

© 2024 by the author(s).

This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



How to cite / Як цитувати статтю: Selskyi P, Televiak A, Lutsyk V, Franchuk V, Sverstiuk A, Voloshyn V, Furdela M. Prognosis of limb muscular structural disorders after tourniquet application based on the changes in lipid peroxidation indicators using neural network clustering. *East Ukr Med J.* 2024;12(3):522-532

DOI: [https://doi.org/10.21272/eumj.2024;12\(3\):522-532](https://doi.org/10.21272/eumj.2024;12(3):522-532)

ABSTRACT

Petro Selskyi

<https://orcid.org/0000-0001-9778-2499>

Department of Pathology with Autopsy Course and Forensic Medicine, Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil, Ukraine

Anatolii Televiak

<https://orcid.org/0000-0001-7173-400X>

Department of Anatomy, Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil, Ukraine

Vitalii Lutsyk

<https://orcid.org/0009-0001-9372-5822>

Department of Pathology with Autopsy Course and Forensic Medicine, Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil, Ukraine

Valentyn Franchuk

<https://orcid.org/0000-0001-8484-8049>

Department of Pathology with Autopsy Course and Forensic Medicine, Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil, Ukraine

Andriy Sverstiuk

<https://orcid.org/0000-0001-8644-0776>

Department of Medical Informatics,

PROGNOSIS OF LIMB MUSCULAR STRUCTURAL DISORDERS AFTER TOURNIQUET APPLICATION BASED ON THE CHANGES IN LIPID PEROXIDATION INDICATORS USING NEURAL NETWORK CLUSTERING

Acute ischemia can cause a sudden decrease in limb perfusion, threatening its viability. The restoration of blood supply causes complex damage to previously ischemic tissues as well as to the tissues distant from the area of ischemia, which is defined as ischemia-reperfusion injury. This condition gets significantly worse under conditions of acute blood loss. The development of new approaches for the prognosis of morphological changes in the soft tissues of the limbs and further clinical research on their correction is also relevant for civilian and military medicine, especially in martial law conditions.

The objective of the study was to establish an association between the degree of structural changes in the rat hind-limb skeletal muscles and systemic changes in the indicators of lipid peroxidation and antioxidant defense in ischemia-reperfusion injury against the background of acute blood loss to make prognosis for morphological disorders using neural network clustering.

Materials and Methods. We carried out a histological and morphometric study of skeletal muscles and measured the parameters of lipid peroxidation (content of diene conjugates, triene conjugates, TBA-reactive substances) and antioxidant defense (superoxide dismutase and catalase activity) in blood serum of 30 mature white male rats. Simulation of acute ischemia was performed by applying SWAT rubber tourniquets 5–6 mm wide on the hind limbs of rats at the level of the inguinal fold for 2 hours under thiopental sodium anesthesia. Reperfusion was induced by restoring blood circulation in the limbs of the animals after removing the tourniquet. Acute blood loss was simulated by transection of the femoral vein.

To analyze the relationship between the identified structural

Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil, Ukraine

Volodymyr Voloshyn

<https://orcid.org/0000-0002-6514-3120>

Department of Pathology with Autopsy Course and Forensic Medicine, Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil, Ukraine

Mykhailo Furdela

<https://orcid.org/0000-0002-6816-8614>

Department of Pathology with Autopsy Course and Forensic Medicine, Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil, Ukraine

disorders of the hind limbs skeletal muscles and the changes in the lipid peroxidation (LPO) and antioxidant defense (AOD) indicators, as well as to predict the progression of morphological changes during the ischemia-reperfusion injury, a neural network approach was used using the NeuroXL Classifier add-on for Microsoft Excel.

Results and Discussion. In the early reperfusion period under conditions of acute blood loss, structural remodeling was manifested by edema and dystrophic-degenerative changes in skeletal muscles, with the most pronounced changes on the first day (Group III). The average diameter of the muscle fiber ($(43.66 \pm 0.60) \mu\text{m}$) in this period exceeded the corresponding indicator ($(40.63 \pm 0.24) \mu\text{m}$) of the control group by 6.94% ($p < 0.01$), while the similar indicator of Group II ($(41.97 \pm 0.25) \mu\text{m}$) – by 3.87% ($p < 0.05$). In the late reperfusion period, the remodeling of structural components of skeletal muscles was manifested as a slowing down of acute manifestations with an incomplete return to the baseline values.

We established an increase in the blood serum content of LPO products in all experimental groups in the early reperfusion period. This study confirmed the development of ischemia-reperfusion injury with activation of lipid peroxidation and a decrease in antioxidant defense in experimental animals. Thus, the diene conjugates (DC) content was the highest in the third experimental group (the first day of reperfusion), exceeding the indicator of the intact animals by 51.06% ($p > 0.05$). The triene conjugates (TC) content also reached its maximum during this period, exceeding the control level by 1.61 times ($p < 0.01$). One day later, the highest level of the TBA-reactive substances (TBA-RS) was observed. During the late postischemic period (Day 7 and Day 14), a gradual normalization of indicators was observed; however, the content of TBA-RS was still significantly higher than that of the control group on the 14th day ($p < 0.005$).

In all studied groups, there was a decrease in the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase. Blood serum catalase activity was observed at its lowest level after three days of reperfusion, exceeding the control values by 65.76% ($p < 0.005$), while SOD content kept decreasing on Day 7 and Day 14. We observed a significant dynamic decrease of PAI in the blood serum of rats in all studied groups in the early reperfusion period ($p < 0.005$) with a gradual increase of this indicator in the late reperfusion period, which, however, did not return to the control values ($p < 0.005$).

When predicting the development of morphological disorders in the early reperfusion period based on the results of the analysis of cluster profiles obtained due to the neural network clustering of blood serum LPO and AOD values in white rats and the morphological disorder severity in different periods of ischemia-reperfusion injury under conditions of acute blood loss, we observed the greatest significance of the combined changes in DC, TC, TBA-RS content and SOD and catalase activity, with the most significant changes being in TBA-RS and catalase values.

Conclusions. Ischemic-reperfusion injury against the background of acute blood loss was manifested by edema and dystrophic-degenerative changes in skeletal muscles during the period of ischemia and in the first hours after the restoration of blood circulation. This indicates an increased load on the organs of the homeostasis system and the systemic nature of the injury.

When predicting the development of morphological disorders in the early reperfusion period based on the results of the analysis of cluster profiles obtained due to the neural network clustering of blood serum LPO and AOD values in white rats and the morphological disorder severity in different periods of ischemia-reperfusion injury under conditions of acute blood loss, we observed the greatest significance of the combined changes in TBA-RS content and catalase activity.

Keywords: acute ischemia, skeletal muscles, ischemia-reperfusion injury, acute blood loss, lipid peroxidation, antioxidant defense, neural network clustering.

Corresponding author: *Анатолій Телев'як, кафедра анатомії людини, Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна.*
 Ел. пошта: televiak@tdmu.edu.ua; тел: +380673500488

РЕЗЮМЕ

Петро Сельський

<https://orcid.org/0000-0001-9778-2499>

Кафедра патологічної анатомії з секційним курсом та судовою медициною, Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна

Анатолій Телев'як

<https://orcid.org/0000-0001-7173-400X>

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

Віталій Луцик

<https://orcid.org/0009-0001-9372-5822>

Кафедра патологічної анатомії з секційним курсом та судовою медициною, Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна

Валентин Франчук

<https://orcid.org/0000-0001-8484-8049>

Кафедра патологічної анатомії з секційним курсом та судовою медициною, Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна

Андрій Сверстюк

<https://orcid.org/0000-0001-8644-0776>

ПРОГНОЗУВАННЯ СТРУКТУРНИХ ПОРУШЕНЬ М'ЯЗІВ КІНЦІВОК ПІСЛЯ НАКЛАДАННЯ ТУРНИКЕТУ НА ОСНОВІ ЗМІН ПОКАЗНИКІВ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ НЕЙРОМЕРЕЖЕВОЇ КЛАСТЕРИЗАЦІЇ

При гострій ішемії виникає раптове зниження перфузії кінцівки, яке створює загрозу її життєздатності. При відновленні кровопостачання виникає комплексне ураження раніше ішемізованих, а також віддалених від місця ішемії тканин, що визначається як ішемічно-реперфузійний синдром. Зазначені порушення суттєво поглиблюються за умов гострої крововтрати. Розробка нових підходів при прогнозуванні морфологічних змін м'язів тканин кінцівок є актуальною для подальших клінічних досліджень стосовно корекції таких порушень у цивільній та військовій медицині, особливо в умовах воєнного стану

Мета дослідження – встановити взаємозв'язок між ступенем структурних змін скелетних м'язів задніх кінцівок щурів і системними змінами показників ліпідної пероксидації та антиоксидантного захисту при ішемії-реперфузії на тлі гострої крововтрати для прогнозування морфологічних порушень із застосуванням нейромережевої кластеризації.

Матеріали і методи. Проведено гістологічне, морфометричне дослідження скелетних м'язів і визначення показників пероксидного окиснення ліпідів (дієнові і трієнові кон'югати, ТБК-активні продукти) та антиоксидантного захисту (активність супероксиддисмутази, каталази) сироватки крові 30 статевозрілих білих щурів-самців. Для моделювання гострої ішемії на задні кінцівки тварин на рівні пахової складки накладали гумові джгути SWAT шириною 5-6 мм упродовж 2 години під тіопентал натрієвим знечуленням. Реперфузію викликали шляхом відновлення кровообігу у кінцівках тварин після зняття турнікету. Моделювання гострої крововтрати здійснювали шляхом пересікання стегнової вени.

Для аналізу взаємозв'язку ступеня виявлених структурних порушень скелетних м'язів задніх кінцівок зі змінами показників ліпідної пероксидації (ПОЛ) та антиоксидантного захисту (АОЗ), а також задля прогнозування прогресування морфологічних змін тканин за розвитку ішемічно-реперфузійного синдрому

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

Володимир Волошин

<https://orcid.org/0000-0002-6514-3120>

Кафедра патологічної анатомії з
секційним курсом та судовою
медициною, Тернопільський
національний медичний університет
імені І.Я. Горбачевського МОЗ
України, Тернопіль, Україна

Михайло Фурдела

<https://orcid.org/0000-0002-6816-8614>

Кафедра патологічної анатомії з
секційним курсом та судовою
медициною, Тернопільський
національний медичний університет
імені І.Я. Горбачевського МОЗ
України, Тернопіль, Україна

застосовано нейромережевий підхід із використанням надбудови NeuroXL Classifier для програми Microsoft Excel.

Результати досліджень та їх обговорення. У ранньому періоді реперфузії за умов гострої крововтрати структурне ремоделювання проявлялося набряком та дистрофічно-дегенеративними змінами у скелетних м'язах із найвиразнішими змінами на першу добу (третя група щурів). Пересічний діаметр м'язового волокна ($(43,66 \pm 0,60)$ мкм) у цей період перевищував відповідний показник ($(40,63 \pm 0,24)$ мкм) контрольної групи на 6,94 % ($p < 0,01$), а аналогічний показник попередньої (другої) групи ($(41,97 \pm 0,25)$ мкм) – на 3,87 % ($p < 0,05$). У пізньому реперфузійному періоді ремоделювання структурних компонентів скелетних м'язів виявлялося у сповільненні гострих проявів із неповним поверненням до вихідного стану.

Встановлено зростання вмісту продуктів ПОЛ у сироватці крові усіх експериментальних груп раннього реперфузійного періоду. Дослідження підтвердило розвиток у піддослідних тварин ішемічно-реперфузійного синдрому з активацією ліпідної пероксидації та зниженням антиоксидантного захисту. Так, показник дієнових кон'югат (ДК) виявлявся найвищим у третій експериментальній групі (перша доба реперфузії), перевищуючи на 51,06 % показник групи інтактних тварин ($p > 0,05$). Рівень трієнових кон'югат (ТК) також досягнув максимального значення у цей період, перевищуючи у 1,61 раза контрольний ($p < 0,01$). Через одну добу мав місце і найвищий рівень показника ТБК-активних продуктів (ТБК-АП). Упродовж пізнього постішемічного періоду (сьома і чотирнадцята доба) спостерігалось поступове повернення показників до контрольних значень, проте вміст ТБК-АП і на чотирнадцяту добу все ще суттєво перевищував показник групи контролю ($p < 0,005$).

В усіх досліджуваних групах мало місце зниження активності супероксиддисмутази (СОД) і каталази. Показник каталазної активності сироватки крові спостерігався на найнижчому рівні через три доби реперфузії, перевищуючи контрольний на 65,76 % ($p < 0,005$), а показник рівень СОД знижувався й упродовж сьомої та чотирнадцятої діб. Спостерігалось і динамічне зниження АПІ в сироватці крові щурів усіх досліджуваних груп раннього реперфузійного періоду ($p < 0,005$) з поступовим підвищенням зазначеного показника упродовж пізнього періоду реперфузії, який все ж не повернувся до рівня контрольних значень ($p < 0,005$).

При прогнозуванні розвитку морфологічних порушень у ранньому реперфузійному періоді за результатами аналізу кластерних портретів при проведенні нейромережевої кластеризації показників ПОЛ та АОЗ сироватки крові білих щурів і показника вираженості морфологічних порушень у різні періоди ішемії-реперфузії за умов гострої крововтрати встановлено найсуттєвіше значення поєднаних змін рівнів ДК, ТК, ТБК-АП та СОД і каталази, серед яких найістотнішими є зміни рівнів ТБК-активних продуктів та каталази.

Висновки. Ішемічно-реперфузійне ураження за умов гострої крововтрати виявлялося набряком і дистрофічно-дегенеративними змінами скелетних м'язів, а також значними змінами показників пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту сироватки крові вже у перші години після відновлення кровообігу

із найбільшою вираженістю на першу добу, що свідчить про посилене навантаження на органи системи гомеостазу та на системність уражень.

При прогнозуванні розвитку морфологічних порушень у ранньому реперфузійному періоді за результатами аналізу кластерних портретів при проведенні нейромережевої кластеризації показників ПОЛ та АОЗ сироватки крові білих щурів і показника вираженості морфологічних порушень у різні періоди ішемії-реперфузії за умов гострої крововтрати встановлено найвагоміше значення поєднаних змін рівнів ТБК-активних продуктів та каталази.

Ключові слова: гостра ішемія, скелетні м'язи, ішемічно-реперфузійний синдром, гостра крововтрата, пероксидне окиснення ліпідів, антиоксидантний захист, нейромережева кластеризація.

Автор, відповідальний за листування: *Анатолій Телев'як, кафедра анатомії людини, Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна.*
 Ел. пошта: televiak@tdmu.edu.ua; тел: +380673500488

ABBREVIATIONS / УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ

AOD – antioxidant defense
 PAI – prooxidant/antioxidant index
 DC – diene conjugates
 LPO – lipid peroxidation
 SOD – superoxide dismutase
 TBA-RS – TBA-reactive substances
 TC – triene conjugates

INTRODUCTION / ВСТУП

Acute ischemia can cause a sudden decrease in limb perfusion, which poses a threat to its viability. This condition develops due to obstruction of the large arterial lumen as a result of acute thrombosis, embolism, and impaired vascular patency due to injuries or compression, in particular, in conditions of a compartment syndrome, which is one of the most common types of injuries in military and civilian medicine [1, 2]. At the same time, the restoration of blood supply causes complex damage to previously ischemic tissues as well as to the tissues distant from the area of ischemia, which is defined as ischemia-reperfusion injury [2, 3, 4]. This condition gets significantly worse under conditions of acute blood loss [5].

The role of lipid peroxidation (LPO) activation in the pathogenesis of ischemia-reperfusion injury has been studied in many studies [6, 3], but LPO progression and antioxidant defense (AOD) response under conditions of acute blood loss in different periods of ischemia-reperfusion injury remain insufficiently studied. It is particularly relevant to introduce the latest information methods for a comprehensive comparative analysis of tissue structural changes and disorders in the

lipid peroxidation system to predict morphological disorders of the soft tissues of the limbs [7, 8, 3, 9, 10]. The development of new approaches for the prognosis of such conditions and further clinical research on their correction is also relevant for civilian and military medicine, especially in martial law conditions.

The objective of the study was to establish an association between the degree of structural changes in the rat hind-limb skeletal muscles and systemic changes in the indicators of lipid peroxidation and antioxidant defense in ischemia-reperfusion injury against the background of acute blood loss in order to make prognosis for morphological disorders using neural network clustering.

Materials and Methods. The study was carried out on 30 non-linear sexually mature white rats. Morphological changes in the rat hind-limb skeletal muscles were studied, and the content of diene conjugates (DC), triene conjugates (TC), TBA-reactive substances (TBA-RS), superoxide dismutase (SOD), and catalase was determined in blood serum in experimental ischemia-reperfusion injury under conditions of acute blood loss. Simulation of acute ischemia was performed by placing SWAT rubber tourniquets 5–6 mm wide on the hind limbs of rats at

the level of the inguinal fold under thiopental sodium anesthesia, while reperfusion was simulated by removing the tourniquet 2 hours after its application. Acute blood loss was simulated by transection of the femoral vein. After blood loss reached ~ 25% of circulating blood volume (CBV), hemostasis was maintained in the animals. CBV was calculated according to the generally accepted formula: 7.8% of the total weight of the rat [6].

All experimental animals were divided into 6 study groups of 5 rats each. The control group consisted of 5 intact animals. Group I included animals with ischemic changes after 2 hours without reperfusion. The model of the early postischemic period was represented by groups of rats with reperfusion changes: 2 hours (Group II), 1 day (Group III), and 3 days (Group IV) after removing the tourniquet, while the model of the late postischemic period – 7 days (Group V) and 14 days (Group VI) after removing the tourniquet. Animals were sacrificed by decapitation under sodium thiopental anesthesia.

Tissues for morphological examination were taken below the tourniquet application site, including the superficial layers of the quadriceps muscle of the rat hind limb in the middle third of the thigh. Histological sections were stained with hematoxylin and eosin, and Van Gieson staining and Masson's trichrome staining were used. Specimens were studied using a Bresser Trino Researcher 40x-100x microscope and a MICROmedSEO SCAN laboratory microscope with a camera and a polarizing nozzle. At the same time, the most demonstrative histological specimens were photographed with a Digital Camera for Microscope Science Lab DCM 820 Resolution 8.0 Mp. During the morphometric study of the muscles, the diameter of the muscle fiber was measured. The specified parameters were calculated using SEO Image Lab image processing and analysis software of the company "Sumy Electron Optics."

To study LPO and AOD, blood was obtained from the apex of the heart by cardiomy. Blood serum was isolated by centrifugation for 15 minutes at 3000 rpm with subsequent cooling. DC, TC, TBA-RS content, SOD and catalase activity were measured in each experimental group according to generally accepted methods [11]. The essence of measuring the content of DC and TC is that the hydroperoxides extracted with a heptane-isopropyl mixture give the maximum absorption of a light wave with a length of 232 nm. TBA-RS concentration was measured using the following principle: at high temperatures in an acidic environment, malondialdehyde reacts with thiobarbituric acid, generating a colored adduct with an absorption maximum at 532 nm. At the same time, the concentration of TBA-RS is proportional to the intensity of the resulting color and is determined using a

photometer. Superoxide dismutase activity was measured using a method based on the enzyme's ability to inhibit the reduction of nitro-tetrazolium blue; catalase activity was measured using the ability of hydrogen peroxide to form a stable complex with ammonium molybdate, and the color intensity of it is inversely proportional to catalase activity in the studied substrate. We also analyzed the changes in the prooxidant/antioxidant index (PAI), which reflected the balance between prooxidant and antioxidant mechanisms and was an indicator of antioxidant defense (AOD). PAI was calculated using the formula: $PAI = \text{catalase activity} / \text{content of TBA-reactive substances}$ [12].

The study was conducted at the Central Research Laboratory of Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine.

The Microsoft Excel (2010) program package was used for statistical data processing. Normal distribution verification for the studied indicators was done using the Kolmogorov-Smirnov test. Under the conditions of normal distribution, the statistical significance of the difference between the arithmetic means was determined by the Student-Fisher test (t). In the case of non-normal distribution in odd groups, the statistical significance of the obtained results was determined using the Mann-Whitney (U) test.

To analyze the relationship between the identified morphological disorders of the hind limbs skeletal muscles and the changes in the lipid peroxidation (LPO) and antioxidant defense indicators, as well as to predict the progression of structural changes during the ischemia-reperfusion injury, a neural network approach was used using the NeuroXL Classifier add-on for Microsoft Excel, which made it possible to carry out a high-precision classification, to determine the associations and trends, and to establish the value of combined changes in these indicators [9, 13, 14].

Results and Discussion. Structural remodeling in the early reperfusion period was characterized by edema, dystrophic-degenerative, and necrotic changes in skeletal muscles and fibrous structures with an inflammatory response to ischemia-reperfusion injury under conditions of acute blood loss. The average index of the muscle fiber cross-section performed 2 hours after the restoration of perfusion ($41.97 \pm 0.25 \mu\text{m}$) exceeded the indicator in Group I by 2.05% ($p < 0.05$) and the indicator in the control group by 3.19% ($p < 0.05$). Edema of muscle tissue, especially of the perimysium, was most pronounced in Group III on Day 1 of reperfusion. At the same time, necrotic changes in muscle fibers were detected, while hemorrhagic foci and small round cell infiltrates were visualized in the stroma (Fig. 1).

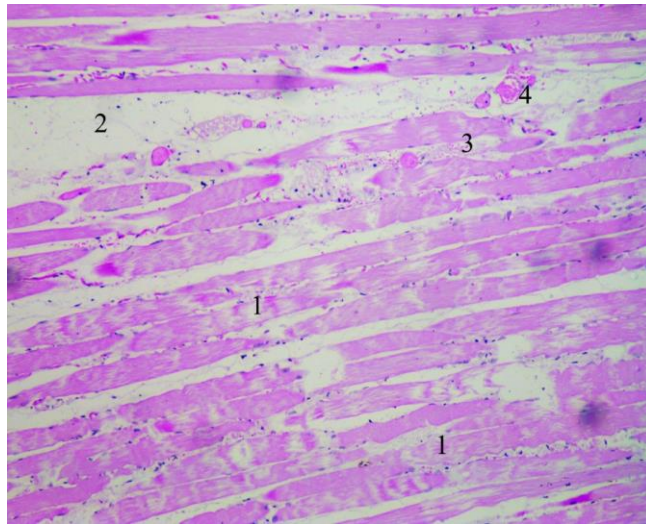


Figure 1 – Femoral muscle of the hind limb of a rat on Day 1 after restoration of blood supply Hematoxylin and eosin staining. $\times 100$

Figure legend: 1 – necrotic area; 2 – edema; 3 – hemorrhage and stroma infiltration; 4 – expanded venule lumen

The average diameter of muscle fibers (43.66 ± 0.60 μm) in Group III was significantly (by 3.87%) higher than the corresponding indicator of Group II ($p < 0.05$) and by 6.94% higher than the indicator of the control group ($p < 0.05$). Later, the indicator of the average diameter of the fibers decreased but still exceeded the indicator of the control group by 4.08% ($p < 0.01$).

In animals of Groups V and VI, which represented the model of the late period of ischemia-reperfusion injury, there was a decrease in acute signs of reperfusion injury

of skeletal muscles and a partial restoration of their structure. On Day 7, Group V still had the average diameter of muscle fibers by 2.33% higher than the control group ($p < 0.05$), while on Day 14, there was no longer a statistically significant difference in this indicator in comparison with rats of the control group. Perivascular proliferation of collagen fibers was observed in skeletal muscle specimens in this period. Perivascular hemorrhages and dystrophic changes in skeletal muscle fibers were detected only in some areas (Fig. 2).

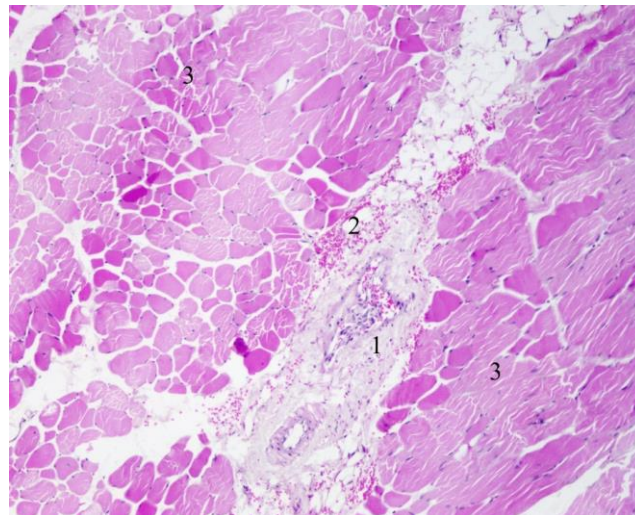


Figure 2 – Femoral muscle of the hind limb of a rat on Day 7 of reperfusion. Hematoxylin and eosin staining. $\times 100$

Figure legend: 1 – proliferation of collagen fibers around microvessels; 2 – a site of perivascular hemorrhage; 3 – necrosis of muscle fibers

In all studied groups, a comparative analysis was carried out for the content of LPO and AOD products in blood serum, namely: diene and triene conjugates (DC

and TC), TBA-reactive substances (TBA-RS), catalase, and superoxide dismutase (SOD). The obtained results are shown in Table 1.

Table 1 – POL and AOD content in blood serum of white rats in different periods of ischemic-reperfusion injury under conditions of simulated acute blood loss (M ± m)

Parameter	Control group	Group 1 no reperfusion	Group 2 reperfusion 2 h	Group 3 reperfusion Day 1	Group 4 reperfusion Day 3	Group 5 reperfusion Day 7	Group 6 reperfusion Day 14
DC, IU/mL	0.46 ± 0.08	0.55 ± 0.07	0.69 ± 0.08*	0.94 ± 0.09 *,***	0.89 ± 0.10 *	0.62 ± 0.08 ***	0.53 ± 0.06
TC, IU/mL	0.43 ± 0.05	0.64 ± 0.08*	0.81 ± 0.09*	1.03 ± 0.12 **	1.01 ± 0.12 **	0.74 ± 0.10 *	0.58 ± 0.10
TBA-RS, mM/L	5.30 ± 0.33	7.47 ± 0.49*	10.50 ± 0.46 ****,*****	18.30 ± 0.39 ****,*****	17.48 ± 0.31 **,*****	15.82 ± 0.46 **,*****	11.06 ± 0.44 **,*****
SOD, IU/L	44.26 ± 1.27	41.52 ± 2.03	34.47 ± 1.60 **,***	30.48 ± 1.22 **	30.44 ± 1.56 **	29.01 ± 1.58 **	26.5 ± 1.32 **
Catalase, kat/L	39.78 ± 1.20	33.40 ± 1.26*	30.13 ± 1.26 **	14.32 ± 0.72 ****,*****	13.62 ± 0.70 *****	17.58 ± 0.62 **,*****	17.14 ± 0.78 *****

Note 1. * – p<0.05 vs. the control group;

Note 2. ** – p<0.01 vs. the control group;

Note 3. *** – p<0.05 vs. the preceding group;

Note 4. **** – p<0.01 vs. the preceding group;

Note 5. ***** – p<0.005 vs. the control group.

In Group II of rats with a reperfusion time at 2 hours, a significant increase in blood serum DC content was observed vs. the control group (by 33.33%; p<0.05). In Group III, the DC indicator reached the highest value and was 26.60% higher vs. Group II (p<0.05) and 51.06% higher vs. the control group (p>0.05). After 3 days from the moment of reperfusion, the DC content slightly decreased, being by 48.31% higher than that of the control group (p<0.05). On the 7th and 14th days, the DC content continued to decrease. Although it still slightly exceeded the indicator of the control group, the difference was not statistically significant (p>0.05).

Blood serum TC content increased in Groups I and II and reached its maximum in Group III with a reperfusion period of 1 day; thus, the latter was 21.36% higher vs. Group II (p>0.05) and 61.0% higher vs. the control group (p<0.01). Further, the TC content decreased; on the 7th day, it was only 26.09% higher than that in the control group (p<0.05).

A statistically significant increase in blood serum content of TBA-RS was revealed in all studied groups compared to the control group (p<0.005). Moreover, this indicator reached its highest value after 1 day of reperfusion, being higher than the similar indicator of Group II by 42.62% (p<0.01). Subsequently, the content of TBA-RS gradually decreased and reached its minimum on the 14th day after the tourniquet was removed. At the same time, this indicator remained significantly higher (by 52.08%) vs. controls (p<0.005).

SOD activity gradually decreased in all experimental

groups in both early and late reperfusion periods, reaching its minimum in rats with a reperfusion period of 14 days. At the same time, the SOD indicator was 40.05% lower vs. the control group (p<0.01).

Changes in the level of catalase activity were largely similar to those of SOD. Catalase activity reached the lowest value in the group of animals with 3-day reperfusion, being statistically significantly lower vs. the control group (by 65.76%; p<0.005). In subsequent periods, an increase in the activity of this enzyme was noted, but even after 14 days of reperfusion, the catalase activity was 58.91% lower compared to the controls (p<0.005).

In this experiment, a significant decrease in the PAI values was found in the blood serum in all experimental groups. In 1-day reperfusion group, this indicator (0.78±0.03) was 9.73 times lower than the corresponding indicator of the control group (p<0.005), remaining at approximately the same level as in animals with 3-day reperfusion. The indicator increased in the animals of the late-reperfusion group, but even after 14 days, it remained lower compared to the control indicator (p<0.005).

In order to identify the value of combined changes in certain indicators for predicting the development of ischemia-reperfusion injuries under conditions of acute blood loss, neural network clustering was carried out based on LPO and AOD values in the blood serum of white rats at different times of the early reperfusion period, i. e. DC (1), TC (2), TBA-RS (3), SOD (4), and catalase (5). An additional parameter for clustering was

the severity of structural disorders of muscle tissue in different periods of reperfusion. This indicator, S (6), was determined for each experimental animal of the first subgroup as "1", the second subgroup – as "2", the third subgroup (the most pronounced structural disorders) – as "3", and the fourth subgroup – as "2".

To carry out neural network clustering, we chose the number of clusters equal to three and used the parameters proposed by the program. The results of the program clustering are presented in Figure 3 a, b. At the same time, 50.0% of experimental animals belonged to the first

cluster, 25.0% – to the second cluster, and 25.0% – to the third cluster.

As follows from Figure 3, the severity of structural changes during the development of ischemia-reperfusion injury (S) was the highest in the third cluster (40.0%). At the same time, the third cluster presented the maximum values of DC (25.42 %), TC (21.42 %), and TBA-reactive substances (34.55 %), and the minimum values of catalase (-9.19 %) and SOD (- 13.04%) compared to the corresponding indicators in the first two clusters.

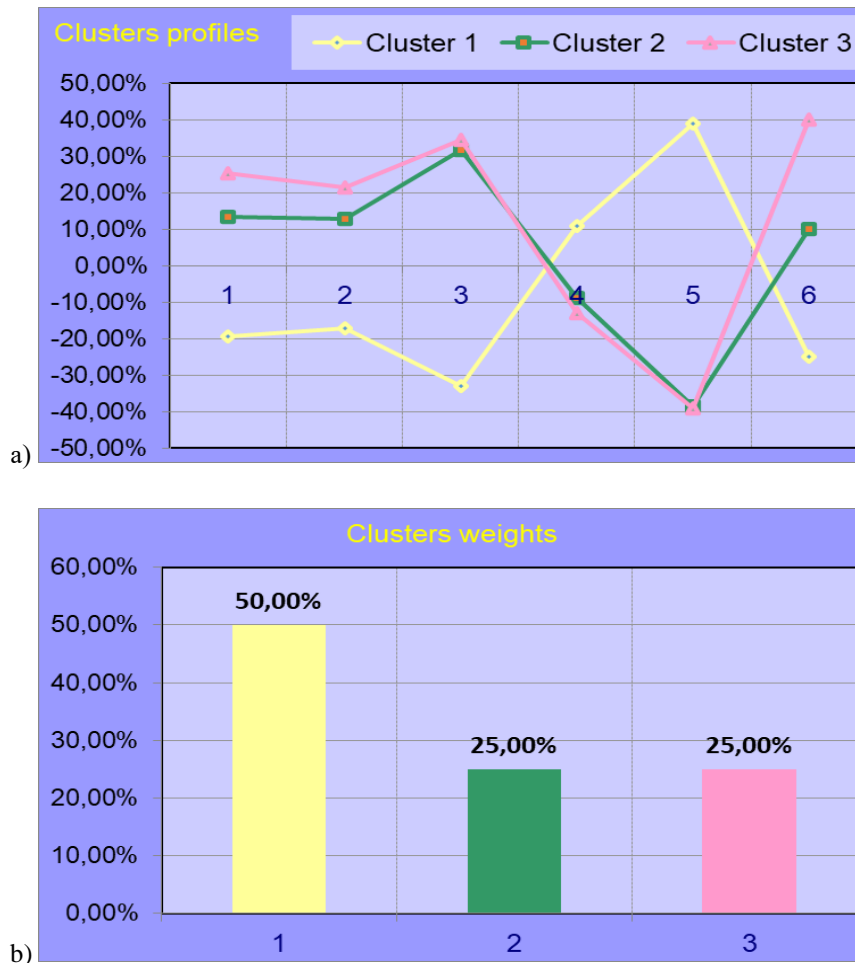


Figure 3 – Results of clustering of blood serum LPO and AOD indicators of white rats in different periods of ischemic-reperfusion injury under conditions of acute blood loss: a) cluster profiles – parameters, including LPO, AOD indicators and morphological changes severity in different periods of reperfusion; b) cluster weights - shares of animals that fell into a certain cluster

CONCLUSIONS / ВИСНОВКИ

Ischemic-reperfusion injury against the background of acute blood loss was manifested by edema and dystrophic-degenerative changes in skeletal muscles during the period of ischemia and in the first hours after the restoration of blood circulation, with the most pronounced disorders on the first day. The average diameter of the muscle fiber ($43.66 \pm 0.60 \mu\text{m}$) in this

period exceeded the corresponding indicator ($40.63 \pm 0.24 \mu\text{m}$) of the control group by 6.94% ($p < 0.01$).

This experimental study confirmed the development of ischemia-reperfusion injury with activation of lipid peroxidation and a decrease in antioxidant defense in experimental animals. Thus, the DC content was the highest in the third experimental group (the first day of

reperfusion), exceeding the indicator of the intact animals by 51.06% ($p>0.05$). The TC content also reached its maximum during this period, exceeding the control level by 1.61 times ($p<0.01$). One day later, the highest level of the TBA-RS was observed. During the late postischemic period (Day 7 and Day 14), a gradual normalization of indicators was observed; however, the content of TBA-RS was still significantly higher than that of the control group on the 14th day ($p<0.005$).

In all studied groups, there was a decrease in the activity of SOD and catalase. Blood serum catalase activity was observed at its lowest level after three days of reperfusion, exceeding the control values by 65.76% ($p<0.005$), while SOD content kept decreasing on Day 7 and Day 14.

Such changes indicated, in our opinion, the reaction of systemic compensatory mechanisms of AOD in response to significant activation of lipid peroxidation. However, under conditions of acute blood loss, full compensation was not observed in the reperfusion period. The above confirms the significant dynamic decrease of

PAI in the blood serum of rats in all studied groups in the early reperfusion period ($p<0.005$) with a gradual increase of this indicator, which, however, did not return to the control values ($p<0.005$).

When predicting the development of morphological disorders in the early reperfusion period based on the results of the analysis of cluster profiles obtained due to the neural network clustering of blood serum LPO and AOD values in white rats and the morphological disorder severity in different periods of ischemia-reperfusion injury under conditions of acute blood loss, we observed the greatest significance of the combined changes in DC, TC, TBA-RS content and SOD and catalase activity, with the most significant changes being in TBA-RS and catalase values.

The study's results can be used in clinical studies on the optimal medical correction of hypovolemic shock and ischemic-reperfusion injury, taking into account the prognosis of structural remodeling of the soft tissues of the limbs in both civilian and military medicine.

PROSPECTS FOR FUTURE RESEARCH / ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Prospects for further research: prognosis of morphological disorders of skeletal muscles after the application of a tourniquet in the conditions of the combined effect of other pathological factors (burn disease, injury of the musculoskeletal system, closed craniocerebral injury).

AUTHOR CONTRIBUTIONS / ВКЛАД АВТОРІВ

All authors substantively contributed to the drafting of the initial and revised versions of this paper. They take full responsibility for the integrity of all aspects of the work.

FUNDING / ДЖЕРЕЛА ФІНАНСУВАННЯ

None.

CONFLICT OF INTEREST / КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES/СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Gubka VO, Konovalenko IA, Suzdalenko OV. Results of treatment of patients with acute arterial ischemia of the extremities. *Patology*. 2015;2(34):55–58. https://www.researchgate.net/publication/283115450_Treatment_results_in_patients_with_acute_limb_ischemia/fulltext/568782a008ae19758398a8df/Treatment-results-in-patients-with-acute-limb-ischemia.pdf
- Khomenko I, Korol S, Korol S., Matviichuk B, Matviichuk B. Clinical and organizational peculiarities of providing trauma care to the patients with soft tissue defects in gunshot and mine blast injuries of the limbs. *Trauma*. 2018;19(5):125–129. <https://doi.org/10.22141/1608-1706.5.19.2018.146655>
- Henyk SM. Reperfusion syndrome after revascularization of lower limb ischemia. *Heart and vessels*. 2016;3:104–108. http://nbuv.gov.ua/UJRN/sis_2016_3_13
- Drew B, Bennett B, Littlejohn L. Application of current hemorrhage control techniques for backcountry care: part one, tourniquets and hemorrhage control adjuncts. *Wilderness and Environmental Medicine*. 2015;26:236–245. <https://doi.org/10.1016/j.wem.2014.08.016>
- Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai APY. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(4):1650–1667. <https://doi.org/10.1159/000489241>
- Horban II. The influence of acute blood loss complicated by limb ischemia-reperfusion on the antioxidant-prooxidant balance of the liver and its correction with carbacetam. *Achievements of Clinical*

- and *Experimental Medicine*. 2020;2:93–100. <https://doi.org/10.11603/1811-2471.2020.v.i2.11320>
7. Vakulenko V, Martseniuk VP, Vakulenko LO, Selskyi PR, Kutakova OV, Gevko OV, Kadobnyj TB. Cardiovascular system adaptability to exercise according to morphological, temporal, spectral and correlation analysis of oscillograms. *Family Medicine & Primary Care Review*. 2019;21(3):253–263. <https://doi.org/10.5114/fmpcr.2019.88385>
 8. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai Y. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol. Biochem*. 2018;46:1650–1667. <https://doi.org/10.1159/000489241>
 9. Du KL. Clustering: A neural network approach. *Neural network*. 2010;23(1):89–107. <https://doi.org/10.1016/j.neunet.2009.08.007>
 10. Selskyi PR, Televiak AT, Veresiuk TO, Selskyi BP, Lutsyk VI. Comparative analysis of morphological disorders and changes of prooxidant-antioxidant system in acute experimental ischemia-reperfusion using neural network clustering. *Medical informatics and engineering*. 2022;1-2:70–76. <https://doi.org/10.11603/mie.1996-1960.2022.1-2.13109>
 11. Kuzminskyi IV. Influence of ischemia-reperfusion syndrome for cytolytic syndrome. *Achievements of clinical and experimental medicine*. 2018;3(35):176–181. <https://doi.org/10.11603/1811-2471.2018.v0.i3.9351>
 12. Merliev DI. Role of morpho-functional changes in the kidneys in the pathogenesis of early manifestations of cranio-skeletal trauma. PhD thesis: Ternopil, 2015:195. https://www.essuir.sumdu.edu.ua/bitstream-download/123456789/40774/1/diss_Merliev.pdf;jsessi-onid=A463FD4F9B9D0E3BB4570BD49D8560AC
 13. Selskyi PR, Sverstiuk A, Slyva AF, Selskyi BP. Prediction of the progression of endometrial hyperplasia in women of premenopausal and menopausal age based on an analysis of clinical and anamnestic indicators using multiparametric neural network clustering. *Family Medicine*. 2023;25(2):184–189. <https://doi.org/10.5114/fmpcr.2023.127679>
 14. Batko Yu, Batryn N, Melnyk G, Verbovyi S, Datsko T, Selskyi P. Development of algorithms for biomedical image segmentation based on preliminary markup and texture attributes. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2017;90(6/4):35–44. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2017.119299>

Received 30.04.2024

Accepted 11.06.2024

Одержано 30.04.2024

Затверджено до друку 11.06.2024

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS / ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

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

<https://orcid.org/0000-0001-9778-2499>; ел. пошта: selskyi@tdmu.edu.ua

Анатолій Телев'як – кандидат медичних наук, старший викладач кафедри анатомії людини Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна.

<https://orcid.org/0000-0001-7173-400X>; ел. пошта: televiak@tdmu.edu.ua

Віталій Луцик – доктор філософії в медицині (PhD), аспірант кафедри патологічної анатомії з секційним курсом та судовою медициною Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна.

<https://orcid.org/0009-0001-9372-5822>; ел. пошта: lutsyk@tdmu.edu.ua

Валентин Франчук – доктор медичних наук, професор, завідувач курсом судової медицини кафедри патологічної анатомії з секційним курсом та судовою медициною Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна.

<https://orcid.org/0000-0001-8484-8049>; ел. пошта: franchukv@tdmu.edu.ua

Андрій Сверстюк – доктор медичних наук, професор кафедри медичної інформатики Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна.

<https://orcid.org/0000-0001-8644-0776>; ел. пошта: sverstyuk@tdmu.edu.ua

Володимир Волошин – кандидат медичних наук, доцент кафедри патологічної анатомії з секційним курсом та судовою медициною Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна.

<https://orcid.org/0000-0002-6514-3120>; ел. пошта: voloshynv@tdmu.edu.ua

Михайло Фурдела – кандидат медичних наук, доцент кафедри патологічної анатомії з секційним курсом та судовою медициною Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна.

<https://orcid.org/0000-0002-6816-8614>; ел. пошта: furdela@tdmu.edu.ua