.
11. Heinke S, Ludwig B, Schubert U, et al. Diabetes induction by total pancreatectomy in minipigs with simultaneous splenectomy: a feasible approach for advanced diabetes research. *Xenotransplantation*. 2016;23(5): 405-413. doi:10.1111/xen.12255
12. Jha AK, Bhagwat S, Dayal VM, Suchismita A. Torsion of spleen and portal hypertension: Pathophysiology and clinical implications. *World J Hepatol*. 2021;13(7):774-780. doi:10.4254/wjh.v13.i7.774
13. Lamas O, Martínez JA, Martí A. Decreased splenic mRNA expression levels of TNF- α and IL-6 in diet-induced obese animals. *J Physiol Biochem*. 2004;60(4):279-283. doi:10.1007/BF03167074
14. Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. Structure and function of the immune system in the spleen. *Scimmunol*. 2019;4(33):eaa06085. doi:10.1126/sciimmunol.aau6085
15. Li Q, Wang Q, Xu W, et al. C-Reactive Protein Causes Adult-Onset Obesity Through Chronic Inflammatory Mechanism. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:18. Published 2020 Feb 20. doi:10.3389/fcell.2020.00018
16. Lori A, Perrotta M, Lembo G, Carnevale D. The Spleen: A Hub Connecting Nervous and Immune Systems in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6):1216. Published 2017 Jun 7. doi:10.3390/ijms18061216
17. Macia L, Delacre M, Abboud G, et al. Impairment of dendritic cell functionality and steady-state number in obese mice. *J Immunol*. 2006;177(9):5997-6006. doi:10.4049/jimmunol.177.9.5997
18. Ozkanlar S, Kara A, Sengul E, Simsek N, Karadeniz A, Kurt N. Melatonin Modulates the Immune System Response and Inflammation in Diabetic Rats Experimentally-Induced by Alloxan. *Horm Metab Res*. 2016;48(2): 137-144. doi:10.1055/s-0035-1548937
19. Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, et al. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol*. 2008;85(3):335-353. doi:10.1016/j.pneurobio.2008.04.001
20. de Souza TA, de Souza DW, Siqueira BS, Rentz T, de Oliveira Emilio HR, Grassioli S. Splenic participation in glycemic homeostasis in obese and non-obese male rats. *Obes Res Clin Pract*. 2020;14(5):479-486. doi:10.1016/j.orcp.2020.07.009
21. Sutradhar S, Deb A, Singh SS. Melatonin attenuates diabetes-induced oxidative stress in spleen and suppression of splenocyte proliferation in laboratory mice. *Arch Physiol Biochem*. 2022;128(5):1401-1412. doi:10.1080/13813455.2020.1773506
22. Switzer KC, McMurray DN, Chapkin RS. Effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on T-cell membrane composition and function. *Lipids*. 2004;39(12):1163-1170. doi:10.1007/s11745-004-1343-y
23. Szweczyk-Golec K, Woźniak A, Reiter RJ. Inter-relationships of the chronobiotic, melatonin, with leptin and adiponectin: implications for obesity. *J Pineal Res*. 2015; 59(3):277-91. doi:10.1111/jpi.12257
24. Tarantino G, Savastano S, Capone D, Colao A. Spleen: A new role for an old player?. *World J Gastroenterol*. 2011;17(33):3776-3784. doi:10.3748/wjg.v17.i33.3776
25. Tarantino G, Scalera A, Finelli C. Liver-spleen axis: intersection between immunity, infections and metabolism. *World J Gastroenterol*. 2013;19(23):3534-3542. doi:10.3748/wjg.v19.i23.3534
26. Tarantino G, Citro V, Conforti P, Balsano C, Capone D. Is There a Link between Basal Metabolic Rate, Spleen Volume and Hepatic Growth Factor Levels in Patients with Obesity-Related NAFLD?. *J Clin Med*. 2019;8(10):1510. Published 2019 Sep 20. doi:10.3390/jcm8101510
27. Tarantino G, Citro V, Balsano C. Liver-spleen axis in nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021;15(7):759-769. doi:10.1080/17474124.2021.1914587
28. Winer DA, Winer S, Shen L, et al. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med*. 2011;17(5):610-617. doi:10.1038/nm.2353
29. Xiong J, Wang Z, Cao J, Dong Y, Chen Y. Melatonin mediates monochromatic light-induced proliferation of T/B lymphocytes in the spleen via the membrane receptor or nuclear receptor. *Poult Sci*. 2020;99(9):4294-4302. doi:10.1016/j.psj.2020.06.008
30. Yi WJ, Kim TS. Melatonin protects mice against stress-induced inflammation through enhancement of M2 macrophage polarization. *International Immunopharmacology*. 2017;48:146-158. doi:10.1016/j.intimp.2017.05.006

Надійшла до редколегії 29.08.2022

Отримано виправлений варіант 03.10.2022

Підписано до друку 03.10.2022

Received in the editorial 29.08.2022

Received version on 03.10.2022

Signed in the press on 03.10.2022

О. Калмикова, канд. біол. наук,
Г. Шеметова, студ.,
Н. Скрипник, канд. біол. наук,
О. Савчук, д-р біол. наук,
М. Дзержинський, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

МЕЛАТОНІН ПОКРАЩУЄ ГІСТОФІЗІОЛОГІЮ СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ З ІНДУКОВАНИМ ОЖИРІННЯМ: ХРОНОТЕРАПЕВТИЧНИЙ ПІДХІД

Однією з ознак ожиріння є розвиток системного прозапального стану низького рівня в усьому організмі, включаючи органи імунної системи. Збільшення селезінки при ожирінні, спричиненому споживанням висококалорійної дієти, сприяє розвитку хронічного запалення. Мелатонін завдяки імуномодуючій, антиоксидантній та метаболічній функціям вважається ефективним кандидатом для терапії ожиріння. Оскільки імунна система демонструє виражену циркадну ритмічність, а імунні клітини мають різні типи рецепторів мелатоніну, то хронотерапевтичний підхід може бути використаний при виборі найбільш ефективних режимів введення мелатоніну для корекції пошкодження селезінки, спровокованого ожирінням. Отже, основною метою нашого дослідження був аналіз гістофізіології селезінки щурів під час розвитку ожиріння, спричиненого споживанням висококалорійної дієти (HCD) після різного часу (вранці або ввечері) щоденного введення мелатоніну. Мелатонін вводили через зонд протягом 7 тижнів у дозі 30 мг/кг за 1 годину до вимкнення світла (HCD ZT11, M ZT11, вечір) або через 1 годину після включення світла (HCD ZT01, M ZT01, ранок). Для оцінювання морфофункціонального стану селезінки використовували патогістологічне дослідження червоної, білої пульпи та різних зон лімфоїдних фолікулів. Розвиток ожиріння супроводжувався гіперемією і розширенням судин червоної пульпи; при цьому в білій пульпі зазначали помітну деформацію зародкових центрів і зруйновані межі між зонами лімфоїдних фолікулів. Група HCD демонструє зменшення відносної кількості білої пульпи, площі поперечного перерізу зародкових центрів і площі поперечного перерізу крайової зони при підвищенні відносної кількості червоної пульпи та співвідношення крайової зони / зародкових центрів порівняно з контролем. Введення мелатоніну щурам з ожирінням збільшує відносну кількість білої пульпи (група HCD ZT11), площу поперечного перерізу зародкових центрів (групи HCD ZT01 і HCD ZT11), площу поперечного перерізу крайової зони (група HCD ZT11) і зменшує співвідношення маргінальної зони / зародкових центрів (група HCD ZT01) порівняно із групою HCD. Також лікування мелатоніном вранці або ввечері не вплинуло на гістофізіологію селезінки щурів, які споживали стандартну дієту (групи M ZT01 та M ZT11). Ці результати показали, що мелатонін можна розглядати як потужний потенційний терапевтичний засіб для відновлення змін селезінки, спричинених ожирінням.

Ключові слова: хронобіологія, індуковане висококалорійною дієтою ожиріння, біла пульпа, червона пульпа, гермінативні центри, крайова зона.

Наукове видання



ВІСНИК
КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

БІОЛОГІЯ

Випуск 3 (90)

Редактор *Н. Земляна*

Оригінал-макет виготовлено ВПЦ "Київський університет"

Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, статистичних даних, відповідної галузевої термінології, імен власних та інших відомостей. Редколегія залишає за собою право скорочувати та редагувати подані матеріали.



Формат 60x84^{1/8}. Ум. друк. арк. 4,65. Наклад 300. Зам. № 222-10521.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 3.
Підписано до друку 27.10.22

Видавець і виготовлювач
ВПЦ "Київський університет"

Б-р Тараса Шевченка, 14, м. Київ, 01601, Україна
☎ (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 72; тел./факс (38044) 239 31 28
e-mail: vpc_div.chief@univ.net.ua; redaktor@univ.net.ua
http: vpc.univ.kiev.ua

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02