

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧОРНОМОРСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ПЕТРА МОГИЛИ**

Факультет фізичного виховання та спорту
Кафедра медико-біологічних основ спорту та фізичної реабілітації

**МЕТАБОЛІЗМ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ У ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ
ТА В УМОВАХ ГІПОКІНЕЗІЇ**

ДИПЛОМНА РОБОТА
Спеціальність 091 Біологія
Освітня програма «Фізіологія рухової активності»

Студентка ... групи
Глебова Катерина Валеріївна
Науковий керівник
д. біол. н., професор
Чернозуб А.А.

Миколаїв 2022

ЗГІДНО РІШЕННЯ КАФЕДРИ «Медико-біологічних основ спорту та фізичної реабілітації», протокол № 8 від 17 січня 2022 року.

дипломну роботу магістра Глебової К.В. на тему:

«Метаболізм сполучної тканини у щурів різного віку та в умовах гіпокінезії»
рекомендувати до захисту.

Завідувач кафедри

Сергій ГЕТМАНЦЕВ

Декан факультету

Андрій ЧЕРНОЗУБ

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ГІПОКІНЕЗІЯ ЯК ФАКТОР РОЗВИТКУ	
МЕТАБОЛІЧНИХ ПОРУШЕНЬ В ОРГАНІЗМІ.....	8
Висновок до першого розділу.....	27
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	
2.1. Методи дослідження.....	28
2.1.1. Аналіз літературних джерел.....	28
2.1.2. Методика визначення глікопротеїнів в крові.....	28
2.1.3. Методика визначення сіалових кислот в крові.....	30
2.1.4. Методика визначення хондроїтинсульфатів в крові.....	31
2.1.5. Методика визначення фракцій глікозаміногліканів в крові.....	33
2.1.6. Методика визначення оксипроліну в сечі.....	36
2.1.7. Методика визначення уронових кислот в сечі.....	38
2.1.8. Статистичні методи.....	39
2.2. Організація дослідження.....	39
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОКАЗНИКІВ	
МЕТАБОЛІЗМУ ГЛІКОПРОТЕЇНІВ ТА ПРОТЕОГЛІКАНІВ В	
КРОВІ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ЗА ГІПОКІНЕЗІЇ.....	41
3.1. Динаміка вмісту глікопротеїнів та сіалових кислот в крові щурів за гіпокінезії.....	41
3.2. Динаміка вмісту хондроїтинсульфатів та фракцій глікозаміногліканів у крові щурів за гіпокінезії.....	42
Висновки до третього розділу.....	44
РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСКРЕЦІЇ	
ОКСИПРОЛІНУ ТА УРОНОВИХ КИСЛОТ ІЗ СЕЧЕЮ ЩУРІВ	
РІЗНОГО ВІКУ ЗА ГІПОКІНЕЗІЇ.....	45
Висновки до четвертого розділу.....	47

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	48
ВИСНОВКИ.....	60
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ПЕРШОДЖЕРЕЛ.....	61
ДОДАТКИ.....	66
Додаток А	
Список публікацій автора за темою роботи.....	67
Додаток Б	
Сертифікати про апробацію матеріалів магістерської роботи.....	68

ВСТУП

Актуальність

Гіпокінезія є станом недостатньої рухової активності організму із обмеженням темпу та об'єму руху, і є на сьогодні четвертою причиною ендемічної смерті пацієнтів у світі (Cilindro C., Gholamalishahi S., La Torre G., Masala D., 2019). За результатами досліджень Е.А. Паршина із співавт. (Паршин П.А., Востроилова Г.А., Хохлова Н.А., Чаплыгина Ю.А., 2019), експериментальне моделювання гіпокінезії у білих щурів призводить до збільшення вмісту в крові загального білка, сечовини, глюкози, пірувату та активності лактатдегідрогенази у сироватці крові, що свідчить про метаболічні порушення різних органів та систем.

На сьогодні також вивчено вплив гіпокінезії на метаболізм холестеролу і стан серцево-судинної системи (Shmakov D.N., Nuzhny V.P., Kibler N.A., Kharin S.N., 2020), а також морфологію органів імунної системи (Grigorenko D.E., Aminova G.G., Vasianina K.A., 2013) у щурів в експерименті.

Відомо, що гіпокінезія здатна впливати на вміст та метаболізм компонентів кісткової та хрящової тканини, що є основою розвитку патологічних процесів, зокрема, остеопорозу, проте її ефекти до кінця невідомі, оскільки описано лише декілька моделей на тваринах (Aguado E., Mabileau G., Goyenvalle E., Chappard D., 2017).

Очевидно, що зниження рухової активності кісток негативно впливає на стан кісткової тканини і характеризується підвищеною інтенсивністю ендостальної резорбції та більш низькою щільністю остеонів, проте чітких біохімічних маркерів цих процесів не приводиться (Schlecht S.H., Pinto D.C., Agnew A.M., Stout S.D., 2012).

Таким чином, експериментальних наукових праць, присвячених вивченню біохімічних показників, які характеризують стан сполучної тканини в експерименті для оцінки впливу гіпокінезії на організм, на сьогодні недостатньо, що й зумовлює актуальність дослідження.

Мета роботи – вивчення динаміки та значення основних метаболітів, які характеризують стан сполучної тканини, в сироватці крові та сечі у щурів різного віку за гіпокінезії.

Завдання роботи:

1. За результатами аналізу літературних джерел сформуванати сучасне уявлення про вплив гіпокінезії на стан опорно-рухової системи та визначити основні механізми даного впливу.

2. Встановити основні біохімічні показники, які можуть характеризувати стан сполучної тканини щурів в експерименті та проаналізувати методики їх визначення в сироватці крові та сечі.

3. Визначити біохімічні показники крові та сечі, які характеризують метаболізм сполучної тканини у щурів за гіпокінезії.

4. Провести оцінку метаболічних порушень у щурів різного віку за гіпокінезії та основні біохімічних маркерів стану сполучної тканини – глікопротеїнів, сіалових кислот, хондроїтинсульфатів, фракцій глікозаміногліканів, оксипроліну та уронових кислот.

Об'єкт дослідження – гіпокінезія у щурів.

Предмет дослідження – метаболізм сполучної тканини у щурів різного віку за експериментальної гіпокінезії.

Методи дослідження. В роботі застосовувались наступні методи дослідження: аналіз літературних джерел, методики біохімічних досліджень сироватки крові та сечі щодо вмісту метаболітів сполучної тканини, статистичні методи.

Наукова новизна роботи. В даній роботі *вперше* застосовано комплексний підхід для оцінки метаболічних порушень сполучної тканини за експериментально відтвореної гіпокінезії у щурів та проведено паралелі з клінічними порушеннями за гіпокінезії у людини.

Практичне значення роботи. Результати досліджень, одержані під час виконання магістерської роботи, використовуються у науково-практичній діяльності відділу лабораторної діагностики та імунології ДУ «Інститут

патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України» (завідувачка відділом – к. біол. н., ст. н. с. Ф.С. Леонтєва).

Публікації. За темою роботи опубліковано 3 наукові праці, серед яких 1 – в Українському біофармацевтичному журналі, що входить до переліку фахових наукових видань України з біологічних наук, та 2 тези наукових конференцій.

РОЗДІЛ 1

ГІПОКІНЕЗІЯ ЯК ФАКТОР РОЗВИТКУ ПОРУШЕНЬ ОПОРНО-РУХОВОЇ СИСТЕМИ

Акінезія, гіпокінезія та брадикінезія – поняття, які досить широко використовуються для опису порушень моторних функцій, але застосовуються непослідовно та охоплюють більше різних патологічних станів. Було встановлено, що акінезія та гіпокінезія з’явилися як терміни в ХІХ столітті, на відміну від гіперкінезії, але використовувалися з 1920 року, в той же час був введений «брадикінетичний синдром». Використання всіх термінів збільшилося в цей період через епідемію енцефаліту та знову зросло з відкриттям леводопи з 1961 року. Завдяки широкому використанню наборів критеріїв з 1980-х років брадикінезія замінила акінезію як найбільш часто використовуваний термін. Поява Інтернету призвела до збільшення публікацій і пов’язаного з цим збільшення неоднорідності у використанні термінів. Це вказує на зміни в часі та відсутність єдності в термінології, яка використовується для опису діапазону порушень виконання рухів. Сучасна термінологія не в змозі охопити нюанси проблем, з якими ми стикаємося під час документування цих порушень. Тому автори рекомендують, щоб поточна ситуація могла б отримати користь від об’єктивного та надійного підходу з використанням даних мережевих і схематичних технологій, а також нових розробок у технологіях оцінки. Очікується, що це сприятиме створенню нової термінології щодо рухових розладів (Schilder J.C., Overmars S.S., Marinus J., van Hilten J.J. & Koehler P.J., 2017).

Було досліджено вплив антиортостатичної гіпокінезії на параметри вертикальної постави (ортостатична та постуральна стабільність). Антиортостатична гіпокінезія супроводжувалася ортостатичною нестабільністю, що виражалася у зменшенні часу толерантності в ортостатичній пробі, значному підвищенні частоти серцевих скорочень та систолічного артеріального тиску. Починаючи з 10–11 хвилини

стабілометричного тесту, спостерігалися значні зміни параметрів, що відображають постуральну стабільність. Було показано, що антиортостатична гіпокінезія впливає на всі параметри постуральної стабільності; була порушена симетрія в парних стабілометричних тестах (Orlov D.O., Sukhostavtseva T.V., Shpakov A.V., Puchkova A.A., Stavrovskaya D.M., Sedelkova V.A. & Artamonov A.A., 2020).

Достовірно встановлено, що дофамінергічна система смугастого мозку порушується зі старінням, а саме функція рецептора D_2 . Також добре задокументовано пов'язане з віком зниження рівня нейрогормону мелатоніну як у людей, так і у тварин. Те, що було недостатньо вивчено, так це можлива взаємодія між системою рецепторів D_2 і віковим зниженням мелатоніну з його безпомилковою схемою синтезу та вивільнення виключно під час темної фази. Автори перевірили дію антагоніста D_2 , галоперидолу (1,0 мг/кг внутрішньовенно), на підлітків (2 міс.) і дорослих щурів (10 міс.) у світлій (ZT3) і темній фазах (ZT 15) на щурах, які утримувалися в циклі 12 л/12D і вплив екзогенного мелатоніну (15 мг/кг в/добу x 4 дні, загальна доза 60 мг/кг) на антагонізм D_2 . Використовуючи бар-тест, який вимірює екстрапірамідний побічний ефект гіпокінезії, ми повідомляємо, що галоперидол діє по-різному залежно від віку та фази. Дорослі щури відчували дію антагоніста D_2 як у світлій, так і в темній фазі, тоді як молоді щури не виявляли гіпокінетичних ефектів у темряві. За допомогою маніпуляційного освітлення ми змогли відновити дію галоперидолу на молодих щурів у темній фазі. Ми також виявили поліпшення впливу часу зменшення мелатоніну на планку після лікування галоперидолом, однак цей ефект був виявлений лише у старших щурів. Ці дані демонструють важливість циклу світло/темрява та віку у сприйнятливості до екстрапірамідних ефектів при застосуванні препаратів, які націлені на функцію рецептора D_2 (Hussain S., Villarreal S., Ramirez N., Hussain A. & Sumaya I.C., 2020).

Досліджено вплив гіпокінезії в поєднанні з впливом холоду на морфологічні параметри серця у щурів Wistar-Kyoto та щурів зі спонтанною

генетично детермінованою гіпертензією (SHR). Патологічні процеси, що розвиваються в серці білих лабораторних щурів, суттєво впливали на роботу серця і виражалися в погіршенні морфологічної структури серця: зменшення маси серця, витончення вільної стінки лівого шлуночка. Ці зміни свідчать про перехід на нижчий енергетичний рівень функціонування. При цьому в обох щурячих лініях розвивається гіпертрофія правої вільної стінки. Комбінований ефект гіпокінезії та холоду, ймовірно, є фактором, що опосередковано сприяє розвитку легеневого серця (Shmakov D.N., Nuzhny V.P. & Kibler N.A., 2019).

Невикористання викликає швидку втрату кісткової тканини у людей і тварин; гіподинамія/безрухливість зараз визнано фактором ризику остеопорозу. Гіподинамія також зменшує кісткову масу, але її наслідки в основному невідомі, і описано лише кілька моделей на тваринах. Гіподинамічна курка визнана підходящою моделлю втрати кісткової маси, але її вплив на якість до кінця не вивчено. Автори використали десять курей, вирощених у великому вольєрі (група FREE); десять інших були замкнені в невеликих клітках з невеликим простором для пересування (група HYPO). Їх умертвили через 53 дні, а стегнові кістки оцінили за допомогою мікрокомп'ютерної томографії (microCT) та наноіндентації. Зрізи (товщиною 4 мкм) були проаналізовані за допомогою інфрачервоної мікроспектроскопії з перетворенням Фур'є (FTIR), щоб побачити вплив на мінералізацію та колаген, а також кількісне зображення розсіяних електронів (qBEI) для зображення мінералу кісткової матриці. Об'єм трабекулярної кістки та мікроархітектура були значно змінені в групі HYPO. FTIR показав значне зниження відношення мінералу до матриці в групі HYPO, пов'язане зі збільшенням вмісту карбонатів і збільшенням кристалічності (розраховано як відношення площ підсмуг, розташованих на 1020 і 1030 см⁻¹), що вказує на поганий якість мінералу. Зрілість колагену (розрахована як відношення площ підсмуг, розташованих на 1660 і 1690 см⁻¹) була значно знижена в групі HYPO. На тканинному рівні спостерігалися знижені біомеханічні властивості. Закрита курка представляє нову модель для дослідження гіподинамії, оскільки зміни кісток не виникають

внаслідок хірургічного ураження або травматичного методу. Тварини мають знижену кісткову масу і змінені якості кісткової матриці, яка менш мінералізована і колаген містить менше поперечних зв'язків, ніж у контрольній курки (Aguado E., Mabileau G., Goyenvalle E., Chappard D., 2017).

Було також встановлено, що адинамічна кістка є найбільш частим типом ураження кісток у пацієнтів з хронічною хворобою нирок. Тривале застосування антирезорбтивної терапії також може призвести до адинамічного стану кісток. Характерною ознакою адинамічної кістки є втрата кісткового обміну, а основним клінічним занепокоєнням адинамічної кістки є зниження якості кістки та збільшення ризику переломів. Наше поточне дослідження має на меті дослідити, як змінюється якість кістки з віком у нашій раніше створеній моделі адинамічної кістки на миші. У цьому дослідженні використовували молодих і старих мишей (4 місяці та 16 місяців відповідно). Мишей Col2.3A_{tk} (ДТК) лікували ганцикловіром і памідронатом для створення адинамічного стану кісток. Якість кісток оцінювали за допомогою встановлених методів, включаючи гістоморфометрію кістки, мікрокомп'ютерну томографію, кількісне зображення розсіяних електронів та біомеханічне тестування. Зміни мінеральних властивостей і властивостей матриці досліджували за допомогою порошкової рентгенівської дифракції та спектроскопії. У контрольній групі зі старінням спостерігалось природне зниження утворення та резорбції кістки з відповідним погіршенням трабекулярної структури кістки. Обмін кісткової тканини був сильно притупленим у будь-якому віці у адинамічних тварин, що зберігало трабекулярну втрату кісткової тканини, яка зазвичай пов'язана зі старінням. Проте збереження трабекулярної кісткової маси та структури у старих адинамічних мишей не врятувало погіршення механічних властивостей кістки. Також спостерігалось зниження міцності кортикальної кістки у старих адинамічних мишей, що супроводжувалось більш зрілим колагеновим матриксом і довшими кістковими кристалами. Мало що відомо про вплив метаболічного захворювання кісток на стійкість до переломів кісток. Ми спостерігали вікове зниження міцності кісток, яке погіршувалось адинамічним

станом, і це зниження може бути пов'язано зі змінами рівня матеріалу на рівні тканин. Наша мишача модель може бути корисною у дослідженні механізмів, пов'язаних з переломами, що виникають у пацієнтів літнього віку, які отримують антирезорбтивну терапію, у яких дуже низький рівень обміну в кістковій тканині (Ng A.H., Omelon S., Variola F., Allo B., Willett T.L., Alman V.A. & Grynpras M.D., 2016). Етіологія адинамічної хвороби кісток (ABD) недостатньо вивчена, але відмітною ознакою ABD є відсутність кісткового обміну. ABD виникає при остеодистрофії нирок (ROD) і підозрюється у пацієнтів літнього віку, які отримують тривалу антирезорбтивну терапію. Основною клінічною проблемою ABD є погіршення якості кістки та підвищений ризик переломів. Наскільки нам відомо, експериментальні моделі тварин для ABD, відмінні від ROD-ABD, не були розроблені та не вивчені. Цілі цього дослідження полягали в тому, щоб розробити мишачу модель ABD без ускладнень ниркової абляції та охарактеризувати зміни якості кісток при ABD порівняно з контролем. Щоб відновити адинамічний стан кісток, 4-місячних самок мишей Col2.3 Δ tk лікували ганцикловіром для специфічної абляції остеобластів, а памідронат використовували для інгібування остеокластичної резорбції. Чотири групи тварин використовували для характеристики якості кісток при ABD: контроль нормальних кісток, контроль без утворення, контроль без резорбції та адинамічна група. Після 6-тижневого періоду лікування тварин забивали, а кістки збирали для аналізу. Оцінку якості кісток проводили з використанням встановлених методів, включаючи гістологію кістки, кількісне зображення розсіяних електронів (qBEI), подвійну рентгенівську абсорбціометрію (DXA), мікрокомп'ютерну томографію (microCT) та біомеханічне тестування. Гістоморфометрія підтвердила ознаки ABD, пов'язані з остеобластами, у нашій моделі миші. Формування кістки було майже повним пригніченим у зразках No Formation та Adynamic. Пригнічення резорбції кісток у групі Adynamic було підтверджено фарбуванням, стійким до тартрату кислою фосфатазою (TRAP). Нормальна мінеральна щільність і архітектура кісток зберігалися в групі Adynamic, тоді

як група без утворення продемонструвала зниження вмісту мінералів кістки та товщини трабекулярної тканини порівняно з групою Adynamic. Як і очікувалося, група No Formation мала більш гіпомінералізований профіль, а група Adynamic мала вищий середній профіль мінералізації, який подібний до пригніченого обміну кісток у людини. Ці дані підтверджують успішну реплікацію адинамічного стану кістки у миші без ускладнення ниркової абляції. Наш підхід є першою моделлю ABD, яка використовує фармакологічні маніпуляції у трансгенної миші, щоб імітувати клітинну динаміку кісток, що спостерігається в стані ABD людини. Ми плануємо використовувати нашу мишачу модель для дослідження адинамічного стану кісток при старінні та вивчення змін якості кісток та ризику переломів внаслідок надмірного пригнічення кісткового обміну (Ng A.H., Willett T.L., Alman B.A. & Grynpras M.D., 2014).

Ще в одному дослідженні було проаналізовано сенсорну, структурну та функціональну реакцію щурів, підданих іммобілізації лапи. Основні методи досліджень полягали у наступному: таз, стегно, коліно та щиколотки тварин були іммобілізовані за допомогою водонепроникної стрічки упродовж двох тижнів для оцінки сенсорної реакції на термічні (тест гарячої пластини) та механічні подразники (тест фон Фрея), структури рухової системи (гістологія та рентгенографія) та м'язів. функція (скоротливість камбаловидної кістки). Основні висновки були наступними: тварини, які не використовуються, стали більш чутливими до теплових подразників (49 %), хоча менше реагували на механічні виклики (58 %). Тварини, які не вживали, показали місцеві пошкодження, такі як зменшення діаметра м'язового волокна (16,7 % у литковій кістці, 5,7 % у камбаловидної кістки), скоротливої активності (55% контрольного максимального тонічного скорочення) і товщини кори великогомілкової кістки (9,3%), а також збільшення вмісту нітриту: білка співвідношення, що свідчить про деградацію білка. Невикористання також викликало системні адаптації, які включають підвищення рівня лактатдегідрогенази в сироватці крові (36,1 %) і лужної фосфатази (400 %), але

зниження рівня кальцію (8,4 %) і загального білка сироватки (5,5 %), особливо альбуміну (34,2%). Таким чином, два тижні функціонального невикористання кінцівки призводять до локальних і системних шкідливих адаптаційних змін у сенсорних і структурних системах. Це дослідження дає нове уявлення про механізми нервової та рухової системи, пов'язані з терапевтичною іммобілізацією кінцівок при патологічних станах м'язів і скелета (Santos-Júnior F.F., Pires Ade F., Ribeiro N.M., Mendonça V.A., Alves J.O., Soares P.M., Ceccatto V.M. & Assreuy A.M., 2015).

Досліджено клітинний склад і вільнорадикальне окислення в кістковому мозку білих безпородних щурів після гіпокінетичного стресу (24 і 72 год) та вплив екзогенного глюкокортикоїду триамцинолону ацетоніду (2 мг/кг; введений через 24 год після гіпокінезії); вимірювання проводили через 96 год після введення препарату. Гіпопластичний ефект глюкокортикоїду після 24-годинної гіпокінезії спостерігався на тлі зниженого вільнорадикального окислення. У тварин, підданих 3-денній гіпокінезії, резистентність кісткового мозку до гіпопластичної дії цього препарату супроводжувалася активацією вільнорадикальних процесів (Tseilikman V.E., Osikov M.V., Strelnikova L.A., Filimonova T.A., Strelnikov I.V., Tseilikman O.B., Kozochkin D.A., Sinitskiy A.I., Pankov N.E. & Pankova N.A., 2013).

Ремобілізацію раніше іммобілізованої задньої правої кінцівки щура в положенні з укороченим підошовним згинанням гомілковостопного суглоба шляхом вільного руху або пов'язаної з періодичним пасивним розтягуванням оцінювали за допомогою аналізу змінних показників ходи та діапазону руху тильного згинання. Змінні були пов'язані з експресією білків позаклітинного матриксу та додаванням серійних саркомерів. Шістдесят чотири самки щурів Wistar були розділені на 8 груп: знерухомлені, вільні протягом 10 днів, іммобілізовані/розтягнені/вільні на 1, 3 або 10 днів, іммобілізовані/вільні на 1, 3 або 10 днів. Проаналізовано змінні параметри ходи, діапазон рухів, кількість серійних саркомерів, локалізацію та інтенсивність фарбування фібронектину, а також експресію колагену I та III типів. Гіпокінезія змінила функціональні

параметри ходи, зменшила діапазон рухів тильного згинання (ROM), збільшила кількість волокон з внутрішньоклітинним фібронектином/загальну кількість волокон (FIF/TNF) та зменшила експресію колагену I типу. Через три дні морфологічні зміни посилювалися і кількість серійних саркомерів зросла в обох групах, іммобілізованих / розтягнутих / вільних та іммобілізованих / вільних. Також спостерігалися функціональні порушення, обмеження ROM та збільшення FIF/TNF. Незважаючи на вищеописані зміни, 10-денна програма розтягування підвищила ефективність ремобілізації, що призвело до відновлення аномалій, що спостерігалися в м'язах (Саção-Benedini L.O., Ribeiro P.G., Gomes A.R., Ywazaki J.L., Monte-Raso V.V., Prado C.M. & Mattiello-Sverzut A.C., 2013).

Дослідження електронно-парамагнітної (ЕПР) спектроскопії показало, що 90-денна гіпокінезія у щурів супроводжується збільшенням продукції NO в серці. Неселективний інгібітор NO-синтази L-NAME знижував вміст NO в передсердях і шлуночках серця гіпокінетичних щурів на 67–70 %. Селективний інгібітор індукованої NO-синтази аміногуанідин також знижував рівень NO в передсердях і шлуночках серця гіпокінетичних щурів на 60–65 %. Наші результати показують, що збільшення продукції NO під час гіпокінезії пов'язане з активацією NO-синтаз (Zaripova R.I., Gainutdinov Kh.L. & Zefirov T.L., 2014).

Вісімдесят білих щурів були розділені на 4 групи: (1) контрольна (віварій), (2) антиортостатична гіпокінезія (АГ), (3) лише перитоніт і (4) АГ з перитонітом. Ефекти АГ досягалися шляхом поміщення щурів на спеціальну підставку на термін 14 днів з подальшим формуванням перитоніту. Після цього досліджували біохімічні показники зразків крові. Поєднання ефектів мікрогравітації та перитоніту є односпрямованим і має взаємну вагу. Як показано в ряді випадків дворазове підвищення рівня досліджуваних показників у порівнянні з контрольним і віваріальним перитонітом. Порівняльна оцінка тяжкості перитоніту показала, що імітований вплив мікрогравітації перетворює перитоніт у більш складні форми (Panchenkov

D.N., Baranov M.V., Astakhov D.A., Nechunaev A.A., Leonov S.D., Behteva M.E., 2013).

Нервово-м'язові веретена (NMS) камбаловидного м'яза та їх судинне русло досліджували у 250 організмів самців щурів Wistar після закінчення (30, 60, 120 і 240 днів) гіпокінезії. Матеріал досліджували гістологічним фарбуванням за Кульчицьким, Мейсоном та Ренсоном, електронно-мікроскопічними та гістохімічними методами (демонстрація сукцинатдегідрогенази). Встановлено, що початкові зміни передавали зменшення просвіту прекапілярних артеріол (на 25,4 %) та кровоносних капілярів (на 29,1 %). Ці зміни тісно корелювали зі збільшенням ширини субкапсулярного простору (на 34,7 %), зменшенням товщини капсули НМС (на 48,7 %) та діаметром екваторіальної зони (на 17,9 %). Також була знижена активність сукцинатдегідрогенази в інтрафузійних м'язових волокнах. У результаті розпаду терміналів гама-аксонів площа поперечного перерізу НМС зменшилася на 75,6 %. Таким чином, під час гіпокінезії виникли початкові зміни в джерелах кровопостачання НМС, тоді як їх структурна ремоделювання включало деструктивні зміни (Popel S.L., 2014).

За допомогою лазерної доплерівської флоуметрії досліджували мікрогемодинаміку тканин у щурів, які зберігали гіпокінезію до 10 днів. Дослідження будови ритмів коливань кровотоку в мікроциркуляторному руслі виявило, що хронічний гіпокінетичний стрес призводить до значного зниження осциляторної та неосциляційної мікрогемодинаміки показників, що виражається в розвитку вазоконстрикції, зниженні метаболічної функції ендотелію та виділенні до них оксиду азоту, порушення припливу і відтоку крові, переважання шунтуючого кровотоку, зменшення кількості функціонуючих капілярів (Chuyan E.N., Ravaeva M.Y., 2015).

Це дослідження має на меті показати, що під час гіпокінезії (НК) вміст магнію в тканинах (Mg^{2+}) зменшується більше при більшому споживанні Mg^{2+} , ніж при нижчому споживанні Mg^{2+} , і що втрати Mg^{2+} збільшуються більше, ніж при нижчому виснаженні Mg^{2+} у тканинах через нездатність організму

використовувати Mg^{2+} . під час НК. Дослідження були проведені на самцях щурів лінії Вістар під час періоду до НК та періоду НК. Щури були порівню розділені на чотири групи: контрольні щури без добавок (UVCR), щури з гіпокінетичними добавками (UHKR), контрольні щури з добавкою віварію (SVCR) і щури з додатковими гіпокінетичними щурами (SHKR). SVCR і SHKR споживали 42 мЕкв Mg^{2+} на день. Вміст Mg^{2+} в ікроножному м'язі та правої стегнової кістки значно зменшився, тоді як рівень Mg^{2+} у плазмі, а також втрата Mg^{2+} із сечею та калом значно зросли у SHKR та UHKR порівняно з їхніми значеннями до НК та відповідними контрольними показниками віварію (SVCR та UVCR). Однак вміст Mg^{2+} у м'язах та кістках знизився більш значно, а рівень Mg^{2+} у плазмі, а також втрата Mg^{2+} із сечею та калом у SHKR значно зросла, ніж у UHKR. Більша втрата Mg^{2+} тканиною при більшому споживанні Mg^{2+} і менша втрата Mg^{2+} тканиною при меншому споживанні Mg^{2+} показує, що ризик більшого виснаження тканинного Mg^{2+} безпосередньо пов'язаний із величиною споживання Mg^{2+} . Більша втрата Mg^{2+} при більшому виснаженні Mg^{2+} тканини та менша втрата Mg^{2+} при нижчому виснаженні Mg^{2+} тканини показують, що ризик більшої втрати Mg^{2+} безпосередньо пов'язаний із величиною виснаження Mg^{2+} тканини. Було зроблено висновок, що виснаження Mg^{2+} тканини збільшується більше, коли надходження Mg^{2+} вище, і що втрати Mg^{2+} збільшуються більше при більшому, ніж нижчому виснаженні тканини Mg^{2+} , що вказує на те, що під час тривалої гіпокінезії виснаження тканини Mg^{2+} пов'язане не з дефіцитом Mg^{2+} в їжі, а з нездатністю організму використовувати Mg^{2+} (Yan G. Zorbas, Kostas K. Kakuris, Viktor A. Denogradov, Kosmas B. Yerullis, 2006).

Було проведено дослідження щодо вивчення динаміки зміни рівня паратгормону, кальцитоніну, циклічних нуклеотидів (цАМФ, цГМФ) та кальцію в крові щурів, а в сечі – фосфату, кальцію та циклічних нуклеотидів. Було показано кореляцію між змінами параметрів дослідження. Це підтверджує теорію про взаємозв'язок між гілками гормональних систем (циклічні нуклеотиди-кальцій), які виконують центральну роль у регуляції

гомеостазу. Результати показують, що добова екскреція кальцію та фосфату залежить від віку у щурів під час патогенезу гіпокінезії: значення вищі в контрольних групах. Зміни вмісту кальцію в крові та фосфатурії у піддослідних тварин різного віку пов'язували зі змінами інтенсивного процесу реабсорбції в кістках під час реадаптаційного періоду гіпокінезії (Chek J.V., Laniko A.I., 2002).

Досліджено параметри гемостатичного гомеостазу при ізольованому та комбінованому впливі низькоінтенсивного γ -опромінення в низькій дозі, гіпербаричної оксигенації та антиортостатичної гіпокінезії. Комплексна дія вищевказаних стресових факторів супроводжується вираженим гіперкоагуляційним зсувом з ознаками тромбінемії на тлі пригніченого фібринолізу, що свідчить про ризик внутрішньосудинного згортання крові (Romanovskaya V.N., Staroselskaya A.N., Zhavoronkov L.P., 2012).

Було проведено дослідження, щоб визначити загальну втрату кальцію (Ca^{2+}) у тканинах із дефіцитом Ca^{2+} та втрату Ca^{2+} тканинами з або без добавки Ca^{2+} під час гіпокінезії. Дослідження проводили на 240 самцях щурів Вістар протягом передекспериментального періоду 9 днів і експериментального періоду 98 днів. Щури були порівну розділені на чотири групи: контрольні щури з віварієм (UVCR), щури з гіпокінетичним вмістом без добавок (UHKR), контрольні щури з добавкою віварію (SVCR) та щури з добавками гіпокінетики (SHKR). Добавки кальцію 2,6 ммоль давали тваринам у групах SVCR та SHKR. Результати: рівень Ca^{2+} литкового м'яза та правої стегнової кістки зменшився ($p < 0,05$) і рівень Ca^{2+} у плазмі крові, а втрата Ca^{2+} із сечею та калом збільшилася ($p < 0,05$) у SHKR та UHKR групи порівняно з їхніми доекспериментальними значеннями та значеннями у відповідних контрольних групах віварію (SVCR та UVCR). Вміст Ca^{2+} у м'язах та кістках знизився більше ($p < 0,05$), тоді як рівень Ca^{2+} у плазмі крові, а втрата Ca^{2+} із сечею та калом зросла більше ($p < 0,05$) у групі SHKR, ніж у групі SVCR. Дефіцит Ca^{2+} у тканині під час гіпокінезії більш очевидний, ніж без добавок Ca^{2+} , а втрата Ca^{2+} посилювалася при більш високому, ніж нижчому, дефіциті Ca^{2+} у тканині. Це

показує, що тканинний дефіцит Ca^{2+} не є результатом нижчого вмісту Ca^{2+} у споживаній їжі, а загальна втрата Ca^{2+} організмом спричинена не більшим вмістом Ca^{2+} у тканинах, а через неможливість організму використовувати Ca^{2+} при тривалій гіпокінезії (Zorbas Y.G., Kakuris K.K., Deogenov V.A., Neophitos E.A., 2008).

Досліджено зміни води та електролітів у сечі та плазмі щурів під час тривалого обмеження рухової активності (гіпокінезія) на 90 самцях щурів Wistar (від 375 до 396 г) протягом 15-денного періоду прегіпокінезії та 90-денного періоду гіпокінезії. Усі щури були розділені порівну на дві групи: щури, поміщені в звичайні умови віварію, служили контрольними щурами віварію (VCR), а щури, піддані гіпокінезії, служили гіпокінетичними щурами (HKR). Гіпокінетичний ефект здійснювався шляхом утримання групи HKR в невеликих індивідуальних клітках, які обмежували всі їхні рухи в усіх напрямках, не перешкоджаючи споживанню їжі та води. Протягом 15 днів прегіпокінетичного періоду та протягом 90 днів гіпокінетичного періоду рідина, споживана та виведена із сечею, прийом їжі, маса тіла, концентрація натрію та калію у плазмі та їх виділення із сечею, осмоляльність плазми, концентрація загального білка у плазмі, виміряли гемоглобін цільної крові та концентрацію гематокриту. У групі HKR споживання води та їжі значно знизилися ($p < 0,05$) порівняно з групою VCR, тоді як діурез, екскреція натрію та калію із сечею, концентрація натрію та калію в плазмі, осмоляльність плазми, концентрація білка плазми, гемоглобін цільної крові та гематокрит значно підвищився ($p < \text{або} = 0,05$) у порівнянні з групою VCR. Було зроблено висновок, що тривалий вплив гіпокінезії спричиняє значні зміни водного балансу та рівня натрію та калію як у сечі, так і в плазмі крові у щурів (Zorbas Y.G., Federenko Y.F., Cherapakhin K.P., Kuznetsov N.K., Yarulin V.L., Federov M.A., 1998).

Зміни рівня глюкози, лактату та вільних жирних кислот у крові та глікогену в печінці та скелетних м'язах щурів ($n = 47$) при введенні адреналіну (150 мкг/кг маси тіла) досліджували на 7 день відновного періоду після

гіпокінезія тривалістю 15 і 30 днів. У тварин, підданих обмеженій руховій активності, порівняно зі звичайними щурами, епінефрин менше впливає на вміст глікогену в м'язах, не супроводжується підвищенням рівня вільних жирних кислот у сироватці крові та призводить до більш помітного підвищення рівня молочної кислоти в крові. Наднирковий контроль ліполітичних процесів у жировій тканині та глікогенолітичних процесів у м'язах у постгіпокінетичний відновний період знижується (Telushkin P.K., Potarov P.P., 1993).

Дослідження було встановлено, що гіпокінезія викликає виснаження м'язових мінералів. Однак механізм виснаження м'язових мінералів під час гіпокінезії залишається невідомим. Вимірюючи затримку електролітів і значення електролітів у м'язах, плазмі та сечі під час та після гіпокінезії, метою цього дослідження було з'ясувати, чи може гіпокінезія пригнічувати утримання мінералів і призводити до виснаження м'язових мінералів. Дослідження проводили на 204 13-тижневих самцях щурів Wistar (370-390 г) протягом 10 днів до гіпокінетичного періоду, 98 днів гіпокінетичного періоду та 15 днів після гіпокінетичного періоду. Щури були порівну розділені на дві групи: контрольні щури віварію (VCR) та гіпокінетичні щури (HCR). Усіх гіпокінетичних щурів утримували протягом 98 днів у невеликих індивідуальних клітках, які обмежували їх рухи в усіх напрямках, не перешкоджаючи споживанню їжі та води. Усіх контрольних щурів утримували на 98 днів в індивідуальних клітках в умовах контролю віварію. Обидві групи щурів годували попарно. Протягом періоду гіпокінезії вміст натрію (Na), калію (K), магнію (Mg), кальцію (Ca) і води та затримка електролітів у скелетних м'язах значно знизилася ($p < 0,05$), тоді як рівні електролітів у сечі та плазмі значно зросли ($p < 0,05$) у HCR порівняно з їхніми значеннями до гіпокінезії та відповідним відеомагнітофоном. Протягом перших днів періоду після гіпокінезії затримка мінералів значно зросла ($p < 0,05$), рівень електролітів у плазмі та сечі значно знизився ($p < 0,05$), тоді як вміст м'язового електроліту та води залишався значно ($p < 0,05$) зниженим у HCR в порівнянні з

відеомагнітофоном. Вміст мінералів і води в м'язах, затримка електролітів, значення електролітів у плазмі та сечі не змінилися у VCR порівняно з їх значеннями до гіпокінезії. Було зроблено висновок, що під час гіпокінезії знижений вміст м'язових мінералів може свідчити про виснаження м'язових мінералів, тоді як підвищена втрата електролітів із сечею та виснаження м'язових мінералів можуть продемонструвати зниження утримання мінералів. Зниження екскреції електролітів і зниження вмісту мінеральних речовин у м'язах під час пост-гіпокінезії можуть свідчити про виснаження мінеральних речовин скелетних м'язів під час гіпокінезії. Дисоціація між утриманням електролітів і м'язовим мінеральним виснаженням може продемонструвати наявність зниженої затримки електролітів як механізму м'язового електролітного виснаження під час тривалої гіпокінезії (Zorbas Y.G., Kakurin V.J., Denogradov S.D., Luzhkov S.H., Neofitov A.C., 2002).

Метою наступного дослідження було показати, що гіпокінезія може по-різному впливати на вміст води та електролітів у м'язах, маючи мінімальні відмінності в їх функції та морфології. З цією метою досліджували вміст води та електролітів у скелетних та серцевих м'язах, екскрецію рідини, всмоктування електролітів та рівень електролітів у плазмі, сечі та фекаліях щурів при тривалій гіпокінезії. Дослідження проводили на ста двадцяти шести 13-тижневих самцях щурів Вістар під час прегіпокінетичного періоду та періоду гіпокінезії. Тварин порівну розділили на дві групи: контрольні щури віварію (VCR) та гіпокінетичні щури (HKR). Гіпокінетичних тварин утримували в невеликих індивідуальних клітках, які обмежували їх рух у всіх напрямках, не перешкоджаючи споживанню їжі та води. Контрольні щури містилися в індивідуальних клітках в умовах контролю віварію. Поглинання натрію (Na^+) і калію (K^+), вміст електролітів і води в серцевих м'язах (правий і лівий шлуночки), розгиначі стегна (чотириголовий м'яз стегна) і довгий м'яз спини (двоголовий м'яз стегна), об'єм сечі та рівень електроліту у плазмі, сечі та калі не змінилися в VCR порівняно з їхніми догіпокінетичними рівнями. Поглинання Na^+ та K^+ , вміст води та електролітів у серцевих та скелетних

м'язах значно зменшилось, тоді як об'єм сечі, рівні електролітів у плазмі та екскреція електролітів із сечею та калом значно зросли у НКР порівняно з їх значеннями до гіпокінезії та з відповідним контролем у віварії. Вміст води та електролітів у скелетних м'язах значно зменшився, ніж у серцевих м'язах. Рівень води та електролітів знизився більше в розгиначі стегна і в правому шлуночку, ніж у довгому м'язі спини, лівого шлуночка або перегородки. М'язи, які страждають від більшої втрати води та електролітів на тлі меншого вмісту води та електролітів, демонструють менші відкладення води та електролітів. Нижчий вміст електролітів і води в скелетних, ніж у серцевих м'язах, показує, що вміст води та електролітів зменшується більше в скелетних, ніж у серцевих м'язах. Скелетні м'язи показали нижчий вміст води та електролітів, ніж серцевий м'яз, що вказує на те, що ризик зменшення м'язової води та вмісту електролітів обернено пов'язаний з функцією та морфологією м'язів, тобто чим більше опорних функцій і морфології м'язів, тим вище ризик для зниження вмісту води та електролітів у м'язах. Було зроблено висновок, що чим більша функція та морфологія м'язів, тим менше відкладення електролітів і води, вищі втрати води та електролітів та менший вміст води та електролітів (Zorbas Y.G., Kakuris K.K., Neofitos E.A., Afoninos N.I., 2005).

Фізична активність відіграє модулюючу роль на етапах регулювання зв'язку збудження-скорочення (ЕСС), що визначають скоротливість скелетних м'язів. Ми оцінили та порівняли скоротливу реакцію та спричинені кофеїном контрактири швидких (розгинач довгого пальця; EDL) і повільних (камбаловидна кістка; SOL) м'язів у суспензійної гіпокінезії (SH) та щурів, які тренувалися. Після SH або вправи низької інтенсивності EDL і SOL були ізольовані, реєструвалися судомні та тетанічні скорочення, а також контрактири з прийомом кофеїну (10 мМ). Судомні і тетанічні скорочення EDL збільшилися на 60 % у тренуваних щурів ($p < 0,05$), тоді як після SH ніяких змін не спостерігалось. Вправа не змінювала посмикування та тетанічні скорочення SOL, тоді як SH пригнічував скорочення ($p < 0,05$). Кофеїнові контрактири були зменшені у тренуваних щурів EDL ($p < 0,05$). У SH-щурів EDL контрактири

збільшувалися по амплітуді ($p < 0,01$) із швидким перебігом часу ($p < 0,05$). Контрактури не змінилися в SOL після фізичного навантаження або SH. Ми прийшли до висновку, що SH і фізичні вправи надають різноманітний модулюючий вплив на скоротливість скелетних м'язів. Поліпшення скоротливості внаслідок фізичних навантажень було помітним при EDL. Наші результати свідчать про те, що специфічні адаптації м'язового типу пов'язані зі зміною ECC через відмінності в етапах регулювання, зокрема у внутрішньоклітинних механізмах обробки Ca^{2+} (Ertunc M., Atalay A., Yildirim M., Onur R., 2010).

Наступне дослідження мало на меті показати вплив гіпокінезії на втрату калію (K^+) тканиною при різному виснаженні K^+ тканини та дефіциті K^+ у тканині при різному споживанні K^+ . З цією метою вимірювали вміст K^+ у тканині, рівень K^+ у плазмі та втрату K^+ із та без добавок K^+ під час гіпокінезії. Дослідження проводили на самцях щурів Вістар протягом передекспериментального та експериментального періоду. Тварини були порівну розділені на чотири групи: контрольні щури з віварієм без добавок (UVCR), щури з гіпокінетичним вмістом без добавок (UHKR), контрольні щури з добавками віварію (SVCR) та щури з додатковими гіпокінетичними щурами (SHKR). SVCR і SHKR щодня додавали 2,50 мЕкв хлориду калію (KCl). Результати: вміст K^+ литкового м'яза та правої стегнової кістки значно зменшився, тоді як рівень K^+ у плазмі та втрата K^+ із сечею та калом значно зросли у SHKR та UHKR порівняно з їхніми доекспериментальними значеннями та значеннями в їх відповідний контроль віварію (SVCR та UVCR). Вміст K^+ у кістках і м'язах знизився більш значно, а рівень K^+ у плазмі та втрата K^+ із сечею та калом зросли більш значно у SHKR, ніж у UHKR. Таким чином, більший дефіцит K^+ було встановлено у тканинах із вищим, ніж нижчим споживанням K^+ ; це показує, що ризик дефіциту K^+ у тканині безпосередньо пов'язаний із споживанням K^+ . Більш висока втрата K^+ при вищому дефіциті K^+ у тканині та менша втрата K^+ при нижчому дефіциті K^+ показує, що ризик більшої втрати K^+ безпосередньо пов'язаний з тканинним

K⁺ дефіцитом. Дефіцит K⁺ у тканині збільшується, коли споживання K⁺ є вищим, а втрата K⁺ збільшується більше при більшому, ніж нижчому дефіциті K⁺ у тканині, що вказує на те, що під час гіпокінезії дефіцит K⁺ у тканині зумовлений нездатність організму використовувати K⁺, але не до дефіциту K⁺ у раціоні (Tsiamis C.B., Kakuris K.K., Deogenov V.A., Yerullis K.B., 2008).

Вміст глікогену та активність гексокінази були близькими до контрольних, тоді як активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (G6PD) підвищувалася в тканині печінки щурів після 20-денної гіпокінезії. Гострий стрес (або реадаптаційний стрес) спостерігався у тварин після припинення іммобілізації, який характеризувався зниженням вмісту глікогену та активності гексокінази та G6PD у тканині печінки. Ці досліджені закономірності перевищували контрольні значення протягом першого тижня після іммобілізації, вони ставали схожими на контрольні протягом 10 днів і багаторазово зменшувалися в період між 20 і 30 днями. Лише протягом 45–65 днів реадаптаційного періоду вміст глікогену, а також активність НК та G6PD повністю нормалізувалися (Khasina E.I., Kirillov O.I., 1990).

У даному дослідженні було проведено вимірювання мінералізації, щільності, а також вмісту електролітів у стегновій кістці щурів при тривалій гіпокінезії. Дослідження проводили на 144 самцях щурів Вістар (370-390 г) протягом 15-денного періоду до гіпокінезії та 90-денного періоду гіпокінезії. Щури були порівну розділені на дві групи: гіпокінетичні щури (HKR) та контрольні віварії (VCR). Групу щурів HKR утримували в невеликих індивідуальних клітках. Виміряли щільність мінералізації стегнової кістки, мінеральний вміст золи, вміст кальцію (Ca) і фосфату (P), а також концентрацію Ca та P у плазмі крові. У групі HKR маса тіла, мінералізація стегнової кістки, щільність, вміст мінералів золи, концентрація Ca та P значно зменшилися ($p < \text{або} = 0,01$), тоді як концентрація Ca та P у плазмі значно зросла ($p < \text{або} = 0,01$) порівняно з групою VCR. Виміряні параметри суттєво не змінилися в групі відеомагнітофона в порівнянні з базовими контрольними значеннями. Зроблено висновок, що тривала гіпокінезія спричиняє значне

зниження концентрації електролітів, що супроводжується зниженням мінералізації, щільності та мінерального вмісту золи стегнової кістки щурів (Zorbas Y.G., Charapakhin K.P, Kakurin V.J, Deogenov V.A., 2000).

Важливість вивчення питань щодо механізмів метаболічних порушень гіпокінезії у сучасній клінічній, експериментальній медицині та біології зумовлено тим, що гіпокінезія є однією із найважливіших клінічних характеристик хвороби Паркінсона людини. Хвороба Паркінсона є хронічним прогресуючим нейродегенеративним руховим розладом, що характеризується глибокою та вибірковою втратою нігостриарних дофамінергічних нейронів. Клінічні прояви цього комплексного захворювання включають рухові порушення, що включають тремор спокою, брадикінезію, постуральну нестабільність, утруднення ходи та ригідність. Сучасні ліки забезпечують лише симптоматичне полегшення і не можуть зупинити загибель дофамінергічних нейронів. Основна перешкода в розвитку нейропротекторної терапії пов'язана з обмеженим розумінням процесів захворювання, що призводять до загибелі дофамінергічних нейронів. Хоча етіологія загибелі дофамінергічних нейронів є невловимою, поєднання генетичної схильності та факторів навколишнього середовища, здається, відіграє вирішальну роль. Більшість випадків хвороби Паркінсона є спорадичними, однак відкриття генів, пов'язаних з рідкісними сімейними формами захворювання (що кодують альфа-синуклеїн, паркін, DJ-1, PINK-1 і LRRK2) та дослідження на експериментальних моделях тварин дали вирішальне уявлення про молекулярні механізми патогенезу захворювання та визначені ймовірні цілі для терапевтичного втручання. Останні результати свідчать про мітохондріальну дисфункцію, окислювальне пошкодження, аномальне накопичення білка і фосфорилування білка як ключові молекулярні механізми, що ставлять під загрозу функцію дофамінових нейронів і виживання як основну причину патогенезу як спорадичного, так і сімейної хвороби Паркінсона. У цьому огляді ми надаємо огляд найбільш релевантних висновків, зроблених дослідницькою спільнотою за останній рік, і

обговорюємо, як ці значущі висновки покращили наше розуміння подій, що призводять до нігостріатальної дофамінергічної дегенерації, та визначення потенційних шляхів виживання клітин, які можуть служити цілі для нейропротекторної терапії для запобігання цього неврологічного захворювання, яке призводить до інвалідності (Thomas V., Veal M.F., 2007).

Клінічний діагноз хвороби Паркінсона зосереджений на специфічному моторному синдромі, який характеризується наявністю брадикінезії, а також тремором спокою, ригідністю м'язів або тим і іншим. Нещодавно були випущені нові критерії для діагностики хвороби Паркінсона, які відтворюють моторний синдром як основну ознаку хвороби Паркінсона. Крім цих трьох основних симптомів, при хворобі Паркінсона можуть бути присутніми інші рухові особливості, включаючи труднощі ходи та постуральну нестабільність. Більше того, у пацієнтів з хворобою Паркінсона зазвичай розвиваються рухові ускладнення через 5-10 років після початку захворювання. Ці рухові ускладнення є найсильнішим предиктором патології за хвороби Паркінсона і фактично використовуються клінічно для підтвердження діагнозу. Допоміжні дослідження зазвичай мало корисні і проводяться лише в окремих випадках, що свідчить про важливість клінічного обстеження для встановлення діагнозу хвороби Паркінсона або підозри на інший стан, який може його маскувати (Erro R, Stamelou M., 2017).

Висновок до першого розділу

На основі результатів аналізу літературних даних з питань впливу гіпокінезії на метаболічні процеси в організмі експериментальних тварин та людини було встановлено, що:

- термін «гіпокінезія» досить широко використовуються для опису порушень моторних функцій;
- гіпокінезія впливає на стан серцево-судинної системи, що проявляється підвищенням артеріального тиску та підвищенням частоти серцевих скорочень, розвивається гіпокінетичний стрес;
- у результаті експериментального відтворення гіпокінезії у тварин змінюється метаболізм кісткової тканини, що проявляється зменшенням кісткової маси, порушеннями катаболізму колагену і, як наслідок – зниженням мінеральної щільності кісткової тканини, проте у наукових працях останніх 10 року біохімічних маркерів, які б інформативно віддзеркалювали стан сполучної тканини, не приведено;
- за гіпокінезії в експерименті у щурів розвивається порушення обміну калію, магнію, кальцію та фосфору, змінюється рівень паратгормону, та кальцитоніну в крові.
- актуальність дослідження метаболічних порушень сполучної тканини за гіпокінезії зумовлюється перш за все тим, що гіпокінезія є однією із найважливіших клінічних характеристик хвороби Паркінсона людини, пошук біохімічних маркерів якої на сьогодні є актуальним питанням медицини та біології.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Методи дослідження

В роботі застосовувались наступні методи дослідження:

1. Аналіз літературних джерел.
2. Методики біохімічних досліджень сироватки крові та сечі щодо вмісту метаболітів сполучної тканини.
3. Статистичні методи.

2.1.1. Аналіз літературних джерел

Аналіз літературних джерел дозволив проаналізувати значення гіпокінезії в розвитку метаболічних порушень в організмі експериментальних тварин та встановити його актуальність щодо прикладного значення у клінічній медицині.

Аналіз англomовних наукових статей у зарубіжних виданнях вказує на відсутність достатньої кількості біохімічних маркерів, які б характеризували стан сполучної тканини за гіпокінезії.

2.1.2. Методика визначення вмісту глікопротеїнів в крові

Принцип методу визначення. Розчин фруктози (під час кип'ятіння глюкоза перетворюється на фруктозу) у присутності амонію молібдату та концентрованої сульфатної кислоти дає синє забарвлення, інтенсивність якого залежить від кількості глікопротеїнів.

Норми похибки визначення. Реалізація цієї методики забезпечує відносну похибку визначення глікопротеїнів у біологічних рідинах у межах $\delta = \pm 30\%$, за ймовірності $p = 0,95$. Коефіцієнт варіації $V = \pm 10\%$.

Засоби вимірювання. Реактиви. Матеріали та допоміжне обладнання. 1. Лабораторний скляний посуд, ГОСТ 1770-74, ГОСТ 20292-74. 2. Піпеточні дозатори, ГОСТ 28311-89. 3. Ваги рівноплічні ВР-100 (5,0 г – 100,0 г), 4 класу точності, похибка 50 мг, ГОСТ 24104-88. 4. Ваги загального призначення (10,0 мг – 100,0 г), 4 класу точності, ГОСТ 7328-73. 5. Фотометр фотоелектричний КФК-2МП, КФК – 3 ТУ 3-3.2164-89. 6. Кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм. 7. Розчин трихлороцтової кислоти 25 %, ТУ 6-09-1926-77. 8. Молібденово-сульфатний реактив (хч). 9. Трихлороцтова кислота (ТХО, хч), ГОСТ 61-75. 10. Сульфатна (сірчана) кислота концентрована (хч), ГОСТ 4204-77. 11. Центрифуга ОПН-3, ТУ 5.375-4260-76. 12. Дистильована вода, ГОСТ 6709-72. 13. Водяна баня, ТУ 64.1-2850-80. 14. Крижана баня.

Умови виконання визначення: температура навколишнього середовища – 20 ± 5 °С; атмосферний тиск – 84,0-106,7 кПа; 630–800,3 мм рт. ст. 3) Відносна вологість – 30–80 %.

Підготовка до виконання. Приготування робочих розчинів: 1. *Розчин трихлороцтової кислоти 25 %:* 25 г ТХО (хч) довести до 100 мл дистильованою водою. 2. *Молібденово-сульфатний реактив:* 7,95 г амонію молібдату (хч) помістити в мірну колбу на 500 мл, розчинити приблизно у 350 мл дистильованої води, долити 75 мл концентрованої сульфатної кислоти (хч), охолодити, довести дистильованою водою до мітки. Реактив готують на крижаній бані. Він стабільний у фазі зберігання упродовж одного місяця.

Хід визначення.

Інгредієнти	Дослідна проба	Контрольна проба
1	2	3
Вода дистильована	4,0	4,2
Сироватка крові	0,2	–
Розчин 1	1,0	1,0

Пробу перемішують, поміщають у киплячу водяну баню на 20 хв, потім охолоджують на крижаній бані і центрифугують 5 хв за 2000–3000 об./хв.

1	2	3
Центрифугат	1,0	–
Розчин 2	3,5	4,5

Пробірки з дослідною і контрольною пробами прикривають скляними пробками і ставлять у киплячу баню на 20 хв. Потім охолоджують проточною водою до температури 18–20 °С і колориметрують у кюветах з товщиною шару 10 мм при світлофільтрі з довжиною хвилі 670 нм проти контрольної проби. Глікопротеїни визначають згідно з калібрувальним графіком, який складають за стандартними розчинами фруктози – відповідно 0,1 – 0,2 – 0,3 – 0,4 – 0,5 – 0,75 – 1,0 – 1,25 – 1,5 г/л. Результат виражають у г/л.

2.1.3. Методика визначення сіалових кислот в крові

Принцип методу визначення. У результаті гідролізу безбілкового фільтрату сироватки крові зі складу сіалоглікопротеїнів виділяються сіалові кислоти, які з розчином сульфатної кислоти в льодяній оцтовій кислоті у киплячій водяній бані дають кольорову реакцію.

Норми похибки визначення. Реалізація методики забезпечує відносну похибку визначення сіалових кислот у біологічних рідинах в межах $\pm 30\%$, до ймовірності $P = 0,95$. Коефіцієнт варіації $U = \pm 10\%$.

Засоби вимірювання, реактиви. Матеріали та допоміжне обладнання. 1. Лабораторний скляний посуд, ГОСТ 1770-74, ГОСТ 20292-74. 2. Піпеточні дозатори, ГОСТ 28311-89. 3. Ваги рівноплічні ВР-100 (5,0–100,0 г) 4 класу точності, похибка 50 мг, ГОСТ 24104-88. 4. Ваги загального призначення (10,0–100,0 мг) 4 класу точності, ГОСТ 7328-73. 5. Секундомір механічний СОСпр-26-2-00, ГОСТ 5072-79. 6. Фотометр фотоелектричний КФК-2МП, КФК-3, ТУ 3-3.2164-89. 7. Кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм. 8. Розчин трихлороцтової кислоти 10 %, ТУ 6-09-1926-77. 9. Оцтова кислота, ГОСТ 61-75. 10. Сульфатна кислота, ГОСТ 4204-77. 11. Оцтово-сульфатний реактив. 12. Центрифуга ОГШ-3, ТУ 5.375-4260-76. 13. Дистильована вода, ГОСТ 6709-72. 14. Водяна баня, ТУ 64.1-2850-80. 15. Крижана баня.

Умови виконання визначення. 1. Температура навколишнього середовища – 20 ± 5 °С. 2. Атмосферний тиск – 84,0–106,7 кПа; 630–800,3 мм

рт. ст. 3. Відносна вологість – 30–80 %.

Підготовка до виконання. Приготування робочих розчинів: 1. *Оцтово-сульфатний реактив.* До 95 мл крижаної оцтової кислоти додають невеликими порціями за ретельного перемішування 5 мл концентрованої сульфатної кислоти. Реактив готують на крижаній бані. Він стабільний упродовж одного місяця. 2. *Розчин трихлороцтової кислоти* – 10 мл ТХО кислоти на 100 мл дистильованої води.

Хід визначення.

Компоненти	Дослідна проба	Контрольна проба
1	2	3
Сироватка крові	1,0	–
Розчин ТХО кислоти	1,0	–

Пробу перемішують, ставлять у киплячу водяну баню на 5 хв. Потім охолоджують на крижаній бані і центрифугують 5 хв за 2000–3000 об/хв.

Центрифугат	0,4	–
Оцтово-сульфатний реактив	5,0	5,0

Пробірки з дослідною й контрольною пробами прикривають скляними пробками і ставлять у киплячу баню на 30 хв. Потім охолоджують проточною водою до температури 18–20°C і колориметрують у кюветах з товщиною шару 10 мм при зеленому світлофільтрі (довжина хвилі 500–560 нм) проти контрольної проби.

Оцінка результатів. Визначення сіалових кислот проводять згідно з даними одержаної екстинції досліджуваної проби, яку треба помножити на коефіцієнт 1000. Результат виражають в умовних одиницях (одиниці Гесса). Для переведення із одиниць Гесса у ммоль/л результат дослідження помножують на коефіцієнт 0,0115.

2.1.4. Методика визначення хондроїтинсульфатів в крові

Принцип методу визначення. Хондроїтинсульфати в присутності етакридину лактату спричиняють помутніння сироватки крові, інтенсивність

якого пропорційна їх концентрації.

Норми похибки визначення. Реалізація цієї методики забезпечує відносну похибку визначення хондроїтинсульфатів у сироватці крові в межах 5–15 % за ймовірності $p=0,95$. Коефіцієнт варіації $V = \pm 5 \%$.

Засоби вимірювання. реактиви. матеріали та допоміжне обладнання. 1) Лабораторний скляний посуд, ГОСТ 1770-74, ГОСТ 20282-94. 2) Ваги торсійні ВТ – 500, МРТУ64-1-990-63. 3) Ваги лабораторні 2 класу точності. 4) Секундомір. 5) Холодильник. 6) Фотоелектроколориметр КФК 2МР. 7) Натрію гідроксид. 8) Лимонна кислота (цитрат). 9) Дистильована вода, ГОСТ 6709-72. 10) Натрію хлорид, ГОСТ 4233-77. 11) Оцтова кислота (ацетат), ГОСТ 61-75. 12) Натрію ацетат, ГОСТ 199-78. 13) Етакридину лактат.

Умови виконання визначення. 1. Температура навколишнього середовища – 20 ± 5 °С. 2. Атмосферний тиск – 84.0–106.7 кПа; (630,0–800,3) мм рт. ст. 3. Відносна вологість – 30–80 %.

Підготовка до виконання. Кров для визначення вмісту хондроїтинсульфатів беруть після 12 год голодної дієти в суху пробірку. Це є важливою умовою, оскільки метод ґрунтується на нефелометрії – визначенні мутності розчину.

Приготування робочих розчинів:

1. Ацетатний буфер (а+б):

а) 0,6 мл оцтової кислоти, довести до 100 мл дистильованою водою.

б) 1,36 г натрію оцтовокислого, довести до 100 мл дистильованою водою. 10 мл розчину **а** + 90 мл розчину **б** утворюють 100 мл буфера з рН 5,5.

2. Цитратний буфер (а+б):

а) До 2,1 г лимонної кислоти (цитрату) додати 20 мл 1 М розчину NaOH, довести водою до 100 мл.

б) 0,1 М розчин NaOH. 72,3 мл розчину **а** + 27,7 мл розчину **б** утворюють 100 мл буфера з рН 3.К 100 мл ацетатного буфера + 100 мл цитратного буфера, додати 0,780 г NaCl, рН 5,5.

3. Етакридину лактат – 0,1 М розчин: 3,43 г на 100 мл дистильованої

води. Розчиняти в процесі нагрівання, за необхідності фільтрувати.

4. *Стандарт* – 100 мг хондроїтинсульфату у 100 мл води.

Хід визначення. До 5 мл буфера додати 0,1 мл сироватки крові (мікропіпеткою), 0,1 мл розчину етакридину лактату, через 5 хв вимірювати оптичну густина на ФЕК. Довжина хвилі – 540 нм.

Оцінка результатів. Вимірюють оптичну густина стандартної і дослідної проб, результат виражають у г/л. Розрахунок проводять за формулою: $C_{\text{досл.}} = (100 \times E_{\text{досл.}}) / E_{\text{ст}}$, де $C_{\text{досл.}}$ – концентрація хондроїтинсульфатів, г/л; $E_{\text{досл.}}$ – оптична щільність дослідної проби; $E_{\text{ст}}$ – оптична щільність стандартної проби.

2.1.5. Методика визначення фракцій глікозаміногліканів в крові

Принцип методу визначення. Визначення кількісного вмісту фракцій сульфатованих гексозаміногліканів здійснюється осадженням цих речовин резохіном і поетапним вимиванням фракцій солями натрію хлориду різної концентрації.

Норми похибки вимірювання. Реалізація цієї методики забезпечує відносну похибку визначення фракційного складу та сумарного вмісту гексозаміногліканів у сироватці крові в межах $\pm 9\%$ за ймовірності $p=0,95$. Коефіцієнт варіації $V=\pm 3\%$.

Засоби вимірювання. Реактиви. Матеріали та допоміжне обладнання. 1. Лабораторний скляний посуд, ГОСТ 1770-74, ГОСТ 20282-94. 2. Ваги торсійні ВТ-500, ТУ 64-1-990-72. 3. Піпеточні дозатори, ТУ 9452-001-33189998-95. 4. Центрифуга лабораторна ОПн-3, ТУ 5-375-4260-76. 5. Фотоелектроколориметр КФК-2 МП. 6. Дистильована вода, ГОСТ 6709-72. 7. Папір фільтрувальний, ГОСТ 12026-76. 8. Резохін (хч). 9. Натрію хлорид (хч). 10. Хондроїтин-6-сульфат (стандарт). 11. Хондроїтин-4-сульфат (стандарт). 12. Гепарансульфат (стандарт).

Умови виконання визначення. 1. Температура навколишнього

середовища – 20 ± 3 °С. 2. Атмосферний тиск – 84,0–106,7 кПа. 3. Відносна вологість – 30–80 %.

Підготовка до виконання визначення. Кров для дослідження беруть після 12-годинної голодної дієти в суху чисту пробірку натще, що є важливою умовою, оскільки метод базується на нефелометрії (визначення мутності розчину), а хільоз суттєво завищує результати. Сироватку отримують методом центрифугування за 1000 об./хв протягом 10 хв.

Для дослідження використовують:

1. Розчин резохіну з масовою часткою 0,5 % (осаджувач).
2. 1 М розчин натрію хлориду з молярною часткою.

Хід визначення. Для проведення дослідження використовують 2 пробірки: дослідну та контрольну. В них спочатку вносять реактиви, як наведено в таблиці:

Речовини	Пробірки	
	дослід	контроль
Сироватка крові	0,05 мл	0,05 мл
Дистильована вода	3,35 мл	2,25 мл
Розчин резохіну з масовою часткою 0,5 %	1,00 мл	—

Обидві пробірки струшують і витримують за температури 20 ± 3 °С протягом 30 хв. Через 30 хв вимірюють інтенсивність помутніння в дослідній та контрольній пробірках на фотоелектроколориметрі з властивостями нефелометра, що дозволяє визначати мутність розчину, за довжини хвилі 400 нм у кюветі з товщиною робочого шару 5 мм. Вміст загальних ГАГ у сироватці крові визначають за формулою:

$$D_1 - K_1 = P_{\text{заг.}} \times 100 = \text{загальні ГАГ (в умовних одиницях)},$$

де D_1 – інтенсивність помутніння у дослідній пробірці; K_1 – інтенсивність помутніння у контрольній пробірці; $P_{\text{заг.}}$ – різниця інтенсивності помутніння; 100 – коефіцієнт переведення в умовні одиниці.

Для визначення вмісту *хондроїтин-6-сульфатів (I фракції)* в дослідну та контрольну пробірки додають по 0,05 мл розчину натрію хлориду з молярною

часткою 1,0 моль/л. Пробірки струшують і витримують за температури 20 ± 3 °С протягом 10 хв, після чого вимірюють інтенсивність помутніння в дослідній та контрольній пробірках на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 400 нм у кюветі з товщиною робочого шару 5 мм. Обчислюють різницю в показниках досліду та контролю за формулою:

$$D_2 - K_2 = P_2 (P_2 - P_1) \times 100 = I \text{ фракція ГАГ (в умовних одиницях),}$$

де D_2 – інтенсивність помутніння у дослідній пробірці; K_2 – інтенсивність помутніння у контрольній пробірці; P_2 – різниця інтенсивності помутніння; 100 – коефіцієнт переведення в умовні одиниці.

Для визначення вмісту *хондроїтин-4-сульфатів (II фракції)* у дослідну та контрольну пробірки додають по 0,05 мл розчину натрію хлориду з молярною часткою 1,0 моль/л. Пробірки струшують і витримують за температури 20 ± 3 °С протягом 10 хв, після чого вимірюють інтенсивність помутніння в дослідній та контрольній пробірках на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 400 нм в кюветі з товщиною робочого шару 5 мм. Обчислюють різницю в показниках досліду та контролю за формулою:

$$D_3 - K_3 = P_3 (P_2 - P_3) \times 100 = II \text{ фракція ГАГ (в умовних одиницях),}$$

де D_3 – інтенсивність помутніння у дослідній пробірці; K_3 – інтенсивність помутніння у контрольній пробірці; P_3 – різниця інтенсивності помутніння; 100 – коефіцієнт переведення в умовні одиниці.

Для визначення вмісту *гепарансульфату (III фракції)* в дослідну та контрольну пробірки додають по 0,05 мл розчину натрію хлориду з молярною часткою 1,0 моль/л. Пробірки струшують і витримують за температури 20 ± 3 °С протягом 10 хв, після чого вимірюють інтенсивність помутніння в дослідній та контрольній пробірках на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 400 нм в кюветі з товщиною робочого шару 5 мм. Обчислюють різницю в показниках досліду та контролю та за калібрувальною кривою визначають концентрацію гепарансульфату.

Оцінка результатів. Кожну фракції глікозаміногліканів виражають в ум. од., сумарний вміст глікозаміногліканів виражають складанням всіх фракцій.

2.1.6. Методика визначення оксипроліну в сечі

Принцип методу визначення. Хлорамін окислює діетиламін-бензоальдегід (ДАБА) під час нагрівання з утворенням червоного забарвлення. Наявність оксипроліну кількісно змінює це забарвлення через конкурентність його окиснення хлораміном.

Норми похибки визначення. Реалізація цієї методики забезпечує відносну похибку визначення в межах 5–15 %, за достовірності $P = 0,95$. Коефіцієнт варіації $V = \pm 5 \%$.

Засоби вимірювання. Реактиви. Матеріали та допоміжне обладнання.

1. Лабораторний скляний посуд, ГОСТ 1770-74, ГОСТ 20282-94. 2. Ваги торсійні ВТ-500, МРТУ64-1-990-63. 3. Ваги лабораторні 2 класу точності. 4. Секундомір. 5. Холодильник. 6. Сушильна шафа. 7. Термометр на 100 °С. 8. Фотоелектроколориметр КФК 2МР. 9. Соляна (хлоридна) кислота, ГОСТ 3118-77. 10. Натрію гідроксид. 11. Ізопропіловий спирт. 12. Оксипролін (стандарт). 13. Хлорамін Б. 14. Лимонна кислота (цитрат). 15. Дистильована вода, ГОСТ 6709-72. 16. ДАБА (діетиламінбензоальдегід), ТУ 6-09-3272-77. 17. Натрію цитрат, ГОСТ 22280-76. 18. Хлорна кислота, ТУ 6-09-2878-73. 19. Натрію ацетат.

Умови виконання визначення. 1. Температура навколишнього середовища – $20 \pm 5^\circ\text{C}$. 2. Атмосферний тиск – 84,0–106,7 кПа. 3. Відносна вологість – 30–80 %.

Підготовка до виконання. Для визначення оксипроліну використовують сечу. Для дослідження не можна використовувати сечу кольору «м'ясних помий».

Приготування робочих розчинів:

- 1) 7 н хлоридна кислота.
- 2) 1,75 н натрію гідроксид.
- 3) 50 мг% розчин оксипроліну (перед роботою розвести в 100 разів ізопропіловим спиртом).

4) *Хлорамін Б* готують перед роботою: 70 мг хлораміну Б розчиняють в 1 мл дистильованої води і додають 4 мл буфера.

5) *Буфер*: 3,7 г натрію ацетату + 4,54 г натрію цитрату + 0,55 г цитрату + 38,5 мл ізопропілового спирту, доводять до 100 мл дистильованою водою; рН одержаного буфера – 6,3.

6) *ДАБА* готують перед роботою: 700 мг ДАБА розчинити в 1,6 мл 7 N хлоридної кислоти.

Хід визначення. 1 мл сечі наливають в ампулу об'ємом 5 мл, до неї додають 3 мл 7 N хлоридної кислоти. Ампулу запаюють на полум'ї газового пальника і ставлять на 8 годин у сушильну шафу за температури 100 °С для гідролізу. Після гідролізу вміст ампули переносять у центрифужну пробірку і центрифугують. До 1 мл центрифугату додають 3 мл 1,75 н розчину натрію гідроксиду і нейтралізують до рН = 7. Потім у 3 пробірки наливають по 0,5 мл нейтралізату. До нейтралізату першої (пробірка № 1) і другої (пробірка № 2) пробірок додають по 1 мл ізопропілового спирту, а в третю пробірку (пробірка № 3) наливають 1 мл стандарту. Потім у першу і третю пробірки наливають по 1 мл розчину хлораміну Б. Через 4 хв в усі пробірки додають по 1 мл розчину ДАБА, після чого в другу пробірку (пробірка № 2) додають 0,5 мл розчину хлораміну Б. Потім усі пробірки ставлять на водяну баню при 60 °С точно на 20 хв. Пробірки охолоджують і через 20 хв вимірюють інтенсивність забарвлення на фотоелектроколориметрі з зеленим світлофільтром (540 нм) у кюветі 5 мм проти дистильованої води.

Оцінка результатів. Вимірюють оптичну густина в стандартній і дослідних пробірках на фотоелектроколориметрі. Розрахунок проводять за формулою:

$$\frac{(E_1 - E_2)}{(E_3 - E_1)} \times 5 \times 32 = \text{вміст оксипроліну в сечі (мг/л)},$$

де E_1 – екстинція пробірки № 1; E_2 – екстинція пробірки № 2; E_3 – екстинція пробірки № 3; 5 – стандарт оксипроліну в мг/л; 32 – розведення.

2.1.7. Методика визначення уронових кислот в сечі

Принцип методу визначення. Методика дозволяє визначати вміст уронових кислот у сечі за реакцією із карбазолом та виражати їх концентрацію в мг/л.

Норми похибки визначення. Реалізація цієї методики забезпечує відносну похибку визначення в межах 5–9 %. Коефіцієнт варіації $U = \pm 3 \%$.

Засоби вимірювання. Реактиви. Матеріали та допоміжне обладнання. 1. Тетраборат натрію. 2. Сульфатна кислота концентрована, ГОСТ 4204–72. 3. Карбазол. 4. Натрію гідроксид. 5. Спирт етиловий (етанол) 96 %. 6. Цетавлон (цетримід). 7. Вода дистильована, ГОСТ 6709 – 72. 8. Фотоелектроколориметр КФК–2МП. 9. Водяна баня. 10. Пробірки, ГОСТ 20292–74. 11. Піпетки 5,0 мл, 0,5 мл, ГОСТ 20292–74. 12. Колба мірна, ГОСТ 1770–74. 13. Глюкуронова кислота (стандарт).

Умови виконання визначення. 1. Температура навколишнього середовища – $20 \pm 5^\circ\text{C}$. 2. Атмосферний тиск – 84,0–106,7 кПа. 3. Відносна вологість – 30–80 %.

Метод визначення. Визначення вмісту уронових кислот за інтенсивністю забарвлення з карбазолом за реакцією Diczhe.

Підготовка до виконання. Для визначення уронових кислот використовують сечу. Для дослідження не можна використовувати сечу кольору «м'ясних помийв». Для дослідження використовують:

1. *Борат:* 9,5 г тетраборату натрію розчиняють в 1 л сульфатної кислоти концентрованої.
2. *Розчин карбазолу* з масовою часткою 1,25 г/л на абсолютному спирті.
3. *Розчин натрію гідроксиду (NaOH)* з молярною часткою 0,2 моль/л.
4. *Розчин спирту етилового* у воді з масовою часткою 780 г/л (96%).
5. *Розчин цетавлону* з масовою часткою 125 г/л.

Хід визначення. 30,0 мл добової сечі переносять у пластикову пробірку на 50 мл, додають 1,0 мл 12,5 % розчину цетавлону, потім поміщають на 6–8

год у холодильник за температури 6 ± 4 °С, після цього згусток, що утворився, відокремлюють центрифугуванням за 3 тис об./хв, триразово промивають 30 мл 96° етилового спирту і розчиняють у 10,0 мл 0,1N розчину натрію гідроксиду. До 1,0 мл розчиненого осаду додають 5 мл борату і кип'ятять 10 хвилин на водяній бані. Потім пробірку охолоджують на льоду, додають 0,2 мл розчину карбазолу і знову ставлять у киплячу водяну баню на 15 хв. Проби охолоджують і міряють інтенсивність забарвлення на фотоколориметрі (540 нм) у кюветі на 10 мм (колориметрують проти контролю). Контроль обробляють одночасно з дослідом, але замість розчиненого осаду додають 1 мл 0,1 N розчину NaOH.

Оцінка результатів. Оцінку результатів проводять за калібрувальним графіком, який будують із пробами за концентрацією глюкуронової кислоти 1,0, 2,0; 3,0; 4,0 та 5,0 мг/л.

2.1.8. Статистичні методи

Статистичну обробку цифрових результатів досліджень проведено за допомогою програми Statsoft STATISTICA. Обчислювали середню арифметичну варіаційного ряду (M), стандартну похибку середньої арифметичної (m) та достовірність відмінностей (p) за критерієм Стюдента.

2.2. Організація дослідження

Дослідження проводились на 42 білих щурах-самцях віком 3 та 12 місяців, що утримувались у віварії ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України», м. Харків. В кожній інтактній та дослідній вікових групах було по 7 тварин.

Дослідження проводили відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених на I Національному конгресі з біоетики (Київ, 2001). Умови гіпокінезії відтворювали з використанням

спеціально сконструйованого приладу, який забезпечував обмеження рухливості тварини без порушень вентиляції тіла. Сечу збирали за допомогою спеціального сконструйованого приладу для збирання сечі, який дозволяв відділити сечу від фекалій тварин, на 7, 14, 21 та 30 день спостереження. Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації через 7 та 30 днів іммобілізації під тіопенталовим наркозом, після чого відбирали кров для дослідження. З крові виготовляли сироватку шляхом центрифугування. Вміст сіалових кислот визначали за методом Гесса, глікопротеїнів – за модифікованим методом О.П. Штейнберга та Я.Н. Доценка, хондроїтинсульфатів – за Nemeth-Csoka в модифікації Л.І. Слуцького, фракційний склад глікозаміногліканів (ГАГ) – за реакцією з резохіном. Вміст оксипроліну в сечі визначали за реакцією з хлораміном Б, уронових кислот – за реакцією з карбазолом.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОКАЗНИКІВ МЕТАБОЛІЗМУ ГЛІКОПРОТЕЇНІВ ТА ПРОТЕОГЛІКАНІВ В КРОВІ ЩУРІВ ЗА ГІПОКІНЕЗІЇ

3.1. Динаміка вмісту глікопротеїнів та сіалових кислот в крові щурів за гіпокінезії

Під час дослідження сироватки крові щурів було встановлено, що у інтактних тварин 3-х та 12-місячного віку вміст сіалових кислот був різним – $2,94 \pm 0,16$ та $1,98 \pm 0,09$ ммоль/л відповідно. Після 7-денної гіпокінезії їх концентрація у молодих тварин не змінювалась, проте у тварин старшої групи цей показник збільшувався. Аналогічною була динаміка вмісту глікопротеїнів в сироватці крові (табл. 1).

Таблиця 1

Динаміка вмісту сіалових кислот у сироватці крові щурів за гіпокінезії ($M \pm m$)

Вік, міс.	Термін гіпокінезії, доба	Глікопротеїни, г/л	Сіалові кислоти, ммоль/л
3	Інтактний контроль	$1,38 \pm 0,02$	$2,94 \pm 0,16$
	7 доба	$1,41 \pm 0,02$	$2,82 \pm 0,13$
	30 доба	$1,95 \pm 0,04^*$	$4,20 \pm 0,35^*$
12	Інтактний контроль	$1,23 \pm 0,03$	$1,98 \pm 0,09$
	7 доба	$1,85 \pm 0,02^{**}$	$3,04 \pm 0,24^{***}$
	30 доба	$3,38 \pm 0,08^{***}$	$5,46 \pm 0,49^{***}$

Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ порівняно з інтактним контролем

Очевидно, що на щурів 12-місячного віку іммобілізація впливала більш суттєво на ранніх етапах дослідження. Проте глікопротеїни та сіалові кислоти

не є специфічними маркерами для характеристики метаболізму саме кісткової та хрящової тканини, адже вони є важливим й інформативним тестом для віддзеркалення загальної реакції сполучної тканини організму в період адаптації до гіпокінезії. Глікопротеїни є складними білками сполучної тканини, які віддзеркалюють ступінь запальних порушень. Сіалові кислоти є похідними нейрамінової кислоти, входять до складу молекул олігосахаридів, гліколіпідів, у складі сіаловмісних глікопротеїнів беруть участь у міжклітинних взаємодіях, специфічній рецепції на поверхні клітин, передачі сигналів, транспорті іонів та забезпеченні антигенної специфічності та тканинної сумісності, зазвичай зростають в крові за важких запальних процесів, в тому числі пов'язаних із сполучною тканиною – пухлинами кісткової тканини, остеомієлітом та ревматичними захворюваннями суглобів (Морозенко Д.В., Леонтєва Ф.С., 2016).

У тварин 12-місячного віку відзначалось підвищення концентрації глікопротеїнів та сіалових кислот в сироватці крові як на 7, так і на 30 добу гіпокінезії, особливо на кінцевому етапі експерименту. До 30-ї доби рівень глікопротеїнів та сіалових кислот в сироватці крові раптово збільшувався порівняно з показником у інтактних тварин.

3.2. Динаміка вмісту хондроїтинсульфатів та фракцій глікозаміногліканів в крові щурів за гіпокінезії

Також за гіпокінезії спостерігалось суттєве збільшення концентрації в сироватці крові хондроїтинсульфатів вже на 7 добу експерименту у тварин обох вікових груп, при цьому рівень цих метаболітів на 30 добу був на однаковому рівні.

Таким чином, слід відзначити, що організм щурів реагував на гіпокінезію зростанням в крові даних метаболітів, що зумовлено перебудовою хрящової та кісткової тканини до нових умов функціонування, оскільки відомо, що вони мають важливе значення у метаболізмі хрящової та

субхондральної кісткової тканини (Бойків Д.П., Бондарчук Т.І., Іванків О.Л., 2007). У тварин різного віку спостерігались зміни фракційного складу ГАГ в сироватці крові – хондроїтин-6-сульфату (I фракція), хондроїтин-4-сульфату (II фракція) та гепарансульфату (III фракція). За результатами досліджень, у молодих щурів на 7 добу I фракція залишалась без змін, проте на 30 добу спостерігалось значне її зниження. В цей період підвищувалась II фракція ГАГ (табл. 2).

Таблиця 2

Динаміка вмісту хондроїтинсульфатів та фракцій глікозаміногліканів у сироватці крові щурів за гіпокінезії (M±m)

Вік, міс.	Термін гіпокінезії, доба	Хондроїтин-сульфати, г/л	Фракції ГАГ, Од.		
			I	II	III
3	Інтактний контроль	0,162±0,019	11,60±1,23	3,91±0,50	1,50±0,25
	7 доба	0,271±0,032 ***	13,14±2,53	4,10±0,70	1,55±0,21
	30 доба	0,256±0,024 ***	6,91±0,65 **	6,73±0,40 **	1,80±0,18
12	Інтактний контроль	0,191±0,003	15,63±1,32	7,46±0,64	2,20±0,13
	7 доба	0,222±0,009 *	10,72±0,80 **	5,80±0,40 *	1,67±0,20 *
	30 доба	0,221±0,006 *	11,27±1,40 *	6,24±0,36	1,86±0,32

Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ порівняно з інтактним контролем

У тварин віком 12 місяців на 7 та 30 добу вміст більшості фракцій був нижче значень, які характеризують фракційний склад ГАГ у інтактних щурів.

Це може свідчити про зниження біосинтетичних властивостей клітинних елементів сполучної тканини після 30-добової гіпокінезії. Як відомо, саме ГАГ необхідні організму для підтримання фізико-хімічних та біомеханічних властивостей екстрацелюлярного матриксу сполучної тканини, і перерозподіл їх фракційного складу спричинений саме віковими порушеннями обміну протеогліканів сполучної тканини (Белова С.В., 2013).

Висновки до третього розділу

Динаміка біохімічних маркерів крові, які характеризують метаболізм сполучної тканини, вказує на залежність змін показників від віку та тривалості гіпокінезії. Збільшення вмісту в крові хондроїтинсульфатів у щурів молодшої вікової групи за умов гіпокінезії може свідчити про адаптаційну реакцію з боку хрящової та кісткової тканин скелету, проте у старшій віковій групі за умов гіпокінезії зростання вмісту хондроїтинсульфатів може свідчити про вікові порушення. Адже відомо, що найважливішими компонентами сполучної тканини скелету є хондроїтин-4-сульфат та хондроїтин-6-сульфат, які різняться за фізико-хімічними властивостями, а також розподілом у сполучній тканині різних видів. Так, хондроїтин-4-сульфат переважає у кістковій тканині, хрящі, склері, аорті, а хондроїтин-6-сульфат – у тканинах суглобових хрящів, сухожилків, шкірі, клапанах серця, міжхребцевих дисках (Морозенко Д.В., Левченко В.І., Тимошенко О.В., 2012).

РОЗДІЛ 4

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСКРЕЦІЇ ОКСИПРОЛІНУ ТА УРОНОВИХ КИСЛОТ ІЗ СЕЧЕЮ ЩУРІВ ЗА ГІПОКІНЕЗІЇ

Дослідження екскреції оксипроліну та уронових кислот із сечею було проведено для встановлення їх ролі в катаболізмі колагену і протеогліканів за гіпокінезії. Результати досліджень показали, що кількість оксипроліну, що виділяється із сечею, була значно меншою у щурів віком 12 місяців порівняно із 3-х місячними, що пов'язано із значним зниженням швидкості обміну колагену при старінні, яке проявляється зменшенням екскреції із сечею продуктів його деградації (табл. 3).

Таблиця 3

Динаміка вмісту оксипроліну та уронових кислот в сечі щурів за гіпокінезії ($M \pm m$)

Вік, міс.	Термін гіпокінезії, доба	Оксипролін, мг/добу	Уронові кислоти, мг/добу
3	Інтактний контроль	0,41±0,04	1,16±0,12
	7 доба	0,27±0,03*	1,07±0,44
	14 доба	0,35±0,02	0,78±0,08*
	21 доба	0,59±0,06*	1,59±0,07**
	30 доба	0,12±0,02	0,81±0,11
12	Інтактний контроль	0,11±0,02	2,80±0,41
	7 доба	0,10±0,01	0,92±0,12***
	14 доба	0,12±0,01	1,15±0,45*
	21 доба	0,36±0,04***	2,75±0,72
	30 доба	0,28±0,05**	1,97±0,52

Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ порівняно з інтактним контролем

На 7 день гіпокінезії виділення оксипроліну у тварин віком 3 місяці зменшувалось, у 12-місячних щурів – не відрізнялось від екскреції у інтактних тварин. У подальшому вміст оксипроліну в сечі збільшувався до максимальних значень на 21 день експерименту в обох вікових групах. У 12-місячних тварин показники за гіпокінезії до цього терміну були нижче за молодих тварин, і лише на 30 добу рівень екскреції оксипроліну у щурів 12-місячного віці був вище за показник у 3-місячному віці. Можливо, основним джерелом його утворення є деструкція колагену кісткової тканини кінцівок за рахунок того, що їх функціональне навантаження було найбільшим порівняно з іншими ділянками скелету за розміщення тварин у клітки-пенали

У 12-місячних тварин адаптація до перебування у клітках-пеналах перебігала на іншому рівні порівняно із молодими особинами, оскільки підвищена екскреція оксипроліну була присутня до кінця досліду. Аналіз даних щодо екскреції уронових кислот порівняно з оксипроліном вказує на глибокі відмінності виведення цих метаболітів з організму. Вміст уронових кислот у сечі було значно більшим у щурів віком 1 рік, ніж у молодих тварин. Відомо, що зі збільшенням віку вміст протеогліканів в сполучній тканині знижується, зокрема, зменшується у них частка компонента глікозаміногліканів як якісно, так і кількісно. Цей процес супроводжується інтенсивним виведенням кінцевих продуктів метаболізму протеогліканів із сечею у процесі старіння організму, що було підтверджено дослідженнями уронових кислот у сечі тварин різного віку. Під час адаптації до гіпокінезії спостерігалось значне зниження рівня екскреції уронових кислот: у щурів віком 1 рік упродовж 7 та 14 днів, у 3-місячних – до 14 дня досліду. На 21 добу рівень екскреції у тварин старшої групи відновлювався до рівня інтактної, а у молодшій – досягав максимальних величин. Як було вказано вище, в цей час було відзначено максимальний рівень екскреції оксипроліну в обох групах щурів. Збільшення концентрації уронових кислот в сечі на 21 день гіпокінезії, у порівнянні з іншими термінами спостереження.

Висновки до четвертого розділу

Таким чином, 30-добове обмеження рухливості у віці 3 та 12 місяців спричиняло суттєві зміни метаболізму основних біохімічних компонентів тканин хребтового сегменту – колагену і протеогліканів. Характер цих змін був специфічний для кожного з компонентів та залежав від віку тварин.

Наприкінці спостережень спостерігалась підвищена екскреція оксипроліну, яка була вираженою у тварин старшої вікової групи. У молодому віці особливістю адаптації до гіпокінезії віддзеркалювались у загальній метаболічній реакції, яка характеризувалась відповідною динамікою показників сечі. За рахунок порушень метаболізму компонентів органічного матриксу кісткової та хрящової тканини порушувалась нормальна екскреція оксипроліну.

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

При експериментальному вивченні гіпокінезії у експериментальних тварин і особливо при екстраполяції даних неможливі прямі аналогії з людиною. Однак у всіх видів ссавців мають місце загальні закономірності в генезі дистрофічних пошкоджень кістково-суглобового апарату, причому існують видові особливості реакцій різних відділів системи на дію тих чи інших факторів у тварин і людей. У зв'язку з цим доцільно розглянути структурні особливості сполучної тканини, яка формує кісткову систему та систему з'єднання кісток.

Кісткова та хрящова тканини, які є основними компонентами сегментів скелета як системи, характеризуються певними особливостями структури, що відрізняється переважанням міжклітинного матриксу над клітинним компонентом. Матрикс хряща здатен мінералізуватись та перебудовується в кісткову тканину (енхондральне окостеніння). Для розвитку деяких кісток ця стадія не є обов'язковою і вони формуються за участю кісткових клітин. Проблемі взаємовідносин клітин та позаклітинного матриксу у сучасній хондрології та остеології приділяється особлива увага. Дослідження системи "клітина – міжклітинний матрикс" визнано найбільш перспективним напрямом при вивченні проблеми вікових та патологічних змін тканин кісткової системи.

Морфологічно в кістковій тканині визначаються такі типи клітин: остеогенні клітини-попередники, остеобласти, остеоцити та остеокласти. Остеопрогеніторні клітини за своїми характеристиками подібні до фібробластів. Остеобласти, здійснюють синтез кісткової речовини, характеризуються наявністю добре розвиненого ендоплазматичного ретикулума, містять мітохондрії, апарат Гольджі та лізосоми, характеризуються високою активністю, синтезуючи колаген кісткової тканини і деякі неколагенові білки.

Остеоцити утворюються з остеобластів у лакунах новостворених кісткових структур та нездатні до синтезу кісткової тканини. Пов'язані між собою та з остеобластами на поверхні кістки відростками мембран, що проходять через каналці остеїду, остеоцити формують подібність до синцитію з великою площею

поверхні. Це утворення служить для транспорту іонів, є буферно-бар'єрною зоною кісткової тканини, виконує гомеостатичні функції. Можна припустити, що клітинний синцитій сприймає механічні деформації кісток, сприяючи трансформації механічних сигналів у біомеханічні механізми, що модифікують мембрану клітини та, зрештою, що впливають на синтез молекул біополімерів кісткової тканини. Остеокласти є гетерогенною групою багатоядерних клітин (від 2 до 100 ядер), багатих лізосомальними ферментами, такими як кисла фосфатаза та катепсину, що здійснюють резорбцію мінерального та органічного матриксу. У їх цитоплазмі міститься більше мітохондрій, ніж у цитоплазмі остеобластів, але ендоплазматичний ретикулум розвинений слабше, а рибосомальний апарат сильно редукований. Мембрани остеокластів також формують багато відростків, які пронизують матрикс, досягаючи поверхні кістки. Якщо остеобласти та остецити є похідними клітин-попередників мезенхіми, то остеокласти, як припускають, походять від макрофагів або інших судинних нескелетогенних клітин. Остеобласти і остеокласти мають кілька чітких біохімічних характеристик: маркерним ферментом остеобластів є лужна фосфатаза, а остеокластів – кисла фосфатаза і сукцинатдегідрогеназа.

Якщо клітини хрящової тканини оточені позаклітинною субстанцією, у якій переважають протеоглікани, то клітини кісткової тканини оточені матриксом, у якому більшість припадає на частку фібрилярного колагенового матриксу. Ця відмінність виявляється важливою реакції різних видів сполучної тканини на механічні навантаження.

Колаген, глікозаміноглікани та структурні глікопротеїни – три структурні елементи, що входять до складу міжклітинного матриксу сполучної тканини та забезпечують такі важливі її функції, як біомеханічну, трофічну, захисну та репаративну.

Колаген становить близько 30 % усієї білкової маси організму людини і відіграє основну роль у здійсненні біомеханічної функції сполучної тканини. За останні 10 років ідентифіковано первинну структуру колагену та з'ясовано механізми його надмолекулярної організації у фібрили та волокна. Усі типи

молекул колагену складаються з трьох α -ланцюгів, скручених у триспиральні макромолекули довжиною 300 нм і діаметром 1,5 нм. Декілька таких макромолекул, з'єднаних бічними і поздовжніми зв'язками, утворюють фібрилу. Кожна α -ланцюг колагену містить близько 1000 амінокислотних залишків, причому, за винятком коротких кінцевих послідовностей, кожна третя амінокислота є гліцином. Триспиральна конформація залежить також від присутності проліну та оксипроліну – двох ригідних циклічних амінокислот. Без оксипроліну потрійна спіраль нестабільна за температури тіла. Крім відмінностей у генетично детермінованій амінокислотній послідовності, α -ланцюги розрізняються за вмістом оксипроліну, оксилізину та глікозилізованого оксилізину – продуктів посттрансляційної модифікації колагену.

Продуктом трансляції в рибосомах є незрілі про- α -ланцюги. Дозрівання або процесинг здійснюється внутрішньо- і позаклітинно. Внутрішньоклітинний процесинг включає відщеплення протеазою (протеазами) сигнальних послідовностей, гідроксилювання проліну і лізину, утворення міжланцюгових дисульфідних зв'язків і, нарешті, скручування ланцюгів в потрійну спіраль.

Як тільки спіралізація про-колагену закінчується, він секретується із клітин, причому швидкість секреції прямо залежить від швидкості спіралізації. Позаклітинний процесинг полягає в перетворенні про-колагену і здійснюється за допомогою принаймні двох ферментів: про-К-амінопротеази і про-К-карбоксипротеази в присутності Ca^{2+} . Після відщеплення кінцевих пропептидів молекули колагену понтанно збираються в фібрили.

Деградація колагену здійснюється колагеназою. Цей фермент розщеплює нативний колаген при фізіологічних умовах на два нерівні фрагменти: С-(25 %) і N-термінальний (75 %). Відомо кілька інгібіторів колагенази (ЕДТА, цистеїн, а-антитрипсин) та встановлено, що її дія контролюється стероїдними гормонами. Колагеназа з різною ефективністю розщеплює певні типи колагену.

Колаген кісткової тканини становить 70–75% всього її білкового компонента і відноситься до колагену, що відноситься до 1 класу колагенів.

Колаген хряща відноситься до II типу 1 класу колагенів, які відрізняються за амінокислотним складом від α -ланцюгів колагену I типу. Крім того, відомо близько 11 різновидів мінорних колагенів, функція яких, імовірно, полягає в участі у процесі диференціації сполучної тканини, що зумовлює її високу адаптаційну пластичність. У нормальній кістці менше, ніж 5 % загального колагену, посідає частку колагенів іншого типу, ніж I тип колагену. При захворюваннях скелета збільшується вміст його нетипових форм.

Згідно з сучасними уявленнями, колаген грає роль пасивної матриці для орієнтованого розташування мінеральних структур і необхідні спеціальні механізми для фіксації клітин до кісткового матрикса. Аналогічна думка була висловлена раніше, яка полягає в тому, що колагени є пасивними інформаційними системами. В організмі колаген піддається безперервному синтезу та розщепленню під час модифікацій структур, відновлення та зростання тканин, а також у процесі диференціювання тканин, при хворобливих станах або в процесі старіння.

Якщо анатомо-гістологічні та біохімічні характеристики хребців, суглобів та зв'язкового апарату принципово мало відрізняються від тих самих характеристик кісток та суглобів іншої локалізації, то структурно-метаболичні особливості міжхребцевих дисків не мають аналогів в організмі і вони можуть розглядатися як окрема структура. У структуру міжхребцевого диска входять майже три різновиди хрящової тканини – волокнистий (типовий фіброзний) хрящ фіброзного кільця, специфічний різновид хрящової тканини драглистого ядра і типовий гіаліновий хрящ замикальних пластин. Вважається, що драглисте ядро діє гідростатично у передачі вертикальних навантажень на фіброзне кільце. Клітинний склад міжхребцевого диска неоднорідний. Клітини гіалінових замикальних пластин є типовими округлими хондроцитами.

В області контакту з кістковою тканиною тіла хребця є шар мінералізованого хряща, в якому відбувається з'єднання волокнистих структур кісткової тканини тіл хребців з волокнами хрящового матриксу. Під мінералізованим шаром хряща розташовується типовий гіаліновий хрящ зі "стовпцевими" групами хондроцитів. У замикальних пластинах при ультраструктурних дослідженнях виявлені тонкі звивисті каналці, що

з'єднують губчасту кісткову тканину з пульпозним ядром і забезпечують (частково) трофіку останнього. Клітини фіброзного кільця та пульпозного ядра важко класифікувати. Одні автори описують їх як хондроцити, інші як фіброцити. Деякі визначають як хондроцити та фіброцити в одній і тій же тканині. Клітини зовнішнього відділу фіброзного кільця, подібні до клітин сухожилля, класифікуються як типовий фіброзний хрящ.

Найбільш складною є визначення клітинного складу пульпозного ядра. Часто трапляються твердження, що його клітини походять з ембріональної нотохорди. Действельно, нотохондральні клітини присутні в пульпозному ядрі в період раннього розвитку, наприклад, у людини віком до 10 років. У деяких ссавців, наприклад у кішок, нотохондральні клітини присутні у пульпозному ядрі протягом усього життя.

Проте даних про диференціацію нотохондральних клітин у клітини зрілого пульпозного ядра, незважаючи на їх повільне зникнення, немає. Нотохорд розглядається як етап розвитку пульпозного ядра дорослого організму, але не як його попередник. Вважають, що у зрілому віці клітини пульпозного ядра мезенхі-мального походження і класифікуються як спеціалізовані хондроцити. Хондроїдні клітини пульпозного ядра дійсно мають багато спільного з хондроцитами, але за антигенними та деякими іншими властивостями явно відрізняються від них. Аутоіммуногенні властивості тканини пульпозного ядра відіграють важливу роль у патогенезі остеохондрозу хребта, у залученні інтактних міжхребцевих дисків до загального дистрофічного процесу за рахунок аутоімунних факторів, що виходять з дегенерованих дисків. Хондроїдні клітини пульпозного ядра великими відростками, з великим ядром, що містить кілька ядерців. У їхній цитоплазмі є розвинена ендоплазматична мережа мітохондрій, гранули глікогену. Вони розташовуються у пульпозному ядрі в одиночному порядку або невеликими групами. Кількість їх невелика. У перехідній від пульпозного ядра до фіброзного кільця зоні зростає клітинна популяція з перевагою фібробластів.

У сукупності клітинний склад міжхребцевого диска можна як діапазон спеціалізованих хондроцитів. Багато клітин пульпозного ядра виглядають як нежиттєздатними, і в людини це, принаймні, є ознакою фізіологічну норму. Вже у

новонароджених зустрічаються хондроїдні клітини із ознаками дистрофії. Тим не менш, клітинний склад пульпозного ядра збільшується з віком, про що свідчить зростання кількості ДНК у тканині пульпозного ядра в онтогенезі. Це свідчить про важливу роль клітин тканин міжхребцевого диска у підтримці його активного функціонування протягом життя індивідуума.

Структура хребетних сегментів різних відділів хребта досить повно описано у літературі. Однак значно менше відомостей є про відмінності між ними та специфічні особливості їх будови.

Хрящова тканина міжхребцевого диска людини та тварин складається з колагену I та II типу. При вивченні біохімічного складу міжхребцевих дисків було встановлено, що I тип колагену виявлений по зовнішній частині фіброзного кільця, тоді як II тип - був присутній на внутрішній частині та у складі пульпозного кільця. Загалом, незалежно від віку індивідуума, вміст колагену у фіброзному кільці було вище, ніж у пульпозному ядрі, і збільшувалося у напрямку зовнішньої частини.

Важливо відзначити, що у людини вміст колагену в кільці збільшується у напрямку до нижніх відділів хребта (в діапазоні Th12 – S1) у тій же мірі, що й у напрямку зовнішніх відділів кільця. Сукупність відомостей про структуру колагену свідчить про те, що I тип колагену міститься, в основному, в щільних, паралельно розташованих колагенових фібрил, а II тип колагену – переважно в зонах, багатих протеогліканами. У фіброзному кільці можуть бути гібридні волокна з комбінацією I і II типів колагену, які можуть бути синтезовані різними фібробластами. Вміст колагену в пульпозному ядрі людини досить стійкий після 10 років і залишається приблизно на одному рівні після 25-річного віку. Водночас вміст води протягом життя у пульпозному ядрі поступово зменшується від 90 % при народженні до 80 % – у віці 20 років, до 70 % – у віці 80 років. У центрі пульпозного ядра вміст колагену та протеогліканів досить стабільний протягом усього життя організму. У периферічних відділах ядра відзначається збільшення колагену з віком.

У цілому, якщо в тканині диска у дітей 5-річного віку на I тип колагену припадає 53 %, а на II тип – 47 %, то у 60-річних співвідношення становить 44 % та 56 %,

відповідно. В основному, відношення колагену I типу та II типу у людини з віком змінюється незначно. Однак, можливо, локальні зміни розподілу обох типів мають місце. Тонкі зміни у механізмі синтезу колагену можуть протягом тривалого часу змінювати структуру та послаблювати біомеханічні властивості фіброзного кільця у скомпрометованому диску. Зокрема збільшення II типу колагену в присутності I типу може знижувати силу натягу кільця. Багато хто з неколагенових білків входить до складу протеогліканів і значно перебудовується з віком. У міру елімінування з тканин дисків хондроїтінсульфатів зростає частка участі в структурі міжклітинної речовини неколагенових білків. Основним білковим компонентом є еластин, з якого складаються еластичні волокна, подібно до того як основним компонентом колагенових волокон є колаген (Слуцький Л.І., 2009).

Еластичні волокна поширені переважно в органах та тканинах, функція яких пов'язана з великими деформаціями під дією малих навантажень з повним (еластичним) відновленням форми після припинення деформуючого впливу (аорта, легені, зв'язковий апарат). Еластичні волокна були виявлені у структурних компонентах міжхребцевого диска при електронно-мікроскопічних дослідженнях. У великій мірі вони сконцентровані в області між пульпозним ядром та фіброзним кільцем. Сліди еластину було визначено у пульпозному ядрі бика, проте розташування волокон було досить рідкісним. Очевидно, еластин є додатковим чинником, який забезпечує функцію колагену, зберігає форму органу за його механічних деформаціях.

У порівнянні з іншими видами сполучної тканини, міжхребцевий диск надзвичайно багатий на неколагенові білки, багато з яких є глікопротеїнами, міцно пов'язаними з колагеновими фібрилами. У процесі природного старіння відзначається збільшення вмісту неколагенових білків у тканинах міжхребцевого диска, особливо в пульпозному ядрі, що супроводжується зниженням рівня глікозаміногліканів. Для пульпозного ядра це збільшення становить від 20 до 45 %, а фіброзного кільця від 5 до 25 % протягом періоду життя. Неколагенові білки багаті на тирозин, який умовно вважається їх специфічною міткою. Вони визначають пружно-деформаційні властивості фіброзного кільця диска. В даний час виявлено три

різновиди неколагенових білків. У дітей фіброзне кільце містить неколагеновий білок з високим потенціалом набухання. У віці старше 25 років основне місце займає (3-протеїн, який є впорядкованою кристалічної структурою; це можна пов'язати з оптимальною стабілізацією пружно-деформативних властивостей міжхребцевих дисків у молодому віці. У фіброзному кільці групи старше 50 років встановлено наявність третього типу білка, який має високу електронну щільність і характерний для старшого віку. За даними Л.І.Слущького (2009), тирозину, що є характерною складовою неколагенових білків, як у пульпозному ядрі, так і фіброзному кільці набагато менше, ніж оксипроліну. З віком вміст тирозину збільшується, особливо у фіброзному кільці (від $0,67 \pm 0,04$ до $1,16 \pm 0,13$ г у 3-му поперековому диску), у пульпозному ядрі збільшення вмісту тирозину незначне. При дистрофічних змінах зберігалася така закономірність: кількість тирозину підвищувалося, але більшою мірою, ніж у процесі природної інволюції. Передбачається, що в міру старіння міжхребцеві диски можуть акумулювати неколагеновий білок, порівняно з іншими макромолекулярними утвореннями. Форма молекул та структура акумульованих білків не визначена.

Неколагенові білки – велика група сполук, структура та функції яких поступово набуває більш конкретного виразу. Вони пов'язані з колагеном нековалентним зв'язком і поліфункціональні. У цю групу входять усі білки неколагенової природи, що виявляються у сполучній тканині, як у вільному стані, так і в комплексах протеогліканів та глікопротеїнів.

До групи нектинів відносяться структурні глікопротеїни, локалізовані переважно в ділянці базальних мембран і які володіють адгезивними властивостями (фібронектин). Вони здійснюють зв'язок клітин з фібрилами, з'єднуючи їх між собою та з агрегатами протеогліканів. Основними неколагеновими білками, що синтезуються кістковими та хрящовими клітинами, є: кісткові фосфопропротеїни (функція – регуляція процесу мінералізації); остеонектин та хондронектин (зв'язування мінерального компонента кістки та фібрил колагену, регуляція швидкості росту мінерального компонента кістки); остеокальцин (в хрящі — хондрокальцин) (зв'язування кристалів гідроксіапатиту) і подібний до нього, але

більшого розміру та міцно пов'язаний з матриксом, так званий, гла-білок (участь у мінералізації, зв'язування розчинного кісткового морфогенетичного білка та доставка його до клітин), сіалопротеїн (участь у транспорті кальцію); "структурний глікопротеїн" (стабілізація колагенових структур), кістковий морфо-генетичний білок (остеоіндуктивний ефект) та протеоглікани, а також інші компоненти. Позаклітинний матрикс впливає на функції клітин, як активну інформаційну систему, як єдине ціле, регулюючи їх мітотичну та біосинтетичну активність. Також визначають мінералізацію тканин як процес, індукований органічним матриксом, під контролем живих клітин, об'єднуючий всі три компоненти сполучної тканини в діалектичній єдності.

Первинна структура еластину подібна до первинної структури колагену, хоча кількість залишків оксипроліну в першому в 10 разів менша, ніж у колагені. Еластин містить також значно менше аспаргінової та глютамінової кислот та аргініну та значно більше валіну та аланіну. Еластин дуже бідний полярними амінокислотними залишками, що, мабуть, обумовлює його еластичність, оскільки окремі фабрили в цьому випадку мають значну кінетичну свободу по відношенню один до одного.

Найважливішим компонентом позаклітинного матриксу сполучної тканини є протеоглікани. Їх синтез здійснюється спеціалізованими клітинами, остеобластами та хондробластами, а функції дуже різноманітні: від інгібування процесу кальцифікації до участі у морфогенезі кістки та хряща. Протеогліканові агрегати складаються з центральних ниток гіалуронової кислоти, з якою пов'язані окремі протеоглікани у вигляді нековалентного зв'язку з коровими білками. Інші зв'язкують білки також є частиною комплексу і стабілізують агрегат. До корових білків приєднуються молекули глікозаміногліканів (ГАГ) — хондроїтин-4- та 6-сульфатів, дерматан-сульфату, гепарансульфату, гепарину та кератансульфату. Полісахариди та білкові частини молекул протеогліканів з'єднані міцним ковалентним зв'язком. Ця сполука здійснюється за допомогою С-глюкозидного зв'язку між ОН-групами серину, галактозою та ксилозою (крім кератансульфату), а з глікопротеїнами, колагеном та еластином протеоглікани з'єднані іонними та водневими зв'язками.

Сульфатування протеогліканів є останнім етапом у їхньому біосинтезі.

Білкеве ядро полімеру містить три області: - область зв'язування гіалуронової кислоти становить близько 1/3 загальної довжини білкового стрижня; кератансульфат багаті області - займають 1/10 частину; область, багата на хондроїтинсульфати, варіює по довжині і зв'язує близько 90% ланцюгів хондроїтинсульфатів. Протеоглікани виконують трофічну (транспорт води, солей, ліпідів), репаративну (випереджальне накопичення ГАГ у місцях активного фібриллогенезу) та механічну функції (взаємодія протеогліканів з фібрилярними утвореннями у формі просторової структури). У кістки та хрящі більшість протеогліканів існує у формі агрегатів, які не допускають відкладення на прилеглих білкових стрижнях мінералів, не даючи їм зростати до критичної величини.

Розпад чи зміна структури агрегатів знімає їх інгібуючу дію зростання мінералів. Агрегати можуть дисоціювати під впливом таких неспецифічних факторів, як розчини деяких солей або зменшення рН, під дією гіалуронідази та лізоциму. При цьому відбуваються зміни в структурі матриксу, кисневому забезпеченні тканини, метаболізму клітин, концентрації кальцію в мітохондріях та везикулах матриксу. Зменшення вмісту протеогліканів може стимулювати біосинтетичну активність хондроцитів, а збільшення концентрації гіалуронової кислоти перешкоджає новоутворенню протеогліканів.

Дефект у будь-якій з ланок цього ланцюга процесу може призвести до аномальної зрадиням сполучної тканини, що впливає на розміри та форму органу. Встановлено, що суглобові хрящі та хрящі тіл хребців містять у складі матриксу майже виключно хондроїтин-6-сульфат, тоді як хрящі платівки росту та субартікулярної зони – приблизно рівні кількості хондроїтину 4- та 6-сульфату. Матрикс хряща зрілого організму містить у структурі протеогліканових агрегатів тільки хондроїтин-6-сульфат, тоді як у організмі, що росте, переважає хондроїтин-4 сульфат. Останнє свідчить про його важливу роль у процесі мінералізації. Хондроїтинсульфат складається з повторюючисахаридних одиниць N-ацетилгалактозаміну і глюкуронової кислоти, а кератансульфат – з N-ацетилглюкозаміну і галактози.

У міру старіння організму відбувається зменшення розмірів мономерів протео-

гліканів і ланцюгів хондроїтинсульфатів або за рахунок їх відриву від ланцюга гіалуронової кислоти, або за рахунок послаблення їх зв'язків з колагеновими структурами. У міжхребцевих дисках вміст протеогліканів у пульпозному ядрі більше, ніж у фіброзному кільці, що знаходиться у зворотній залежності із вмістом колагену. Відношення кератансульфату до хондроїтинсульфату в протеогліканах диска збільшується з віком і по-різному між окремими дисками, а також між пульпозним ядром і фіброзним кільцем у молодих і зрілих індивідуумів. Кількість кератансульфату зростає на тлі нестачі хондроїтинсульфату. Загалом у міжхребцевому диску ставлення кератансульфатів до хондроїтинсульфатів у протеогліканах значно вище, ніж у інших хрящових тканинах. При порівнянні структури протеогліканів кісткової та хрящової тканин встановили, що, якщо в мінералізованому хрящі, крім колагену II типу, містяться високоагреговані протеоглікани, деякі малі протеоглікани та кілька різновидів неколагенових білків, (включаючи хондрокальцин), то в губчастій та компактній кістковій тканині, крім I типу колагену, містяться малі агрегати протеогліканів та неколагенові білки, відсутні у мінералізованому хрящі. Важливий той факт, що деградація останніх супроводжується збільшенням мінерального компонента від 70% до 95%, можливо через те, що при цьому звільняються поверхні кристалів, що створює передумови для їх подальшого зростання. У хрящі великі гідродинамічні розміри молекули протеогліканів знижують швидкість дифузії, уповільнюючи процес відкладення мінералів. Osteобласти синтезують протеоглікани менших величин. Такі біокромоллекули, як було встановлено, акумулюються в зонах провізорної кальцифікації.

Отже, структура та функції тканин, що входять до складу компонентів сполучної тканини, залежать від комплексу взаємодій між клітинами та матриксом. Концентрація кальцію в тканинних рідинах і клітинах також є ключовим моментом у процесах контролю метаболізму кісткової та хрящової тканин, оскільки ці процеси забезпечують кінцевий етап адаптації тканин – їх мінералізацію. Гіпокінезія в свою чергу відповідним чином впливає на стан сполучнотканинних елементів скелету, зокрема, на обмін колагену і протеогліканів, і, як свідчать результати наших досліджень, цей вплив зумовлений двома факторами: віком тварин та тривалістю позбавлення рухової активності.

ВИСНОВКИ

1. На основі результатів аналізу літературних даних з питань впливу гіпокінезії на метаболічні процеси в організмі експериментальних тварин та людини було встановлено, що термін «гіпокінезія» досить широко використовуються для опису порушень моторних функцій; гіпокінезія впливає на стан серцево-судинної системи, що проявляється підвищенням артеріального тиску та підвищенням частоти серцевих скорочень, за гіпокінезії розвивається гіпокінетичний стрес; у результаті експериментального відтворення гіпокінезії у тварин змінюється метаболізм кісткової тканини, що проявляється зменшенням кісткової маси, порушеннями катаболізму колагену і, як наслідок – зниженням мінеральної щільності кісткової тканини, проте у наукових працях останніх 10 років біохімічних маркерів, які б інформативно віддзеркалювали стан сполучної тканини, не приведено; гіпокінезія є однією із найважливіших клінічних характеристик хвороби Паркінсона людини, тому пошук біохімічних маркерів гіпокінезії на сьогодні є актуальним питанням медицини та біології.

2. Динаміка біохімічних маркерів крові, які характеризують метаболізм сполучної тканини, вказує на залежність змін показників від віку та тривалості гіпокінезії. Збільшення вмісту в крові хондроїтинсульфатів у щурів молодшої вікової групи за умов гіпокінезії може свідчити про адаптаційну реакцію з боку хрящової та кісткової тканин скелету, проте у старшій віковій групі за умов гіпокінезії зростання вмісту хондроїтинсульфатів може свідчити про вікові порушення.

3. Встановлено, що 30-добова гіпокінезія спричиняла суттєві порушення стану сполучної тканини, що віддзеркалювалось у змінах біохімічних показників сироватки крові експериментальних щурів та було пов'язано із змінами метаболізму основних біохімічних компонентів тканин хребтового сегменту – колагену і протеогліканів; характер цих змін був специфічний для кожного з компонентів та залежав від віку тварин.

4. Наприкінці спостережень було встановлено підвищена екскреція оксипроліну, яка була вираженою у тварин старшої вікової групи. У молодому віці особливістю адаптації до гіпокінезії віддзеркалювались у загальній метаболічній реакції, яка характеризувалась відповідною динамікою показників сечі. За рахунок порушень метаболізму компонентів органічного матриксу кісткової та хрящової тканини порушувалась нормальна екскреція оксипроліну.

5. Визначення у сироватці крові глікопротеїнів, сіалових кислот, фракцій ГАГ та хондроїтинсульфатів, можна представити в якості комплексу біохімічних тестів для оцінки порушень метаболізму сполучної тканини під час обмеження рухової активності організму.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ПЕРШОДЖЕРЕЛ

1. Белова С.В. Метаболические особенности хондротинсульфата в обеспечении нормального функционирования соединительной ткани. Успехи физиологических наук. 2013. № 3(44). С. 77–84.
2. Біохімічні показники стану сполучної тканини у діагностиці хвороб собак і котів: методичні рекомендації / Д.В. Морозенко, В.І. Левченко, О.П. Тимошенко. – Біла Церква, 2012. – 42 с.
3. Бойків Д.П., Бондарчук Т.І., Іванків О.Л. [та ін.]. Біохімічні показники в нормі і при патології. За ред. О.Я. Склярова. К., Медицина, 2007. 320 с.
4. Морозенко Д.В., Леонтьєва Ф.С. Методи дослідження маркерів метаболізму сполучної тканини у сучасній клінічній та експериментальній медицині. Молодий вчений: науково-практичний журнал. 2016. № 2(29). С. 168–172.
5. Паршин П.А., Востроилова Г.А., Хохлова Н.А., Чаплыгина Ю.А. Метаболический статус белых крыс при гипокинезии и его фармакокоррекция аминоселеном. *Ветеринарная патология*. № 4. 2019. С. 49–54.
- 6.
7. Adynamic Bone Decreases Bone Toughness During Aging by Affecting Mineral and Matrix. Ng AH, Omelon S, Variola F, Allo B, Willett TL, Alman BA, Grynblas MD. *J Bone Miner Res*. 2016 Feb;31(2):369-79. doi: 10.1002/jbmr.2702. Epub 2015 Oct 6.
8. Aguado E., Mabileau G., Goyenvalle E., Chappard D. Hypodynamia Alters Bone Quality and Trabecular Microarchitecture. *Calcif Tissue Int*. 2017. 100(4). P. 332–340. doi: 10.1007/s00223-017-0235-x. Epub 2017 Feb 3.
9. Biochemical aspects of the influence of antiorthostatic hypokinesia on the experimental peritonitis. Panchenkov DN, Baranov MV, Astakhov DA, Nechunaev AA, Leonov SD, Behteva ME. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2013 Jan-Mar;(1):56-60.

10. Changes in some parameters of carbohydrate and lipid metabolism in rats with adrenaline administration in the rehabilitation period after hypokinesia. Telushkin PK, Potapov PP. *Aviakosm Ekolog Med.* 1993 Jan-Feb;27(1):64-6.

11. Cilindro C., Gholamalishahi S., La Torre G., Masala D. Efficacy of the curves training program for losing body weight, body circumferences and fat mass percentage: a non-randomized clinical trial. *Clin Ter.* 2019. 170(4). P. 235–240. doi: 10.7417/CT.2019.2139.

12. Combined Effects of Hypokinesia and Ambient Temperature on Heart Remodeling in Normotensive and Hypertensive Rats. Shmakov DN, Nuzhny VP, Kibler NA. *Bull Exp Biol Med.* 2019 Oct;167(6):720-722. doi: 10.1007/s10517-019-04607-9. Epub 2019 Oct 26.

13. Development, validation and characterization of a novel mouse model of Adynamic Bone Disease (ABD). Ng AH, Willett TL, Alman BA, Grynepas MD. *Bone.* 2014 Nov; 68:57-66. doi: 10.1016/j.bone.2014.07.037. Epub 2014 Aug 8.

14. Effect of NO synthase blockade on NO production in rat heart under conditions of hypokinesia. Zaripova RI, Gainutdinov KhL, Zefirov TL. *Bull Exp Biol Med.* 2014 Sep;157(5):545-7. doi: 10.1007/s10517-014-2610-1. Epub 2014 Sep 27.

15. Effect of hypokinesia on calcium loss in calcium-supplemented and -unsupplemented rats. Zorbas YG, Kakuris KK, Deogenov VA, Neophitos EA. *Arch Med Res.* 2008 Jul;39(5):496-502. doi: 10.1016/j.arcmed.2008.04.001.

16. Effects of Anti-Orthostatic Hypokinesia on the Parameters of Vertical Posture: Orthostatic and Stabilometric Study. Orlov DO, Sukhostavtseva TV, Shpakov AV, Puchkova AA, Stavrovskaya DM, Sedelkova VA, Artamonov AA. *Bull Exp Biol Med.* 2020 May;169(1):9-12. doi: 10.1007/s10517-020-04813-w. Epub 2020 May 31.

17. Effects of chronic hypokinetic stress on microhemodynamics of tissue. Chuyan EN, Ravaeva MY. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 2015 Mar;101(3):316-25.
18. Effects of preliminary hypokinetic stress on sensitivity of the bone marrow to the hypoplastic effect of exogenous glucocorticoid. Tseilikman VE, Osikov MV, Strelnikova LA, Filimonova TA, Strelnikov IV, Tseilikman OB, Kozochkin DA, Sinitskiy AI, Pankov NE, Pankova NA. *Bull Exp Biol Med*. 2013 Sep;155(5):601-4. doi: 10.1007/s10517-013-2204-3.
19. Effects of hypokinesia on cyclic nucleotides and hormonal regulation of calcium metabolism in rats. Chek JB, Laniko AI. *East Afr Med J*. 2002 Apr;79(4):210-3. doi: 10.4314/eamj.v79i4.8881.
20. Electrolytes in femur and plasma of rats during prolonged restriction of motor activity. Zorbas YG, Charapakhin KP, Kakurin VJ, Deogenov VA. *Acta Astronaut*. 2000 Nov;47(10):781-8. doi: 10.1016/s0094-5765(00)00118-1.
21. Exercise and suspension hypokinesia-induced alterations in mechanical properties of rat fast and slow-twitch skeletal muscles. Ertunc M, Atalay A, Yildirim M, Onur R. *Acta Physiol Hung*. 2010 Sep;97(3):316-25. doi: 10.1556/APhysiol.97.2010.3.8.
22. Fluid electrolyte changes during prolonged restriction of motor activity in rat. Zorbas YG, Federenko YF, Cherapakhin KP, Kuznetsov NK, Yarulin VL, Federov MA. *J Physiol Biochem*. 1998 Mar;54(1):33-40.
23. Glycogen level and activity of carbohydrate metabolism enzymes in the liver of rats during the readaptation period after a 20-day hypokinesia. Khasina EI, Kirillov OI. *Vopr Med Khim*. 1990 May-Jun;36(3):43-5.
24. Grigorenko D.E., Aminova G.G., Vasianina K.A. Morpho functional state of the peripheral organs of the immune system in rats after the hypokinesia and in the period of rehabilitation. *Morfologiya*. 2013. 144(6). P. 47–51.
25. Haloperidol-induced hypokinesia in rats is differentially affected by the light/dark phase, age, and melatonin. Hussain S, Villarreal S, Ramirez N, Hussain

A, Sumaya IC. *Behav Brain Res.* 2020 Feb 3;379:112313. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112313. Epub 2019 Nov 9.

26. Hemostatic system in Wistar rats in different types of oxidative stress. Romanovskaya VN, Staroselskaya AN, Zhavoronkov LP. *Bull Exp Biol Med.* 2012 Jul;153(3):309-12. doi: 10.1007/s10517-012-1702-z.

27. Hypodynamia Alters Bone Quality and Trabecular Microarchitecture. Aguado E, Mabillean G, Goyenvalle E, Chappard D. *Calcif Tissue Int.* 2017 Apr;100(4):332-340. doi: 10.1007/s00223-017-0235-x. Epub 2017 Feb 3.

28. Morphological characteristic of a motor unit afferent limb in hypokinesia. S.L. Popel. *Morfologiya.* 2014;145(1):28-33.

29. Muscle electrolyte measurements during and after hypokinesia in determining muscle electrolyte depletion during hypokinesia in the rat. Zorbas YG, Kakurin VJ, Denogradov SD, Luzhkov SH, Neofitov AC. *Biol Trace Elem Res.* 2002 Winter;90(1-3):155-73. doi: 10.1385/BTER:90:1-3:155.

30. Parkinson's disease. Thomas B, Beal MF. *Hum Mol Genet.* 2007 Oct 15;16 Spec No. 2:R183-94.

31. Potassium loss with tissue potassium deficiency in rats during hypokinesia. Tsiamis CB, Kakuris KK, Deogenov VA, Yerullis KB. *Arch Med Res.* 2008 Apr;39(3):292-8. doi: 10.1016/j.arcmed.2007.10.002. Epub 2007 Dec 26.

32. Remobilization through stretching improves gait recovery in the rat. Cação-Benedini LO, Ribeiro PG, Gomes AR, Ywazaki JL, Monte-Raso VV, Prado CM, Mattiello-Sverzut AC. *Acta Histochem.* 2013 Jun;115(5):460-9. doi: 10.1016/j.acthis.2012.11.001. Epub 2012 Dec 23.

33. Schlecht S.H., Pinto D.C., Agnew A.M., Stout S.D. Brief communication: the effects of disuse on the mechanical properties of bone: what unloading tells us about the adaptive nature of skeletal tissue. *Am J Phys Anthropol.* 2012. 149(4). P. 599–605. doi: 10.1002/ajpa.22150. Epub 2012 Oct 19.

34. Sensorial, structural and functional response of rats subjected to hind limb immobilization. Santos-Júnior FF, Pires Ade F, Ribeiro NM, Mendonça VA,

Alves JO, Soares PM, Ceccatto VM, Assreuy AM. *Life Sci.* 2015 Sep 15; 137:158-63. doi: 10.1016/j.lfs.2015.07.020. Epub 2015 Jul 29.

35. Shmakov D.N., Nuzhny V.P., Kibler N.A., Kharin S.N. Changes in Total Cholesterol and Heart Rate in Normotensive and Hypertensive Rats under Combined Influence of Cold Exposure and Hypokinesia. *Bull Exp Biol Med.* 2020. 169(6). P. 738–741. doi: 10.1007/s10517-020-04968-6. Epub 2020 Oct 24.

36. The Motor Syndrome of Parkinson's Disease. Erro R, Stamelou M. *Int Rev Neurobiol.* 2017;132:25-32.

37. The terminology of akinesia, bradykinesia and hypokinesia: Past, present and future. Schilder JC, Overmars SS, Marinus J, van Hilten JJ, Koehler PJ. *Parkinsonism Relat Disord.* 2017 Apr;37:27-35. doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.01.010. Epub 2017 Jan 22.

38. Tissue magnesium loss during prolonged hypokinesia in magnesium supplemented and unsupplemented rats. Yan G Zorbas, Kostas K Kakuris, Viktor A Denogradov, Kosmas B Yerullis. *Physiol Chem Phys Med NMR.* 2006;38(2):93-104.

39. Water and electrolyte changes in skeletal and cardiac muscles of rats during prolonged hypokinesia. Zorbas YG, Kakuris KK, Neofitos EA, Afoninos NI. *Physiol Chem Phys Med NMR.* 2005;37(2):127-40.

ДОДАТКИ

Додаток А
Список публікацій автора та темою роботи

1. Леонтєва Ф.С., **Глєбова К.В.**, Морозенко Д.В. Динаміка вмісту метаболітів сполучної тканини у крові щурів різного віку за гіпокінезії Український біофармацевтичний журнал, № 1 (66) 2021. 42–45.

2. Леонтєва Ф.С., **Глєбова К.В.**, Морозенко Д.В. Оксипролін та уронові кислоти сечі як маркери метаболізму сполучної тканини в експериментальних щурів за гіпокінезії. Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації: тези доповідей III науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю (12 травня 2021 р.). – Х. : Вид-во НФаУ, 2021. 117–118.

3. **Глєбова К.В.**, Данильченко С.І. Динаміка вмісту сіалових кислот в крові щурів різного віку за гіпокінезії. Youth Pharmacy Science: матеріали II Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (7-8 грудня 2021 р., м. Харків). – Харків: НФаУ, 2021. 261–262

Додаток Б

Сертифікати про апробацію матеріалів магістерської роботи

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
 НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
 НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ПРИКЛАДНОЇ ФАРМАЦІЇ
 КАФЕДРА НОРМАЛЬНОЇ ТА ПАТОЛОГІЧНОЇ ФІЗІОЛОГІЇ



СЕРТИФІКАТ

ГЛЕБОВА КАТЕРИНА ВАЛЕРІЇВНА

Учасник III науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю

«ВІД ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ТА КЛІНІЧНОЇ ПАТОФІЗІОЛОГІЇ ДО ДОСЯГНЕНЬ СУЧАСНОЇ МЕДИЦИНИ І ФАРМАЦІЇ»

Реєстраційне посвідчення № 407 Державної наукової установи «Український інститут науково-технічної експертизи та інформації» від 16.09.2020 р.

Ректор Національного фармацевтичного
 університету, доктор фармацевтичних наук,
 професор, Заслужений діяч науки і техніки України

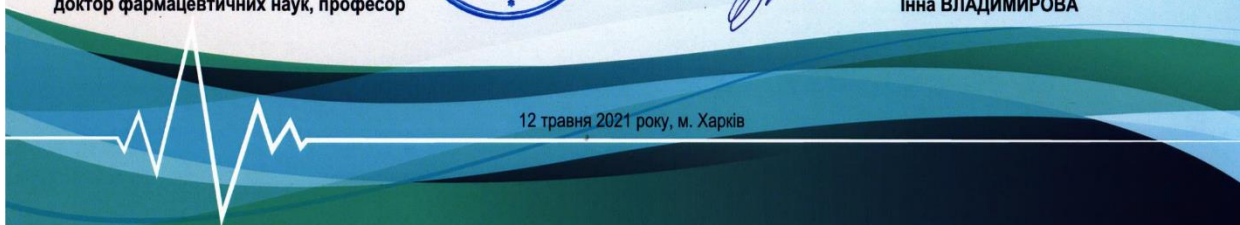


Алла КОТВИЦЬКА

Проректор з науково-педагогічної роботи,
 доктор фармацевтичних наук, професор

Інна ВЛАДИМИРОВА

12 травня 2021 року, м. Харків





Міністерство
охорони здоров'я
України

Національний
фармацевтичний
університет



Цим засвідчується, що

**Глебова К. В.,
Данильченко С. І.
Науковий керівник:
Чернозуб А. А.**

брав(ла) участь у роботі II Всеукраїнської
науково-практичної конференції
з міжнародною участю

**YOUTH
PHARMACY
SCIENCE**

СЕРТИФІКАТ

Ректор НФаУ,
д. фарм. н., проф.



Алла КОТВИЦЬКА

7-8 грудня 2021 р.
м. Харків
Україна