

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЖЕРНОКЛЬОВ УЛЯНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 612.7:612.825+616.092

ДИСЕРТАЦІЯ

СЕЗОННІ ВІДМІННОСТІ РЕАКЦІЇ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ НА
ЕКЗОГЕННИЙ МЕЛАТОНІН ТА НОРМОБАРИЧНУ ГІПОКСІЮ
САНОГЕННОГО РІВНЯ

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Науковий керівник: Літовка Ірина Георгіївна, доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник

АНОТАЦІЯ

Жернокльов У.О. Сезонні відмінності реакції кісткової тканини на екзогенний мелатонін та нормобаричну гіпоксію саногенного рівня. — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ, 2018.

У дисертаційній роботі, відповідно до поставленої мети досліджено механізми ремоделювання кісткової тканини в залежності від пори року та артеріального тиску тварин. Використання як екзо-, так і ендогенних коригуючих впливів надає можливість стимуляції процесів фізіологічного ремоделювання кісткової тканини.

Показано, що введення екзогенного мелатоніну щурам лінії Вістар в осінній період супроводжується одночасним підвищенням активності як резорбції, так і формуванням нових елементів кісткової тканини. У весняний період за тих самих умов експерименту спостерігали розбалансування процесів резорбції та відновлення кісткової тканини.

Отримані дані дозволяють акцентувати увагу на сезонних змінах реактивності кісткової тканини та її залежності від артеріального тиску і активності щитовидної залози. Тому, для досягнення позитивного ефекту біофізичних та/або фармакологічних чинників на ремоделювання кісткової тканини варто враховувати загальний фізіологічний стан організму (рівень артеріального тиску крові) та його чутливість до сезонних варіацій.

Ключові слова: ремоделювання кісткової тканини, мелатонін, дозована нормобарична гіпоксія, остеобласти, остеокласти, сезонні варіації.

Zheronklov U.O. Seasonal differences in the reaction of bone tissue to exogenous melatonin and normobaric hypoxia of the sanogenic level. — The manuscript.

Thesis for PhD in biology by specialty 03.00.13 –Human and Animals Physiology. Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, 2018.

In the thesis, according to the goal, the mechanisms of bone tissue remodeling were studied depending on the season and arterial pressure of animals. The use of both exo- and endogenous corrective effects provides the possibility of stimulating the processes of physiological remodeling of bone tissue.

It is shown that the introduction of exogenous melatonin to the rats of the Wistar line in autumn is accompanied by simultaneous increase in the activity of both resorption and formation of new elements of bone tissue. In spring, under the same conditions of the experiment unbalanced processes of destruction and restoration of bone tissue were observed.

The obtained data allow to focus attention on seasonal changes in the reactivity of bone tissue and its dependence on arterial pressure and thyroid activity. Therefore, in order to achieve the positive effect of biophysical and/or pharmacological factors on bone remodeling, the general physiological state of the organism (blood pressure) and its sensitivity to seasonal variations should be taken into account.

Keywords: bone remodeling, melatonin, dosed normobaric hypoxia, osteoblasts, osteoclast, seasonal variations.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

- 1) Березовський В.Я., Літовка І.Г., Весельський С.П., Янко Р.В., **Жернокльов У.О.** Вплив екзогенного мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини// Фізіологічний журнал – 2015 – Т.61, №3. – С.64-69.
- 3) Літовка І.Г., Березовський В.Я., Весельський С.П., **Жернокльов У.О.** Ремодельовання кісткової тканини після введення екзогенного мелатоніну в різні сезони року // Фізіологічний журнал – 2016 – Т.62, №3. – С.48-53.

4) **Zhernoklov U.** Influence of exo- and endogenous factors on bone remodeling in Wistar rats / **U.Zhernoklov**, V.Berezovskyi, I. Litovka // European J. of Technical and Natural Sciences. – 2016. – Vol.4. – P.3-8 (doi: 10.20534/EJTNS-16-4-3-8).

5) **Zhernoklov U.** Remodeling of the bone tissue of rats of different lines after melatonin effect / **U.Zhernoklov**, V.Berezovskyi, I. Litovka // Eureka: Life Sciences. – 2016. – Vol. 6. – P.52-58 (doi:10.21303/2504-5695.2016.00247).

6) Litovka I. Seasonal features of exogenous melatonin and dosed hypoxia influences on bone remodeling of young rats / I. Litovka, V. Berezovskyi, S. Veselskyi, R. Yanko, **U. Zhernoklov** // IJIRR. – 2017 – Vol. 4, №4. – P. 3986-3991.

7) Янко Р.В. Реакція щитоподібної залози спонтанно-гіпертензивних щурів на дію дозованої нормобаричної гіпоксії в осінній період / Р.В. Янко, В.Я. Березовський, **У.О. Жернокльов**, І.Г. Літовка / Проблеми ендокринної патології. – 2017. – №1. – С.80-86 (doi.org/10.21856/j-PER.2017.1.09).

які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1) **Жернокльов У.О.** Вплив екзогенного мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини // Матеріали X Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія від молекули до біосфери», 2-4 грудня, Харків, 2015. – С.61.

2) Янко Р.В., Плотнікова Л.М., **Жернокльов У.О.**, Березовський В.Я. Дослідження стану сполучної тканини щитоподібної залози після поєднаного впливу дозованої нормобаричної гіпоксії та мелатоніну // Матеріали XIV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна 2016: Біологічні науки», 6-8 квітня, Київ, 2016. – С.221-222.

3) **Жернокльов У.О.** Особливості поєднаного впливу екзогенного мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини у щурів // Матеріали IV Міжнародної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених

«Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології», 12-14 квітня, Вінниця, 2016. – С.342-343.

4) **Жернокльов У.О.**, Літовка І.Г. Вплив керованої атмосфери та екзогенного мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини щурів // Сборник материалов Международного симпозиума., «Актуальные проблемы биофизической медицины, 12-15 травня, Київ, 2016. – С.47-49.

5) **У.О. Жернокльов.** Вплив екзогенного мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини у молодих щурів //Збірник наукових праць «Біологічні дослідження – 2016», Житомир, 2016. – С.266-267.

6) Янко Р.В., Чака Е.Г., **Жернокльов У.А.** Особенности влияния мелатонина на структуру печени в зависимости от уровня потребления кислорода // Матеріалах IV Всеукраїнської наукової конференції студентів та молодих вчених з фізіології з міжнародною участю «Фізіологія – медицині, фармації та педагогіці: актуальні проблеми та сучасні досягнення» (Харків, Україна, 2017).

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

BMP-2 – bone morphogenetic protein – 2 - кістковий морфогенетичний білок-2

HIF – 1 – hypoxia inducible factor - фактор індукований гіпоксією

NF-κB – nuclear factor B - ядерний фактор κB

ODF – osteoclast differentiation factor - фактор диференціації остеокластів

Runx2 - транскрипційний фактор диференціації остеобластів

SHR –spontaneously hypertensive rats - спонтанні гіпертензивні щури

TNF – tumor necrosis factor - фактор некрозу пухлин

VEGF - vascular endothelial growth factor – фактор росту ендотелію судин

ВЖК – вільні жирні кислоти

вТ3 – вільний трийодтиронін

вТ4 – вільний тироксин

ГА – гіалуронідазна активність

ГАГ – глікозаміноглікани

ДНГ – дозована нормобарична гіпоксія

ЗГТ – замісна гормональна терапія

ЗГТ – замісна гормональна терапія

ІПФ – І – інтегральний позитивний фактор 1

КТ – кісткова тканина

КФ – кисла фосфатаза

ЛФ – лужна фосфатаза

Ове - оваріектомія

Пк - пінеалоектомія

PO_2 – парціальний тиск кисню

СІСР – С-термінальний пропептид колагену І типу

СХЯ – супрахізматичні ядра

Тг – тиреоїні гормони

ТГ – тригліцериди

ТРКФ – тартратрезистентна кисла фосфатаза

УК – уронові кислоти

ФЛ – фосфоліпіди

ХС – холестерин

ЩЗ – щитоподібна залоза

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	6
ВСТУП.....	11
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	17
1.1. Сучасний стан проблеми ремоделювання кісткової тканини за умов нормальної життєдіяльності.....	17
1.2. Особливості ремоделювання кісткової тканини під впливом мелатоніну.....	27
1.3. Особливості ремоделювання кісткової тканини щурів за умов зниженого парціального тиску кисню саногенного рівня.....	38
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	43
2.1. Загальна характеристика об'єктів та протокол дослідження	43
2.2. Визначення показників ремоделювання кісткової тканини у щурів.....	46
2.2.1. Визначення активності лужної фосфатази в сироватці крові щурів.....	46
2.2.2. Визначення активності кислої фосфатази і тартратрезистентної кислої фосфатази у сироватці крові щурів	47
2.2.3. Визначення концентрації уронових кислот у кістковій тканині щурів.....	49
2.2.4. Визначення концентрації глікозаміногліканів орциновим методом у сироватці крові щурів.....	49
2.2.5. Визначення гіалуронідазної активності у сироватці крові щурів.....	51
2.2.6. Визначення концентрації піридиноліну у сироватці крові щурів	52
2.3. Визначення гормонів щитоподібної залози у сироватці крові щурів.....	54
2.3.1. Визначення концентрації вільного трийодтироніну у сироватці крові щурів	54

2.3.2. Визначення концентрації вільного тироксину у сироватці крові щурів	57
2.4. Визначення концентрації вільних амінокислот у кістковій тканині щурів.....	59
2.5. Визначення концентрації загальних ліпідів та їх фракцій у кістковій тканині щурів.....	60
2.6. Статистична обробка результатів.....	60
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	61
3.1. Сезонні варіації дії екзогенного мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини щурів ліній Вістар та SHR.....	61
3.2. Сезонні варіації спільної дії дозованої нормобаричної гіпоксії та мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини щурів ліній Вістар та SHR.....	72
3.3. Реакція гормонів щитоподібної залози (трийодтироніну і тироксину) на вплив екзогенного мелатоніну, дозованої нормобаричної гіпоксії та їх спільної дії у щурів ліній Вістар та SHR в різні сезони року.....	83
3.4. Амінокислотний склад кісткової тканини до та після впливу мелатоніну у щурів ліній Вістар та SHR в різні сезони року.....	88
3.5. Амінокислотний склад кісткової тканини до та після впливу нормобаричної гіпоксії саногенного рівня та її спільної дії з мелатоніном у щурів ліній Вістар та SHR в різні сезони року.....	94
3.6. Ліпідний склад кісткової тканини до та після введення екзогенного мелатоніну у щурів ліній Вістар та SHR в різні сезони року.....	101

3.7. Ліпідний склад кісткової тканини до та після впливу нормобаричної гіпоксії саногенного рівня та її спільної дії з мелатоніном у щурів ліній Вістар та SHR в різні сезони року.....	105
РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	112
ВИСНОВКИ.....	126
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	128
ДОДАТОК 1.....	159

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Вивчення відмінностей реакції кісткової тканини (КТ) на екзо- та ендогенні подразники є предметом численних наукових досліджень [50, 72, 156, 157, 187]. Проте, лише поодинокі публікації присвячені впливу сезонних варіацій на КТ [161, 177].

Роль сезонних коливань фізіологічних параметрів полягає в адаптації організму до періодично змінюваних умов навколишнього середовища і є характеристикою для всіх рівнів біологічної організації та пояснює величезний інтерес хронофізіологів до них [4, 37, 68]. На відміну від значної кількості досліджень, що стосуються циркадних ритмів лише деякі поодинокі роботи присвячені циркануальним [45, 82, 177].

КТ людини і хребетних тварин є динамічною та метаболічно активною структурою. Завдяки процесу ремоделювання, який складається з формування та резорбції, вона постійно оновлюється протягом усього життя. Інтенсивність цього процесу може бути різною [33, 37, 46, 65, 136, 191]. У здорової людини в періоді активного росту та розвитку переважає процес формування КТ до моменту досягнення пікової маси, що відповідає статевому дозріванню [53, 71]. Після чого починається зворотній процес – посилена резорбція КТ. Техногенний прогрес зумовив малорухомий спосіб життя. Наслідком цього є дефіцит навантаження КТ. Це призводить до зменшення її маси, щільності, міцності та підвищення ризику переломів. Тому дослідження засобів регулювання фізіологічного самовідновлення (ремоделювання КТ) актуальні і можуть відкрити нові напрямки науково обґрунтованих методів профілактики та корекції негативних наслідків зовнішніх впливів, нефізіологічного способу життя та інше. Використання як екзо-, так і ендогенних коригуючих впливів дозволяє стимулювати процеси фізіологічного ремоделювання КТ [4, 26, 36, 91].

Відомо, що гормон епіфізу мелатонін регулює діяльність ендокринної системи, у тому числі тонус гладеньких м'язів кровоносних судин, кров'яний

тиск, сезонні коливання інтенсивності метаболізму та інші. Наявність генетичних ліній щурів із нормальним і підвищеним артеріальним тиском дозволяє оцінити реакцію особин із різним вихідним тонусом кров'яних судин в осінній та весняний періоди. Зважаючи на поширеність гіпертонічної хвороби у людей із сучасним способом життя, такі дослідження актуальні та спроможні надати важливу інформацію для практичних методів її профілактики. Відомо, що мелатонін активує процеси адаптації при зміні умов навколишнього середовища [6, 7, 38, 132, 186, 200, 201, 245, 253]. Також відомо, що він опосередковано регулює циркадні ритми метаболізму КТ, шляхом впливу на концентрацію ендогенних факторів (паратиреоїдного та тиреоїдних гормонів, інсуліноподібного фактору росту-I) [202, 249]. Мелатонін модулює диференціацію клітин КТ, остеобластів та остеокластів, сприяє мінералізації органічного матриксу, інтенсифікує синтез його колагенових та неколагенових білків [166].

Встановлено також, що кероване газове середовище може бути перспективним шляхом регуляції стану КТ. Відомо, що парціальний тиск кисню (PO_2) впливає на фізіологічне ремоделювання КТ [114, 156, 244]. Дозована нормобарична гіпоксія (ДНГ) сприяє прискоренню диференціації клітин остеобластної лінії [70]. Помірно знижений PO_2 є неспецифічним стимулятором метаболізму КТ. Він сприяє нормалізації щільності КТ та відновлює взаємодію її органічного та неорганічного матриксу, стимулює активність остеобластів [56, 92, 93, 158].

Одночасна дія мелатоніну та зниженого PO_2 може активувати процес фізіологічного ремоделювання КТ. Проте, вплив цих факторів недостатньо вивчений. Результати поодиноких робіт, наведених у сучасній літературі є неоднозначними [138, 239, 240]. Це може бути пов'язано із різними умовами проведення експериментів. Зокрема, сезоном, рівнем PO_2 , режимом подачі гіпоксичної газової суміші, дозою екзогенного мелатоніну та ін. Крім того, активність адаптивних реакцій організму залежить від трофічних процесів - рівня артеріального тиску, який впливає на швидкість процесів

ремоделювання КТ [109, 189, 247]. Тому, вивчення характеру впливу екзогенного мелатоніну та зниженого PO_2 на процеси ремоделювання КТ у нормо- та гіпертензивних тварин відкриє нові шляхи корекції її функціонального стану.

Хронобіологічний підхід при вивченні сезонних варіацій впливу мелатоніну та ДНГ може мати вирішальне значення для розробки конкретних стратегій профілактики та корекції стану КТ.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано згідно плану наукових досліджень відділу клінічної фізіології сполучної тканини Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за темою «Дослідити механізми регуляції стану елементів сполучної тканини організму при різних рівнях енергетичного метаболізму в клінічних та експериментальних умовах» № державної реєстрації 0112U008231, яка входить до зведеного плану НДР НАН України.

Мета роботи – дослідити сезонні варіації впливу екзогенного мелатоніну та нормобаричної гіпоксії саногенного рівня на показники ремоделювання кісткової тканини щурів ліній Вістар та SHR. Для досягнення мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Дослідити особливості процесів фізіологічного ремоделювання кісткової тканини щурів ліній Вістар та SHR до та після впливу екзогенного мелатоніну в осінній та весняний періоди.
2. Дослідити особливості одночасного впливу екзогенного мелатоніну та дозованої нормобаричної гіпоксії на процеси фізіологічного ремоделювання кісткової тканини щурів ліній Вістар та SHR восени і навесні.
3. Оцінити вплив гормонів щитоподібної залози на показники фізіологічного ремоделювання кісткової тканини щурів ліній Вістар та SHR в осінній і весняний періоди на фоні впливу екзогенного мелатоніну, дозованої нормобаричної гіпоксії саногенного рівня та їх одночасної дії.

4. Вивчити вплив екзогенного мелатоніну та його одночасної дії з дозованою нормобаричною гіпоксією на амінокислотний і ліпідний склад КТ.

Об'єкт дослідження: фізіологічне ремоделювання кісткової тканини.

Предмет дослідження: вплив екзогенного мелатоніну та дозованої нормобаричної гіпоксії на ремоделювання кісткової тканини восени та навесні.

Методи дослідження. Фізико-хімічні (спектрофотометрія, тонкошарова хроматографія), імунохімічні (імуноферментний аналіз), статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вперше показано вплив екзогенного мелатоніну, дозованої нормобаричної гіпоксії (ДНГ) та їх одночасної дії на показники ремоделювання кісткової тканини у щурів ліній Вістар та SHR в осінній та весняний періоди.

Вперше доведено, що введення екзогенного мелатоніну (5 мг/кг маси тіла) щурам лінії Вістар в осінній період супроводжується одночасним підвищенням активності як резорбції, так і формування нових елементів КТ. У весняний період за тих самих умов спостерігали розбалансування процесів деструкції та відновлення КТ.

Вперше показано, що восени введення екзогенного мелатоніну (5 мг/кг) щурам лінії SHR характеризується зниженням активності лужної фосфатази та підвищенням концентрації тиреоїдних гормонів (вТ3, вТ4). Решта показників ремоделювання КТ виявили мінімальну реакцію на екзогенний мелатонін. Натомість навесні виразно активуються показники резорбції КТ, зростає активність кислої фосфатази (КФ), концентрація глікозаміногліканів (ГАГ), вільних амінокислот і ліпідів, які приймають участь у синтезі колагену.

Вперше виявлено, що поєднана дія мелатоніну і ДНГ в осінній період підвищує активність кислої фосфатази (КФ) і тартратрезистентної кислої фосфатази (ТРКФ), що свідчить про активацію резорбції КТ у обох ліній

щурів. Ізольований вплив ДНГ, як восени, так і весною мінімально змінював ремоделювання КТ у обох ліній щурів. Показано, що у щурів лінії Вістар поєднаний вплив мелатоніну і ДНГ підвищує рівень мінералізації КТ восени.

Вперше показано, що введення мелатоніну в дозі 5 мг/кг в осінній період підвищує концентрацію трийодтироніну (вТ3) у щурів лінії SHR та концентрацію тироксину (вТ4) у обох ліній тварин. Весною після введення мелатоніну спостерігали тільки зниження секреції вТ3 у щурів лінії SHR.

На основі отриманих даних можна стверджувати, що в різні сезони року існує неоднакова реактивність КТ до екзогенних стимулів та фармакологічних препаратів у тварин із різним вихідним станом артеріального тиску.

Практичне значення одержаних результатів. Виявлено сезонні відмінності реакцій ремоделювання КТ у щурів ліній Вістар та SHR на введення екзогенного мелатоніну (5 мг/кг) та дозованої нормобаричної гіпоксії (ДНГ). Максимальна чутливість до введення мелатоніну та ДНГ проявляється у щурів лінії Вістар в осінній період, а у щурів лінії SHR навпаки, навесні зростають показники резорбції КТ. Тому, у випадках терапевтичного призначення мелатоніну та ДНГ необхідно враховувати більш високу чутливість організму щурів лінії Вістар в осінній період. Генетично обумовлена різниця артеріального тиску у щурів двох досліджуваних ліній може свідчити про більшу ймовірність побічних реакцій на введення мелатоніну та вплив ДНГ у осіб схильних до артеріальної гіпертензії.

Особистий внесок здобувача. Автором виконано аналіз наукової літератури за темою дисертації, сформульована мета, завдання і методи дослідження. Виконано статистичну обробку, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовлено матеріал для публікацій. Розробка схеми експерименту, введення екзогенного мелатоніну *per os*, подача гіпоксичної суміші та отримання об'єктів дослідження було проведено разом із співробітниками відділу клінічної фізіології сполучної тканини Інституту

фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Визначення ліпідного та амінокислотного складу органічного матриксу кісткової тканини за допомогою тонкошарової хроматографії було проведено під керівництвом старшого наукового співробітника Інституту фізіології ім. Петра Богача Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, доктора біологічних наук Весельського С.П.

Апробація результатів дисертації. Головні положення дисертації доповідались та обговорювалися на: 10-й Міжнародній конференції молодих учених «Біологія від молекули до біосфери» (Харків, Україна, 2015); 9-му Міжнародному симпозіумі «Актуальные проблемы биофизической медицины» (Київ, Україна, 2016); 14-ій Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна 2016: Біологічні науки», (Київ, Україна, 2016); 4-й Міжнародній конференції студентів, аспірантів і молодих науковців «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии и экологии» (Вінниця, Україна, 2016); збірнику наукових праць «Біологічні дослідження – 2016» (Житомир, Україна, 2016); матеріалах IV Всеукраїнської наукової конференції студентів та молодих вчених з фізіології з міжнародною участю «Фізіологія – медицині, фармації та педагогіці: актуальні проблеми та сучасні досягнення» (Харків, Україна, 2017).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 12 робіт, у тому числі 6 статей у спеціалізованих журналах, 3 з яких у міжнародних виданнях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури щодо фізіологічного ремоделювання кісткової тканини, матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень та їх обговорення, узагальнення отриманих результатів, висновків і списку використаних джерел. Загальний обсяг дисертації становить 160 сторінки друкованого тексту. Дисертація ілюстрована 35 рисунками та 25 таблицями. Бібліографія містить 266 джерел. З них 190 іноземних найменувань.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сучасний стан проблеми ремоделювання кісткової тканини за умов нормальної життєдіяльності

За сучасними науковими даними КТ розглядають як один із видів сполучної тканини, що виступає статичним опорним органом організму і є його метаболічно активною системою. Так само, як й інші тканини організму, КТ руйнується та відновлюється протягом усього життя. Вона постійно знаходиться під впливом динамічних навантажень та адаптується до змін умов існування [58, 83]. В залежності від характеру впливу зовнішніх та внутрішніх факторів на ремоделювання КТ, вони можуть викликати як позитивні, так і негативні ефекти [1, 2, 56, 58].

Ремоделювання КТ представляє собою безперервний процес, при якому стара КТ руйнується клітинами кісткової резорбції остеокластами. Після чого замінюється на нову, яка синтезується клітинами, що її утворюють - остеобластами. Протягом життя процес ремоделювання КТ, перш за все, забезпечує регулювання гомеостазису кальцію і відновлення мікротріщин у ній в результаті механічного навантаження. Відомо, що скелет повністю ремоделюється кожних десять років, відновлення мікродефектів запобігає передчасному старінню КТ [188].

Остеобласти та остеокласти складають базисні мультиклітинні функціональні одиниці [46, 53, 122, 188]. Їхня активність залежить від нейро-гуморальної сигналізації, в результаті якої новоутворена КТ може бути позитивною (в процесі росту), нейтральною (при піку кісткової маси) або негативною (при остеопорозі й інших захворюваннях, що призводять до чистої втрати кісткової маси) [135, 169, 229].

Остеобласти походять з мезенхімальних стовбурових клітин, продукують матрикс КТ, який складається з колагенових і неколагенових білків (таких як І тип колагену і остеокальцин, відповідно), а також контролюють його подальшу мінералізацію, тобто утворення гідроксиапатиту. Таким чином, швидкість утворення КТ буде залежати від індивідуальної активності остеобластів, їх тривалості життя і числа їх клітин-попередників (преостеобластів) [173, 196].

Остеокласти походять з гемопоетичних стовбурових клітин і утворюються шляхом злиття клітин моноцитомакрофагової клітинної лінії [107, 173]. Вони прикріплюються до поверхні кістки, утворюють кисле середовище, що розчиняє мінеральний компонент, піддаючи органічний матрикс ефектам протеолітичних ферментів, таких як цистеїн протеїнкази [196, 252].

КТ - динамічна тканина і процес її ремоделювання відбувається на поверхні кортикальної кістки і в її трабекулярній частині. Один цикл ремоделювання КТ триває близько 6 місяців. Даний процес складається з чотирьох етапів: 1) активація попередників остеокластів (преостеокластів), які трансформуються в багатоядерні остеокласти під впливом цитокінів і гормонів, остеокласти приєднуються до поверхні КТ і формують гофрований кордон на межі з матриксом. Так, створюються ізольоване мікросередовище; 2) резорбція кістки остеокластами шляхом утворення резорбційної порожнини - процес, який триває близько 3 тижнів [25, 46, 53, 136]; 3) завершення резорбційного етапу, на місці ремоделювання з'являються остеобласти, вони відкладають остеїд і мінералізують його, утворюючи, таким чином, фізіологічно нормальну КТ; 4) формування нової КТ, яка заповнює резорбційну порожнину, що триває кілька місяців [139]. Частина остеобластів інкапсулюються в остеїдний матрикс і диференціюються в остецити. Решта остеобластів продовжують синтезувати КТ, аж поки не відбудеться зупинка їхньої функції. Потім вони перетворюються у неактивні клітини, які повністю вистилають поверхню новоутвореної КТ і пов'язані з

остеоцитами матриксу кістки за допомогою мережі каналців [106, 122] (рис.1.1.1).

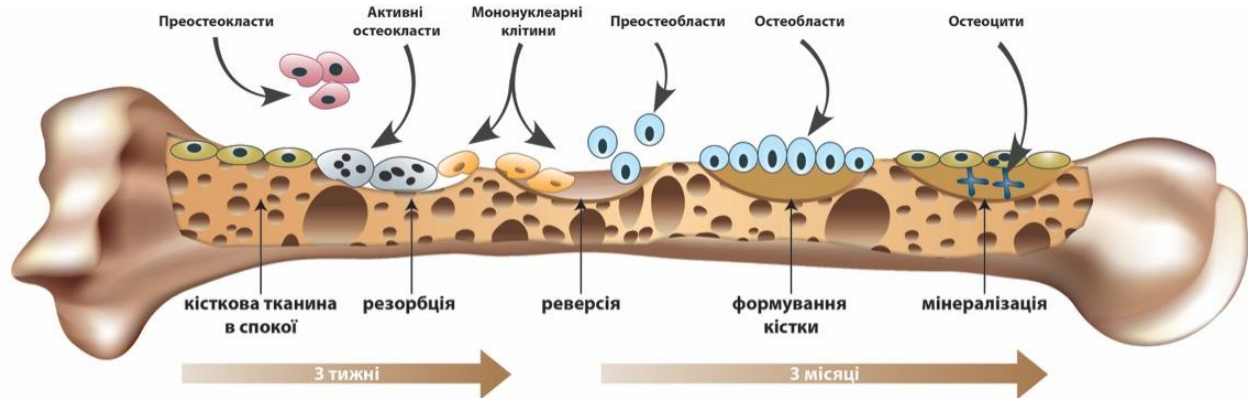


Рис.1.1.1. Ремоделювання кісткової тканини за нормальної життєдіяльності

Стан КТ визначають за допомогою гістоморфометричних, денситометричних та біохімічних методів. У даний час біохімічні методи дослідження використовуються частіше, так як є неінвазивними, а також дозволяють безпосередньо одержати інформацію про її функціональний стан. Біохімічні маркери відображають підсумкові зміни резорбції і формування кістки [39, 63, 64, 66]. Найбільш специфічним ферментом остеобластів є ЛФ, яка характеризує їхню активність та проліферацію [76]. До найбільш інформативних маркерів резорбції КТ відносять наступні показники: КФ, ТРКФ, карбокситермінальні телопептиди колагену 1 типу в крові, а також екскреція кальцію, гідроксипроліну, піридиноліну, дезоксипіридиноліну. ТРКФ використовують для оцінки активності остеокластів при остеопорозі [66, 75, 151, 154, 223].

Нові колагенові волокна у позаклітинному матриксі стабілізуються поперечними зв'язками. Існує два види містків між трьома молекулами колагену – дезоксипіридинолін (лізилпіридинолін) і піридинолін (гідроксилізилпіридинолін) [66, 75, 108, 199]. Наявність у сечі молекул з піридиноліновими зшивками свідчить про активний процес резорбції КТ [66, 75, 199]. Ці маркери є високочутливими і специфічними [66].

Іншою важливою складовою органічного матриксу є ГАГ, які пов'язані з білками в білково вуглеводні комплекси – протеоглікани. Протеоглікани беруть участь у водно-сольовому обміні, а також утворюють тісний зв'язок із колагеновими волокнами, зумовлюють впорядкованість, високу організованість структурних взаємин органічного матриксу, залучені в регуляцію відкладання мінералів, морфологію кристалів, об'єднання елементів органічного матриксу [257].

Кістковій тканині властива висока лабільність та пластичність, тому вона активно реагує на зміни внутрішнього та зовнішнього середовища [16, 60, 83]. Сезонні зміни біохімічних показників метаболізму типові для всіх видів тварин і людини, особливо різко ці зміни виявляються у тварин, які взимку впадають у неактивний стан своєї життєдіяльності. Встановлено, що такі зміни регулюються активністю секреції гіпоталамічних структур та щитоподібною залозою (ЩЗ) [45, 82].

Відносну незалежність метаболізму від пори року у більшості хребетних і людини забезпечує гормональна регуляція температурного гомеостазису за рахунок більш активного ліпідного метаболізму. Незважаючи на відносну стабільність температури тіла вищих хребетних та людини, сезонні варіації процесів обміну в тканинах існують у більшості із них. Вони стосуються і метаболізму КТ, темпів її ремоделювання, в регуляції яких приймають участь ендокринні структури головного мозку та ендокринні залози.

В осінній період у більшості тварин у зв'язку зі змінами тривалості та інтенсивності природного освітлення починаються зміни концентрації гормонів гіпоталамуса та ЩЗ, які можуть прямо або опосередковано впливати на активність та диференціацію основних клітин КТ – остеобластів та остеокластів.

В організмі людини і тварин КТ має найбільш питому масу – 85% [75]. Вже з періоду ембріогенезу, КТ має поліфункціональне значення. Вона виконує опорну, метаболічну, захисну, кровотворну, гуморальну та метаболічну функції [21, 28, 67, 71].

В онтогенезі ссавців, здійснюється генетично обумовлений процес закладання хрящового скелету та його поступове насичення мінеральними компонентами, після чого формується КТ. Ремоделювання КТ контролюється нейрогенними та гуморальними факторами, механічним навантаженням. Фізіологічне ремоделювання КТ контролюється симпатичною нервовою системою, що в свою чергу забезпечує регулювання метаболізму КТ. Кальцій регулюючі (паратиреоїдний гормон, кальцитонін, кальцитріол), системні гормони (тиреоїдні гормони (Тг), статеві, глюкокортикоїди, соматотропний гормон, інсулін, мелатонін), ростові та місцеві фактори (ІПФ-I, -II, ТФР – β , інтерлейкін – 1, -4, -6, -8, -13, TNF) – відносяться до гуморальних чинників (рис. 1.1.2).

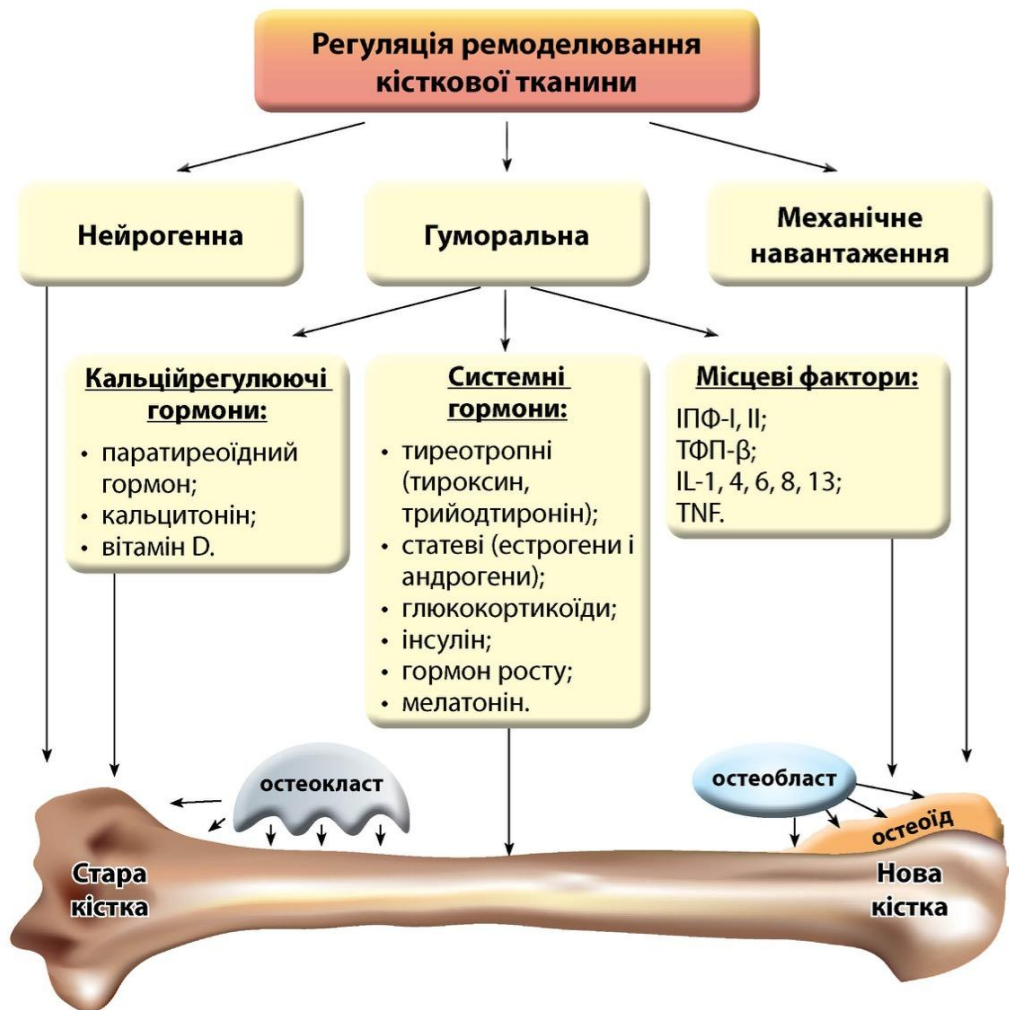


Рис. 1.1.2 Регуляція процесів фізіологічного ремоделювання кісткової тканини.

Співвідношення між процесами руйнування і утворення, активації остеобластів та остеокластів, взаємодії їхніх компонентів, забезпечує фізіологічне ремоделювання КТ та її адаптацію до умов навколишнього середовища.

Сучасне урбанізоване суспільство створило нові умови для життєдіяльності людини та її систем організму. Адаптація до таких умов призвела до розвитку і поширення донозологічних форм порушення фізіологічної функції зниження рівня здоров'я населення та виникнення цілого ряду так званих «хвороб цивілізації». Остеопороз є однією із форм патології КТ, якій передують тривалий перехідний стан зниження кісткової маси – остеопенія [40, 77, 85, 90, 222]. Саме тому сьогодні пошук шляхів і методів корекції процесів ремоделювання КТ є надзвичайно актуальним. Введення мелатоніну та проведення сеансів дихання ДНГ саногенного рівня можна розглядати одними із таких методів.

Дані сучасної літератури, дають можливість припустити, що основний механізм стимулюючої дії зниженого PO_2 реалізується через вплив на індукований гіпоксією фактор (HIF-1), який бере участь в механізмах сигнальної трансдукції інших білків і таким чином виконує роль молекулярного сенсору кисню [32, 117, 134, 213] (рис.1.1.3).

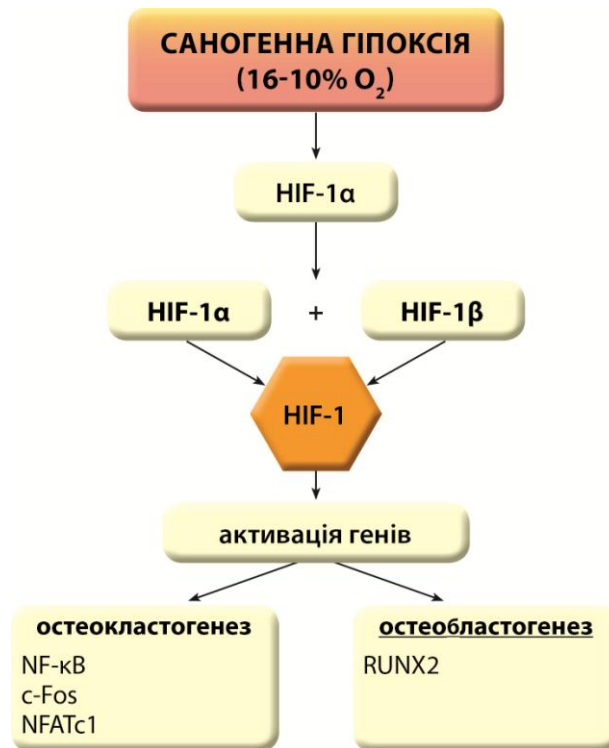


Рис. 1.1.3. Механізм дії дозованої нормобаричної гіпоксії саногенного рівня на процеси ремоделювання кісткової тканини

Так як остеобласти синтезують колаген, стимуляція цих процесів безпосередньо впливає на темпи адаптаційної перебудови КТ. Також відомо, що вплив ДНГ саногенного рівня на остеобласти призводить до стимуляції експресії гену ендотеліального клітинноспецифічного цитокіну (VEGF). Показано, що остеобласти мають кисневі сенсори і завдяки VEGF можуть впливати на ангіогенез та збільшення току крові до пошкодженої частини КТ [152, 153, 242]. Так, зниження PO_2 активує продукцію регуляторних білків, проліферацію і диференціацію клітин.

Регуляція ремоделювання здійснюється гормонами та іншими факторами росту, які є в організмі. Вони впливають певним чином на функціонування остеобластів і остеокластів. У першу чергу, це гормони, що регулюють обмін кальцію в організмі – кальцитонін, який виробляє ЩЗ, і паратгормон паращитовидної залози. Загальновідомим також є той факт, що нормальне функціонування і продукція КТ не можливі без вітаміну D [53, 90, 105, 124, 206].

Впливають на ремоделювання й інші гормони. Свою роль у процесах ремоделювання КТ відіграють інсулін, соматотропний гормон (соматотропін), глюкокортикоїди, Тг (трийодтиронін (вТ3), вТ4), статеві гормони. Важливими у процесах відновлення кісток також є низка ростових факторів: інсуліноподібні фактори росту-1 і -2, фактор росту фіброblastів, трансформуючий фактор росту Р, тромбоцитарний фактор росту, епідермальний фактор росту. Свою роль відіграють інтерлейкіни-1, -6, -8, -11, фактор некрозу пухлини, макрофаг-колонієстимулюючий фактор, гранулоцит-макрофаг-колонієстимулюючий фактор, а також низка місцевих факторів, які синтезуються безпосередньо у самих кісткових клітинах і вивільняються, коли кістка піддається деструкції тканинного матеріалу [19, 53, 93, 136, 164].

Гормони ЩЗ відіграють роль в синхронізації періодичності кісткового метаболізму [112, 183]. Вони активують як остеобласти, так і остеокласти [94]. Дія Тг на остеобласти опосередковується через експресовані на них рецептори й супроводжується підвищенням утворення остеокальцину, ЛФ, інсуліноподібного фактору росту-1, інтерлейкіну-6 та інтерлейкіну-8. Гормони ЩЗ сприяють процесам ремоделювання, оскільки стимулюють остеобластичну й остеокластичну активність трабекулярної та кортикальної КТ, але при цьому не чинять помітного впливу на синтез матриксних білків і реплікацію клітин кістки [237].

Секреція Тг регулюється гіпоталамо-гіпофізарною системою [140]. Регуляція рівню тиреоїдних гормонів у сироватці крові здійснюється шляхом зворотного зв'язку по гіпоталамо - гіпофізарно - тиреоїдній осі. [258]. Тироліберин (TRH – thyrotropin- releasing hormone) синтезується в гіпоталамусі та стимулює секрецію тиреотропного гормону (ТТГ, англ. – TSH – thyroid – stimulating hormone) із передньої долі гіпофізу. TSH стимулює синтез та вивільнення Тг. Тг діють в кістці через рецептори TR α для регулювання росту та розвитку кістки. ТГ також діють через рецептори

TR β , що експресуються в гіпоталамусі та гіпофізі для інгібування синтезу та секреції TRH та TSH (рис.1.1.4) [143, 264].

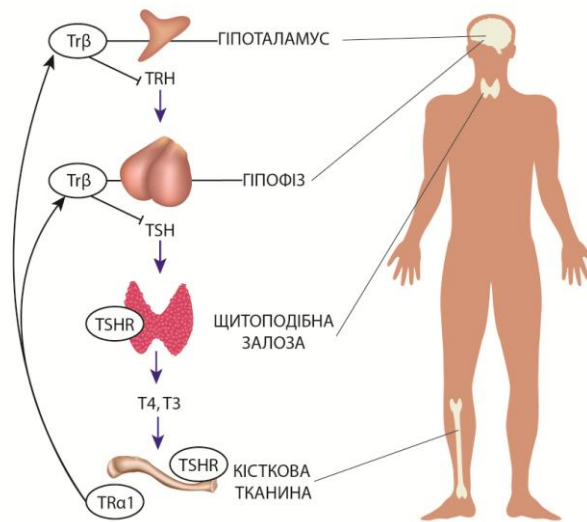


Рис.1.1.4. Гіпоталамо-гіпофізарно-тиреоїдно-кісткова вісь [263]

Сучасне розуміння КТ повинне включати раніше невідомі її функції. КТ - це також системний ендокринний регулятор, що виробляє низку гормонів, які зв'язують та модулюють рецептори на її поверхні. КТ – це більше, ніж цільова тканина для гормонів. Це так само важлива ендокринна структура. Розуміння різносторонньої взаємодії між КТ та циркулюючими гормонами – це величезний виклик з практичної точки зору. Нова інформація стосовно взаємодій між КТ та іншими системами організму може застосовуватися в лікуванні багатьох патологічних станів, у тому числі розладів ремоделювання КТ [265].

Численні публікації, присвячені дослідженням ремоделювання КТ підтверджують, що кістак є реактивною динамічною системою. Він активно реагує на зміни як внутрішнього, так і зовнішнього середовища [19, 93, 83]. Тому для більш детального вивчення змін активності процесів ремоделювання КТ під дією ендо- та екзогенних факторів необхідне подальше дослідження впливу мелатоніну та дозованої нормобаричної

гіпоксії саногенного рівня. Це може дати можливість цілеспрямовано впливати на процеси фізіологічного відновлення КТ [263].

1.2. Особливості ремоделювання кісткової тканини під впливом мелатоніну

У численних дослідженнях показано сезонні зміни характеру та інтенсивності фізіологічних процесів в організмі та їх біохімічних показників [42, 45, 96, 197]. Якщо циркадні (добові) ритми забезпечують термінову адаптацію функцій організму до зміни освітлення, то циркануальні (сезонні) – до зміни енергетичного метаболізму та процесів регенерації [147, 261]. Синтезу мелатоніну в організмі притаманна як добова, так і сезонна ритміка. Восени та взимку зі зменшенням освітлення концентрація гормону зростає, а весною та влітку, навпаки, знижується [5, 166]. Біоритмологічна структура метаболізму КТ є достатньо пластичною і легко модифікується при змінах умов зовнішнього середовища: температури повітря, ступеня освітленості та режиму харчування [166]. У літературі існує точка зору, що мелатонін впливає на циркануальні ритми метаболізму кістки. Однак дані щодо його дії на ремоделювання КТ нині є дискусійними [161, 177].

Відновлення, підтримання або ж підвищення міцності КТ та/або мінерального гомеостазису у відповідь на зміни ендо- та екзогенних впливів, потребують взаємодії між остеобластами, остеокластами та остеоцитами [162, 204]. Одним із гормонів, що задіяний в даних процесах є мелатонін [175].

Мелатонін - це гормон, що ритмічно секретується шишкоподібною залозою під контролем супрахіазматичного ядра (СХЯ) і циклу світло/темрява [213, 216, 233]. Крім того, він також виробляється кількома іншими тканинами, серед яких сітківка, тимус, селезінка, яєчники, яєчка, кишечник і кістковий мозок [214, 249]. Екстрапінеальний мелатонін, що секретується специфічними органами локально використовується в якості фізіологічно активної речовини (автокоїду) і не входить в циркуляційне русло [214]. Мелатонін із шишкоподібною залозою не діє на конкретний орган-мішень; він впливає на всі тканини за рахунок своєї амфіфільності, легко

проникає у субклітинні компартменти, такі як мітохондрія і ядро [95, 171, 249].

Мелатонін відіграє важливу роль у багатьох фізіологічних процесах, у тому числі регулюванні кров'яного тиску [147, 261, 263], активності яєчників, імунній функції і т.д. [162]. Механізм дії мелатоніну також різний. У деяких випадках, дія мелатоніну опосередкована зв'язуванням індоламіну з мембранними рецепторами (MT1, MT2, MT3) або ядерними рецепторами (ROR/RZR) [119]. Крім того, завдяки його ліпофільним властивостям, мелатонін проходить через клітинні мембрани, таким чином отримуючи доступ до субклітинних органел [95].

Серед головних ефектів мелатоніну на КТ відзначають: стимуляція диференціації та активації остеобластів, гальмування диференціації остеокластів, нейтралізація утворених остеокластами вільних радикалів, посилення синтезу колагенових і неколагенових білків кісткового матриксу [194, 200, 221]. Тобто встановлена можливість варіацій циркадної інтенсивності фізіологічної регенерації КТ за допомогою зміни амплітуди та ритму добових флуктуацій концентрації мелатоніну в організмі. Щодо циркануальних впливів – такі дані неоднозначні.

Припускають, що мелатонін впливає на ремоделювання КТ трьома принциповими шляхами. По-перше, мелатонін безпосередньо впливає на остеобласти та остеокласти. Дослідження, проведені останнім часом, у тому числі і в нашому відділі, показали, що мелатонін підвищує проліферацію клітин преостеобластів та остеобластів, сприяє експресії колагену I типу та маркерів білків КТ (ЛФ, остеопонтину, кісткового сіалопротеїну та остеокальцину), стимулює утворення та мінералізацію матриксу в цих клітинах [16, 60, 143, 194, 217, 221, 226, 230, 258]. Крім того, мелатонін пригнічує диференціювання остеокластів шляхом збільшення рівня білку остеопротегерину [163]. По-друге, мелатонін опосередковано регулює метаболізм КТ шляхом взаємодії із системними гормонами (наприклад, паратгормоном, кальцитоніном, і естрогеном). По-третє, остеокласти

генерують високі рівні супероксидів аніонів в процесі резорбції кістки, що сприяє її деградації. Мелатонін є важливим антиоксидантом. Він може зв'язувати вільні радикали, які генеруються остеокластами в процесі резорбції КТ і захищати клітини від окислювальних атак [142, 168, 178]. Дана властивість мелатоніну проявляється у його обох як фізіологічних, так і фармакологічних концентраціях [175].

Мелатонін як індикатор циркадних ритмів метаболізму кісткової тканини. Клітини-мішені мелатоніна знайдені у багатьох органах і клітинах: печінці, нирках, наднирниках, жовчному міхурі, яєчниках, ендометрії, плаценті, тимусі, лейкоцитах, ендотелії, в сітківці ока, шлунково-кишковому тракті, кістковому мозку [224, 256]. Честь відкриття екстрапінеальної продукції мелатоніну належить російським вченим І.М. Кветному та Н.Т.Райхліну [47]. Екстрапінеальний мелатонін відіграє ключову роль як паракринна сигнальна молекула для локальної координації клітинної функції та міжклітинних зв'язків у нормі та патології. Він може діяти і як типовий гормон, досягая віддалених клітин-мішеней за допомогою кровотока. Функціонально всі клітини, що продукують мелатонін, мають відношення до так званої дифузної нейроендокринної системи, універсальної системи адаптації і підтримки гомеостазису організму.

Взаємодія мелатоніну з клітинами може відбуватися різними способами. За своєю природою мелатонін – це похідне індолу, має амфіфільні властивості. Атомна молекулярна маса його молекули дорівнює 232,3. Внаслідок цього він долає всі тканинні бар'єри, вільно проходить через клітинну мембрану. Мелатонін впливає на внутрішньоклітинні процеси минаючи систему рецепторів і вторинних месенджерів, або шляхом взаємодії з ядерними рецепторами. Він втручається в клітинні системи шляхом зміни процесів їх взаємодії [200]. За своїми властивостями він належить до циркадно-залежних регуляторів метаболізму та кальцієвого гомеостазису кістки.

Біоритмологічна структура метаболізму КТ є досить пластичною і легко модифікується змінами умов зовнішнього середовища: рівня рухової активності, ритму світло/темрява, режиму харчування [249]. Показано, що порушення фотоперіодизму може призводити до інтенсифікації або гальмування ремоделювання кістки [121, 166]. В літературі існує точка зору, що мелатонін регулює циркадні ритми метаболізму кістки. Він діє опосередковано, шляхом зміни концентрацій ендогенних факторів – паратиреоїдного та Тг, інсуліноподібного фактора росту-1.

Дослідження, проведені на щурах, показали, що рівень маркерів формування кісткової тканини (ЛФ та С-термінальних пропептидів колагену І типу (CICP) і показників руйнування (гідроксипроліну, кальцію, карбокситермінальних телопептидів колагену І типу) знижується з 8-ї до 17-ї години [202]. Концентрація паратиреоїдного гормону знижувалася з 5-ї до 17-ї та 23-ї години. Концентрація інсуліноподібного фактора росту-1 була високою між 20-ю та 11-ю годинами. Разом із тим рівень CICP зростав з 20-ї до 11-ї, карбокситермінальних телопептидів колагену І типу — з 23-ї до 5-ї, гідроксипроліну — з 21.30 до 6.30, кальцію — з 3.30 до 9.30. Концентрація неорганічного фосфору зменшувалась з 14.00 до 23.00 [202].

Синхронність та магнітуда циркадних ритмів виявляється обмеженою періодом годування, циклом світло/темрява та ендокринними взаємозв'язками [236]. У дослідях, проведених на щурах [204], показано, що вірогідними регуляторами циклічності є паратиреоїдний гормон, інсуліноподібний фактор росту-I, гідроксипролін та мелатонін [81, 202], які впливають на кістковий метаболізм *in vitro* і мають денний ритм (особливо інсуліноподібний фактор росту-I) *in vivo*. Ці гормональні ритми у щурів виявляються обмеженими періодичністю світла і темряви. Крім того, світловий цикл залишається основним синхронізатором кісткового ремоделювання [200, 204, 232].

Мелатонін виконує функції модулятора диференціації остеобластів та остеокластів [219]. Він сприяє мінералізації матриксу у культурі, посилює

синтез колагенових та неколагенових білків кісткового матриксу, гальмує розвиток остеопенії, активуючи секрецію гормону росту у щурів [256].

В модельних експериментах на трансгенній лінії (MMTV-Neu) сліпих мишей, але реагуючих на світло, було показано вплив замісної гормональної терапії (ЗГТ) та добавки мелатоніну на ніч на маркери остеогенезу та рівень мелатоніну в сироватці крові. ЗГТ збільшила кісткову поверхню, зменшила трабекулярний простір, знизила кількість остеокластів, не впливаючи на кількість остеобластів в порівнянні з контролем. Хронічна ЗГТ + терапія мелатоніном дещо збільшила щільність КТ. Ці дані дозволяють припустити, що ендогенний ритм концентрації мелатоніну модулює важливі якісні і кількісні показники кісткової тканини. ЗГТ з / або без нічного мелатоніну у мишей проявляє унікальні впливи на маркери КТ і її щільність. Наслідки цих засобів корекції поодиночі і в поєднанні можуть поліпшити стан КТ у жінок у перименопаузі та у осіб із низьким рівнем нічного мелатоніну від порушень глибини сну, надлишку освітлення, або віку [255].

Досліджено вплив екзогенно введеного мелатоніну (у період мінімуму його природного синтезу \approx о 17.00) на ліпідний та амінокислотний склад органічного матриксу у 11- і 15-місячних щурів-самців лінії Wistar. Висловлено думку, що екзогенний мелатонін опосередковано впливає на кістковий метаболізм шляхом підвищення вмісту полярних ліпідів та зниження вільних амінокислот. Це свідчить про здатність мелатоніну активувати процеси ремоделювання КТ та інтенсифікувати в ній синтез колагену [14]. Аналогічними дослідженнями підтверджено, що ритми та амплітуда синтезу мелатоніну в організмі людини та тварин не обмежуються тільки періодичністю світла і темряви, а залежать від експресії генів, що кодують синтез цього гормону [155, 182].

Вплив пінеалектомії на кістковий метаболізм. Факт впливу пінеалектомії на кістковий метаболізм було показано на вівцях [131]. Визначали маркери формування і резорбції кістки. Для оцінки довгострокових змін після пінеалектомії, аналізували мінеральну щільність

кістки через 0, 3, 9, 18 і 30 місяців. Зміни цього показника, за думкою авторів, можуть бути обумовлені збільшенням долі губчастої частини, а також зменшенням її щільності. Кількісна гістоморфометрична оцінка та визначення продуктів деградації колагену підтвердили підвищення резорбції КТ після пінеалектомії. Оваріектомія призводить до тимчасової втрати маси нижньої третини променевої кістки з наступним збільшенням її до вихідного рівня. Зміни після пінеалектомії у овець свідчать про втрату кісткової маси, яка не була тимчасовою, оскільки постійне зниження мінеральної щільності спостерігали до 30 місяців. Таким чином, шишкоподібна залоза впливає на метаболізм КТ, а пінеалектомія може бути використана як модель деструкції кістяку.

Досліджено радіологічні та гістологічні зміни в шийних хребцях курчат на моделі грудного сколіозу. Встановлено зниження проліферації остеобластів при дефіциті мелатоніну, що призводить до розвитку сколіозу та остеопорозу. Відновлення рівня мелатоніну запобігає розвитку сколіозу та остеопорозу. Це свідчить, за думкою авторів, що рівень мелатоніну може мати вирішальне значення для розвитку деформацій і остеопорозу при ідіопатичному сколіозі [160, 179, 185, 205].

Вплив мелатоніну на неорганічний матрикс. У другій половині ХХ сторіччя досліджено вплив мелатоніну на рівень кальцію в тканинах організму. Було відзначено, наприклад, зменшення концентрації кальцію в сироватці крові новонароджених щурів, яким гальмували синтез мелатоніну білим люмінесцентним світлом [149]. Після застосування екзогенного мелатоніну виявлено відновлення вихідного рівня кальцію. Автори розглядають наслідки світло-залежної гіпокальціємії як результат недостатнього поглинання кальцію кістками за умов коли рівень мелатоніну знижений після гальмування його синтезу світлом [149]. Крім того, коли секрецію мелатоніну пригнічували у щурів застосуванням β -адреноблокаторів, концентрація кальцію у сироватці крові знижувалася [148]. Концентрація кальцію відновлювалася після введення мелатоніну. Автори

прийшли до висновку, що зменшення концентрації мелатоніну викликає гіпокальціємію. Зроблено припущення, що мелатонін регулює концентрацію кальцію в крові. Оскільки стан КТ залежить від активності як остеобластів, так і остеокластів, доцільно розглянути вплив мелатоніну на ці клітини.

Вплив мелатоніну на остеобласти. Численні дослідження *in vitro* підтвердили гіпотезу стимулюючого ефекту мелатоніну на диференціювання та активність остеобластів. Преостеобласти культивовані у присутності мелатоніну, здійснювали раннє диференціювання і експресію білків кісткових маркерів у порівнянні з контрольними клітинами інкубованих без мелатоніну [221]. Ці ефекти блокуються лузіндолом, що є антагоністом рецепторів мелатоніну [221]. Вікове зниження продукції мелатоніну може змістити диференціацію клітин кісткового мозку від остеобластичної диференціації до адипоцитної лінії клітин. Це може мати відношення до розвитку остеопорозу при старінні [225]. Мелатонін також сприяє остеогенному диференціацію стовбурових клітин кісткового мозку. Водночас він здійснює негативний вплив на диференціювання отриманих із жирової тканини стовбурових клітин [259, 260]. У культурах остеобластів людини [194, 226], мелатонін виявляє наступні ефекти: стимулює проліферацію та активність ЛФ цих клітин; сприяє експресії колагену типу I, остеопонтину, кісткового сіалопротейну і остеокальцину; стимулює формування мінералізованої матриці.

Чи опосередковують сигнальні механізми вплив мелатоніну на остеобласти - невідомо, хоча роль шляху мітогенактивованої протеїнкінази (МАРК) вважається вірогідною [217].

Одним із важливих компонентів діяльності остеобластів є утворення вільних радикалів, які здійснюють процеси руйнування кісток і резорбції [137]. Мелатонін, за його здатність безпосередньо нейтралізувати вільні радикали і стимулювати активність антиоксидантних ферментів [218, 219], може гальмувати остеокластичну активність. Ці дії включають в себе: сприяння остеобластичній диференціації, активності та експресії

остеопротегерина, який запобігає диференціюванню остеокластів; очищення вільних радикалів, що утворюються при активності остеокластів та реалізують резорбцію кістки.

Існують і протилежні гіпотези щодо впливу мелатоніна на ремоделювання КТ та роль остеобластів у цьому процесі. Островська та ін. виявили кореляцію між високими концентраціями мелатоніну в плазмі крові щурів-самців лінії Вістар і низькими рівнями маркерів формування кістки [166]. В іншому дослідженні проаналізовано ефекти мелатоніна на культуру остеобластів у присутності остеокластів. Виявлено пригнічення активності обох типів клітин, що дозволило їм зробити висновок про встановлення балансу між ними [224, 243]. Автори підкреслюють важливість міжклітинної взаємодії остеобластів і остеокластів для розуміння їх фізіологічної активності, так само, як і реакції на мелатонін.

Вплив мелатоніну на остеокласти. Іншою можливою мішенню для мелатоніну можуть бути остеокласти. Мелатонін, за припущенням Conconi та співавт. [118], втручається у функцію остеокластів. Schroeder та співавт. [228] показали, що мелатонін може гальмувати резорбцію кісток. Виявлено, що мелатонін знижує резорбцію кісткової маси за рахунок пригнічення регуляції RANK-L [212, 241]. Отримані дані свідчать про остеогенний ефект мелатоніну і мають клінічне значення. Препарати мелатоніну використовують в якості терапевтичного агента при необхідності формування кістки (в лікуванні переломів, остеопенії або остеопорозу). Ці препарати також використовують для стимуляції біоактивної поверхні імплантату [174].

Активність остеокластів знаходиться під контролем гормонів паращитовидних залоз. Паратиреоїдний гормон і 1,25-дигідроксихолекальциферол стимулюють експресію диференціації фактору остеокластів (ODF) стромальних клітин і остеобластів кісткового мозку. ODF зв'язується з рецептором активатором ядерного фактору - $\kappa\beta$ (RANK) на поверхні кісткової резорбції активації остеокластів [111, 165]. Мелатонін, у

мікромольних дозах, зменшує експресію RANK мРНК в остеобластах миші і збільшує як мРНК, так і рівні остеопротегерину, який є часткою суперродини TNFR (рецептора фактора некрозу пухлини) та інгібує диференціювання остеокластів шляхом зв'язування з ODF і запобігає зв'язуванню цього фактора з RANK [163]. За допомогою цього шляху, мелатонін може інгібувати кісткову резорбцію і сприяти зростанню маси КТ.

Показано, що пероральне введення екзогенного мелатоніну у дозі 1 мг/кг у період мінімуму його природнього синтезу в організмі дозволяє значно підвищити загальну концентрацію цього гормону в сироватці крові 3- та 9-місячних щурів на 50% та 25,6% відповідно [17]. Зростання рівня мелатоніну у сироватці крові як молодих, так і дорослих щурів не супроводжується значними змінами остеометричних показників кістки. Проте інтенсифікує темпи резорбції КТ у молодих та дорослих щурів, про що свідчить підвищення активності КФ та концентрації ГАГ у сироватці крові. Автори вважають, що використання екзогенного мелатоніну може бути корисним для нормалізації процесу фізіологічної регенерації КТ сучасної людини, яка страждає від гіпокінезії та гіподинамії [17].

Вплив мелатоніну на остеогенез. Показано, що мелатонін здатний змінювати остеогенез і остеогенне диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин. У роботі [176] автори дослідили дію мелатоніну на проліферацію мезенхімальних стовбурових клітин і остеогенне диференціювання за відсутності або в присутності інтерлейкіну-1 β (IL-1 β), який використовували, щоб викликати запалення. Виявлено поліпшення життєздатності клітин і зменшення генерації активних форм кисню у мезенхімальних стовбурових клітинах залежно від дози мелатоніну. Для дослідження впливу мелатоніну на остеогенез, мезенхімальні стовбурові клітини культивували в середовищі остеогенної диференціації, доповненому IL-1 β або мелатоніном. Після впливу IL-1 β протягом 21 дня, 1 μ M мелатоніну значно підвищував рівень колагену I типу, активність ЛФ та остеокальцину. Доза у 100 μ M мелатоніну давала найвищий рівень остеопонтину. Мелатонін

сприяв виживанню мезенхімальних стовбурових клітин і остеогенному диференціюванню при запаленні в середовищі індукованому $IL-1\beta$. Автори припускають, що мелатонін може бути перспективним для стимуляції регенерації КТ [176].

Наведені результати підтвердили, що мелатонін є важливим медіатором у формуванні КТ [224]. Він може запобігати передчасному руйнуванню КТ та сприяти її відновленню за допомогою механізмів мелатонін опосередкованих рецепторів і рецепторів самостійної дії. Основні механізми ефектів мелатоніну на функцію КТ продемонстровано на рис.1.2.1 [56].

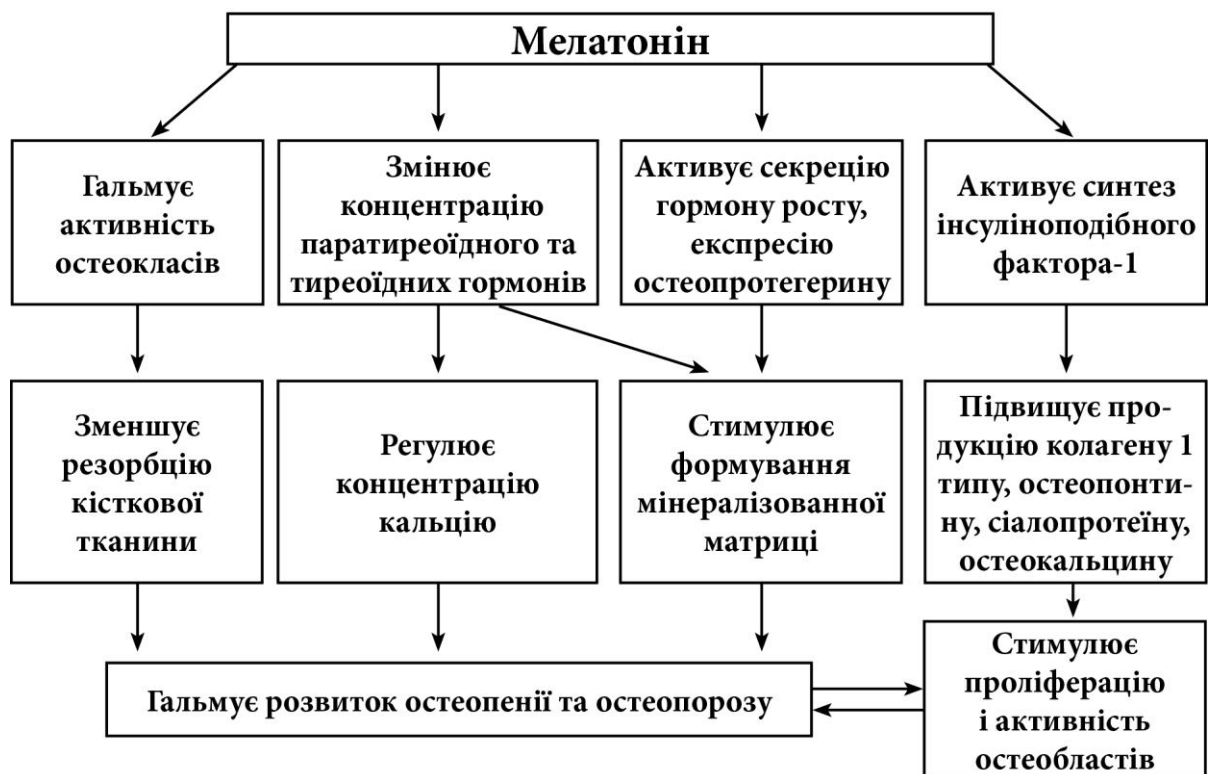


Рис.1.2.1. Основні ефекти фізіологічного впливу мелатоніну на кісткову тканину [56]

Проаналізовані вище дані свідчать про те, що мелатонін залучений в ремоделюванні КТ. Завдяки своїй здатності регулювати кістковий метаболізм, посилювати утворення КТ, мелатонін може використовуватися в якості нового способу корекції кісткових захворювань, що характеризуються

низькою кістковою масою і її підвищеною крихкістю. Таким чином, мелатонін може стабілізувати масу, щільність і структуру просторово-часової організації метаболічних функцій активних елементів КТ, нормалізувати процеси кісткового ремоделювання, що попереджають переломи кісток, покращують стан пацієнта та розширюють його рухову активність. Не менш ефективною альтернативою фармакологічним препаратам може бути вплив слабких стресогенних факторів. Одним із яких є кероване газове середовище.

1.3. Особливості ремоделювання кісткової тканини щурів за умов зниженого парціального тиску кисню саногенного рівня

Численні дослідження підтверджують позитивний вплив змін PO_2 на ремоделювання КТ та її функціональний стан [9, 29, 32, 34, 58, 133, 250, 251]. Проте, отримані дані є суперечливими. Це може бути пов'язано з умовами проведення експерименту: нормо- або гіпобарією, рівнем PO_2 , тривалістю дії гіпоксичної суміші, режимами її подачі та сезонними змінами реактивності організму тварин.

За даними [74] дозована гіпоксія (10-12% O_2) посилює резорбцію КТ. Цей процес відбувається шляхом активації інтерлейкіну-1, інтерлейкіну-6 та TNF. Інтерлейкін-1 та TNF можуть сприяти апоптозу остеобластів. З іншого боку, при гіпоксії одночасно відбувається проліферація остеобластів шляхом стимулювання вироблення ТРФ- β та інтерферону G [61, 88]. Логічно, що інтенсивність ремоделювання КТ залежить від рівня PO_2 в тканинах.

Відомо, що жорстка та тривала гіпоксія (2-6% O_2) може стати причиною загибелі організму. Водночас, переривчасте помірне зниження PO_2 саногенного рівня здійснює позитивний вплив. Доведено, що дихання гірським повітрям стимулює гемопоез, активує діяльність кісткового мозку, капілярне кровопостачання та резистентність організму [24, 80, 81].

В сучасній літературі висловлена точка зору, що в терміні «гіпоксія» слід розрізняти чотири біологічно відмінних рівня. Перший – це індиферентна гіпоксія, яку здорова людина не відчуває ніякими органами чуття. Індиферентний рівень гіпоксії відповідає діапазону від 20 до 16% кисню, що еквівалентно парціальному тиску кисню близько 120 мм рт.ст. [14, 56]. Подальше зниження вмісту $i PO_2$, еквівалентне перебуванню на висотах 1,5 – 2,5 тис. м н.р.м., слід виділяти як саногенну зону гіпоксії. При мінімальному напруженні механізмів адаптації і збереженні функціональних резервів саногенна гіпоксія сприяє покращенню фізіологічних функцій організму та підвищенню загального рівня здоров'я.

Подальше зниження вмісту парціального тиску кисню створює умови патогенної зони, короткочасне перебування в якій є комфортним тільки для гірських туристів і альпіністів на висотах від 4 до 7 тис. м над р.м. Висоти понад 8-9 тис. м доступні виключно добре тренованим альпіністам при обмеженому часі перебування. Це анабіотична зона, постійне перебування в якій несумісне з повноцінним життям і розмноженням живих організмів [15, 56]. Викладені положення та аналіз наукової літератури дають основу для припущення, що правильний вибір саногенної зони і дози гіпоксії може бути одним із факторів підвищення функціональної активності клітин і покращення загального стану КТ.

В останні роки збільшилася кількість наукових досліджень по вивченню позитивного впливу зниженого PO_2 на фізіологічне ремоделювання КТ [209]. Достеменно показано, що PO_2 у межах від 2 до 12% O_2 у повітрі може мати як позитивний, так і негативний ефект. Механізм позитивної реакції організму у відповідь на гіпоксію зі зниженням вмісту кисню до 10-12% призводить до тривалої адаптації [3, 10, 12, 30, 43, 49, 52, 84, 170]. А саме: у клітинах збільшується кількість мітохондрій та активність ферментів дихального ланцюга, прискорюється циклозис [11, 13, 78, 79], збільшується кількість кровоносних капілярів, підвищується активність ЛФ та КФ в КТ, що відіграє стимулюючу роль у її ремоделюванні [18, 20, 22, 55, 58, 97]. Вплив жорсткої гіпоксії має протилежний ефект. Саме тому інтенсивність ремоделювання КТ залежить як від зниження PO_2 , так і від тривалості його впливу [105].

Гіпоксія (2% PO_2) призводить до зростання кількості та розмірів остеокластів шляхом регуляції IGF-2 [97]. Також збільшувалася площа резорбції остеокластів [97, 210]. В умовах гіпоксичного середовища з 5% кисню прискорюється проліферація та диференціація клітин остеобластичної лінії [9]. При 2-5% O_2 знижується секреція ЛФ та організація фібрил колагену. Такий гальмуючий вплив жорсткої гіпоксії відбувається за рахунок зниження проліферації остеобластів, а саме експресії Runx2

(транскрипційного фактору їхньої диференціації). Гіпоксичний вплив, що відповідає 8% O_2 прискорює диференціацію мезенхімальних стромальних клітин остеогенної лінії [210]. При гіпоксії 10% O_2 підвищується швидкість проліферації остеоцитів, знижується активність ЛФ та синтез колагену [114, 190].

Попередні дослідження співробітників нашого відділу підтвердили, що ДНГ саногенного рівня діє на концентрацію паратиреоїдного гормону, остеокальцину та СІСР, які позитивно впливають на інтенсивність ремоделювання КТ у щурів. Різні режими подачі гіпоксії мають відмінну ефективність [55, 104]. Дозоване зниження PO_2 у повітрі до рівня 10-12% активує процеси ремоделювання КТ. Його застосовують як один із засобів попередження деструкції КТ. Проте, параметри такого біофізичного фактору залишаються не до кінця з'ясованими. Тривалість подачі та рівень PO_2 визначають кінцевий ефект її позитивної або негативної дії. Аналіз даних спеціальної літератури вказує на можливість використання ДНГ для корекції інтенсивності фізіологічного ремоделювання КТ [86].

У дорослому організмі існують сформовані генетичні, фізіологічні та біохімічні механізми, які активують захисно-пристосувальні реакції за умов дозованого короточасного зниження PO_2 саногенного рівня [239]. При цьому стимулюється активність кісткового мозку, проліферація клітин, збільшується кількість еритроцитів та концентрація гемоглобіну [24].

При гіпоксії саногенного рівня спостерігається підвищення активності ЛФ кісткового морфогенетичного білку-2 (BMP-2) [198], підвищується остеогенез [180, 193, 238]. Показано, що ДНГ індукує зниження об'єму назальної порожнини, що відображає інтенсивний розвиток велико-лицьових кісток [167]. В інших дослідженнях показано, що ДНГ підвищує кісткову мінеральну щільність [86].

Рівень парціального тиску кисню є надзвичайно важливим фактором у ремоделюванні КТ, діючи через HIF [181], який є ключовим стимулятором ангиогенезу. Новітні результати досліджень дають змогу припустити, що HIF

та VEGF відіграють допоміжну роль між процесами ангіогенезу та остеогенезу протягом утворення та відновлення КТ [227]. ДНГ підвищує остеогенез разом з VEGF, ЛФ та генною регенерацією BMP-2. Ці молекули експресуються в остеобластах та запускають ангіогенез та остеогенез через HIF-1 λ [184]. Кисень є необхідним елементом аеробних процесів для ферментативних реакцій при розвитку тканин, тоді як HIF та VEGF відіграють важливу роль при виживанні за гіпоксичних умов [181]. ДНГ стимулює ремоделювання КТ [231]. Більше того, активація HIF при гіпоксії певного рівня запобігає втраті КТ у мишей з недостатком естрогену, підвищує кісткову мінеральну щільність у трабекулярній мікроархітектурі [213].

Аналіз даних сучасної літератури свідчить, що підвищення рівня мелатоніну в крові так само, як і зниження PO₂ до межі саногенного рівня активує процеси ремоделювання КТ. Використання одночасної дії цих двох факторів може бути застосоване для активації процесів ремоделювання КТ у різних ситуаціях, що призвели до пригнічення остеогенезу. Особливо важливими факторами, які визначають позитивний чи негативний кінцевий ефект дії є ступінь зміни інтенсивності концентрації мелатоніну або рівня PO₂. Розмежування конкретних параметрів цих впливів у кожному випадку може надати новітні відомості для цілеспрямованої корекції фізіологічної активності процесів ремоделювання КТ.

Одним із сучасних напрямків дослідження механізмів ремоделювання КТ є вивчення впливу на цей процес зовнішніх факторів, які діють на живі організми постійно і часто незалежно від неї (біоритми, концентрація кисню в повітрі, спосіб життя) а також багатьох внутрішніх регуляторних факторів та системних патологічних розладів таких як гіпертензія. По мірі накопичення експериментальної наукової інформації відбувається еволюція поглядів на процеси ремоделювання КТ. Однак залишається чимало питань, які потребують подальших досліджень. Одночасна дія двох зовнішніх факторів на ремоделювання КТ - мелатоніну та зниженого PO₂ вивчалась у

експерименті деякими дослідниками у нормотензивних щурів. Експериментальні дані стосовно ремоделювання КТ за дії цих двох зовнішніх факторів на тлі підвищеного артеріального тиску досі не вивчалися. Дослідження можливого впливу цих факторів становлять інтерес як для виявлення нових фізіологічних закономірностей метаболізму КТ, так і у розробці практичних рекомендацій щодо медикаментозних та/або біофізичних впливів при розладах фізіологічного стану КТ.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Загальна характеристика об'єктів та протокол дослідження

Дослідження проведено на 192 зрілих щурах-самцях лінії Вістар середньою масою 200 ± 25 г на початок експерименту та спонтанно-гіпертензивних (SHR, з масою 230 ± 30 г) в осінній (жовтень-листопад) та весняний (березень-квітень) періоди. SHR – спеціальні трансгенні лінії щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією, що є адекватною моделлю даного захворювання у людей. З цією особливістю тварини народжуються. У щурів лінії SHR підвищений артеріальний тиск спостерігають у віці від 4-12 тижнів. Гіпертензія виникає у 100% випадків і передається спадково [228]. Артеріальний тиск у щурів вимірювали в умовах віварію неінвазивним методом на хвостовій артерії за допомогою сфінгоманометра (S-2 «SHE», Німеччина). В експеримент брали тварин лінії SHR із систолічним тиском не нижче 145 мм.рт.ст.

Щурів обох ліній розподілили на групи по 12 особин у кожній: I – інтактні тварини, II – щури, яким вводили мелатонін, III – щури, які зазнавали впливу ДНГ, IV – тварини, які зазнавали одночасної дії ДНГ та мелатоніну. Щурів одержали із розплідника віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (табл. 2.1.1). Тварини усіх груп перебували в уніфікованих умовах зі стандартним раціоном харчування. Щурам дослідних груп II та IV перорально у дозі 5 мг/кг маси тіла вводили 1 мл водної суспензії мелатоніну («Unipharm Inc.», США) о 10.00 годині ранку натщесерце. Контрольним щурам у той самий час вводили еквівалентну кількість фізіологічного розчину. Щурів дослідних груп III і IV розміщували в герметичній камері, в яку за допомогою мембранного газорозподільчого елементу, під контролем ротаметрів, подавали газову суміш (12% кисню в азоті) в переривчастому режимі: 15 хвилин деоксигенація/15 хвилин

реоксигенація протягом 2 годин та 22 години дихання атмосферним повітрям.

Гіпоксичну газову суміш ми отримували за допомогою газорозподільчого елементу з використанням полімерних мембран із полі-4-тетраметилпентену-1. Цей полімер має селективну спорідненість до молекул кисню, проходження яких крізь мембрану дає змогу відокремлювати молекули O_2 повітря від молекул азоту. Змішуючи потоки O_2 і N_2 на виході пристрою у різних пропорціях, ми одержували газову суміш із заданим рівнем PO_2 . Подачу ДНГ здійснювали в переривчастому режимі завдяки створеному блоку програмування з періодичним вмиканням та вимиканням через задані інтервали часу.

Тривалість експерименту становила 28 діб. Щурів декапітували під легким ефірним наркозом відповідно до вимог міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Конвенція Ради Європи про охорону хребетних тварин, 1986 р., Директиви ЄС №609, 1986 р., Наказ МОЗ України №66, 2006 р., Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV, 2006 р.). Всі тварини постійно знаходилися під наглядом ветеринарного лікаря віварію та служби санітарного нагляду.

Біохімічні показники фізіологічного ремоделювання КТ досліджували за допомогою фізико-хімічних (спектрофотометрія, тонкошарова хроматографія) та імунохімічних (імуноферментний аналіз) методів. У сироватці крові визначали показник формування КТ (активність ЛФ) та резорбції – активність КФ, ТРКФ («Лахема», Чехія), концентрацію ГАГ [48] і піридиноліну («Quidel Corporation», США). У екстракті КТ - уронові кислоти (УК) [54], гіалуронідазну активність (ГА) [87]. У сироватці крові визначали концентрації вТЗ («ДС-ИФА-Тироид-Т3 свободный», Російська Федерація) та вТ4 («ДС-ИФА-Тироид-Т4 свободный», Російська Федерація), амінокислотний [44, 51] та ліпідний склад КТ [69].

Таблиця.2.1.1. Схема експерименту та розподіл тварин по групах (n – кількість тварин у групі)

Лінія тварин	Сезон	№ групи тварин	Умови проведення експерименту протягом 28 діб
Вістар	осінь	I	Віварний контроль (n=12)
		II	Мелатонін (5 мг/кг маси тіла тварини, n=12)
		III	Дозована нормобарична гіпоксія ($PO_2=12\%$, n=12)
		IV	Дозована нормобарична гіпоксія+мелатонін ($PO_2=12\%+5$ мг/кг маси тіла тварини, n=12)
	весна	I	Віварний контроль (n=12)
		II	Мелатонін (5 мг/кг маси тіла тварини, n=12)
		III	Дозована нормобарична гіпоксія ($PO_2=12\%$, n=12)
		IV	Дозована нормобарична гіпоксія+мелатонін ($PO_2=12\%+5$ мг/кг маси тіла тварини, n=12)
SHR	осінь	I	Віварний контроль (n=12)
		II	Мелатонін (5 мг/кг маси тіла тварини, n=12)
		III	Дозована нормобарична гіпоксія ($PO_2=12\%$, n=12)
		IV	Дозована нормобарична гіпоксія+мелатонін ($PO_2=12\%+5$ мг/кг маси тіла тварини, n=12)
	весна	I	Віварний контроль (n=12)
		II	Мелатонін (5 мг/кг маси тіла тварини, n=12)
		III	Дозована нормобарична гіпоксія ($PO_2=12\%$, n=12)
		IV	Дозована нормобарична гіпоксія+мелатонін ($PO_2=12\%+5$ мг/кг маси тіла тварини, n=12)

Примітка: в експерименті використано всього 192 тварини

2.2. Визначення показників ремоделювання кісткової тканини у щурів

2.2.1. Визначення активності лужної фосфатази в сироватці крові щурів

Принцип методу («Лакхема», Чехія – стандартний набір реактивів): ЛФ (лужна фосфогідролаза моноестерів ортофосфорної кислоти, КФ 3.1.3.1) розщеплює у N-метил-D-глюкаміновому буфері 4-нітрофенілфосфат з утворенням 4-нітрофенолу і фосфату. Лужна фосфатаза активується хлоридом натрію. Мірою каталітичної активності ферменту є кількість вивільненого 4-нітрофенолу, який вимірюють фотоколориметрично після зупинки ферментативної реакції інгібітором ЛФ, що блокує активний центр ферменту. Активність ЛФ визначали за методикою оцінки активності ЛФ у сироватці крові, наведеною в інструкції стандартного набору реактивів.

Реактиви:

1. Субстрат- 4-нітрофенілфосфат (0,92 мМ/фл);
2. Буфер – N-метил-D-глюкаміновий (42,6 мМ/фл);
3. Стандартний розчин – 4-нітрофенол (2,4 мМ/л);
4. Розчин інгібітора складається з двунатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти дигідрата (30 мМ/л) і гідроксиду натрію (1мМ/л).

До контрольної і дослідної пробірок додавали по 1,0 мл розчину 2. Потім у дослідну пробірку вносили 0,02 мл негемолізованої сироватки крові, перемішували і преінкубували 5 хвилин при 37°C. Після чого додавали в обидві пробірки по 0,2 мл розчину 1 (стартували реакцію) і інкубували їх рівно 10 хвилин при 37°C. Реакцію зупиняли додаванням в обидві пробірки розчину 4. В контрольну пробу додавали ще 0,02 мл негемолізованої сироватки крові. Перемішували і через 20 хвилин вимірювали оптичну щільність дослідної проби (A1) і контрольної проби (A2) проти dist. H₂O при $\lambda=410$ нм, l=3 мм. Вираховували різницю оптичних щільностей: $\Delta A=A1-A2$.

Каталітичну концентрацію ЛФ у пробі розраховували за формулою:

$$\text{ЛФ (мккат/л)} = 8,373 \cdot \Delta A,$$

де 8,373 – коефіцієнт перерахунку при $\lambda=410$ нм. Перерахунок одиниць робили з урахуванням того, що 1 кат/л=1 Моль/л.с, або 1 мккат/л = 60 О/л.

2.2.2. Визначення активності кислої фосфатази і тартратрезистентної кислої фосфатази у сироватці крові щурів

Принцип методу («Лакхема», Чехія – стандартний набір реактивів): КФ (фосфомоноестераза естерів ортофосфорної кислоти, КФ 3.1.3.2) у кислому середовищі розщеплює 4-нітрофенілфосфат і фосфат. Мірою активності ферменту є кількість звільненого 4-нітрофенолу, який вимірюється фотоколориметрично після зупинення ферментативної реакції. Простатичний ізофермент виражено L(+) тартратлабільний, його визначають за різницею загальної та залишкової каталітичної концентрації, яку отримали в присутності тартрату. КФ активована хлоридом натрію.

Реактиви:

1. Цитратний буфер – 0,55 М/л;
2. 4-нітрофенілфосфат субстрат – 0,055 мМ/табл.;
3. Калій-натрій тартрат – 1 мМ/табл.;
4. Стандартний розчин 4-нітрофенол – 0,54 мМ/л;
5. Розчин інгібітору складається з двонатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти дигідрату (30 мМ/л) і гідроксиду натрію (0,1 М/л).

У контрольну (A_3) і дві дослідні (A_1 і A_2) проби додавали по 0,5 мл розчину 2. У пробу A_2 приливали 0,02 мл розчину 3. Вміст пробірок ретельно перемішували, інкубували 5 хвилин, при 37°C. Потім у 2 дослідні пробірки додавали по 0,05 мл сироватки крові. Інкубували точно 30 хвилин при 37°C і додавали по 2,0 мл розчину інгібітора у контрольну і дві дослідні проби, а у стандартну (A_4) – 2,5 мл. Також до стандартної проби додавали 0,05 мл сироватки крові. Всі проби ретельно перемішували і через 20 хвилин

вимірювали оптичну щільність проб A_1 і A_2 , контрольного розчину A_3 і стандартного A_4 проти dist. H_2O на фотоелектроколориметрі КФК-3 при $\lambda=405$ нм, $l=1,0$ мм.

Розраховували калібрувальний фактор (F), що дійсний для даного фотометра, довжини хвилі, кювети, піпетки: $F=300:A_4$. Загальну каталітичну активність КФ (нкат/л) розраховували по формулі:

$$F(A_1 - A_3).$$

Каталітичну активність ТРКФ (нкат/л) розраховували по формулі:

$$F(A_1 - A_2).$$

Перерахунок одиниць здійснювали виходячи з того, що $1 \text{ кат/л} = 1 \text{ моль/л} \cdot \text{с}$, $1 \text{ мккат/л} = 60 \text{ О/л}$.

Підготовку стегових кісток і екстрактів із них для визначення КФ у КТ здійснювали як описано у розділі при визначенні ЛФ.

Подальший розрахунок активності КФ у КТ здійснювали в мкмоль/хв·г тканини за формулою:

$$E = (E_{\text{оп}} - E_{\text{к}}) \cdot 0,101 \cdot P_1/P_2, \text{ де:}$$

E – активність в мікромолях у хвилину на грам тканини;

$E_{\text{оп}}$ – екстинція досліджуваної проби;

$E_{\text{к}}$ – екстинція контрольної проби;

P_1 – загальна вага в грамах КТ, яку взяли для гомогенізації і вага (об'єм) гомогенізуючої рідини;

P_2 – вага тканини в мг у гомогенаті (кюветі);

0,101 – коефіцієнт перерахунку для КФ.

2.2.3. Визначення концентрації уронових кислот у кістковій тканині щурів

Принцип методу [54]: УК при нагріванні з сильними мінеральними кислотами перетворюються в альдегід фурфуролу або його гомологи, які виявляються у вигляді продуктів їх полімеризації з карбазолом.

Реактиви:

1. Натрій тетраборнокислий (бура) – 0,025 М у конц. H_2SO_4 ;
2. Карбазол – 0,125%-розчин у метанолі;
3. Стандартний, 10 мг% водний розчин глюкуронлактона.

До пробірки з наважкою КТ (20 мг) додавали 1 мл dist. H_2O і дуже повільно 5,0 мл реактиву 1. Суміш інкубували 15 хвилин при 100°C . Охолоджували і додавали 0,2 мл реактиву 2. Ретельно перемішували і знову суміш інкубували 15 хвилин при 100°C . Після охолодження вимірювали на фотоелектроколориметрі КФК-3 при $\lambda=530$ нм, $l=5,0$ мм проти контрольної проби, в яку замість карбазолу вносили 0,2 мл dist. H_2O . Розрахунок проводили по стандартній кривій, яку будували з глюкуронлактоном у концентрації від 10 до 100 мкг.

2.2.4. Визначення концентрації глікозаміногліканів орциновим методом у сироватці крові щурів

Принцип методу [48]: ГАГ виділяли із крові цетилпіридинію хлоридом. Вивільнені у результаті гідролізу гексози взаємодіють з орциновим реактивом і забарвлюють розчин у рожевий колір. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна вмісту гексоз.

Реактиви:

1. 1% водний розчин цетилпіридинію хлориду;
2. 0,1 N NaOH;

3. Орциновий реактив – змішати 7,5 об'ємних частин розведеної H_2SO_4 (у співвідношенні 60 мл конц. H_2SO_4 і 40 мл деіонізованої H_2O) з 1 об'ємом розчину орцину (1,6 г орцину/100 мл деіонізованої H_2O). Суміш готували перед використанням.
4. Калібрувальний розчин гексоз (0,1 г/л), що складається із галактози і манози у співвідношенні 1:1.

До 0,1 мл сироватки крові додавали 0,1 мл реактиву 1 і 0,8 мл деіонізованої H_2O , перемішували. Центрифугували при 3000 об./хв. протягом 15 хвилин. Осад двічі промивали реактивом 1, центрифугували і супернатант зливали. Пробірки перевертали на фільтрувальний папір на 30 – 60 с. До осаду додавали 2,0 мл реактиву 2 і 30 хвилин витримували на водяні бані при 37°C до повного розчинення осаду. Після чого додавали 8,5 мл реактиву 3. Перемішували і на 30 хвилин поміщали на водяну баню при 80°C , закривши краплевловлювачами. Пробірки охолоджували до кімнатної температури під проточною водою. Вимірювали оптичну щільність розчину на фотоелектроколориметрі КФК-3 при $\lambda=540$ нм, $l=10,0$ мм.

Паралельно ставили холосту пробу (до 1,0 мл 0,1 NaOH додавали 8,5 мл орцинового реактиву) і стандартну (до 0,1 мл стандартного розчину гексоз додавали 0,9 мл 0,1 NaOH і 8,5 мл орцинового реактиву). Розрахунок проводили за формулою:

$$C_d = E_d \cdot 0,1 / E_k, \text{ де}$$

C_d – концентрація гексоз у досліджуваній сироватці крові;

0,1 – концентрація гексоз у стандартному розчині;

E_d – екстинція досліджуваної проби;

E_k - екстинція стандартної проби.

2.2.5. Визначення гіалуронідазної активності у сироватці крові щурів

Принцип методу [87]: розпад ГАГ у тканинах здійснюється лізосомальними ферментами гіалуроноглюкозамінідазою (КФ 3.2.1.35) і гіалуроноглюкоронідазою (КФ 3.2.1.36). Після інкубації ферментвмістної біологічної рідини з гіалуроновою кислотою визначали продукти її розпаду з карбазольним реактивом.

Реактиви:

1. Розчин калія гіалуроновокислого (2 мг/мл) у dist.H₂O;
2. 0,1 М ацетатний буфер (pH 3,8);
3. 95-96% C₂H₅OH;
4. Концентрація H₂SO₄ (ч.д.а.);
5. Розчин карбазолу в 95-96% C₂H₅OH (1,25 мг/мл);
6. Стандартні розчини: 1, 2, 5, 10 мкг глюкуронової кислоти в 0,5 мл dist.H₂O (м.в. глюкуронової кислоти = 196 Д).

У дві центрифужні пробірки (одна з них холоста проба) вносили по 0,1 мл реактиву 1 (субстрат) і 0,3 мл буферного розчину. У досліджувану пробу додавали 0,1 мл охолодженої (2-4°C) сироватки крові – джерело ГА. Вміст пробірок перемішували та інкубували 30 хвилин при 37-38°C. Охолоджували у воді з льодом. До холостої проби додавали 0,1 мл сироватки крові. Далі в обидві пробірки вносили по 1,0 мл охолодженого реактиву 3. Перемішували і через 5-6 хв. центрифугували при 3000 об./хв. 6 хвилин. До 0,5мл супернатанту досліджуваної і холостої проби на льоду додавали по 2,5 мл реактиву 4. Обережно перемішували, охолоджували проби і нагрівали протягом 10 хвилин при 100°C, знову охолоджували на льоду. Після цього приливали по 0,1 мл розчину 5, перемішували, охолоджували на льоду і повторно нагрівали 10 хв. при 100°C. Проби вимірювали на фотоелектроколориметрі КФК-3 проти холостої проби при $\lambda=530$ нм, $l=5,0$ мм. Кількість продуктів гідролізу гіалуронової кислоти визначали в мкг глюкуронової кислоти по калібрувальному графіку. ГА виражали в мкМ

глюкуронової кислоти в 1 л сироватки крові за 1 годину інкубації (мкМ/л/год).

2.2.6. Визначення концентрації піридиноліну у сироватці крові щурів

Принцип методу (Metra Serum PYD EIA kit «Quidel Corporation», США). Визначення концентрації піридиноліну в сироватці крові щурів є конкурентним імуноферментним дослідженням в мікропланшетному форматі. Піридинолін в зразках та стандартах конкурує з піридиноліном, іммобілізованому в лунках мікропланшета за поліклональні кролячі анти-піридинолін-антитіла. Зв'язані антитіла виявляються козячими анти кролячими антитілами, кон'югованими з ЛФ та реакція виявляється рNPP субстратом.

Реагенти та матеріали:

1. S – стандарти піридиноліну (кат. №4552) – 120 нмоль/л 0,3 мл очищеного піридиноліну з людської сечі в 10 ммоль/л фосфорної кислоти з 0,05% азиду натрію в якості консерванту.
2. L/H - нижній/верхній контролі (кат. №4553, 4554) – 0,3 мл кожний очищеного піридиноліну з людської сечі в 10 ммоль/л фосфорній кислоті з 0,05 азиду натрію в якості консерванту.
3. Стрипи (кат. №4668) 12•8=96 лунок, очищений піридинолін з говяжої кістки, адсорбований на відламуванні, стрипи в упаковці з фольги.
4. Стоп-розчин (кат. №4702) – 15 мл, 0,5 N NaOH.
5. 10x промивочний буфер (кат. №4703) - 55 мл, неіонний детергент в буферному розчині з 0,05% азиду натрію в якості консерванту.
6. Робочий буфер (кат. №4704), 55 мл, неіонний детергент в буферному розчині з 0,05% азиду натрію в якості консерванту.
7. Субстратний буфер (кат. №4705), 3*10 мл, розчин діетаноламіну та хлориду магнію з 0,05% азиду натрію в якості консерванту.

8. Субстратні таблетки (кат. №0012), 3*20 мг, р-нітрофеніл фосфат.
9. Ферментний кон'югат (кат. №4544), 3 кожний, ліофілізовані козячі анти кролячі антитіла, кон'юговані з лужною фосфатазою, з буферними солями і стабілізаторами.
10. Пірідолінові антитіла (кат. № 4543), 9 мл кролячі поліклональні анти-пірідинові антитіла з буферними солями та 0,05% азиду натрію в якості консерванту.
11. Реагент 1 (кат. №4744), 6 мл, гліциновий розчин, що містить кольоровий індикатор і проклін 300 (0,05%) як консервант.

Процедура аналізу:

1. Приготували стандарти, контролі, зразки і реагенти згідно інструкції.
2. Додали 50 мкл реагенту в кожную лунку за допомогою мультиканальної піпетки.
3. Додали 25 мкл розведеного стандарту, контролю та нерозведених фільтрованих зразків в лунки стрипу. Цей крок завершили до 20 хвилин.
4. Додали 75 мкл холодних пірідолінових антитіл в кожную лунку. Вводили пірідолінові антитіла з потрібною силою, щоб бути впевненим в адекватному перемішуванні. Злегка постукали по рамці зі стрипами кілька разів. Закрили стрипи плівкою. Інкубували 18-24 год при 2-8 °С в темноті.
5. Вручну перевернули стрипи. Додали 250 мкл приготовленого 1х промивочного буферу в кожную лунку і перевернули стрипи. Повторили двічі до загальної кількості 3 рази. Перевернули стрипи для просушки на паперовий рушник після останньої промивки.
6. Додали 150 мкл відновленого ферментного кон'югату кімнатної температури в кожную лунку (додали 10 мл 1х промивочного буферу на кожний потрібний флакон). Інкубували 60±5 хв при 20-28 °С.
7. Вручну перевернули стрипи. Додали 250 мкл приготовленого 1х промивочного буферу в кожную лунку і перевернули стрипи. Повторили двічі до загальної кількості 3 рази. Перевернули стрипи для просушки на

паперовий рушник після останньої промивки. Витерли денця стрипів після останньої промивки паперовим рушником, переконалися, що вони чисті.

8. Додали 150 мкл розчину робочого субстрату в кожен лунку. Інкубували 40 ± 5 хв при $20-28^{\circ}\text{C}$.

9. Додали 100 мкл стоп-розчину в кожен лунку, щоб зупинити реакцію. Внесли стоп-розчин в такій самій послідовності і з такою ж швидкістю, як і субстратний розчин.

10. Зчитали оптичну щільність при 405 нм. Переконалися у відсутності бульбашок в лунках та чистоті дна стрипів. Зчитування провели до 15 хв після додавання стоп-розчину.

11. Обрахували результати аналізу використовуючи програмне забезпечення з 4-параметричною кривою.

12. Визначили концентрацію зразків та контролів по стандартній кривій.

13. Контролі були в межах визначених сертифікатом аналізу, доданого до набору.

Результати зразків виражаються в нМ/л і не потребують корекції на розведення.

2.3. Визначення гормонів щитоподібної залози у сироватці крові щурів

2.3.1. Визначення концентрації вільного трийодтироніну у сироватці крові щурів

Принцип методу («ДС-ИФА-Тироид-Т3 свободный», Російська Федерація). Метод визначення базується на твердофазному конкурентному імуноферментному аналізі із застосуванням моноклональних антитіл. При додаванні дослідного зразку до кон'югату Т3-пероксидази під час інкубації, ендogenous Т3 сироватки крові конкурує з Т3, що входить до складу

кон'югату і зв'язується із моноклональними антитілами до ТЗ, іммобілізованими на внутрішній поверхні лунок планшету.

При видаленні вмісту із лунок відбувається розподіл вільного і зв'язаного з антитілами кон'югату ТЗ-пероксидази, при чому кількість зв'язаного антитілами кон'югату зворотно пропорційна кількості вільного ТЗ в зразку сироватки крові.

Під час інкубації з ТМБ-субстратним розчином відбувається фарбування розчину в лунках. Ступінь фарбування прямо пропорційний до кількості зв'язаного антитілами кон'югату ТЗ-пероксидази. Після вимірювання оптичної густини розчину в лунках на основі калібровочного графіку розраховується концентрація вТЗ в досліджуваних зразках (табл. 2.3.1.1).

Таблиця.2.3.1.1. Склад набору реагентів «ДС-ИФА-Тироид-ТЗ свободный»

Характеристика реагентів	Форма випуску
Імуносорбент – планшет полістироловий розбірний (12 стрипів по 8 лунок кожен, розбірність до 1 лунки) з іммобілізованими на внутрішній поверхні лунок моноклональними антитілами до трийодтироніну	1 шт.
Кон'югант – трийодтиронін (ТЗ), мічений пероксидазою хрину. Прозора або опалесцирована яскраво-рожева рідина. В якості консерванту містить 0,1% проклін 300	1 флакон 12,0 мл
Калібратор 0, калібратор 1, калібратор 2, калібратор 3, калібратор 4 – стандартні калібровочні проби на основі сироватки крові, містять відомі кількості вільного ТЗ. Прозорі або злегка опалесцировані світло-жовті рідини. Значення концентрацій трийодтироніну в калібровочних пробах вказані на етикетках флаконів і в аналітичному паспорті якості. В якості консервантів містять: 0,1% проклін 300, 0,01% тімеросал, 0,1% фенол	5 флаконів по 0,5 мл

Контрольна сироватка – сироватка з відомим вмістом вільного ТЗ. Прозора або опалесцирована світло-жовта рідина. Значення концентрації трийодтироніну в сироватці вказане на етикетці флакону і в аналітичному паспорті якості. В якості консервантів містить: 0,1% проклін 300, 0,01% тімеросал, 0,1% фенол	1 флакон 0,5 мл
ПР (концентрат x 25) – промивний розчин, концентрат. Прозора або злегка опалесцирована, безколірна або світло-жовта рідина.	1 флакон 50,0 мл
ТМБ-Субстратний розчин – прозора безколірна рідина.	1 флакон 14,0 мл
Стоп-реагент/0,2М – сірководнева кислота в концентрації 0,2 моль/л. Прозора безколірна рідина.	1 флакон 25,0 мл

Проведення аналізу:

1. Стандартні калібровочні проби і контрольну сироватку вносили по 25 мкл в двох повторях. В решту лунок вносили дозатором по 25 мкл досліджуваних зразків в дублікатах. Час внесення зразків не перевищував 10 хвилин.
2. У всі лунки, крім лунок із контролем ТМБ-Субстратного розчину, вносили по 100 мкл кон'югату, стрипи планшету закривали кришкою або захисною плівкою та інкубувати на шейкері протягом 1 години при кімнатній температурі зі швидкістю струшування від 500 до 800 об/хв.
3. Після цього вміст лунок видаляли за допомогою вошера (або багатоканальної піпетки) в ємкість для збору інфікованого матеріалу, імуносорбент промивали 5 раз робочим розчином ПР, заливаючи його до країв лунок (не менше 300 мкл в лунку) і видаляючи промивний розчин за допомогою вошера (або багатоканальної піпетки) в ємкість для збору інфікованого матеріалу. Після промивання ретельно видаляли залишки рідини з лунок постукуванням по рамці із стрипами в перевернутому положенні по фільтрувальному папері.

4. У всі лунки промитого планшету вносили по 100 мкл ТМБ-Субстратного розчину, витримували 20-30 хвилин при кімнатній температурі в темноті.
5. Реакцію зупиняли додаванням у всі лунки планшету по 150 мкл стоп-реагенту, струшували стрипи на шейкері протягом 5-10 сек і проводили визначення результатів. Час між зупинкою реакції і визначенням не перевищував 20 хвилин.
6. Контроль внесення кон'югату проводили при довжинах хвиль 540 (550) нм, критерій ОП > 0,500.
7. Реєстрацію результатів проводили спектрофотометрично при довжині хвилі 450 нм з налаштуванням приладу по «повітрю».

Реакцію враховували, якщо середнє значення ОП у лунках з контролем ТМБ-Субстратного розчину не перевищує 0,2.

Одиниця виміру отриманих результатів пг/мл. Правила перерахунку результатів: $\text{пмоль/л} \cdot 0,651 = \text{пг/мл}$; $\text{пг/мл} \cdot 1,536 = \text{пмоль/л}$.

2.3.2. Визначення концентрації вільного тироксину у сироватці крові щурів

Принцип методу («ДС-ИФА-Тироид-Т4 свободный», Російська Федерація). Метод визначення базується на твердофазному конкурентному імуноферментному аналізі із застосуванням моноклональних антитіл. При додаванні дослідного зразку і кон'югату Т4-пероксидази під час інкубації, ендогенний Т4 сироватки крові конкурує з Т4, що входить до складу кон'югату і зв'язується з моноклональними антитілами до Т4, іммобілізованими на внутрішній поверхні лунок планшету. При видаленні вмісту із лунок відбувається розподіл вільного і зв'язаного з антитілами кон'югату Т4-пероксидази, при чому кількість зв'язаного антитілами кон'югату зворотно пропорційна кількості вільного Т4 в зразку сироватки крові. Під час інкубації з ТМБ-субстратним розчином відбувається

фарбування розчину в лунках. Ступінь фарбування прямо пропорційний до кількості зв'язаного антитілами кон'югату Т4-пероксидази. Після вимірювання оптичної густини розчину в лунках на основі калібровочного графіку розраховується концентрація вТ4 в досліджуваних зразках (табл. 2.3.2.1).

Схема проведення аналізу:

1. Внесли по 25 мкл калібраторів, контрольної сироватки і дослідних зразків у двох повторях.
2. Внесли по 100 мкл кон'югату у всі лунки, крім лунок з контролем ТМБ-Субстратного розчину.
3. Інкубували 30 хвилин у шейкері при температурі 37 °С або 60 хвилин при кімнатній температурі.
4. Промивали планшет 5 раз, не менше 300 мкл робочого промивного розчину.
5. Внесли по 100 мкл ТМБ-Субстратного розчину у всі лунки.
6. Інкубували 20-30 хв у темноті.
7. Внесли по 150 мкл стоп-реагенту.
8. Струшували протягом 5-10 сек.
9. Визначення результатів проводили при довжині хвилі спектрофотметра 450 нм проти повітря.

Таблиця. 2.3.2.1. Склад набору реагентів «ДС-ИФА-Тироид-Т4 свободный»

Характеристика реагентів	Форма випуску
Імуносорбент – планшет полістироловий розбірний (12 стрипів по 8 лунок кожен, розбірність до 1 лунки) з іммобілізованими на внутрішній поверхні лунок моноклональними антитілами до тироксину	1 шт.
Кон'югант – тироксин (Т4), мічений пероксидазою хрину. Прозора або опалесцирована яскраво-рожева рідина. В якості консерванту містить 0,1% проклін 300	1 флакон 12,0 мл

Калібратор 0, калібратор 1, калібратор 2, калібратор 3, калібратор 4, калібратор 5 – стандартні калібровочні проби на основі сироватки крові, містять відомі кількості вільного Т4. Прозорі або злегка опалесцировані світло-жовті рідини. Значення концентрацій трийодтироніну в калібровочних пробах вказані на етикетках флаконів і в аналітичному паспорті якості. В якості консервантів містять: 0,1% проклін 300, 0,01% тімеросал, 0,1% фенол	6 флаконів по 0,5 мл
Контрольна сироватка – сироватка з відомим вмістом вільного Т4. Прозора або опалесцирована світло-жовта рідина. Значення концентрації трийодтироніну в сироватці вказане на етикетці флакону і в аналітичному паспорті якості. В якості консервантів містить: 0,1% проклін 300, 0,01% тімеросал, 0,1% фенол	1 флакон 0,5 мл
ПР (концентрат × 25) – промивний розчин, концентрат. Прозора або злегка опалесцирована, безколірна або світло-жовта рідина.	1 флакон 50,0 мл
ТМБ-Субстратний розчин – прозора безколірна рідина.	1 флакон 14,0 мл
Стоп-реагент/0,2М – сірководнева кислота в концентрації 0,2 моль/л. Прозора безколірна рідина.	1 флакон 25,0 мл

Одиниця виміру отриманих результатів пг/мл. Правила перерахунку результатів: $\text{пмоль/л} \cdot 0,777 = \text{пг/мл}$; $\text{пг/мл} \cdot 1,287 = \text{пмоль/л}$.

2.4. Визначення концентрації вільних амінокислот у кістковій тканині щурів

Для визначення амінокислотного складу, стегову кістку знежирювали і зневоднювали, а потім піддавали гідролізу при 100°C 20 хвилин у розчині 0,04 М CH_3COOH (1:10). Центрифугували 30 хвилин при 3000 об/хв. Супернатант випарювали при 40-60 °C і розчиняли в 0,1 мл 50% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Наносили на розмічену пластинку мікрошприцем по 20 мкл. Для розгонки використовували систему розчинників, яка включала ізоаміловий спирт – бутиловий спирт – оцтову кислоту – мурашину кислоту – воду (9:7:4:25) по об'єму [44, 51].

2.5. Визначення концентрації загальних ліпідів та їх фракцій у кістковій тканині щурів

Для визначення основних фракцій ліпідів у КТ стегнову кістку очищали від м'язів і відмивали від кісткового мозку. Наважку КТ (100 мг) знежирювали і зневоднювали в спирт:ацетоні (1:2) [69]. Потім спирт:ацетон випарювали, а сухий залишок ліпідів розчиняли в 100 мкл суміші хлороформ-бензол-ацетон (1:2:1) і наносили на розмічену хроматограму мікрошприцем. Хроматографічне розділення загальних ліпідів проводили на фабрично виготовлених пластинах «Silufol» (Чеська Республіка) розміром 15×15 см, попередньо активуючи їх впродовж 1 години в термостаті при 110⁰С. В цей же час в хроматографічну камеру для кращого насичення вносили фільтрувальний папір і наливали суміш розчинників: гексан-діетиловий ефір-оцтова кислота (7:23:1) [27].

2.6. Статистична обробка результатів

Для статистичного опрацювання отриманих результатів використовували програму Statistica 6. Нормальність розподілу даних аналізували тестом Шапіро-Вілка. Для статистичної оцінки даних застосовували метод однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) [159]. Оскільки розподіл був нормальним, дані представлені як середнє арифметичне та його статистична похибка ($M \pm m$). Вірогідність різниці між контрольними і дослідними зразками оцінювали за t-критерієм Стюдента. При $P < 0,05$ зміни вважали достовірними.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Сезонні варіації дії екзогенного мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини щурів ліній Вістар та SHR

У ремоделюванні КТ беруть участь остеобласти та остеокласти. Активність відповідних маркерів цих клітин відображають інтенсивність утворення або руйнування КТ. Для остеобластів, що забезпечують формування КТ, специфічним є фермент ЛФ.

Активність ЛФ у сироватці крові щурів лінії Вістар має сезонні відмінності. Восени після введення екзогенного мелатоніну цей показник достовірно зростає на 43,9% ($P < 0,05$) порівняно з контролем. Весною виявлено тенденцію до зниження активності даного ферменту на 8% порівняно з контрольними значеннями (рис.3.1.1, табл. 3.1.1, табл. 3.1.2). Таким чином, виявлено сезонні зміни в активності ЛФ на введення екзогенного мелатоніну.

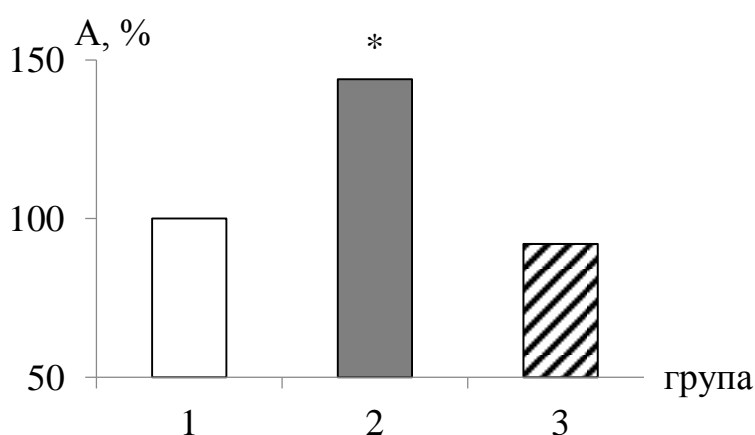


Рис. 3.1.1. Активність лужної фосфатази у сироватці крові щурів лінії Вістар контрольної групи (1) та після введення мелатоніну восени (2), весною (3):
* $P < 0,05$

Таблиця 3.1.1. Показники ремоделювання кісткової тканини в сироватці крові щурів ліній Вістар та SHR восени ($M \pm m$, $n=12$)

Показник, одиниця вимірюван ня	Вістар			SHR		
	Група I контроль	Група II мелатонін 5мг/кг маси тіла	$\Delta, \%$	Група I контроль	Група II мелатонін 5мг/кг маси тіла	$\Delta, \%$
Лужна фосфатаза, МО/л	30,36 \pm 1,89	43,68 \pm 3,41*	+43,9	25,87 \pm 1,31	11,86 \pm 2,95***	-54,1
Кисла фосфатаза, МО/л	44,10 \pm 7,19	36,96 \pm 5,77	-16,2	25,31 \pm 3,19	28,25 \pm 6,11	+11,6
Тартра- трезистен- тна кислота фосфатаза, МО/л	26,1 \pm 1,20	22,9 \pm 2,01	-12,1	15,2 \pm 1,30	16,63 \pm 1,90	+9,4
Глікозамі- ноглікани, г/л	0,30 \pm 0,01	0,16 \pm 0,02*	-46,7	0,17 \pm 0,03	0,14 \pm 0,01	-17,6
Уронові кислоти, мг/г	41,63 \pm 1,79	38,22 \pm 2,64	-8,2	42,25 \pm 1,94	36,29 \pm 2,14	-14,1
Гіалуроні- дазна активність, мкм/год	673,0 \pm 33,40	776,87 \pm 28,50*	+15,4	700,66 \pm 39,11	728,28 \pm 37,29	+3,9
Піридино- лін, нМ/л	2,51 \pm 0,40	1,3 \pm 0,20**	-48,0	2,4 \pm 0,40	1,8 \pm 0,08	-25,0

Примітки: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ – порівняно з контрольною групою тварин

У щурів лінії SHR за тих самих умов активність ЛФ у сироватці крові змінюється однонаправлено. Ми спостерігали вірогідне зниження показника на 54% ($P < 0,001$) восени та на 17,3% ($P < 0,05$) весною (рис 3.1.2, табл.3.1.1, табл. 3.1.2, табл. 3.1.3).

Результати отримані нами восени на щурах лінії Вістар співпадають з даними літератури щодо впливу мелатоніну на проліферацію остеобластів та

активність ЛФ [194, 226]. Весною, цей показник мав тенденцію до зниження, що узгоджується з даними літератури [179, 264].

Таблиця 3.1.2. Показники ремоделювання кісткової тканини в сироватці крові щурів ліній Вістар та SHR весною ($M \pm m$, $n=12$)

Показник, одиниця вимірюван ня	Вістар			SHR		
	Група I контроль	Група II мелатонін 5 мг/кг маси тіла	$\Delta, \%$	Група I контроль	Група II мелатонін 5 мг/кг маси тіла	$\Delta, \%$
Лужна фосфатаза, МО/л	61,54 \pm 2,52	56,66 \pm 2,65*	-8	61,54 \pm 2,52	50,9 \pm 3,49	-17,3
Кисла фосфатаза, МО/л	29,53 \pm 1,70	52,61 \pm 2,40***	+78,2	29,53 \pm 1,70	48,64 \pm 3,70***	+64,7
Тартрат- резистен- тна кисла фосфатаза, МО/л	42,64 \pm 1,70	7,59 \pm 0,63***	-82,2	44,1 \pm 2,2	34,8 \pm 3,20**	-21,0
Глікозамі- ноглікани, г/л	0,07 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	+28,6	0,07 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01**	+85,7
Уронові кислоти, мг/г	30,47 \pm 1,58	27,92 \pm 1,17	-8,4	30,47 \pm 1,58	31,13 \pm 1,11	+2,2
Гіалуроні- дазна активність, мкм/год	444,9 \pm 27,40	436,9 \pm 37,50	-1,8	444,9 \pm 27,40	635,2 \pm 30,30**	+42,8
Піридино- лін, нМ/л	2,1 \pm 0,20	1,2 \pm 0,2*	-42,9	2,2 \pm 0,4	1,9 \pm 0,2	-13,6

Примітки: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ – порівняно з контрольною групою тварин

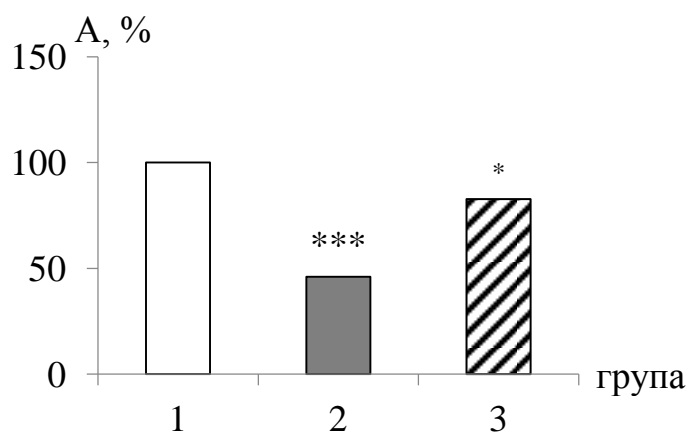


Рис.3.1.2. Активність лужної фосфатази у сироватці крові щурів лінії SHR контрольної групи (1) та після введення мелатоніну восени (2), весною (3): * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ - порівняно з контрольною групою тварин

У щурів лінії SHR в осінній та весняний періоди вірогідне зниження активності ЛФ може свідчити про негативний вплив мелатоніну на маркери формування КТ, що узгоджується з даними літератури [120]. Така реакція дозволяє нам зробити припущення, що кількість активних остеобластів зменшується або чутливість їхніх рецепторів пригнічена, що може бути пов'язано із особливостями метаболізму та загальним фізіологічним станом гіпертензивних тварин.

Остеокласти забезпечують резорбцію КТ. Активність ферментів КФ і ТРКФ відображають інтенсивність даного процесу. Восени у сироватці крові згадані показники у щурів лінії Вістар проявляли тенденцію до зниження, а у щурів лінії SHR – до підвищення (табл. 3.1.1). У весняний період у щурів лінії Вістар активність КФ вірогідно зростає на 78,2% ($P < 0,01$), а ТРКФ – знижувалася на 82,8% ($P < 0,01$) відносно контролю (рис.3.1.3, табл. 3.1.2). У щурів лінії SHR за тих самих експериментальних умов активність КФ вірогідно зростала на 64,7% ($P < 0,01$), а ТРКФ мала тенденцію до зниження відносно контрольних значень (рис.3.1.3, табл. 3.1.2). Таким чином, виявлена істотна різниця в реакції маркерів резорбції КТ у щурів лінії Вістар та SHR у весняний період.

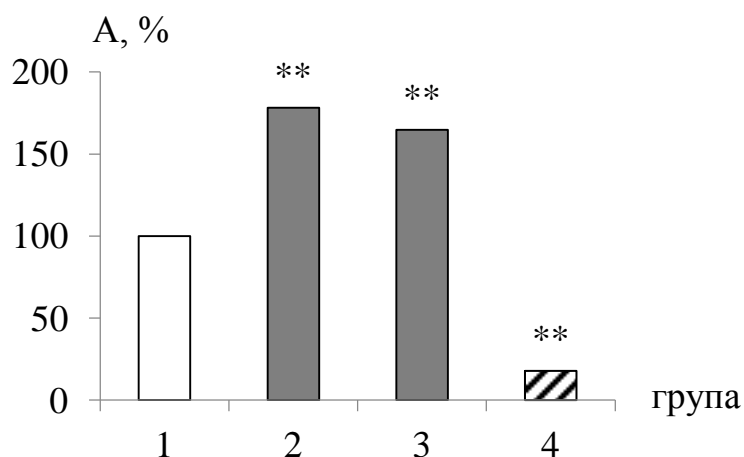


Рис. 3.1.3. Активність кислої (2, 3) і тартратрезистентної кислої фосфатази (4) у сироватці крові щурів лінії Вістар (2, 4) та SHR (3) після введення мелатоніну весною (1 - контрольні групи): ** $P < 0,01$ - порівняно з контрольною групою тварин

Виявлені зміни весною у обох ліній дослідних тварин можна розглядати як наслідок збільшення чисельності та/або функціональної активності остеокластів, тобто домінування остеокластичного типу резорбції КТ, що узгоджується з даними літератури [245]. Припускаємо, що таке збільшення активності КФ та одночасне зниження ТРКФ після впливу мелатоніну у обох ліній тварин призводить до порушення нормального балансу між резорбцією кістки і її синтезом.

Провідну роль у ремоделюванні КТ відіграють органічні компоненти позаклітинного матриксу. Концентрації ГАГ, УК, піридиноліну та ГА відображають основні біохімічні механізми обміну колагену та протеогліканів у КТ. ГАГ (мукополісахариди) – це вуглеводна складова протеогліканів, що входять до міжклітинної речовини сполучної тканини. Вони утворюють поперечні зшивки між фібрилами колагену, беруть участь у синтезі внутрішньо кісткового колагену та відповідають за впорядкованість і міцність бічних з'єднань колагенових фібрил, відображають реактивність сполучної тканини на зовнішні подразники, залучені в регуляцію відкладання мінералів, морфологію кристалу і об'єднання елементів органічного матриксу.

Концентрація ГАГ у сироватці крові щурів лінії Вістар восени знизилася на 46,7 % ($P<0,05$) порівняно з контролем. Весною цей показник підвищився на 28,6 % ($P<0,05$) щодо контролю (рис.3.1.4, табл. 3.1.1, табл. 3.1.2).

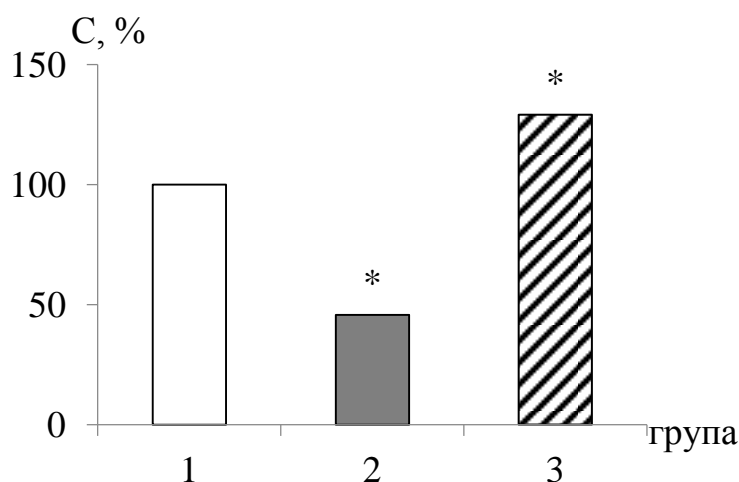


Рис.3.1.4. Концентрація глікозаміногліканів у сироватці крові щурів лінії Вістар контрольної групи (1) та після введення мелатоніну восени (2), весною (3): * $P<0,05$ – порівняно з контрольною групою тварин

Концентрація ГАГ у сироватці крові щурів лінії SHR восени мала тенденцію до зниження (табл.3.1.1), а весною – вірогідно збільшилася на 85,7% ($P<0,01$) (рис. 3.1.5, табл. 3.1.1, табл. 3.1.2).

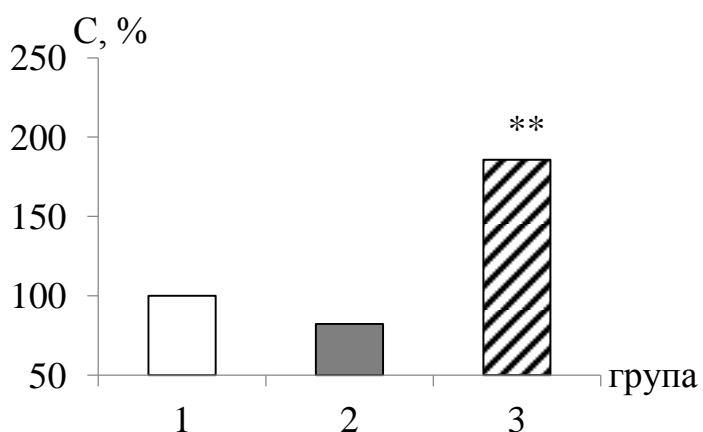


Рис.3.1.5. Концентрація глікозаміногліканів у сироватці крові щурів лінії SHR контрольної групи (1) та після введення мелатоніну восени (2), весною (3): ** $P<0,01$ – порівняно з контрольною групою тварин

Вірогідне зниження концентрації ГАГ у щурів лінії Вістар та її тенденція в аналогічному напрямі у гіпертензивних тварин може свідчити про стабілізацію колагенових фібрил КТ після впливу мелатоніну в осінній період.

Відомо, що надлишок ГАГ змінює колоїдну структуру КТ, посилює її гідрофільність, що спричиняє набухання і розпушення колагенових волокон [68]. Тобто, у весняний період відбувається часткова деградація органічного матриксу КТ під впливом мелатоніну, що призводить до зниження консолідації колагенових волокон та їх зв'язку з кристалами мінералів.

У складі ГАГ містяться УК, рівень яких зростає у сироватці крові при остеопорозі. У досліджувані періоди нами не виявлено вірогідних змін після впливу мелатоніну у обох ліній тварин, а лише тенденцію до зниження у обох дослідних груп восени, весною у лінії Вістар та підвищення – у SHR (табл.3.1.1, 3.1.2). Такі дані можуть свідчити про пригнічення біосинтезу ГАГ у тварин лінії Вістар як осінню, так і весною. Їхню активацію у SHR – розглядати як компенсаторну реакцію при порушенні агрегації протеогліканів після впливу мелатоніну.

ГА – це поєднана дія двох лізосомальних ферментів гіалуроноглюкозоамінідази і гіалуроноглюкоронідази, які розщеплюють ГАГ у КТ. Восени у щурів лінії Вістар вона вірогідно зростає на 15,4% ($P < 0,05$) у сироватці крові дослідної групи. У весняний період цей показник не змінювався (рис.3.1.6, табл.3.1.1, 3.1.2).

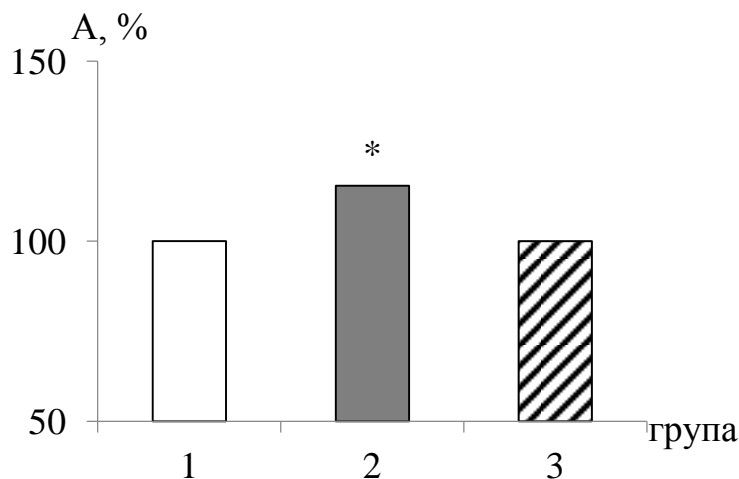


Рис.3.1.6. Гіалуронідазна активність у сироватці крові щурів лінії Вістар контрольної групи (1) та після введення мелатоніну восени (2), весною (3): * $P < 0,05$ – порівняно з контрольною групою тварин

У щурів лінії SHR ГА майже не змінилася восени і мала вірогідне підвищення на 42,8% ($P < 0,01$) весною порівняно із контрольною групою тварин (рис.3.1.7, табл.3.1.1, 3.1.2).

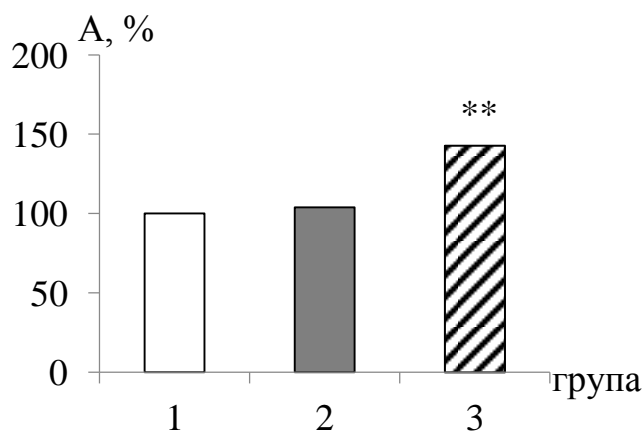


Рис.3.1.7. Гіалуронідазна активність у сироватці крові щурів лінії SHR контрольної групи (1) та після введення мелатоніну восени (2), весною (3): ** $P < 0,01$ – порівняно з контрольною групою тварин

Виявлене нами вірогідне підвищення показників ГА у щурів лінії Вістар осінню та у SHR – весною узгоджується з даними літератури щодо впливу мелатоніну [246, 264]. Така реакція, на нашу думку, може свідчити про часткову деструкцію цілісності органічного матриксу та фіксації

неорганічного компоненту сполучної тканини – кристалів гідроксиапатиту. Так як ГА відображає поєднану дію декількох ферментів, у тому числі й таких, що розщеплюють кислі мукополісахариди (ГАГ), ми можемо зробити висновок, що мелатонін у дозі 5 мг/кг може інтенсифікувати темпи резорбції КТ у щурів [60].

Піридинолін виконує функцію піридинових зшивок зрілих молекул колагену. Він відіграє значну роль в його стабілізації та забезпечує особливі біологічні властивості для утворення структур колагену та еластину. За умов резорбції КТ, яка виконується остеокластами, і руйнуванні колагену, піридинолін «виходить» в судинне русло [253].

Концентрація піридиноліну у щурів лінії Вістар вірогідно знизилася на 48% осінню ($P<0,01$) та на 42,9% весною ($P<0,05$) порівняно з контролем (рис.3.1.8, табл.3.1.1, 3.1.2).

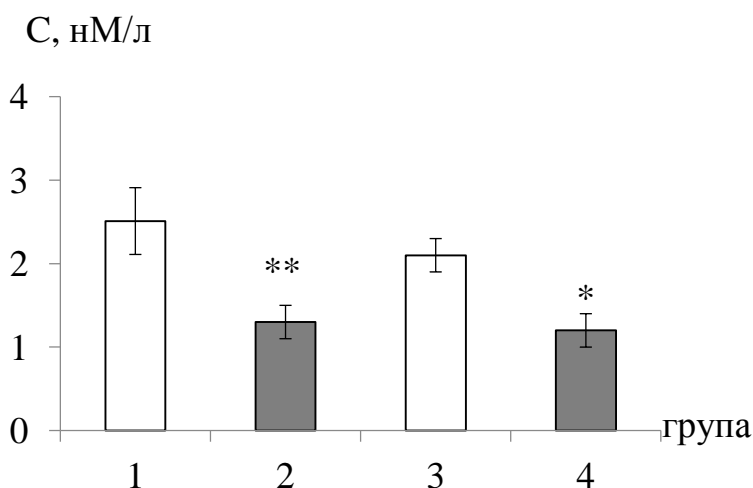


Рис.3.1.8. Концентрація піридиноліну в сироватці крові щурів лінії Вістар контрольних груп (1, 3) та після введення мелатоніну восени (2), весною (4): * $P<0,05$, ** $P<0,01$ – порівняно з контрольною групою тварин

Концентрація піридиноліну в сироватці крові щурів лінії SHR за тих самих умов експерименту мала лише тенденцію до зниження (табл. 3.1.1, 3.1.2).

Вірогідне зниження концентрації піридиноліну у щурів лінії Вістар та її тенденція в тому ж напрямі у тварин лінії SHR як в осінній, так і весняний

періоди можуть свідчити про стимулюючий вплив мелатоніну на регенерацію КТ щурів, що узгоджується з даними літератури [185, 235].

Введення екзогенного мелатоніну щурам лінії Вістар в осінній період супроводжується одночасним підвищенням активності як резорбції, так і формуванням нових елементів КТ. А саме зростає активність ЛФ і ГА, знижується активність КФ і ТРКФ та концентрація ГАГ, УК та піридиноліну. У весняний період за тих самих умов експерименту спостерігали розбалансування процесів деструкції та відновлення КТ. Воно проявлялося у зниженні активності ЛФ, ТРКФ і піридиноліну та зростанні КФ і ГАГ (табл.3.1.3).

Таблиця 3.1.3. Порівняння сезонних відмінностей у реакції щурів ліній Вістар та SHR на введення екзогенного мелатоніну

Показник	Вістар			SHR		
	Весна, Δ%	Осінь, Δ%	Δ, %	Весна, Δ%	Осінь, Δ%	Δ, %
Лужна фосфатаза	-8,0	+43,9	35,9	-17,3	-54,1	36,8
Кисла фосфатаза	+78,2	-16,2	62,0	+64,7	+11,6	53,1
Тартрат-резистентна кисла фосфатаза	-82,2	-12,1	70,1	-21,0	+9,4	11,6
Глікозаміноглікани	+26,6	-46,7	20,1	+85,7	-17,6	68,1
Уронові кислоти	-8,4	-8,2	0,2	+2,2	-14,1	11,9
Гіалуронідазна активність	-1,8	+15,4	13,6	+42,8	+3,9	38,9
Піридинолін	-42,9	-48,0	5,1	-13,6	-25,0	11,4

Введення екзогенного мелатоніну щурам лінії SHR характеризується низькою амплітудою реакцій більшості показників ремоделювання КТ. Восени активуються показники резорбції КТ підвищується активність КФ і ТРКФ, знижується концентрація ГАГ, вільних амінокислот і ліпідів та активність ЛФ. Навесні у щурів лінії SHR за тих самих умов спостерігали вірогідне зниження активності ЛФ і ТРКФ, та зростання концентрації ГАГ і активності КФ. Такі зміни дозволяють зробити висновок про те, що екзогенний мелатонін активує процеси резорбції, які передують утворенню нової КТ. Такі результати узгоджуються з даними літератури щодо впливу мелатоніну на ремоделювання, проліферацію і синтез колагену І типу і формування КТ [111, 120, 208].

Таким чином, як у щурів ліній Вістар, так і SHR наявні сезонні відмінності реакції КТ на вплив екзогенного мелатоніну.

3.2. Сезонні варіації спільної дії дозованої нормобаричної гіпоксії та мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини щурів ліній Вістар та SHR

Восени активність ЛФ після впливу гіпоксії та її одночасної дії з мелатоніном у щурів лінії Вістар мала тенденцію до підвищення (табл.3.2.1). У тварин лінії SHR у цей самий період ми спостерігали аналогічну тенденцію після впливу гіпоксії та до зниження – після її одночасної дії з мелатоніном (табл.3.2.2). Припускаємо, що ДНГ саногенного рівня позитивно впливає на остеобласти і кисень-залежні механізми ремоделювання КТ у тварин в осінній період.

Таблиця 3.2.1. Показники ремоделювання кісткової тканини у сироватці крові щурів лінії Вістар восени ($M \pm m$, $n=12$)

Показник, одиниця виміру	Група I контроль	Група II ДНГ	$\Delta, \%$	Група III ДНГ+ мелатонін	$\Delta, \%$
Лужна фосфатаза, МО/л	49,1 \pm 4,40	58,79 \pm 5,10	+19,7	49,74 \pm 4,30	+1,3
Кисла фосфатаза, МО/л	42,2 \pm 5,50	59,1 \pm 6,30	+40,0	76,0 \pm 7,70**	+80,0
Тартрат-резистентна кисла фосфатаза, МО/л	29,6 \pm 4,70	47,9 \pm 5,40*	+61,8	54,9 \pm 6,60*	+85,5
Глікозаміноглікани, г/л	0,17 \pm 0,02	0,21 \pm 0,02*	+24,0	0,16 \pm 0,03	-6,0
Уронові кислоти, мг/г	44,75 \pm 1,95	44,94 \pm 1,25	+0,4	48,76 \pm 1,19	+9,0
Піридинолін, нМ/л	2,5 \pm 0,40	3,5 \pm 0,4	+40,0	1,8 \pm 0,50*	-28,0

Примітки: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ – порівняно з контрольною групою тварин

Таблиця 3.2.2. Показники ремоделювання кісткової тканини у сироватці крові щурів лінії SHR восени ($M \pm m$, $n=12$)

Показник, одиниця виміру	Група I контроль	Група II ДНГ	$\Delta, \%$	Група III ДНГ+ мелатонін	$\Delta, \%$
Лужна фосфатаза, МО/л	45,9 \pm 5,10	52,8 \pm 5,10	+14,9	42,2 \pm 8,80	-8,0
Кисла фосфатаза, МО/л	26,3 \pm 6,30	39,4 \pm 6,30	+49,8	67,6 \pm 10,90*	+157,0
Тартрат- резистен- тна кисла фосфатаза, МО/л	8,4 \pm 5,40	25,3 \pm 5,40*	+201,2	59,1 \pm 9,30**	+604,0
Глікозамі- ноглікани, г/л	0,12 \pm 0,02	0,15 \pm 0,02	+25,0	0,11 \pm 0,04	-8,0
Уронові кислоти, мг/г	50,84 \pm 1,19	49,67 \pm 0,80	-2,3	48,94 \pm 1,24	-3,7
Піридино- лін, нМ/л	2,4 \pm 0,40	2,7 \pm 0,40	+12,5	3,1 \pm 0,70	+29,2

Примітки: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ – порівняно з контрольною групою тварин

В осінній період активність КФ у щурів лінії Вістар мала тенденцію до підвищення на 40% після впливу ДНГ саногенного рівня та вірогідно на 80% ($P < 0,01$) після її одночасної дії з мелатоніном порівняно з контролем (рис.3.2.1, табл.3.2.1). У щурів лінії SHR активність даного ензиму підвищилася на 49,8% ($P > 0,05$) після впливу ДНГ та на 157% ($P < 0,05$) після дії обох факторів порівняно з контролем (рис.3.2.1, табл.3.2.2).

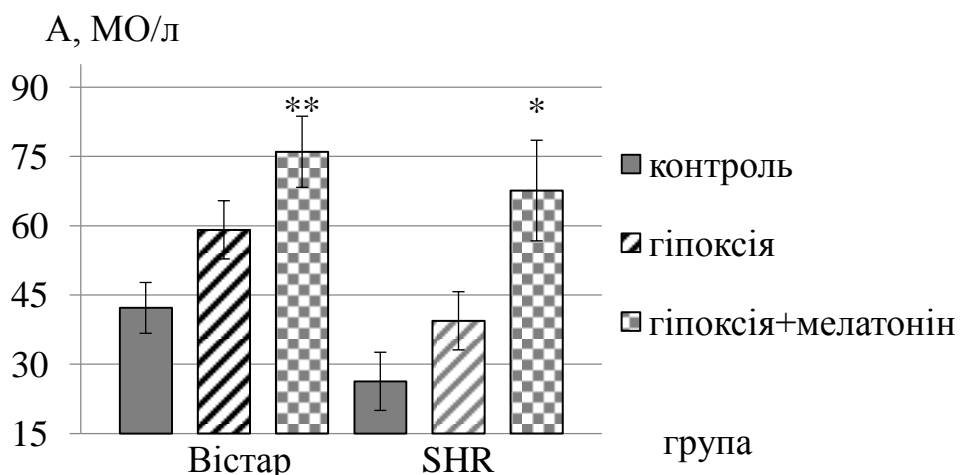


Рис.3.2.1. Активність кислої фосфатази у сироватці крові щурів лінії Вістар та SHR після впливу ДНГ саногенного рівня та мелатоніну восени: * $P<0,05$, ** $P<0,01$ - порівняно з контрольною групою тварин

Восени активність ТРКФ у щурів лінії Вістар зросла як після дії ДНГ саногенного рівня на 61,8% ($P<0,05$), так і після її одночасного впливу з мелатоніном на 85,5% ($P<0,05$) відносно контрольних значень. У щурів лінії SHR також вірогідно зросла активність даного ензиму на 200% ($P<0,05$) після дії ДНГ та на 600% ($P<0,01$) після одночасного впливу обох факторів (рис.3.2.2, табл.3.2.1).

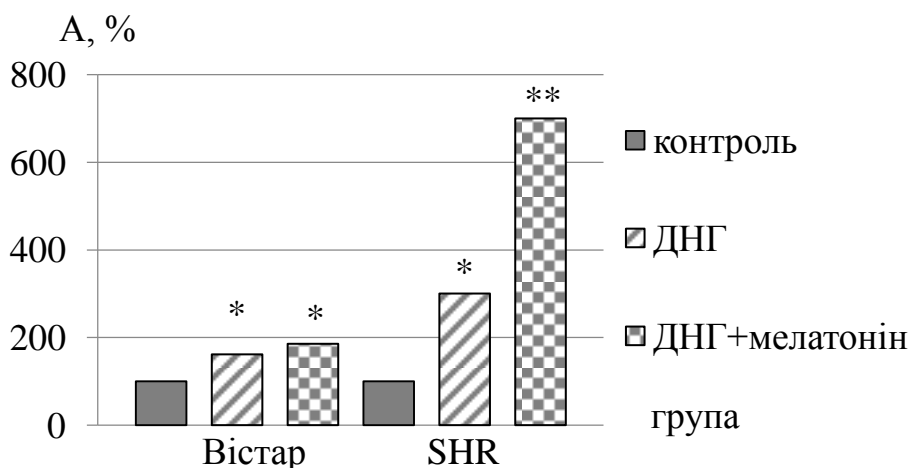


Рис.3.2.2 Активність тартратрезистентної кислої фосфатази у сироватці крові щурів лінії Вістар та SHR після впливу ДНГ саногенного рівня та мелатоніну восени: * $P<0,05$, ** $P<0,01$ - порівняно з контрольною групою тварин

Концентрація ГАГ в осінній період вірогідно підвищилася у щурів лінії Вістар на 24% ($P < 0,05$) після впливу ДНГ саногенного рівня і мала тенденцію до зниження на 6% після її поєднуваного впливу мелатоніном. У щурів лінії SHR ми спостерігали тенденцію цього показника до підвищення показника на 25% ($P > 0,05$) та до його зниження на 8% ($P > 0,05$) порівняно з контролем (рис.3.2.3, табл.3.2.1).

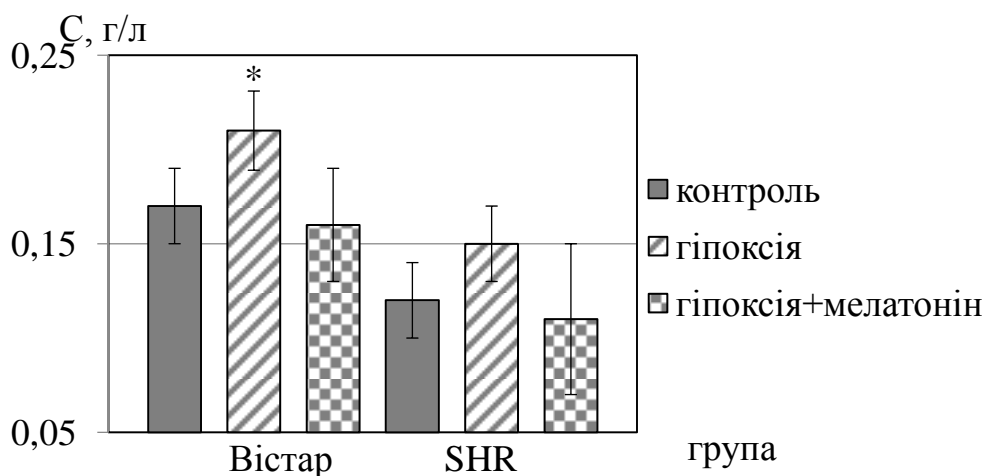


Рис. 3.2.3. Концентрація глікозаміногліканів у сироватці крові щурів лінії Вістар та SHR після впливу ДНГ саногенного рівня та мелатоніну восени: * $P < 0,05$ - порівняно з контрольною групою тварин

Восени концентрація піридиноліну у щурів лінії Вістар підвищилася на 40% ($P > 0,05$) після впливу ДНГ саногенного рівня та вірогідно знизилася на 28% ($P < 0,05$) після одночасної дії ДНГ та мелатоніну порівняно із контрольною групою тварин (рис.3.2.4, табл.3.2.1). У тварин лінії SHR даний показник підвищився на 12,5% ($P > 0,05$) та на 29,2% ($P > 0,05$) відповідно (рис.3.2.4, табл.3.2.1).

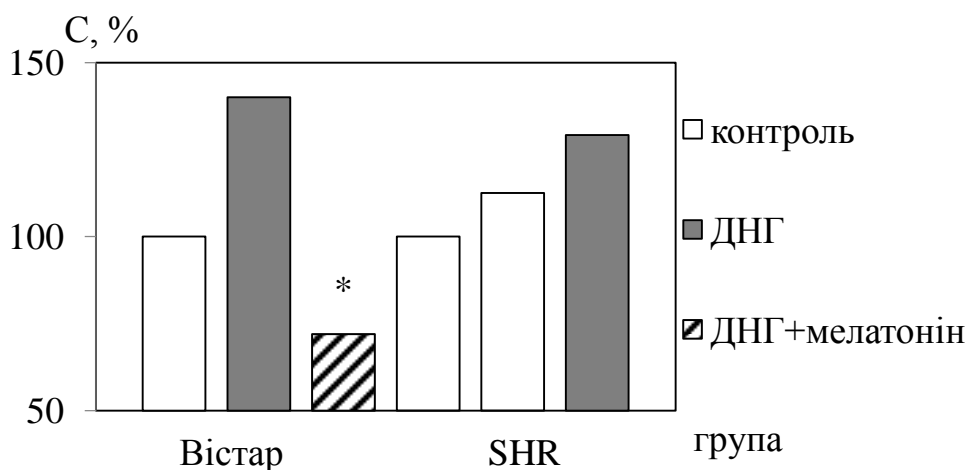


Рис. 3.2.4. Концентрація піридиноліну в сироватці крові щурів лінії Вістар та SHR після впливу ДНГ саногенного рівня та мелатоніну восени: * $P < 0,05$ - порівняно з контрольною групою тварин

Припускаємо, що восени у щурів лінії Вістар активність остеобластів не змінюється при обох досліджуваних експериментальних впливах. Однак порушується зв'язок між ГАГ і фібрилами колагену після впливу ДНГ, зростає активність лізосомальних ферментів, які продукуються остеокластами, після дії ДНГ саногенного рівня та її спільної дії з екзогенним мелатоніном.

На основі отриманих нами даних, припускаємо, що після одночасного впливу мелатоніну та ДНГ саногенного рівня інтенсифікуються процеси формування волокон колагену у нормотензивних тварин. Після впливу двох експериментальних режимів у щурів лінії SHR восени відбувалися значні зміни активності лізосомальних ферментів у напрямку до підвищення. Збільшення активності КФ і ТРКФ у сироватці крові свідчить про прискорення процесів резорбції. За цих самих умов інші з досліджуваних показників ремоделювання КТ у гіпертензивних щурів не змінювалися.

Весною активність ЛФ у сироватці крові щурів лінії Вістар після впливу ДНГ вірогідно не змінювалася. Спостерігали лише тенденцію до її зростання на 20,4%. Її одночасний вплив із мелатоніном призвів до вірогідного зниження цього показника на 43,8% ($P < 0,05$) порівняно з контролем (рис.3.2.5,

табл.3.2.2). За тих самих умов у щурів лінії SHR вірогідних змін не виявили (рис.3.2.5, табл. 3.2.2).

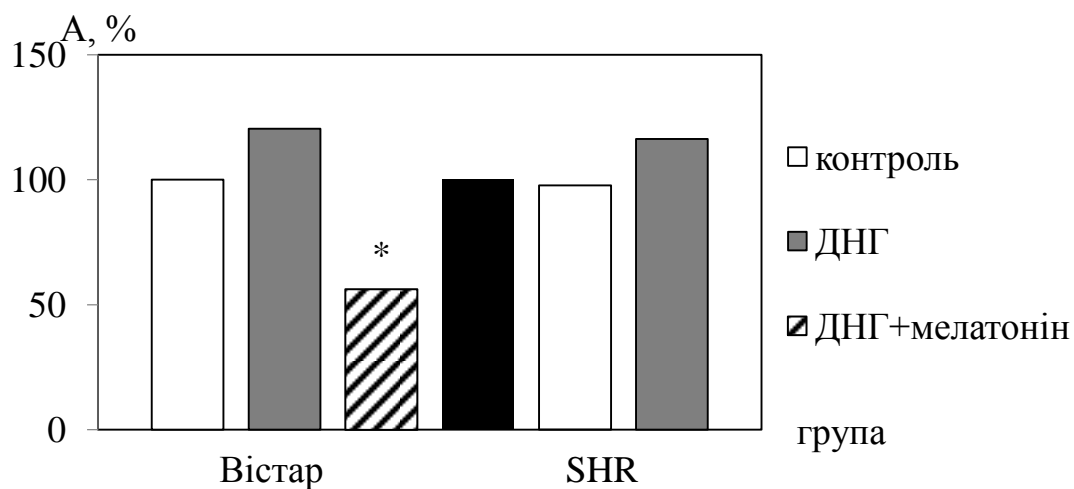


Рис. 3.2.5. Активність лужної фосфатази у сироватці крові щурів лінії Вістар та SHR після впливу ДНГ саногенного рівня та мелатоніну весною: * $P < 0,05$ - порівняно з контрольною групою тварин

Таблиця 3.2.2. Показники ремоделювання кісткової тканини у сироватці крові щурів лінії Вістар навесні ($M \pm m$, $n=12$)

Показник, одиниця виміру	Група I контроль	Група II ДНГ	$\Delta, \%$	Група III ДНГ+ мелатонін	$\Delta, \%$
Лужна фосфатаза, МО/л	$32,9 \pm 1,95$	$39,69 \pm 2,73$	+20,4	$18,52 \pm 1,77^*$	-43,8
Кисла фосфатаза, МО/л	$36,04 \pm 6,85$	$40,52 \pm 8,18$	+12,4	$38,08 \pm 5,44$	+5,7
Тартрат- резистен- тна кисла фосфатаза, МО/л	$20,4 \pm 4,26$	$24,63 \pm 7,42$	+20,7	$15,42 \pm 1,758$	-24,4
Глікозамі- ноглікани, г/л	$0,03 \pm 0,003$	$0,047 \pm 0,01$	+46,9	$0,12 \pm 0,042^*$	+275
Уронові кислоти, мг/г	$43,75 \pm 1,95$	$43,94 \pm 1,25$	+0,4	$45,761 \pm 1,188$	+5
Піридино- лін, нМ/л	$2,1 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,8$	0	$1,5 \pm 0,2^{***}$	-28,6

Примітки: * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ – порівняно з контрольною групою тварин

Весною досліджуючи показники резорбції КТ ми не виявили вірогідних змін активності КФ і ТРКФ у сироватці крові щурів обох експериментальних ліній (табл. 3.2.3). Спостерігали лише тенденцію до підвищення активності КФ і ТРКФ у щурів лінії Вістар та SHR після впливу ДНГ саногенного рівня. Після її одночасної дії з мелатоніном активність КФ не змінилася, а ТРКФ – мала тенденцію до зниження у обох ліній тварин (табл.3.2.2).

Таблиця 3.2.3. Показники ремоделювання кісткової тканини у сироватці крові щурів лінії SHR навесні ($M \pm m$, $n=12$)

Показник, одиниця виміру	Група I контроль	Група II ДНГ	$\Delta, \%$	Група III ДНГ+ мелатонін	$\Delta, \%$
Лужна фосфатаза, МО/л	28,51 \pm 1,94	27,57 \pm 2,59	-3,3	33,16 \pm 5,52	+16,3
Кисла фосфатаза, МО/л	28,85 \pm 9,05	43,13 \pm 3,04	+49,5	25,3 \pm 1,32	-12,3
Тартрат- резистен- тна кисла фосфатаза, МО/л	35,9 \pm 6,8	19,73 \pm 6,9	-45,0	33,78 \pm 6,75	-5,9
Глікозамі- ноглікани, г/л	0,038 \pm 0,003	0,043 \pm 0,006	+15,7	0,129 \pm 0,059	+244
Уронові кислоти, мг/г	49,83 \pm 1,19	48,69 \pm 0,8	-2,0	49,95 \pm 1,24	+0,2
Піридино- лін, нМ/л	2,4 \pm 0,8	2,1 \pm 0,8	-12,5	2,3 \pm 0,2	-4,2

Весною концентрація ГАГ у сироватці крові щурів лінії Вістар вірогідно зросла при одночасному впливі ДНГ та мелатоніну на 275% ($P < 0,05$) порівняно з контролем (рис.3.2.6, табл.3.2.2). У щурів лінії SHR цей показник мав тенденцію до збільшення за обох експериментальних впливів (рис.3.2.6, табл. 3.2.2).

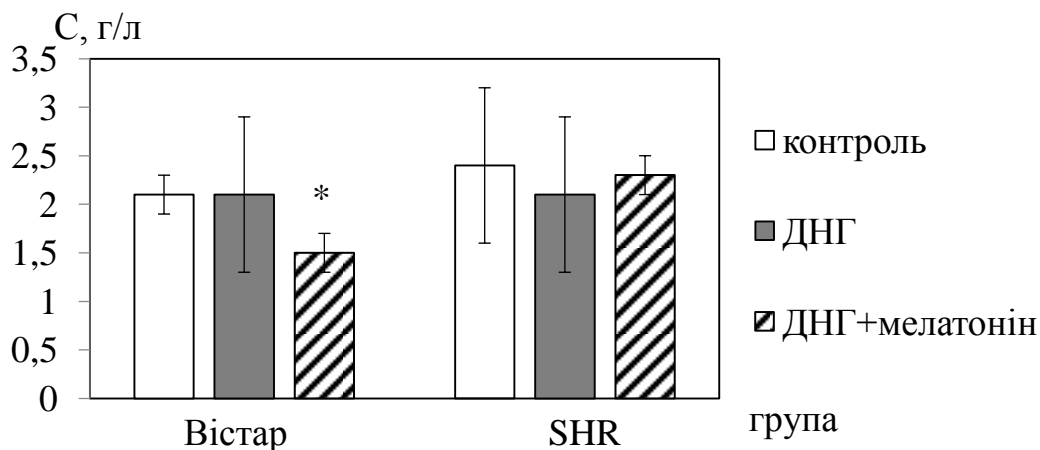


Рис. 3.2.6. Концентрація глікозаміногліканів у сироватці крові щурів лінії Вістар та SHR після впливу ДНГ саногенного рівня та мелатоніну весною: * $P < 0,05$ - порівняно з контрольною групою тварин

Концентрації УК у обох ліній тварин за тих самих умов експерименту залишалися незмінними (табл.3.2.2, табл. 3.2.3).

Весною концентрація піридиноліну у сироватці крові щурів лінії Вістар вірогідно знизилася після одночасної дії ДНГ саногенного рівня та мелатоніну на 28,6% ($P < 0,001$) порівняно з контрольною групою тварин. У щурів лінії SHR за тих самих умов ми спостерігали тенденцію до зниження показника (рис.3.2.7, табл.3.2.3).

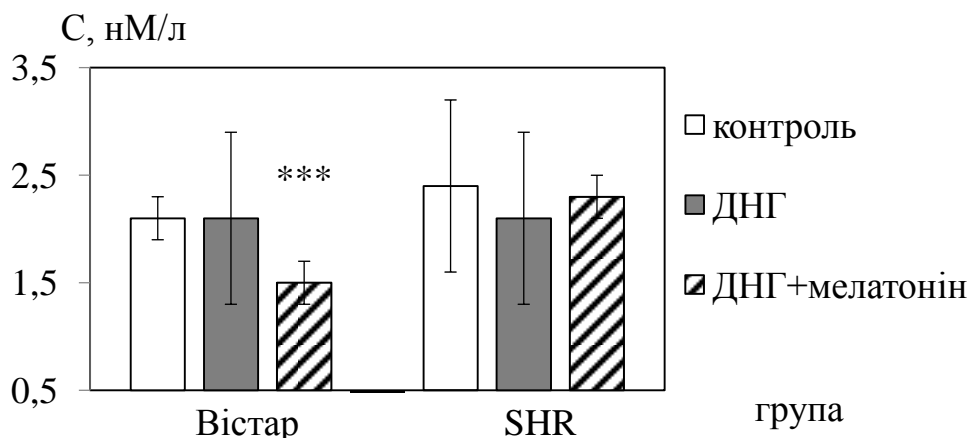


Рис. 3.2.7. Концентрація піридиноліну в сироватці крові щурів лінії Вістар та SHR після впливу ДНГ саногенного рівня та мелатоніну весною: *** $P < 0,001$ - порівняно з контрольною групою тварин

Отже, навесні у щурів лінії Вістар активність ЛФ у сироватці крові вірогідно знизилася після одночасного впливу ДНГ і мелатоніну. Активність КФ і ТРКФ не змінювалася, вірогідно зростала концентрація ГАГ та знизилася концентрація піридиноліну в сироватці крові. Отримані результати свідчать про неузгодженість процесів утворення і руйнування КТ та порушення зв'язку між ГАГ і фібрилами колагену у щурів Вістар після одночасного впливу ДНГ і мелатоніну весною.

Весною у щурів лінії SHR, на відміну від тварин лінії Вістар, за тих самих експериментальних умов ремоделювання КТ відповідало фізіологічному, однак зв'язок між ГАГ і фібрилами колагену порушувався.

Одночасна дія мелатоніну та ДНГ саногенного рівня по-різному впливає на процеси ремоделювання КТ у щурів лінії Вістар та SHR. У щурів лінії Вістар такі зміни у весняний період можна розглядати як наслідок зменшення чисельності та функціональної активності остеобластів, тобто домінування остеобластичного типу резорбції КТ, що засвідчено в літературі [266]. Дані показників метаболізму КТ у щурів лінії SHR весною суттєво не змінювалися ані після впливу ДНГ, ані її одночасної дії з мелатоніном.

На основі проаналізованих даних, припускаємо, що метаболічна перебудова КТ після одночасної дії ДНГ та мелатоніну у щурів направлена на активацію як процесів формування, так і резорбції.

3.3. Реакція гормонів щитоподібної залози (трийодтироніну і тироксину) на вплив екзогенного мелатоніну, дозованої нормобаричної гіпоксії та їх спільної дії у щурів ліній Вістар та SHR в різні сезони року

Гормони ЩЗ впливають майже на всі тканини під час росту і розвитку організму. Досі розуміння специфічних клітинних і молекулярних механізмів дії вТЗ у КТ залишаються не повністю розкритими.

вТЗ бере участь у формуванні та мінералізації кісткового матриксу [112]. КТ є надзвичайно чутливою тканиною-мішенню до вТЗ. Це свідчить про визначну роль Тг в процесі росту, розвитку та обміну КТ [101, 102, 103, 125, 128, 144, 216].

Восени концентрація вТЗ після впливу мелатоніну у щурів лінії Вістар мала тенденцію до підвищення на 14%. У щурів лінії SHR цей показник вірогідно збільшився на 51,3% ($P < 0,001$) порівняно із контрольною групою тварин (рис.3.3.1, табл. 3.3.1). На фоні зростання концентрації вТЗ у гіпертензивних тварин вірогідно знижується активність ЛФ, що може свідчити, на нашу думку, про зростання ступеню чутливості рецепторів остеобластів. Це може призводити до гальмування утворення КТ.

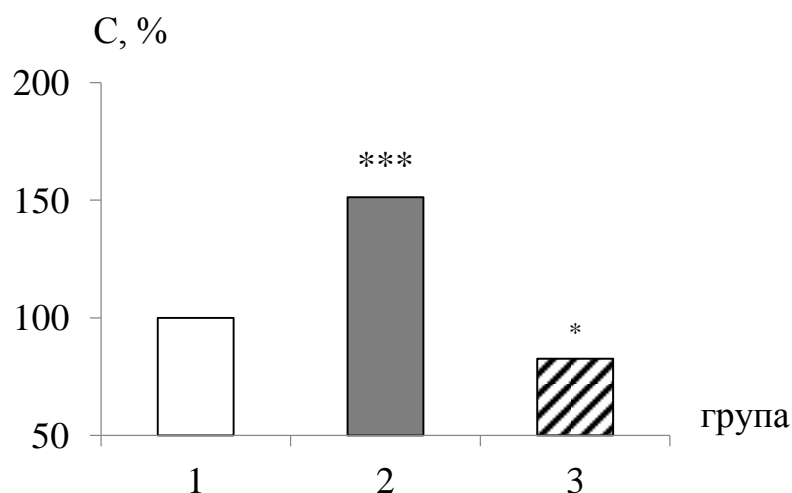


Рис. 3.3.1. Концентрація вільного трийодтироніну в сироватці крові щурів лінії SHR контрольних груп (1) та після введення мелатоніну осінню (2), весною (3): * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$

Таблиця 3.3.1. Концентрація вільного трийодтироніну (пг/мл) в сироватці крові щурів ліній Вістар і SHR після впливу екзогенного мелатоніну (5 мг/кг маси тіла), гіпоксії та одночасної дії ДНГ саногенного рівня з мелатоніном у різні сезони року ($M \pm m$, $n=12$)

Сезон/ лінія		Група I контроль	Група II мелатонін	Δ , %	Група III ДНГ	Δ , %	Група IV мелатонін +ДНГ	Δ , %
Осінь	Вістар	4,3 \pm 0,2	4,9 \pm 0,6	+14	4,2 \pm 0,3	-2,3	4,3 \pm 0,3	0
	SHR	3,9 \pm 0,3	5,9 \pm 0,4***	+51,3	4,1 \pm 0,3	+5,1	4,8 \pm 0,5	+23
Весна	Вістар	4,6 \pm 0,2	4,5 \pm 0,2	-2	4,3 \pm 0,2	-6,5	4,5 \pm 0,2	-2,2
	SHR	4,6 \pm 0,2	3,8 \pm 0,2*	-17,4	4,2 \pm 0,2	-8,7	4,4 \pm 0,2	-4,3

Примітки: * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ – порівняно з контрольною групою тварин

У весняний період у тварин лінії Вістар ми не спостерігали вірогідних змін концентрації вТЗ, а у SHR вона вірогідно знизилася на 17,4% ($P < 0,05$) порівняно з контролем (рис.3.3.1, табл.3.3.1). Наші результати узгоджуються з літературними, де йдеться про те, що при зменшенні концентрації Тг знижується активність як остеобластів, так і остеокластів. Це, в свою чергу, призводить до 2-3-кратного гальмування швидкості ремоделювання КТ [101, 146].

Після впливу ДНГ та її одночасної дії з мелатоніном ми не спостерігали вірогідних змін концентрації вТЗ у обох ліній тварин як восени, так і весною. Лише тенденцію до збільшення на 23% у тварин лінії SHR після впливу обох факторів в осінній період (табл.3.3.1).

Відомо, що метаболізм КТ також залежить від гормону ЩЗ –вТ4 [116, 128]. Восени концентрація вТ4 після впливу мелатоніну у щурів лінії Вістар вірогідно зросла на 30,4% ($P < 0,05$) та на 31,1% у лінії SHR ($P < 0,01$) порівняно з контролем (рис.3.3.2, табл.3.3.2). Весною у тварин лінії Вістар концентрація

вТ4 не змінювалася, а у SHR – вірогідно підвищилася на 31% ($P<0,05$) порівняно з контрольними групами (рис.3.3.2, табл.3.3.2).

Дані літератури щодо впливу мелатоніну на вТ4 суперечливі і не містять інформацію щодо сезону проведення експерименту [112, 226]. Показано, що у 8-місячних мишей самців мелатонін відіграє стимулюючий ефект на вТ4 [215] і це узгоджується з нашими даними. Проте, показаний інгібуючий вплив на рівень вТ4 в групах 2 та 4-місячних мишей самців та у дорослих щурів самців Sprague-Dawley [100], що суперечить нашим результатам.

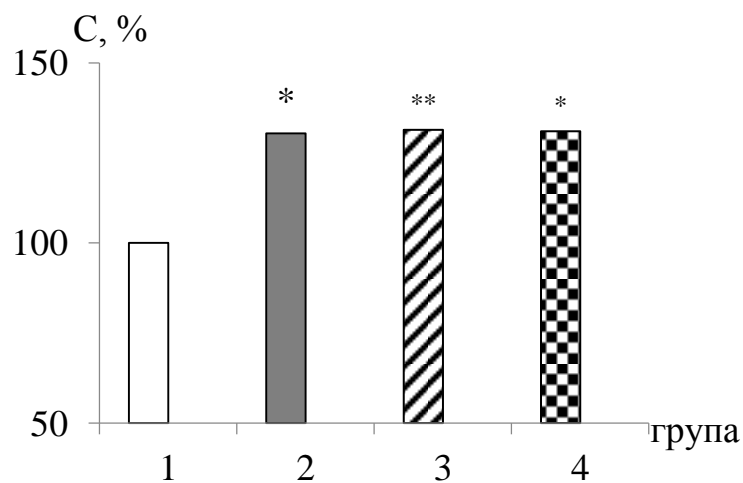


Рис.3.3.2. Концентрація тироксину в сироватці крові щурів лінії Вістар (2) та SHR (3, 4) контрольних груп (1) та після введення мелатоніну восени (2, 3), весною (4): * $P<0,05$, ** $P<0,01$ – порівняно з контрольними групами тварин

Таблиця 3.3.2. Концентрація тироксину (пмоль/л) в сироватці крові щурів ліній Вістар та SHR після впливу екзогенного мелатоніну (5 мг/кг маси тіла), ДНГ саногенного рівня та одночасної дії ДНГ з мелатоніном в різні сезони року ($M \pm m$, $n=12$)

Сезон/ лінія		Група I контроль	Група II мелатонін	Δ , %	Група III ДНГ	Δ , %	Група IV мелатонін +ДНГ	Δ , %
Осінь	Вістар	17,1 \pm 1	22,3 \pm 2,1*	+30,4	18,7 \pm 1,1	+8,7	20,2 \pm 1,4	+18,1
	SHR	19,6 \pm 1,1	25,7 \pm 1,7**	+31,1	17,8 \pm 1,1	-9,2	19,7 \pm 2,0	+0,5
Весна	Вістар	18,7 \pm 0,8	19,2 \pm 0,8	+2,7	19,8 \pm 0,7	+5,9	20,9 \pm 0,8	+11,8
	SHR	18,7 \pm 1,1	24,5 \pm 1,7*	+31,0	20,4 \pm 1,1	+9,1	21,1 \pm 1,2	+12,8

Примітки: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ – порівняно з контрольною групою тварин

Після ДНГ саногенного рівня та її одночасного впливу з мелатоніном на щурів обох ліній концентрація вТ4 мала тенденцію до зростання як осінню, так і весною (табл.3.3.2). Лише у щурів SHR весною цей показник мав тенденцію до зменшення на 9,2% після впливу гіпоксії (табл.3.3.2).

Отримані результати наших досліджень свідчать про те, що мелатонін інтенсифікує тиреоїдну активність, яка суттєво впливає на структурно-метаболичні показники стану КТ

Весною вплив мелатоніну не призвів до вірогідних змін показників Тг у щурів лінії Вістар. У тварин лінії SHR він мав різнонаправлену дію: вірогідно зменшив концентрацію вТ3 та збільшив вТ4. Такі зміни показників активності ЩЗ після введення мелатоніну, виявлені у щурів лінії SHR відображають її вплив на порушення балансу між процесами відновлення та руйнування КТ у весняний період. Припускаємо, що пригнічення фізіологічного ремоделювання КТ весною після введення екзогенного мелатоніну посилюється ендogenousними ендокринними впливами, які здійснюються ЩЗ.

Після впливу ДНГ саногенного рівня та її одночасної дії з мелатоніном восени та весною концентрація гормонів вірогідно не змінювалася у обох ліній тварин. Отримані нами результати відображають важливу роль гормонів ЩЗ у фізіологічному ремоделюванні КТ в залежності від вихідного рівня артеріального тиску тварин та сезону року.

3.4. Амінокислотний склад кісткової тканини до та після впливу мелатоніну у щурів ліній Вістар та SHR в різні сезони року

Амінокислоти (АК) – це саме ті базальні структури, з яких білки створюють свою первинну і всі наступні рівні організації. В ремоделюванні КТ вони виконують наступні функції: лізин та фенілаланін – сприяє росту КТ, синтезу колагену; триптофан та аргінін – стимулюють синтез гормону росту; треонін – важливий компонент колагену; тирозин – попередник гормону росту; аланін та пролін – основні компоненти сполучної тканини; цистин – зміцнює сполучну тканину [14].

Восени концентрація більшості досліджуваних нами вільних амінокислот у КТ дослідних щурів лінії Вістар після введення екзогенного мелатоніну знижувалася. А саме: спостерігали вірогідне зниження концентрації проліну та окипроліну на 22 %, лейцину – на 49%, фенілаланіну – на 35%, ізолейцину – на 15%, валіну та триптофану – на 26%, тирозину та глютамінової кислоти – на 26%, треоніну та ізоваліну – на 39%. Зростала концентрація аргініну, гістидину і таурину - на 48% ($P<0,05$), гліцину та метіоніну – на 40% ($P<0,01$), серину і аспарагінової кислоти – на 150% ($P<0,01$), аланіну і глютаміну – на 124% ($P<0,001$) порівняно з контролем (табл.3.4.1).

Таблиця. 3.4.1. Концентрація вільних амінокислот у щурів лінії Вістар після впливу екзогенного мелатоніну (5 мг/кг маси тіла) в осінній та весняний періоди (мг/100 г сирої кістки, $M\pm m$, $n=12$)

Показник	Осінь			Весна		
	Група I контроль	Група II мелатонін	Δ , %	Група I контроль	Група II мелатонін	Δ , %
1	2	3	4	5	6	7
Цистеїн +цистин	$0,95\pm 0,079$	$1,52\pm 1,477$	+60	$0,9\pm 0,07$	$0,8\pm 0,06$	+11,1
Орнітин +глюкозамін	$0,05\pm 0,150$	$0,13\pm 0,008$	+160	$0,06\pm 0,01$	$0,07\pm 0,007$	+16,7

1	2	3	4	5	6	7
Аргінін+ гістидин+ таурин	0,85± 0,075	1,026± 0,170*	+48	0,9±0,1	0,8±0,07	-11,1
Лізин+ аспарагін	2,32± 0,155	2,65± 0,397	+14,2	2,04±0,2	2,3±0,2	+12,7
Гліцин+ метіонін	2,95± 0,147	4,12± 0,223**	+39,7	2,7±0,3	3,4±0,2	+25,9
Серин +аспарагі- нова кислота	0,04± 0,008	0,1± 0,013**	+150	0,05± 0,007	0,06± 0,007	+20
Аланін +глутамін	1,2±0,10	2,69± 0,147***	+124	2,3±0,1	1,8±0,1	-21,7
Валін+ триптофан	0,11± 0,008	0,082± 0,009*	-25,5	0,07± 0,007	0,03± 0,003**	-57,1
Тирозин+ глутаміно- ва кислота	2,54± 0,106	1,87± 0,154**	-26,4	1,2±0,07	1,3±0,07	+8,3
Треонін +ізовалін	0,31± 0,023	0,19± 0,009**	-38,7	0,09±0,01	0,1±0,01	-11,1
Пролін +оксипро- лін	3,06± 0,109	2,39± 0,152*	-21,9	1,0±0,10	1,8±0,1**	+80
Лейцин	1,64± 0,106	0,84± 0,183*	-48,8	0,6±0,10	0,8±0,10*	+33,3
Фенілаланін	1,03± 0,075	0,67± 0,027**	-35	0,4±0,10	0,7±0,03*	+75
Ізолейцин	0,65± 0,03	0,55± 0,031*	-15,4	0,3±0,03	0,5±0,03**	+66,7

Примітки: *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 – порівняно з контролем; «-» - зниження показника у % порівняно з контролем; «+» - підвищення показника у % порівняно з контролем

Навесні у щурів лінії Вістар відмічено вірогідне збільшення концентрації проліну та оксипроліну на 80 %, лейцину – на 33%,фенілаланіну – на 75%, ізолейцину – на 67% відносно контрольних значень. Зниження спостерігали лише концентрації валіну та триптофану на 57% (P<0,01) щодо контролю (табл.3.4.1).

Восени у щурів лінії SHR після впливу мелатоніну вірогідно зросла концентрація цистеїну і цистину на 54%, орнітину і глюкозаміну на 111%, аргініну, гістидину і таурину – на 41% ($P<0,05$), лізину і аспарагіну на 26,2%, гліцину та метіоніну – на 40,7% ($P<0,01$), аланіну і глутаміну – на 124% ($P<0,001$) порівняно з контролем. Знизилася концентрація валіну і триптофану – на 76,9%, тирозину і глютамінової кислоти на 30,5% ($P<0,01$); треоніну та ізоваліну – на 73,3% ($P<0,01$), проліну та оксипроліну – на 21,9% ($P<0,05$), лейцину – на 48,8% ($P<0,05$) порівняно контрольних значень (табл.3.4.2).

Таблиця 3.4.2. Концентрація вільних амінокислот у щурів лінії SHR після впливу екзогенного мелатоніну (5 мг/кг маси тіла) в осінній та весняний періоди (мг/100 г сирої кістки, $M\pm m$, $n=12$)

Показник	Осінь			Весна		
	Група I контроль	Група II мелатонін	Δ , %	Група I контроль	Група II мелатонін	Δ , %
1	2	3	4	5	6	7
Цистеїн+цистин	1,24±0,078	1,91±0,046***	+54	0,9±0,07	0,5±0,04**	-44,4
Орнітин+глюкозамін	0,09±0,08	0,19±0,011***	+111	0,06±0,01	0,09±0,05	+50
Аргінін+гістидин+таурин	1,0±0,07	1,41±0,120*	+41	0,9±0,10	0,9±0,10	0
Лізін+аспарагін	2,1±0,09	2,65±0,028***	+26,2	2,04±0,2	2,4±0,3	+17,6
Гліцин+метіонін	3,24±0,151	4,56±0,110***	+40,7	2,7±0,30	3,2±0,40	+18,5
Серин+аспарагінова кислота	0,1±0,01	0,11±0,14	0	0,05±0,007	0,14±0,02	+180
Аланін+глутамін	1,68±0,053	1,37±0,035***	+18,5	2,3±0,10	1,9±0,20	-17,4
Валін+триптофан	0,13±0,012	0,03±0,004***	-76,9	0,07±0,007	0,06±0,01	-14,3

1	2	3	4	5	6	7
Тирозин+ глутаміно- ва кислота	2,03± 0,094	1,41± 0,124**	-30,5	1,2±0,10	1,5±0,02**	+25
Треонін +ізовалін	0,3±0,04	0,08± 0,014***	-73,3	0,09±0,01	0,2±0,02**	+122
Пролін +оксипро- лін	2,35±0,09	1,64±0,124	-30,2	1,0±0,1	2,2±0,2**	+120
Лейцин	1,67± 0,041	0,8± 0,04***	-52,1	0,6±0,10	1,1±0,1**	+83,3
Фенілаланін	1,43± 0,053	0,76±0,039	-46,9	0,4±0,1	0,9±0,1**	+125
Ізолейцин	0,52± 0,033	0,44±0,046	-15,4	0,3±0,03	0,7±0,1*	+133

Примітки: * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$ – порівняно з контролем; «-» - зниження показника у % порівняно з контролем; «+» - підвищення показника у % порівняно з контролем

Весною концентрація більшості досліджуваних нами вільних АК у КТ після впливу мелатоніну у щурів SHR вірогідно зростає: тирозина і глутамінової кислоти на 25% ($P<0,01$); треоніну та ізоваліну – на 122% ($P<0,01$), проліну та оксипроліну – на 122% ($P<0,01$), лейцину – на 33,3% ($P<0,01$), фенілаланіну – на 75% ($P<0,01$), ізолейцину – на 66,7% ($P<0,01$) порівняно з контролем.

Навесні зміни концентрації АК, що безпосередньо беруть участь в синтезі колагену в КТ тварин лінії Вістар та SHR, були односпрямованими після впливу екзогенного мелатоніну. В більшості випадків ці показники вірогідно зростали, що може свідчити про пригнічення синтезу колагену органічного матриксу КТ. Отримані нами дані свідчать про негативний вплив екзогенного мелатоніну в дозі 5 мг/кг маси тіла на ремоделювання КТ щурів обох ліній у весняний період. Можливо це пов'язано зі зміною температури середовища, весняним авітамінозом і зменшенням потреб високої теплопродукції.

3.5. Амінокислотний склад кісткової тканини до та після впливу нормобаричної гіпоксії саеногенного рівня та її спільної дії з мелатоніном у щурів ліній Вістар та SHR в різні сезони року

Восени у тварин лінії Вістар після впливу ДНГ саеногенного рівня та її одночасної дії з мелатоніном відбувалися незначні зміни вмісту вільних амінокислот. Після впливу ДНГ вірогідно знижувалися на 29% ($P<0,001$) відносно контролю лише орнітин і глюкозамін. Одночасна дія ДНГ і мелатоніну призводила до вірогідних змін порівняно контрольних значень лише у випадку аланіну і глутаміну (+92,5%, $P<0,001$), проліну і оксипроліну (-39,2%, $P<0,001$), лейцину (+ 60%, $P<0,001$), фенілаланіну (+20,8 %, $P<0,001$), ізолейцину (+43,8%, $P<0,001$). Решта досліджуваних АК не змінювалася (табл.3.5.1).

Таблиця 3.5.1. Показники концентрацій фракцій вільних амінокислот у щурів лінії Вістар після впливу дозованої нормобаричної гіпоксії та її одночасної дії з мелатоніном в осінній період (мг/100 г сирої кістки, $M\pm m$, $n=12$)

Показник	Експериментальні групи тварин				
	Група I контроль	Група III ДНГ	Δ , %	Група IV ДНГ+ мелатонін	Δ , %
1	2	3	4	5	6
Цистеїн +цистин	0,4 \pm 0,02	0,36 \pm 0,02	-10	0,37 \pm 0,02	-7,5
Орнітин +глюкозамін	0,07 \pm 0,004	0,05 \pm 0,003***	-29	0,062 \pm 0,01	-11,4
Аргінін+ гістидин+ таурин	0,55 \pm 0,1	0,5 \pm 0,03	-9	0,61 \pm 0,03	+10,9
Лізин+ аспарагін	1,52 \pm 0,02	1,77 \pm 0,09	+16	1,74 \pm 0,07	+14,5
Гліцин+ метіонін	2,35 \pm 0,2	2,2 \pm 0,1	-6,4	2,3 \pm 0,15	-2,1

1	2	3	4	5	6
Серин +аспарагінова кислота	0,04±0,009	0,03±0,003	-25	0,04±0,007	0
Аланін +глутамін	0,8±0,20	0,76±0,1	-5	1,54±0,120**	+92,5
Валін+ триптофан	0,05±0,01	0,05±0,008	0	0,05±0,003	0
Тирозин+ глутамінова кислота	0,8±0,10	0,74±0,08	-7,5	0,93±0,05	+16
Треонін +ізовалін	0,13±0,03	0,1±0,007	-23	0,09±0,007	-30,8
Пролін +оксипролін	1,48±0,09	1,3±0,05	-12	0,9±0,07***	-39,2
Лейцин	0,30±0,03	0,32±0,02	+6,6	0,48±0,02***	+60
Фенілаланін	0,48±0,03	0,45±0,02	-6,25	0,58±0,02**	+20,8
Ізолейцин	0,32±0,03	0,26±0,02	-18,8	0,46±0,02***	+43,8

Примітки: *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 – порівняно з контролем; «-» - зниження показника у % порівняно з контролем; «+» підвищення показника у % порівняно з контролем

Навесні із 14 досліджуваних груп АК у КТ щурів лінії Вістар після 28-добового впливу ДНГ саногенного рівня вірогідне зниження концентрації відмічено в 4 випадках, а саме: аргініну, гістидину і таурину – на 29% (P<0,001), лізину і аспарагіну – на 14% (P<0,001), серину і аспарагінової кислоти – на 25% (P<0,01), валіну і триптофану – на 50% (P<0,05) відносно контролю (рис.3.5.1, табл.3.5.2).

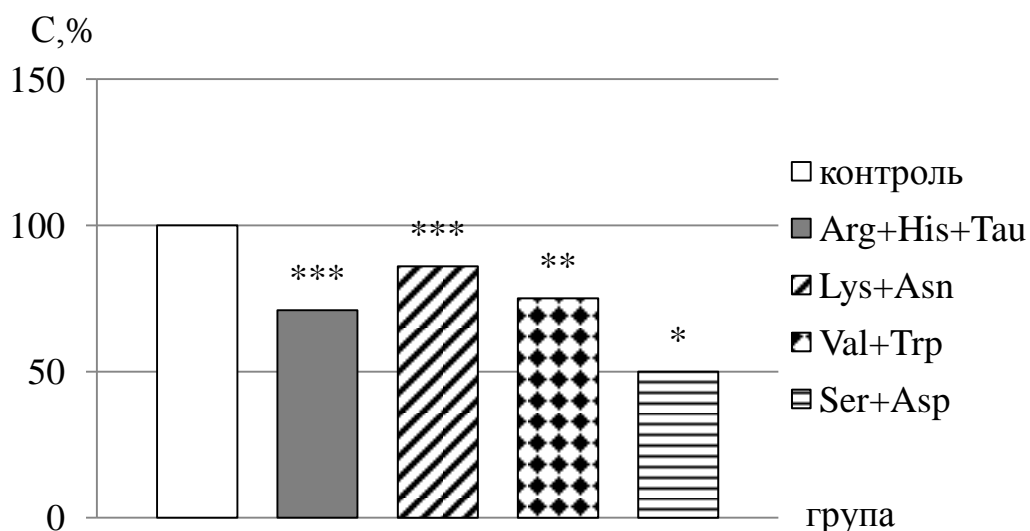


Рис.3.5.1. Концентрація вільних амінокислот у кістковій тканині щурів лінії Вістар після впливу дозованої нормобаричної гіпоксії саногенного рівня навесні: * - $P<0,05$, ** - $P<0,01$, *** - $P<0,001$ – порівняно з контролем

Таблиця 3.5.2. Концентрація вільних амінокислот у щурів лінії Вістар після впливу дозованої нормобаричної гіпоксії та її одночасної дії з мелатоніном у весняний період (мг/100 г сирової кістки, $M\pm m$, $n=12$)

Показник	Експериментальні групи тварин				
	Група I контроль	Група III ДНГ	Δ , %	Група IV ДНГ+ мелатонін	Δ , %
1	2	3	4	5	6
Цистеїн +цистин	$0,46\pm 0,03$	$0,4\pm 0,02$	-13	$0,9\pm 0,05^{***}$	+96
Орнітин +глюкозамін	$0,05\pm 0,007$	$0,04\pm 0,004$	-20	$0,08\pm 0,006^{**}$	+60
Аргінін+ гістидин+ таурин	$0,85\pm 0,05$	$0,6\pm 0,04^{***}$	-29	$0,86\pm 0,05$	+1
Лізин+ аспарагін	$2,09\pm 0,2$	$1,8\pm 0,09^{***}$	-14	$2,66\pm 0,12$	+27
Гліцин+ метіонін	$3,04\pm 0,3$	$2,4\pm 0,2$	-21	$2,7\pm 0,2$	-11

1	2	3	4	5	6
Серин +аспарагінова кислота	0,08±0,007	0,06± 0,004**	-25	0,07±0,007	-13
Аланін +глутамін	1,99±0,12	1,8±0,12	-10	1,94±0,1	-3
Валін+ триптофан	0,04±0,005	0,02±0,003 *	-50	0,05±0,006	+25
Тирозин+ глутамінова кислота	1,48±0,14	1,17±0,13	-21	1,09±0,09*	-26
Треонін +ізовалін	0,15±0,02	0,17±0,007	+13	0,09±0,008**	-40
Пролін +оксипролін	1,9±0,17	1,83±0,08	-4	0,97±0,05***	-49
Лейцин	0,98±0,01	1,12±0,06	+14	0,77±0,04*	-21
Фенілаланін	0,7±0,05	0,7±0,03	0	0,63±0,04	-10
Ізолейцин	0,6±0,05	0,59±0,03	-2	0,49±0,03*	-18

Примітки: *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 – порівняно з контролем; «-» - зниження показника у % порівняно з контролем; «+» підвищення показника у % порівняно з контролем

Навесні після одночасної дії ДНГ та мелатоніну у тварин лінії Вістар зросла концентрація цистеїне і цистине на 96% (P<0,001), а орнітину і глюкозаміну на 60% (P<0,01). В 5 інших випадках за тих же експериментальних умов спостерігали зниження концентрації, а саме: тирозину і глутамінової кислоти – на 26% (P<0,05), треоніну та ізоваліну – на 40% (P<0,01), проліну і оксипроліну – на 49% (P<0,001), лейцину – на 21% (P<0,05), ізолейцину – на 18% (P<0,05) порівняно з контрольними значеннями (рис.3.5.2, табл.3.5.2).

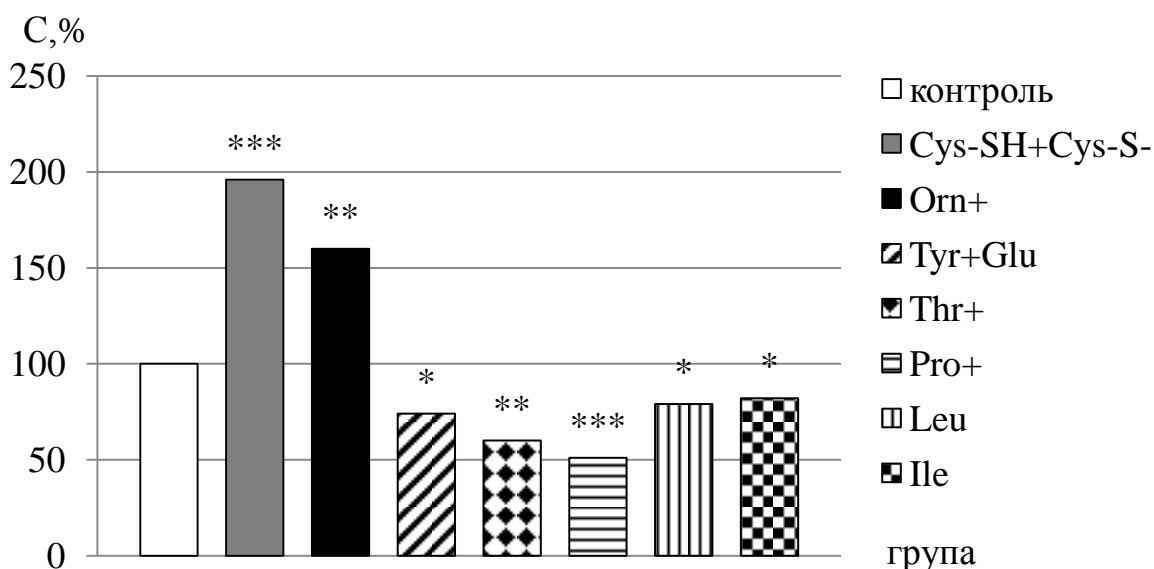


Рис.3.5.2. Концентрація вільних амінокислот у кістковій тканині щурів лінії Вістар після одночасного впливу дозованої нормобаричної гіпоксії саногенного рівня та мелатоніну (5 мг/кг маси тіла) навесні: * - $P<0,05$, ** - $P<0,01$, ***- $P<0,001$ – порівняно з контролем

Восени концентрація більшості досліджуваних нами АК у КТ щурів лінії SHR зросла після обох експериментальних впливів. Після стимулюючої дії ДНГ саногенного рівня це підвищення було вірогідним для вмісту цистеїну і цистину (+19,2%, $P<0,05$), лейцину (+31,7%, $P<0,001$), фенілаланіну (+28,6%, $P<0,001$), ізолейцину (+27%, $P<0,001$). Концентрація аргініну, гістидіну і таурину знизилась на 14% ($P<0,05$), а валіну і триптофану на 25% ($P<0,05$) відносно контрольних значень. Після впливу ДНГ та мелатоніну спостерігали лише підвищення концентрації цистеїну і цистину на 46% ($P<0,001$), орнітину і глюкозаміну на 50% ($P<0,001$), гліцину і метіоніну на 33,8% ($P<0,001$), серину і аспарагінової кислоти на 65 % ($P<0,001$), проліну та окипроліну на 42,5% ($P<0,001$), лейцину на 77% ($P<0,001$), фенілаланіну на 42,6% ($P<0,001$), ізолейцину на 35,6% ($P<0,001$) (табл.3.5.3).

Таблиця 3.5.3. Концентрація вільних амінокислот у щурів лінії SHR після впливу дозованої нормобаричної гіпоксії саногенного рівня та її одночасної дії з мелатоніном в осінній період (мг/100 г сирової кістки, $M \pm m$, $n=12$)

Показник	Експериментальні групи тварин				
	Група I контроль	Група III ДНГ	Δ , %	Група IV ДНГ+ мелатонін	Δ , %
1	2	3	4	5	6
Цистеїн +цистин	0,52±0,03	0,62±0,04*	+19,2	0,76± 0,04***	+46,0
Орнітин +глюкозамін	0,1±0,01	0,118± 0,003	+18,0	0,15± 0,007***	+50,0
Аргінін+ гістидин+ таурин	0,85±0,05	0,73±0,03*	-14,0	0,95±0,05	+11,8
Лізин+ аспарагін	2,1±0,1	2,04±0,11	-2,9	2,6±0,130	+25,0
Гліцин+ метіонін	2,9±0,2	3,25±0,2	+12	3,88±0,14***	+33,8
Серин +аспарагінова кислота	0,04± 0,007	0,05±0,004	+20,0	0,066±0,007*	+65,0
Аланін +глутамін	1,89±0,1	1,78±0,19	-5,8	1,832±0,13	-3,1
Валін+ триптофан	0,08±0,007	0,06 ±0,006*	-25,0	0,08±0,01	0
Тирозин+ глютамінова кислота	1,52±0,10	1,4±0,16	-7,9	1,46±0,14	-3,9
Треонін +ізовалін	0,16±0,01	0,12±0,01	-25,0	0,167±0,02	+4,4
Пролін +оксипролін	1,27±0,08	1,52±0,09	+19,7	1,81±0,08***	+42,5
Лейцин	0,60±0,020	0,79± 0,05***	+31,7	1,063± 0,03***	+77,0
Фенілаланін	0,7±0,03	0,9± 0,04***	+28,6	0,1±0,03**	+42,6
Ізолейцин	0,59±0,02	0,75± 0,04***	+27,0	0,8±0,02***	+35,6

Примітки до таблиці 3.5.3: * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$ – порівняно з контролем; «-» - зниження показника у % порівняно з контролем; «+» - підвищення показника у % порівняно з контролем

Весною у щурів лінії SHR після впливу ДНГ вірогідно знизилася концентрація цистеїну і цистину – на 21% ($P<0,01$), орнітину і глюкозаміну – на 33% ($P<0,001$), аргініну, гістидину і таурину – на 34% ($P<0,001$), лізину і аспарагіну – на 23% ($P<0,05$), серину і аспарагінової кислоти – на 22% ($P<0,001$), лейцину – на 20% ($P<0,05$). Вміст гліцину і метіоніну зріс – на 23% ($P<0,01$), проліну і оксипроліну – на 82% ($P<0,001$), ізолейцину – на 15% ($P<0,05$) відносно контролю (рис.3.5.4).

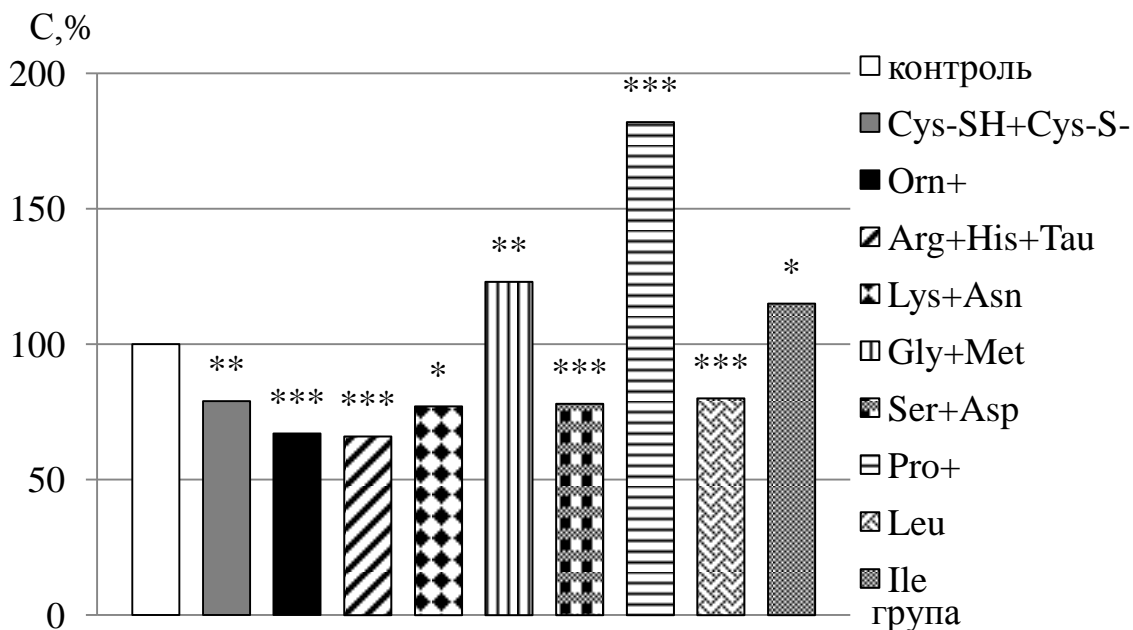


Рис.3.5.3. Амінокислотний склад кісткової тканини щурів лінії SHR навесні після впливу дозованої нормобаричної гіпоксії саногенного рівня: * - $P<0,05$, ** - $P<0,01$, *** - $P<0,001$ – порівняно з контролем

Весною після одночасної дії ДНГ саногенного рівня та мелатоніну у тварин лінії SHR концентрація аргініну, гістидину і таурину знизилася – на 21% ($P<0,01$), тирозину і глютамінової кислоти – на 24% ($P<0,01$), треоніну та ізоваліну – на 47% ($P<0,001$), лейцину – на 13% ($P<0,05$). Підвищилася –

проліну та окипроліну – на 80% ($P<0,001$), фенілаланіну – на 24% ($P<0,001$) відносно контролю (рис.3.5.4).

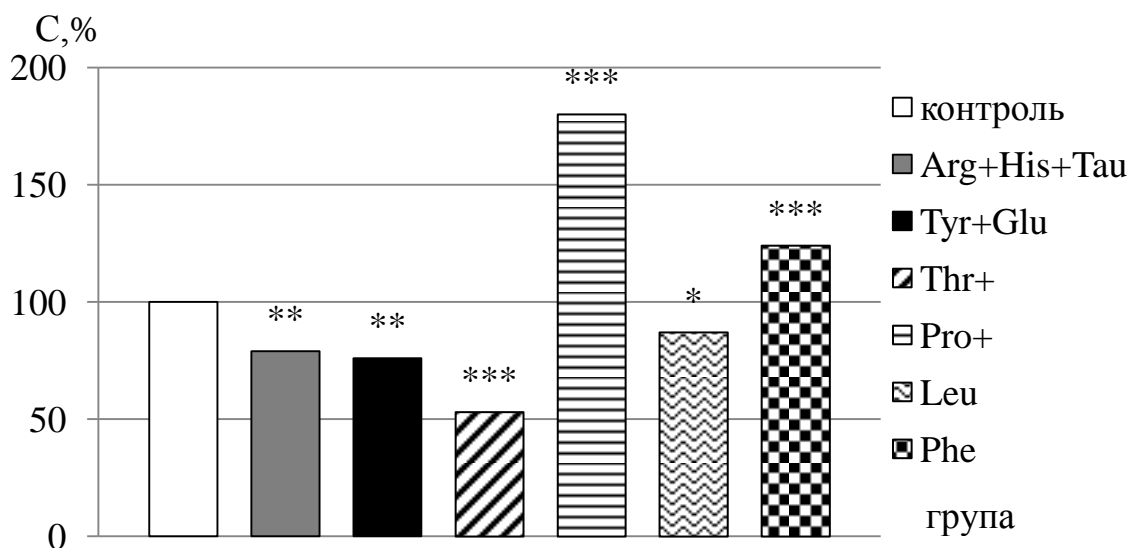


Рис.3.5.4. Концентрація амінокислот у кістковій тканині щурів лінії SHR навесні після одночасної дії дозованої нормобаричної гіпоксії та мелатоніну (5 мг/кг маси тіла): * - $P<0,05$, ** - $P<0,01$, *** - $P<0,001$ – порівняно з контролем

Таблиця 3.5.4. Концентрація вільних амінокислот у щурів лінії SHR після впливу дозованої нормобаричної гіпоксії саногенного рівня та її одночасної дії з мелатоніном у весняний період (мг/100 г сирової кістки, $M\pm m$, $n=12$)

Показник	Експериментальні групи тварин				
	Група I контроль	Група III ДНГ	Δ , %	Група IV ДНГ+ мелатонін	Δ , %
1	2	3	4	5	6
Цистеїн +цистин	$1,1\pm0,06$	$0,87\pm0,05^{**}$	-21	$0,95\pm0,08$	-14
Орнітин +глюкозамін	$0,12\pm0,01$	$0,08\pm0,01^{***}$	-33	$0,1\pm0,008$	-17
Аргінін+ гістидин+ таурин	$1,01\pm0,05$	$0,67\pm0,04^{***}$	-34	$0,8\pm0,06^{**}$	-21
Лізин+ аспарагін	$2,72\pm0,16$	$2,09\pm0,23^{*}$	-23	$2,64\pm0,2$	-3
Гліцин+ метіонін	$3,68\pm0,15$	$2,85\pm0,21^{**}$	+23	$2,85\pm0,3$	+23

1	2	3	4	5	6
Серин +аспарагінова кислота	0,09±0,005	0,07±0,005***	-22	0,09±0,009	0
Аланін +глутамін	1,85±0,22	1,69±0,15	-9	1,57±1,16	-15
Валін+ триптофан	0,07±0,007	0,06±0,007	-14	0,07±0,006	0
Тирозин+ глутамінова кислота	1,26±0,09	1,26±0,09	0	0,96±0,05**	-24
Треонін +ізовалін	0,15±0,01	0,11±0,01	-27	0,08±0,007***	-47
Пролін +оксипролін	1,07±0,06	1,95±0,1***	+82	1,93±0,15***	+80
Лейцин	0,97±0,04	0,78±0,04***	-20	0,84±0,05*	-13
Фенілаланін	0,8±0,05	0,8±0,06	0	0,99±0,05***	+24
Ізолейцин	0,69±0,05	0,79±0,03*	+15	0,72±0,04	+4

Примітки: *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 – порівняно з контролем; «-» - зниження показника у % порівняно з контролем; «+» - підвищення показника у % порівняно з контролем

Восени у щурів лінії Вістар та SHR впливу ДНГ та її поєднуваної дії з мелатоніном концентрація деяких вільних АК зросла, але вони не приймають участі в синтезі колагену КТ. Навесні ДНГ саногенного рівня та її поєднана дія з мелатоніном знижує концентрацію вільних АК КТ щурів лінії Вістар та SHR, у тому числі таких як цистин і лізин, які безпосередньо беруть участь у синтезі колагену. Це свідчить про те, що мінімальна концентрація речовини виникає в інтенсивному місці її поглинання. Тобто, низький рівень цих АК вказує на активацію синтезу колагену органічного матриксу КТ.

3.6. Ліпідний склад кісткової тканини до та після введення екзогенного мелатоніну у щурів ліній Вістар та SHR в різні сезони року

Ліпіди є безпосереднім компонентом кісткового матриксу. Є підстави вважати, що білково-ліпідні комплекси відіграють значну роль у процесах остеогенезу, а саме в процесі мінералізації та утворенні ядер кристалізації [58].

В осінній період за нашими даними розподіл ліпідних фракцій у стегновій кістці контрольних щурів лінії Вістар відбувався наступним чином: 33,7% припадало на загальні фосфоліпіди, 24,1% - загальний холестерин, 20,8% - вільних жирних кислот (ВЖК) і 21,4% - на ТГ. Їхнє співвідношення у загальному пулі ліпідів дорівнювало 0,33: 0,24: 0,21: 0,21. У дослідної групи розподіл був таким: 31% - загальні ФЛ, 26,6% - загальний ХС, 22,9% - ВЖК і 19,5% - ТГ. Співвідношення в загальному пулі після введення екзогенного мелатоніну було 0,31: 0,26: 0,23: 0,20 (рис.3.6.1.)

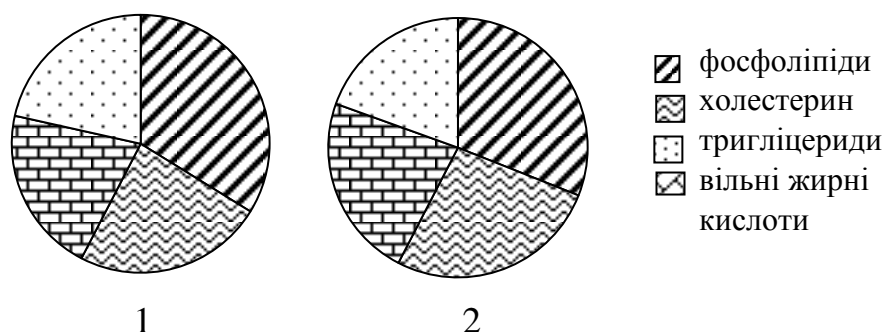


Рис.3.6.1. Співвідношення основних ліпідних фракцій щурів лінії Вістар у % контрольної (1) та після введення екзогенного мелатоніну груп (2) восени

Восени і весною спрямованість змін концентрації загальних ліпідів у КТ після впливу екзогенного мелатоніну у щурів лінії Вістар була однаковою. Восени вона вірогідно знизилася на 20,2% ($P < 0,01$) порівняно з контролем. Восени з усіх ліпідних фракцій знижувалася тільки концентрація тригліцеридів (ТГ) на 27,2% ($P < 0,01$), фосфоліпідів (ФЛ) на 26,6% ($P < 0,01$).

Концентрація решти фракцій – загального холестерину (ХС) та його складових у дослідній групі вірогідно не змінювалася відносно контролю (табл.3.6.1).

Таблиця 3.6.1. Концентрація ліпідних фракцій у кістковій тканині щурів лінії Вістар після введення екзогенного мелатоніну (5 мг/кг маси тіла) в осінній та весняний періоди (мг/г сирової тканини, $M \pm m$, $n=12$)

Ліпідні фракції	Осінь			Весна		
	Контроль	мелатонін	Δ , %	контроль	мелатонін	Δ , %
Фосфоліпіди	21,83± 2,430	16,03± 1,369*	-26,6	31,24±1,2	28,08±1,8	+10,1
Ефіри холестерину	11,2± 1,033	9,43±0,567	-15,8	11,95±0,5	10,38±1,1	-13,1
Вільний холестерин	4,44± 0,479	4,37±0,474	-1,6	2,28±0,4	2,95±0,3	+29,4
Загальний холестерин	15,64± 0,607	13,80± 0,713	-10,5	14,23±0,9	13,33±0,6	-6,3
Вільні жирні кислоти	13,52± 0,905	11,81± 0,631	-12,6	16,64±2,4	14,58±1,1	-12,4
Тригліцери-ди	13,87± 0,537	10,1± 0,572**	-27,2	15,44±1,9	13,04± 0,64	-15,5
Загальні ліпіди	64,86± 3,507	51,74± 2,454**	-20,2	77,55± 2,47	69,03± 4,04*	-11,0

Примітки: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ – достовірні відмінності порівняно з контролем; «-» - зниження показника у % порівняно з контролем; «+» - підвищення показника у % порівняно з контролем

Весною виявлено вірогідне зниження лише концентрації загальних ліпідів у КТ щурів лінії Вістар на 13% ($P < 0,05$) (табл.3.6.1). Суттєвих змін концентрації ліпідних фракцій у КТ дослідних тварин та їх розподілі у загальному пулі ліпідів після впливу екзогенного мелатоніну ми не спостерігали. Результати отримані восени у щурів лінії Вістар відрізнялися від весняних підвищенням майже на 10% концентрації загальних ФЛ і зниженням на 8% загального ХС.

В осінній період у щурів лінії SHR ліпідні фракції у КТ розподілялися таким чином: 51,9% приходився на загальні ФЛ, 16,3% – на загальний ХС, 19,2% – на ВЖК і 12,5% – на ТГ. Співвідношення між фракціями складало: 0,52: 0,16: 0,19: 0,13. Після впливу екзогенного мелатоніну був наступним: 48,92% приходився на загальні ФЛ, 22,21% – на загальний ХС, 17,6% – на ВЖК і 11,2% – на ТГ. Співвідношення в загальному пулі після введення екзогенного мелатоніну було 0,49: 0,22: 0,17: 0,11. Концентрація загального ХС за цих умов вірогідно знизилася на 28,9% ($P<0,05$) порівняно з контролем. Решта досліджуваних показників мала лише тенденцію до зниження, тоді як концентрація ефірів ХС – до збільшення на 139,2% ($P>0,05$) (табл. 3.6.2).

Таблиця 3.6.2. Концентрація ліпідних фракцій у кістковій тканині щурів лінії SHR після впливу екзогенного мелатоніну (5 мг/кг маси тіла) в осінній та весняний періоди (мг/г сирої тканини, $M\pm m$, $n=12$)

Ліпідні фракції	Осінь			Весна		
	контроль	мелатонін	Δ , %	контроль	мелатонін	Δ , %
Фосфоліпиди	60,84 \pm 0,609	54,12 \pm 2,354	-11,05	31,24 \pm 1,2	31,79 \pm 1,1	+1,76
Ефіри холестерину	5,59 \pm 8,277	13,37 \pm 8,277	+139,2	11,95 \pm 0,5	12,21 \pm 0,9	+2,18
Вільний холестерин	14,01 \pm 0,992	11,2 \pm 1,391	-20,1	2,28 \pm 0,4	3,86 \pm 0,3**	+69,3
Загальний холестерин	19,06 \pm 0,714	24,57 \pm 1,091*	-28,9	14,23 \pm 0,9	16,07 \pm 0,5	+12,93
Вільні жирні кислоти	22,55 \pm 1,232	19,5 \pm 1,071	-13,5	16,64 \pm 2,4	23,19 \pm 1,7*	+39,36
Тригліцериди	14,7 \pm 0,649	12,44 \pm 0,796	-15,4	15,44 \pm 1,9	17,18 \pm 1,2	+11,27
Загальні ліпіди	117,2 \pm 3,975	110,63 \pm 5,044	-5,6	77,55 \pm 2,47	88,66 \pm 3,58*	+14,33

Примітки до таблиці 3.6.2.: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ – достовірні відмінності порівняно з контролем; «-» - зниження показника у % порівняно з контролем; «+» - підвищення показника у % порівняно з контролем

Весною розподіл ліпідних фракцій у КТ щурів лінії SHR після впливу екзогенного мелатоніну був наступним: 36,0% приходився на загальні ФЛ, 18,2% – на загальний ХС, 26,3% – на ВЖК і 19,5% – на ТГ. Співвідношення між фракціями складало: 0,36: 0,18: 0,26: 0,19. Концентрація загальних ліпідів у цю пору року вірогідно підвищилася на 14% у лінії SHR ($P < 0,05$) порівняно з контролем. Концентрація ФЛ не змінювалася порівняно з контролем. Вміст вільного ХС був вищим на 69% порівняно з контролем ($P < 0,01$). Концентрація ВЖК вірогідно зросла на 39% ($P < 0,05$) відносно контролю. Концентрації ТГ, ФЛ і загального ХС вірогідно не змінювалися (табл. 3.6.2).

3.7. Ліпідний склад кісткової тканини до та після впливу нормобаричної гіпоксії саногенного рівня та її спільної дії з мелатоніном у щурів ліній Вістар та SHR в різні сезони року

Весною ліпідні фракції у стегновій кістці контрольних щурів лінії Вістар розподілялися наступним чином: 42,4% припадало на загальні ФЛ, 19,6% – на загальний ХС, 23,8% – ВЖК і 14,14% – на ТГ. Співвідношення між цими фракціями у загальному пулі ліпідів дорівнювало 0,42:0,20:0,24:0,14 (Рис.3.7.1).

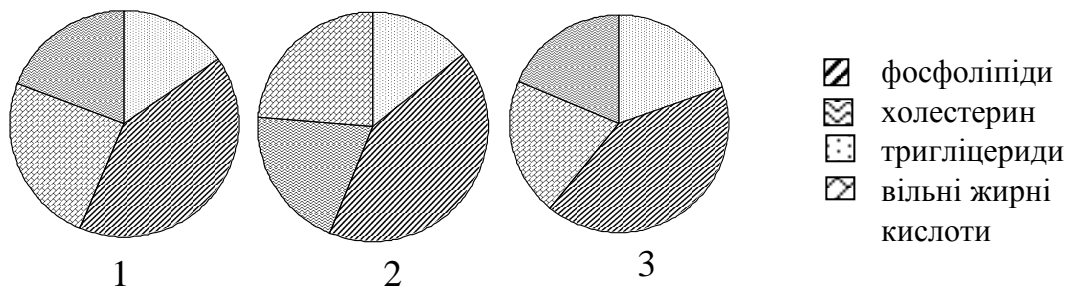


Рис.3.7.1. Співвідношення основних ліпідних фракцій у % контрольних (1) щурів лінії Вістар навесні, після впливу дозованої нормобаричної гіпоксії (2), після її спільної дії з мелатоніном (3)

У весняний період у щурів лінії Вістар загальна концентрація ліпідів зросла на 11% ($P < 0,05$) лише після впливу ДНГ. При порівнянні даних контрольної і дослідних груп тварин цієї лінії було виявлено вірогідне підвищення концентрації ТГ на 62% після спільної дії ДНГ та мелатоніну. Концентрація загального ХС вірогідно не змінювалася в жодній із досліджуваних груп тварин. Проте, після впливу ДНГ концентрація ефірів ХС зросла на 68% ($P < 0,001$), а вільного ХС знижувалася на 48% ($P < 0,01$) порівняно з контролем. Після одночасної дії ДНГ та мелатоніну спостерігали підвищення концентрації ефірів ХС на 58% ($P < 0,001$) відносно контрольних значень (табл.3.7.1).

Таблиця 3.7.1. Вміст ліпідних фракцій у кістковій тканині щурів лінії Вістар навесні ($M \pm m$, мг/г сирової кісткової тканини, $n=12$)

Ліпідні фракції		Експериментальні групи				
		Група I контроль	Група III ДНГ	$\Delta, \%$	Група IV ДНГ+ мелатонін	$\Delta, \%$
Фосфоліпіди		29,52 \pm 1,5	32,56 \pm 2,4	+10	33,76 \pm 3,1	+14
холестерин	Ефіри	6,68 \pm 0,5	11,21 \pm 0,7***	+68	10,54 \pm 0,7***	+58
	Вільний	6,96 \pm 0,6	3,64 \pm 0,96**	-48	5,5 \pm 1,5	-21
	Загальний	13,64 \pm 0,7	14,85 \pm 1,1	+9	16,04 \pm 1,9	+18
Вільні жирні кислоти		16,58 \pm 1,9	19,2 \pm 2,7	+16	16,6 \pm 2,2	0
Тригліцериди		9,84 \pm 1,01	12,11 \pm 0,96	+23	15,9 \pm 2,4*	+62
Загальні ліпіди		69,58 \pm 4,26	78,72 \pm 3,6*	+13	82,3 \pm 6,8	+18

Примітки: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ – достовірні відмінності порівняно з контролем; «-» - зниження показника у % порівняно з контролем; «+» - підвищення показника у % порівняно з контролем

В осінній період у щурів лінії Вістар концентрація загальних ліпідів у КТ мала тенденцію до підвищення на 10,5% після впливу ДНГ саногенного рівня та на 22% після її спільної дії з мелатоніном. Після впливу ДНГ вірогідно зросла концентрація загального ХС на 40,5% ($P < 0,05$), а після її спільної дії з мелатоніном на 56,7% ($P < 0,05$) порівняно з контролем (рис.3.7.2, табл.3.7.2).

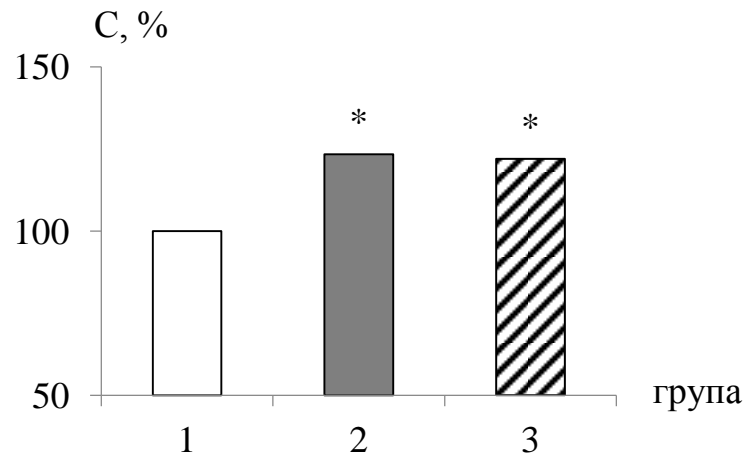


Рис.3.7.2. Концентрація загального холестерину в сироватці крові контрольних (1) щурів лінії Вістар, після впливу дозованої нормобаричної гіпоксії саногенного рівня (2) та її одночасного впливу з мелатоніном (3) восени: * - $P < 0,05$ порівняно з контролем

Таблиця 3.7.2. Вміст ліпідних фракцій у кістковій тканині щурів лінії Вістар в осінній період ($M \pm m$, мг/г сирової кісткової тканини, $n=12$)

Ліпідні фракції		Експериментальні групи				
		Група I контроль	Група III ДНГ	Δ,%	Група IV ДНГ+ мелатонін	Δ,%
Фосфоліпіди		31,17±2,9	33,2±1,9	+6,5	33,4±0,9	+7,0
холе стери н	Ефіри	10,2±1,1	10,02±0,6	-1,8	10,27±0,8	+0,7
	Вільний	2,28±0,9	7,52± 0,6***	+230,0	9,28±1,9**	+307
	Загальний	12,48±1,2	17,54±0,9*	+40,5	19,55±0,8*	+56,7
Вільні жирні кислоти		20,56±1,97	18,9±1,4	-8,0	24,95±1,5	+21
Тригліцериди		17,3±1,0	20,4±1,1	+17,9	21,5±1,5	+24
Загальні ліпіди		81,5±6,2	90,04±4,9	+10,5	99,4±2,7	+22

Примітки: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ – достовірні відмінності порівняно з контролем; «-» - зниження показника у % порівняно з контролем; «+» - підвищення показника у % порівняно з контролем

Одночасно за тих же експериментальних умов виявили підвищення вільного ХС на 230 % і 307 % ($P < 0,05$) відповідно порівняно з контрольними значеннями (рис.3.7.2, табл.3.7.2).

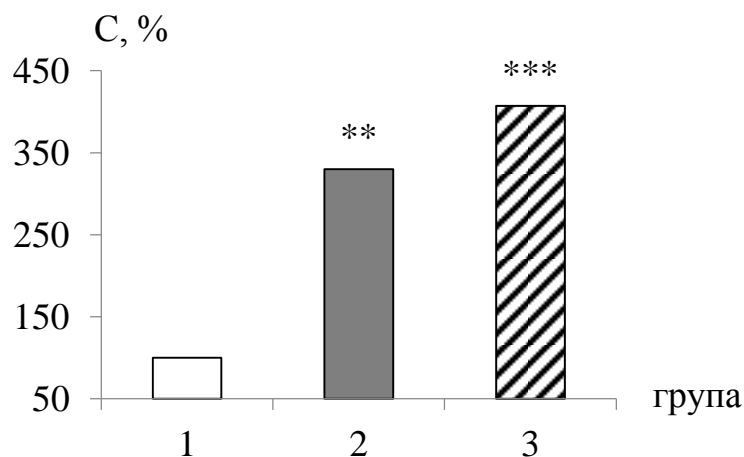


Рис.3.7.2. Концентрація вільного холестерину в сироватці крові контрольних (1) щурів лінії Вістар, після впливу дозованої нормобаричної гіпоксії саногенного рівня (2) та її спільної дії з мелатоніном (3) восени: ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ - порівняно з контролем

Решта ліпідних фракцій у КТ восени у щурів лінії Вістар вірогідно не змінювалася.

В осінній період у контрольних щурів лінії SHR після впливу ДНГ саногенного рівня ліпідні фракції розподілялися наступним чином: 28,7% припадало на загальні фосфоліпіди, 21% – на загальний ХС, 28,8% – ВЖК і 21,6% – на ТГ. Співвідношення між цими фракціями у загальному пулі ліпідів дорівнювало 0,29:0,21:0,29:0,22 (табл. 3.7.3). Зміни ліпідних фракцій за умов впливу ДНГ та її спільної дії з мелатоніном були односпрямованими і мали тенденцію до зниження. Вірогідне зниження відзначили лише ВЖК на 22% ($P < 0,05$) і 23% ($P < 0,05$) при обох експериментальних впливах (рис.3.7.4, табл.3.7.3).

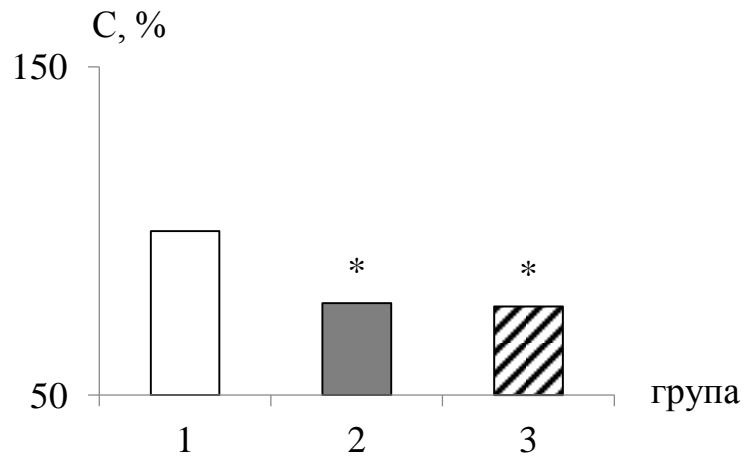


Рис.3.7.4. Концентрація вільних жирних кислот у сироватці крові контрольних (1) щурів лінії SHR, після впливу дозованої нормобаричної гіпоксії (2) та її спільної дії з мелатоніном (3) восени: * $P<0,05$, *** $P<0,001$ - порівняно з контролем

Таблиця 3.7.3. Вміст ліпідних фракцій у кістковій тканині щурів лінії SHR в осінній період ($M\pm m$, мг/г сирої кісткової тканини, $n=12$)

Ліпідні фракції		Експериментальні групи				
		Група I контроль	Група III ДНГ	$\Delta, \%$	Група IV ДНГ+ мелатонін	$\Delta, \%$
Фосфоліпіди		$32,8\pm 0,9$	$32,8\pm 1,6$	0	$31,7\pm 3,1$	-3,4
холестерин	Ефіри	$13,07\pm 0,6$	$11,4\pm 0,6$	-12,8	$11,03\pm 1,0$	-16
	Вільний	$10,9\pm 2,1$	$11,3\pm 2,3$	+3,7	$8,7\pm 1,2$	-20
	Загальний	$23,97\pm 0,9$	$22,7\pm 0,9$	-5,3	$19,73\pm 2,0$	17,7
Вільні жирні кислоти		$32,9\pm 1,3$	$25,8\pm 1,5^*$	-22	$25,4\pm 3,6^*$	-22,8
Тригліцериди		$24,7\pm 1,5$	$23,7\pm 1,4$	-4	$23,7\pm 2,8$	-4
Загальні ліпіди		$114,37\pm 12,6$	$105,0\pm 4,7$	-8,2	$100,43\pm 11,2$	-12,2

Примітки: * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$ – достовірні відмінності порівняно з контролем; «-» - зниження показника у % порівняно з контролем; «+» - підвищення показника у % порівняно з контролем

Весною у контрольних щурів лінії SHR ліпідні фракції у стегновій кістці розподілялися наступним чином: 43,2% припадало на загальні фосфоліпіди, 18,5% – на загальний ХС, 12,4% – ВЖК і 25,9% – на ТГ. Співвідношення між цими фракціями у загальному пулі ліпідів дорівнювало 0,43:0,19:0,12:0,26 (рис.3.7.5, табл. 3.7.4).

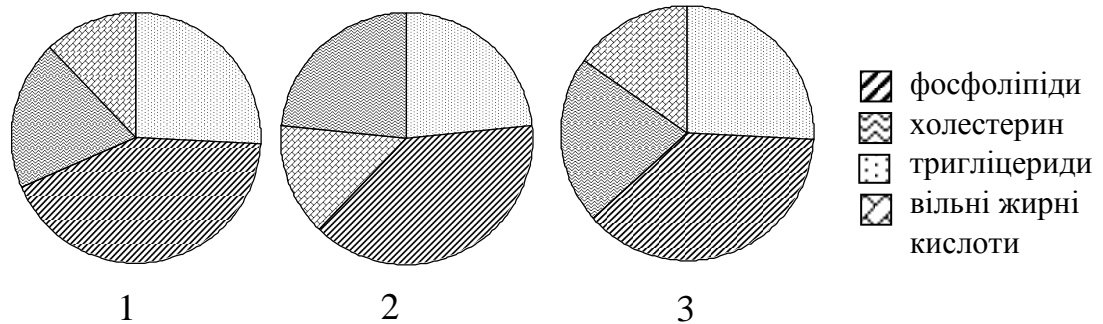


Рис.3.7.5. Співвідношення основних ліпідних фракцій у % у контрольних (1) щурів лінії SHR навесні, після впливу дозованої нормобаричної гіпоксії саногенного рівня(2), після її спільної дії з мелатоніном (3)

Навесні у щурів лінії SHR після впливу ДНГ вірогідно знижувалася на 49% лише концентрація ТГ (табл.3.7.3). Тоді як після спільної дії ДНГ та мелатоніну було виявлено вірогідне зниження концентрації загальних ліпідів на 24%, ФЛ, вільного ХС, ТГ відповідно на 34%, 74% і 24%.

Таблиця 3.7.4. Вміст ліпідних фракцій у кістковій тканині щурів лінії SHR навесні ($M \pm m$, мг/г сирої кісткової тканини, $n=12$)

Ліпідні фракції		Експериментальні групи				
		Група I контроль	Група III ДНГ	$\Delta, \%$	Група IV ДНГ+ мелатонін	$\Delta, \%$
1		2	3	4	5	6
Фосфоліпіди		36,18 \pm 4,3	30,4 \pm 2,98	-16	23,85 \pm 1,4**	-34
хо ле ст ер	Ефіри	11,33 \pm 0,9	10,87 \pm 0,5	-4	12,58 \pm 0,8	+11
	Вільний	4,16 \pm 1,4	4,35 \pm 1,6	+5	1,08 \pm 0,3*	-74
	Загальний	15,49 \pm 1,7	15,22 \pm 2,8	-1,7	13,66 \pm 0,9	-12

1	2	3	4	5	6
Вільні жирні кислоти	10,4±0,6	9,77±0,4	-6	9,8±0,6	-6
Тригліцериди	21,7±1	11,08±1,4***	-49	16,42±1,3**	-24
Загальні ліпіди	83,77±4,3	66,47±7,5	-20,7	63,73±3,1***	-24

Примітки: *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 – достовірні відмінності порівняно з контролем; «-» - зниження показника у % порівняно з контролем; «+» - підвищення показника у % порівняно з контролем

Таким чином, після впливу ДНГ та її поєднуваної дії з мелатоніном виявлено різницю реакції ліпідних фракцій у КТ щурів ліній Вістар і SHR як навесні, так і в осінній період. Вірогідне зниження ФЛ та ТГ у тварин лінії SHR після поєднуваного впливу ДНГ та мелатоніну може негативно відобразитися на рівні мінералізації КТ. Восени після аналогічного впливу ДНГ та мелатоніну у тварин лінії Вістар ми спостерігали вірогідне зростання концентрації вільного і загального ХС та загальних ліпідів. Фракції ліпідів, що задіяні в процес мінералізації КТ вірогідно не змінювалися.

В осінній період вплив ДНГ та її одночасна дія з мелатоніном у щурів лінії Вістар та SHR не призводили до вірогідних змін фракцій ліпідів, які задіяні в процесі мінералізації КТ. Весною після одночасної дії ДНГ та мелатоніну у щурів лінії Вістар ми спостерігали вірогідне підвищення концентрації ТГ. Це узгоджується з даними літератури [292] і свідчить про опосередкований вплив даних факторів на кістковий метаболізм шляхом підвищення вмісту полярних ліпідів. Весною після дії ДНГ у щурів лінії SHR вірогідно знизилася концентрація ТГ, а після її одночасного впливу з мелатоніном – знизилася концентрація як ТГ, так і ФЛ. Така реакція може негативно відобразитися на рівні мінералізації КТ.

РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Сезонним варіаціям фізіологічних і біохімічних процесів в організмі людини і тварин присвячено чимало досліджень [41, 45, 82]. Різна тривалість світлового дня та рівень температури оточуючого середовища в певні пори року призводять до численних змін гуморальної регуляції метаболізму, які реалізується через активність відповідних гормонів (гіпофіза, ЩЗ, тощо). Відомо, що мелатонін здійснює контроль над темпами старіння, ростом пухлин, репродуктивними функціями, регулює кров'яний тиск, активно впливає на інтенсивність метаболізму КТ [110, 111, 132, 211].

Процес самовідновлення КТ також модифікується змінами умов навколишнього середовища [13]. За результатами експериментальних досліджень встановлено, що порушення фотоперіодів може призводити до інтенсифікації або гальмування ремоделювання КТ [202].

Результати проведеної нами роботи підтверджують, що введення екзогенного мелатоніну змінює показники активності формування та резорбції КТ у щурів. У тварин лінії Вістар ці зміни в осінній період проявлялися у підвищенні активності ЛФ та ГА на 44% та 15,4% ($P < 0,05$) відповідно, а концентрація піридиноліну знижується на 48% ($P < 0,01$). Наші дані співпадають з результатами інших дослідників. Вони показали, що *in vitro* мелатонін стимулює секрецію і активність ЛФ, колагену І типу, остеопонтину, кісткового сіалопротейну і остеокальцину та стимулює утворення мінерального матриксу [194, 226]. Дані літератури дають підставу припустити, що дія екзогенного мелатоніну здійснюється через експресію остеогенних генів Runx2, остеокальцину і BMP-2 фактору за допомогою MT2 рецепторів гормону (рис. 4.1.1), [115, 123, 132, 150, 172, 217, 221, 230, 233].

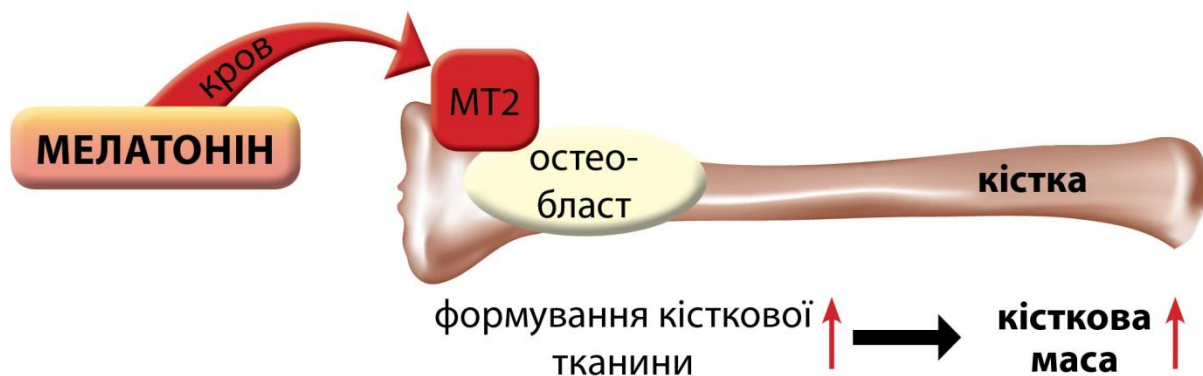


Рис. 4.4.1. Схема регуляції ремоделювання кісткової тканини через MT2-рецептор до мелатоніну.

Восени у щурів лінії SHR за тих самих експериментальних умов активність ЛФ вірогідно знижується на 54% ($P < 0,001$), а решта показників залишаються близькими до контрольних значень. Це може відображати те, що ступінь узгодження діяльності остеокластів та остеобластів є високим і темпи формування та резорбції КТ у них врівноважені.

Весною у тварин лінії Вістар та SHR після впливу мелатоніну зменшилася активність ЛФ на 8% ($P < 0,05$) та 17% ($P > 0,05$), ТРКФ – на 82% ($P < 0,001$) та 21% ($P < 0,01$) та концентрація піридиноліну на 43% ($P < 0,05$) і 14% ($P > 0,05$), а активність КФ збільшилася на 78% та 65% ($P < 0,001$). У щурів лінії SHR вірогідно збільшилася концентрація ГАГ та ГА на 86% та 43% ($P < 0,01$) відповідно. Такі результати узгоджуються з даними наукової літератури де показано, що мелатонін може пригнічувати диференціацію остеокластів шляхом зниження регуляції ядерного фактору κB (NF- κB) із супутнім зниженням індукції фактору транскрипції NFATc1. Крім того, мелатонін, як виявилось, впливає на утворення і регулює активність остеокластів, незалежно від рецепторів до нього на плазматичній мембрані [157]. В доповнення до раніше відомих ефектів мелатоніну і гормонів ЩЗ на КТ, нами встановлено сезонні варіації їх дії на метаболізм кістки.

Ендокринна система має фундаментальне значення в процесі життєдіяльності організму. Особливу роль у цій системі виконує ЩЗ, адже

саме її гормони в процесі енергетичного обміну впливають на ріст, розвиток та диференціацію клітин, в тому числі і КТ [254].

Молекулярні механізми впливу Тг на КТ є складними і тільки частково вивченими. Вони здійснюють прямий або непрямий ефект на КТ. Тг відіграють фундаментальну роль в ендохрональній осифікації при скелетному розвитку і рості, та у підтриманні кісткової маси, в основному через дію тиреоїдних рецепторів TR α 1 [102, 112]. Тг стимулюють активність остеобластів і остеокластів як у трабекулярній, так і у кортикальній КТ [102].

Функціональний зв'язок між мелатоніном та Тг може здійснюватися різними механізмами. З одного боку, вТЗ шляхом прямого впливу на остеобласти і хондроцити, стимулює остеогенез. З іншого, через опосередковані механізми впливу на остеокласти вТЗ ініціює резорбцію КТ. Наприклад, вТЗ може індукувати диференціацію та інгібувати проліферацію остеобластів. Показано, що вТЗ збільшує експресію декількох генів-регуляторів кісткового метаболізму, в тому числі – активності остеокальцину та синтезу колагену I типу [17].

Нашими експериментами показано, що в регуляції активності цих клітин певну роль відіграють гормони ЩЗ вТЗ і вТ4. В осінній період після введення екзогенного мелатоніну концентрації вТЗ та вТ4 підвищилися у обох ліній тварин. Тоді як весною, у щурів лінії Вістар показники залишилися близькими до контрольних значень, а у SHR – знизилася концентрація вТЗ.

Нами вперше було досліджено амінокислотний та ліпідний склад КТ у щурів ліній Вістар та SHR за умов дії екзогенного мелатоніну в різні сезони року. Восени у щурів лінії Вістар після впливу мелатоніну відбуваються вірогідні зміни найбільш значущих для синтезу колагену вільних амінокислот у КТ. А саме, збільшення концентрації аргініну, гістидину та таурину на 48%, серину та аспарагінової кислоти – на 150%, аланіну та глютаміну – на 124%. Одночасно концентрації наступних амінокислот вірогідно знижувалися: валіну і триптофану на 25,5%, тирозину та

глутамінової кислоти – на 26%, треоніну та ізоваліну – на 39%, проліну та окипроліну – на 22%, лейцину – на 49%, фенілаланіну – на 35% та ізолейцину – на 15%. У щурів лінії SHR за тих самих умов експерименту ми спостерігали вірогідне підвищення цистеїну і цистину на 54%, орнітину та глюкозаміну – на 111%, аргініну та таурину – на 41%, лізину та аспарагіну – на 26%, аланіну та глутаміну – на 18,5%. Валін та триптофан знизилися на 77%, тирозин та глутамінова кислота – на 30,5%, треонін та ізовалін – на 73%, а лейцин – на 52%.

Весною у щурів лінії Вістар вплив екзогенного мелатоніну призвів до наступних змін концентрації вільних амінокислот: підвищилися концентрації проліну та окипроліну на 80%, лейцину – на 33%, фенілаланіну – на 75%, ізолейцину – на 67%, а валіну та триптофану – зменшилася на 57%. У щурів лінії SHR вірогідно підвищилися концентрації тирозину та глутамінової кислоти на 25%, треоніну та ізоваліну – 122%, проліну та окипроліну – 120%, лейцину – на 83%, фенілаланіну – на 125%, ізолейцину – на 133%, а цистеїну та цистину – знизилася на 44% порівняно із контрольними значеннями. Навесні зміни концентрації АК, що безпосередньо беруть участь в синтезі колагену в КТ тварин лінії Вістар та SHR, були односпрямованими після впливу екзогенного мелатоніну. В більшості випадків ці показники вірогідно зростали, що може свідчити про пригнічення синтезу колагену органічного матриксу КТ. Отримані нами дані свідчать про негативний вплив екзогенного мелатоніну в дозі 5 мг/кг маси тіла на ремоделювання КТ щурів обох ліній у весняний період. Можливо це пов'язано зі зміною температури середовища, весняним авітамінозом і зменшенням потреб високої теплопродукції.

Отримані нами результати узгоджуються з літературними даними, де показано, що мелатонін посилює синтез колагенових та неколагенових білків органічного матриксу КТ [202], стимулює процеси мінералізації [118, 228]. Припускаємо, що екзогенний мелатонін опосередковано впливає на

кістковий метаболізм шляхом зниження концентрацій вільних АК, які приймають безпосередню участь у синтезі колагену.

Ліпіди є важливою складовою сполучної тканини. Проте, їх роль в мінералізації КТ вивчена недостатньо. Зокрема це стосується ролі білково - ліпідних комплексів у процесах остеогенезу. Ліпіди КТ відіграють важливу роль у формуванні ядер кристалізації при насиченні хряща солями кальцію, діючи як стабілізатори його аморфного стану [73]. Склад ліпідів органічного матриксу КТ достатньо різноманітний. До них входять ФЛ, ХС, ТГ, ВЖК. Кожна з ліпідних фракцій виконує певну роль. Експериментально показано, що ХС стегнової кістки бика знаходиться у вигляді нестійкого комплексного поєднання з колагеном [57, 73]. Встановлена пряма залежність між вмістом кислих ліпідів і ступенем мінералізації КТ, що дає підстави припустити можливість прямої взаємодії між кислими ліпідами і мінеральними компонентами, а саме кальцієм та іншими катіонами [31]. Однак механізм участі ліпідів у процесах мінералізації КТ залишається недостатньо вивченим.

В осінній період після дії екзогенного мелатоніну у щурів лінії Вістар вірогідно знизилася концентрація ФЛ на 26,6% ($P < 0,05$), а ефірів ХС, вільного та загального ХС, ВЖК, ТГ та загальних ліпідів вірогідно не змінилися. У щурів лінії SHR вірогідно знизилася концентрація загального ХС на 18% ($P < 0,05$), решта фракцій не змінилися.

У весняний період концентрації загальних ліпідів та їх фракцій після впливу екзогенного мелатоніну у щурів лінії Вістар вірогідно не відрізнялися від контрольних значень. Тоді як у лінії SHR введення гормону призвело до підвищення показників: вільного ХС на 69% ($P < 0,01$), ВЖК – на 39% ($P < 0,05$), загальних ліпідів – на 14% ($P < 0,05$), а ФЛ, ефіри ХС, загальний ХС та ТГ – вірогідно не змінилися.

Характер змін вмісту вільних АК та ліпідних фракцій вказує на те, що мелатонін безпосередньо впливає на кістковий метаболізм. Вірогідність такого механізму дії мелатоніну можлива за рахунок того, що білок-ліпідні

комплекси забезпечують зв'язок між органічним та неорганічним матриксом [14].

Мелатонін виконує численні функції, в тому числі у ремоделюванні КТ. Виявлено, що він стимулює фізіологічну регенерацію КТ у щурів через посилення проліферації остеобластів [185, 235]. Виходячи з результатів наших досліджень та даних сучасної літератури, мелатонін є гормональним модулятором функцій як остеобластів, так і остеокластів [35, 131].

Отримані нами дані узгоджуються із результатами інших досліджень, де показано, що мелатонін стимулює формування КТ шляхом активації проліферації та диференціації остеобластів *in vitro* [150, 163]. Такі дані дають підставу вважати, що введення екзогенного мелатоніну стабілізує процеси фізіологічного ремоделювання КТ і може використовуватися як остеопротектор.

Нами вперше досліджено вплив ДНГ саногенного рівня та його спільну дію з мелатоніном на показники ремоделювання КТ у щурів ліній Вістар та SHR в осінній та весняний періоди. Відомо, що PO_2 є важливим чинником енергетичного метаболізму та процесів остеогенезу [99, 141, 145, 234, 250]. Також показано, що сеанси ДНГ активують резервні захисно-приспосувальні реакції для здійснення яких у організмі є сформовані генетичні, фізіологічні і біохімічні механізми [97, 195, 220].

Нами отримано дані стосовно впливу ДНГ саногенного рівня на фізіологічний стан КТ у щурів лінії Вістар в осінній період. Спостерігали вірогідне підвищення активності ТРКФ на 62% ($P<0,05$) та ГАГ на 24% ($P<0,05$). При спільній дії ДНГ та мелатоніну підвищувалася активність ТРКФ на 80% ($P<0,01$) та знижувалась концентрація піридиноліну на 28% ($P<0,05$) порівняно з контрольними значеннями. У щурів лінії SHR після впливу ДНГ відбулося вірогідне підвищення активності ТРКФ на 201% ($P<0,05$), а при її спільній дії з мелатоніном – на 604% ($P<0,01$) і 157% ($P<0,05$) активності КФ. Дія ДНГ саногенного рівня активує резорбцію КТ.

Весною після впливу ДНГ саногенного рівня не виявлено вірогідних змін показників ремоделювання КТ у обох лініях щурів. Спільна дія ДНГ та мелатоніну у щурів лінії Вістар вірогідно знизила активність ЛФ на 44% ($P<0,05$) та концентрацію піридиноліну на 28,6% ($P<0,001$) і підвищила ГАГ на 275% ($P<0,05$) порівняно з контролем. У тварин лінії SHR за аналогічних умов експерименту вірогідних змін цих показників не відбувалося. Щодо реакції Тг, вТ3 та вТ4, на вплив ДНГ саногенного рівня та її спільної дії з мелатоніном, то нами не було виявлено вірогідних змін ані осінню, ані весною у обох ліній щурів.

В осінній період після впливу ДНГ саногенного рівня у щурів лінії Вістар при порівнянні показників концентрацій вільних АК контрольних і дослідних груп виявлено вірогідне зниження орнітину та глюкозаміну на 29% ($P<0,001$). А після її спільної дії з мелатоніном - проліну і оксипроліну на 39% ($P<0,05$). Аланін та глутамін, лейцин, фенілаланін та ізолейцин вірогідно підвищилися на 92,5% ($P<0,01$), 60% ($P<0,001$), 21% ($P<0,01$) та 44% ($P<0,001$) відповідно після впливу обох факторів.

У щурів лінії SHR восени вплив ДНГ призвів до вірогідних змін наступних показників: підвищення цистеїну та цистину на 19% ($P<0,05$), валіну і триптофану – на 25% ($P<0,05$), лейцину – 32% ($P<0,001$), фенілаланіну – на 286% ($P<0,001$) та ізолейцину – на 27% ($P<0,05$), і до зниження аргініну, гістидину та таурину на 14% ($P<0,05$), валіну і триптофану – на 25% ($P<0,05$) порівняно з контролем. Спільна дія ДНГ та мелатоніну призвела до вірогідного підвищення концентрацій вільних АК у щурів лінії SHR: цистеїну та цистину на 46% ($P<0,001$), орнітину та глюкозаміну – на 50% ($P<0,001$), гліцину та метіоніну – на 34% ($P<0,001$), серину та аспарагінової кислоти – на 65% ($P<0,05$), проліну та оксипроліну – 43% ($P<0,001$), лейцину – на 77% ($P<0,001$), фенілаланіну – на 43% ($P<0,01$) та ізолейцину – на 36% ($P<0,001$) порівняно з контролем.

У весняний період у щурів лінії Вістар концентрації вільних АК після впливу ДНГ саногенного рівня вірогідно знижувалися, а саме: аргініну,

гістидину та таурину на 29% ($P<0,001$), лізину та аспарагіну – на 14% ($P<0,001$), серину та аспарагінової кислоти – на 25% ($P<0,01$) та валіну і триптофану – на 50% ($P<0,05$) порівняно з контролем. Спільна дія ДНГ та мелатоніну теж вірогідно знижувала вміст наступних фракцій: треоніну та ізоваліну на 40% ($P<0,01$), проліну та оксипроліну на 49% ($P<0,001$), лейцину – на 21% ($P<0,05$) та ізолейцину на 18% ($P<0,05$). Цистеїну та цистину підвищилися на 96% ($P<0,001$), а орнітину та глюкозаміну – на 60% ($P<0,01$) порівняно з контролем. У щурів лінії SHR після впливу ДНГ знизилася концентрація цистеїну і цистину на 21% ($P<0,01$), орнітину та глюкозаміну – на 33% ($P<0,001$), аргініну, гістидину та таурину – на 34% ($P<0,001$), лізину та аспарагіну – на 23% ($P<0,05$), серину та аспарагінової кислоти – на 22% ($P<0,001$) та лейцину – на 20% ($P<0,001$). Підвищився вміст гліцину та метіоніну на 23% ($P<0,001$), проліну та оксипроліну – на 82% ($P<0,001$) та ізолейцину – на 15% ($P<0,05$) порівняно з контрольними значеннями. Спільна дія ДНГ та мелатоніну у щурів SHR знизилася концентрацію аргініну, гістидину та таурину на 21% ($P<0,01$), тирозину та глютамінової кислоти – на 24% ($P<0,01$), треоніну та ізоваліну – на 47% ($P<0,001$) та лейцину – на 13% ($P<0,05$). Підвищувалася концентрація проліну та оксипроліну на 80% ($P<0,001$) та фенілаланіну – на 24% ($P<0,001$) порівняно із контролем.

Осіною дія ДНГ саногенного рівня на показники концентрації ліпідних фракцій щурів лінії Вістар вірогідно підвищила вільний ХС на 230% ($P<0,001$) та загальний ХС на 40,5 % ($P<0,05$) порівняно з контролем. Спільна дія ДНГ та мелатоніну мала аналогічний ефект і збільшила ці ж показники на 307% ($P<0,01$) і 56,7% ($P<0,05$) відповідно. Решта фракцій вірогідно не змінювалися. У щурів лінії SHR вірогідно зменшилась концентрація ВЖК на 22% ($P<0,001$) після впливу ДНГ і на 23% ($P<0,05$) після її спільної дії з мелатоніном.

Весною ДНГ саногенного рівня у щурів лінії Вістар вірогідно підвищила концентрацію ефірів ХС на 68% ($P<0,00$), загальні ліпіди – на 13% ($P<0,05$) та знизилася вільний ХС на 48% ($P<0,01$) порівняно з контролем.

Спільна дія ДНГ із мелатоніном підвищила концентрації ефірів ХС та ТГ на 58% ($P<0,001$) та 62% ($P<0,05$) відповідно. У щурів лінії SHR вплив ДНГ знизив концентрацію ТГ на 49% ($P<0,001$), після її спільної дії з мелатоніном ФЛ – на 34% ($P<0,01$), вільного ХС на 74% ($P<0,05$), ТГ на 24% ($P<0,01$) та загальних ліпідів на 25% ($P<0,001$) порівняно з контрольними значеннями.

Отримані нами дані співпадають із результатами попередніх досліджень інших авторів, в яких розглядається стимулюючий вплив гірського повітря на стан КТ [32, 129]. ДНГ саногенного рівня та її спільна дія з мелатоніном сприяє підвищенню концентрації ліпідних фракцій у КТ щурів лінії Вістар в осінній та весняний періоди і, як наслідок, підвищує рівень її мінералізації. Ми спостерігали протилежний ефект впливу обох факторів у щурів лінії SHR. В осінній період відбувалося зростання майже всіх досліджуваних вільних амінокислот щурів обох ліній за впливу обох факторів. Весняний період відзначився, навпаки, зниженням концентрації більшості вільних АК як після впливу ДНГ, так і після її спільної дії з мелатоніном.

Ступінь проявів впливу ДНГ і його поєднаної дії з мелатоніном пов'язаний із сезонним періодизмом та рівнем артеріального тиску тварин. Узгодженість між процесами руйнування та формування КТ може мати різну сезонну активність, що залежить від сумарного впливу освітлення (тривалість світлового дня), яка визначає активність нічної секреції мелатоніну. Активуюча дія ДНГ саногенного рівня посилює чутливість рецепторів до мелатоніну, які існують на мембранах остеобластів та остеокластів. Гуморальна регуляція дозволяє підтримувати відносну стабільність процесів фізіологічного ремоделювання КТ не зважаючи на зміну температурних та світлових чинників зовнішнього середовища.

На основі результатів наших досліджень, стверджуємо, що сеанси ДНГ саногенного рівня та її спільна дія з мелатоніном активують остеобласти та остеокласти, що відповідають за процеси її ремоделювання в осінній період у щурів лінії Вістар. Такий вплив дозволяє зберігати збалансованість

функціональної активності остеобластів та остеокластів і не порушувати процеси фізіологічного ремоделювання КТ. Слід відмітити, що максимально стимулюючий ефект спостерігали при спільній дії ДНГ із мелатоніном.

Відомо, що за фізіологічних умов активність лізосомальних ферментів (КФ, ТРКФ), регулюються в межах необхідної резорбтивної діяльності остеокластів [1]. Якщо їх активність знижується, то у КТ щурів гальмується процес резорбції і, як наслідок, відбувається затримання подальшого утворення кістки. Вплив екзогенного мелатоніну, ДНГ саногенного рівня та їхня спільна дія на остеобласти та остеокласти порушує баланс формування та руйнування КТ у весняний період у обох досліджуваних ліній щурів. Особливо пригнічується їх активність у щурів лінії SHR. За цих самих умов експерименту, підвищення концентрації ГАГ свідчить про порушення впорядкованості та міцності бічних з'єднань колагенових волокон і уповільнення відкладання мінеральних речовин у КТ [157, 192].

Проведені нами експерименти показали, що в КТ більш виразні зміни складу вільних амінокислот відбулися за умов впливу екзогенного мелатоніну та його спільної дії із ДНГ саногенного рівня в осінній період. Аналіз ліпідних фракцій дозволив встановити, що їхні виражені зміни проявляються як при впливі ДНГ саногенного рівня, так і при її спільній дії з мелатоніном. Вважаємо, що зміни ліпідних компонентів КТ безпосередньо пов'язані з інтенсивністю обмінних процесів у ній.

Отримані значення показників ремоделювання КТ у щурів ліній Вістар та SHR у весняний період показали, що сеанси ДНГ саногенного рівня призвели до менш виразних змін показників ремоделювання КТ, ніж їх одночасна дія з мелатоніном. Вплив екзогенного мелатоніну та його спільна дія із ДНГ супроводжується вірогідними змінами досліджуваних показників, що відображає розбалансування процесів утворення та резорбції КТ. Така різниця в реакції може відбуватися на тлі весняного авітамінозу та виснаження імунної системи, а різкі зміни погодних умов додають негативного впливу, особливо для особин із підвищеним артеріальним

тиском. Саме це може бути наслідком виразних депресивних змін у ремоделюванні КТ щурів весною.

Наведені вище дані дають підстави стверджувати, що введення екзогенного мелатоніну стимулює фізіологічну регенерацію КТ у щурів ліній Вістар та SHR в осінній період. Аналогічно впливає застосування ДНГ саногенного рівня. Обидва чинники здатні забезпечувати збереження фізіологічного стану КТ у тварин. Проте, їх вплив у весняний період відрізняється тим, що змінюється динамічна рівновага між процесами формування та резорбції КТ. Отримані нами результати можуть мати не тільки теоретичне, а й практичне значення у збереженні та стимуляції процесів фізіологічного ремоделювання КТ в різні сезони року та у випадках нормального та підвищеного тиску крові.

Природні сезонні коливання умов існування тренують адаптивні механізми пристосування до змін тривалості світлового дня та температури середовища, що відображається на ремоделюванні КТ. Більшість змін зумовлені різницею тривалості світлового дня, а саме від цього залежить продукція мелатоніну шишковидною залозою (рис.4.4.2).



Рис.4.4.2. Механізми сезонних варіацій дії екзогенного мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини у щурів лінії Вістар та SHR

На фоні сезонних фізіологічних змін ремоделювання КТ, введення екзогенного мелатоніну восени у щурів лінії Вістар призводить до стимуляції фізіологічної регенерації кісткової тканини, а навесні –порушує динамічну рівновагу між процесами формування і резорбції кістки з переважанням останньої. Сезонні відмінності реакції КТ на введення екзогенного мелатоніну проявлялися в активації резорбції та формуванні нових елементів КТ у щурів лінії Вістар та не змінює показники ремоделювання КТ у SHR восени (рис.4.4.3).

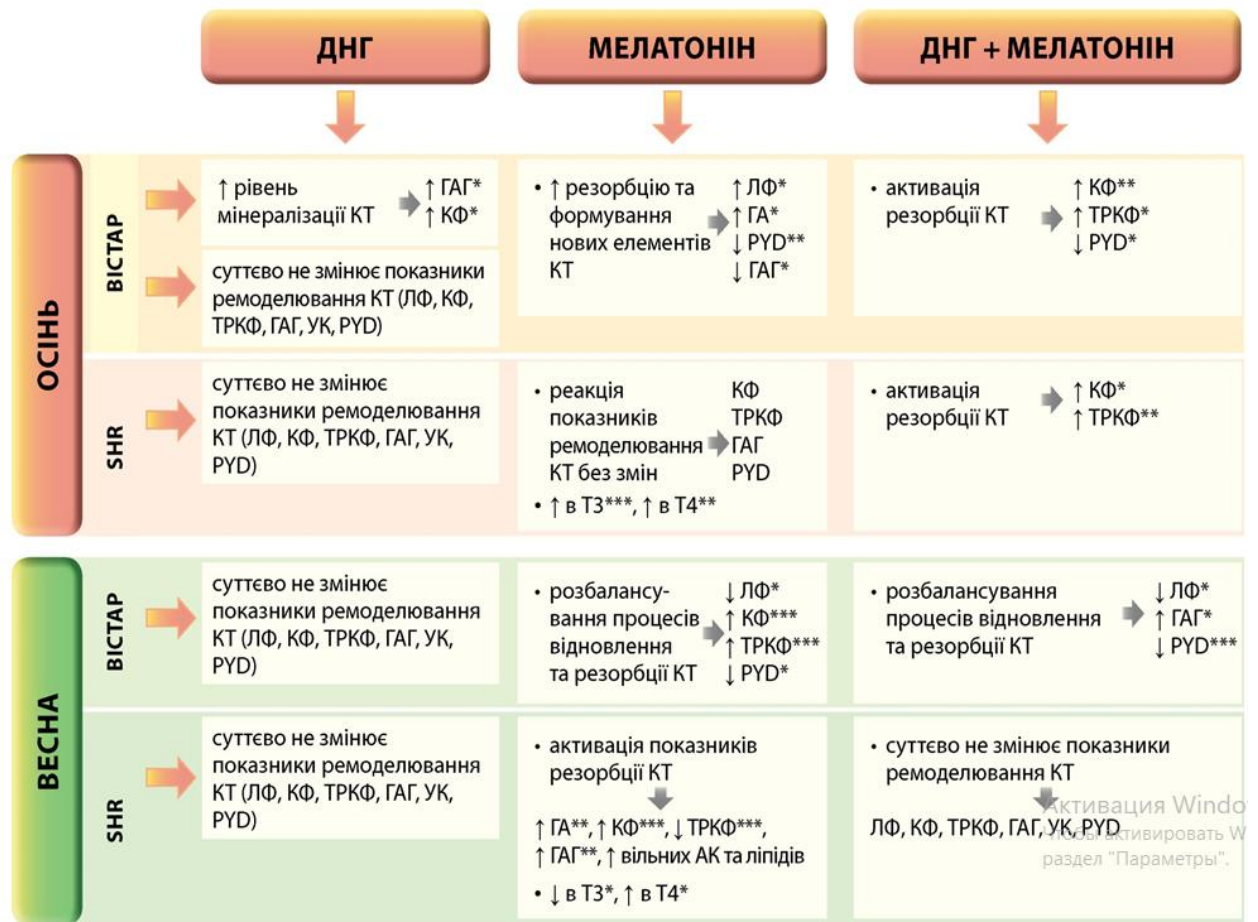


Рис.4.4.3. Сезонні відмінності реакції біохімічних показників кісткової тканини на екзогенний мелатонін та дозовану нормобаричну гіпоксію

Навесні, відбувається відносно розбалансування процесів відновлення та резорбції КТ у щурів обох ліній. ДНГ підвищувала рівень мінералізації КТ у щурів лінії Вістар восени та суттєво не змінювала показники ремоделювання КТ у SHR. Поєднаний вплив ДНГ та мелатоніну активував процеси резорбції в осінній період та призводив до розбалансування процесів самовідновлення у весняний період у щурів лінії Вістар. У SHR аналогічний вплив суттєво не змінює їхні показники.

Результати наших досліджень дають підстави вважати, що введення екзогенного мелатоніну стимулює фізіологічну регенерацію КТ у щурів ліній Вістар та SHR в осінній період. Аналогічно впливає застосування ДНГ саногенного рівня. Обидва чинники здатні забезпечувати збереження фізіологічного стану КТ у тварин обох ліній. Проте, їхній вплив у весняний

період ініціює порушення динамічної рівноваги між процесами формування та резорбції КТ у щурів. Отримані нами результати можуть мати не тільки теоретичне, а й практичне значення у збереженні та стимуляції процесів фізіологічного ремоделювання КТ в різні сезони року та у випадках нормального та підвищеного тиску крові.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено дані огляду наукової літератури та результати власних фізико-хімічних та імунохімічних методів дослідження щодо впливу екзогенного мелатоніну, сеансів дозованої нормобаричної гіпоксії саногенного рівня та їхньої спільної дії на показники ремоделювання кісткової тканини щурів ліній Вістар та SHR в осінній та весняний періоди.

1. В осінній період введення екзогенного мелатоніну (5 мг/кг) щурам лінії Вістар викликає підвищення гіалуронідазної активності та лужної фосфатази з одночасним зниженням концентрації піридиноліну та глікозаміногліканів. Це свідчить про підвищення активності як резорбції, так і формування нових елементів кісткової тканини. У весняний період за тих самих умов активність лужної фосфатази, концентрація піридиноліну знижувалися, а активність кислої фосфатази і тартратрезистентної кислої фосфатази підвищувалися. Це може свідчити про розбалансування процесів ремоделювання кісткової тканини.

2. Восени введення екзогенного мелатоніну у дозі 5 мг/кг маси тіла щурам лінії SHR характеризується низькою амплітудою реакцій більшості показників ремоделювання кісткової тканини, а саме кислої, тартратрезистентної кислої фосфатаз, піридиноліну та глікозаміногліканів. Натомість навесні вірогідно зростає концентрація глікозаміногліканів, вільних амінокислот і ліпідів, тобто активуються показники резорбції кісткової тканини.

3. В осінній період одночасна дія мелатоніну і дозованої нормобаричної гіпоксії саногенного рівня підвищує активність кислої і тартратрезистентної кислої фосфатази у обох ліній щурів, що свідчить про активацію резорбції кісткової тканини.

4. Восени дозована нормобарична гіпоксія та її поєднана дія з мелатоніном у щурів лінії Вістар підвищує концентрацію глікозаміногліканів та активність кислої та тартратрезистентної кислої фосфатаз, знижує концентрацію

піридинодіну, що може свідчити про зміни стану органічного матриксу кісткової тканини.

5. Виявлені сезонні зміни амінокислотного і ліпідного складу кісткової тканини. Навесні концентрація амінокислот, що безпосередньо беруть участь у синтезі колагену в кістковій тканині тварин лінії Вістар та SHR після впливу екзогенного мелатоніну зростали, що може свідчити про пригнічення синтезу колагену органічного матриксу кісткової тканини. Після впливу дозованої нормобаричної гіпоксії та її поєднаної дії з мелатоніном концентрація більшості досліджуваних нами вільних амінокислот у кістковій тканині щурів лінії Вістар знижувалася. Дозована нормобарична гіпоксія саногенного рівня та її спільна дія з мелатоніном підвищує концентрацію ліпідних фракцій у кістковій тканині щурів лінії Вістар в осінній та весняний періоди, тобто забезпечує можливість зростання мінеральної щільності.

6. Восени концентрація тироксину у щурів лінії Вістар і SHR підвищується після введення мелатоніну в дозі 5 мг/кг маси тіла. Навесні таке зростання відмічено лише у щурів лінії SHR. Водночас восени концентрація трийодтироніну підвищилася після введення мелатоніну (5 мг/кг) у щурів лінії Вістар та SHR. Навесні таке зростання відмічено у щурів лінії SHR. Це свідчить про істотність впливу сезонів року на активність щитоподібної залози та пов'язаних з її впливом процесів ремоделювання кісткової тканини.

7. Отримані дані дозволяють акцентувати увагу на сезонних змінах реактивності кісткової тканини та її залежності від артеріального тиску та активності щитовидної залози.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аврунин А.С. Лекции по остеологии. Многоуровневый характер структуры минерального матрикса и механизмы его формирования / А.С. Аврунин, Р.М. Тихилов, А.Б. Аболин и др. // Гений ортопедии. – 2005. – №2. – С.89-94.
2. Аврунин А.С. Старение костной ткани. Теоретическое обоснование новых путей оптимизации процесса механотрансдукции / А.С. Аврунин, Р.М. Тихилов, А.В. Климов // Морфология. – 2005. – Т.128, №5. – С.19-28.
3. Агаджанян Н.А. Горы и резистентность организма / Н.А. Агаджанян, М.М. Миррахимов // М.:Наука. - 1970. – 183 с.
4. Анисимов В.Н. Мелатонин роль в организме, применение в клинике / В.Н. Анисимов // СПб.: Издательство «Система», 2007. – 40 с.
5. Анисимов В.Н. Световой десинхроноз и риск злокачественных новообразований у человека:состояние проблемы / В.Н. Анисимов, И.А. Виноградова, А.В. Букалев, М.Ф.Борисенков, И.Г. Попович, М.А. Забежинский, А.В. Панченко, М.Л. Тындык, М.Н. Юрова // Вопросы онкологии. – 2013. – Т. 59, № 3. – 302-313 с.
6. Анисимов В.Н. Старение женской репродуктивной системы и мелатонин / В.Н. Анисимов, И.А. Виноградова. – СПб. Система, 2008. – 44 с.
7. Арушанян Э.Б. Гормон эпифиза мелатонин – новое ноотропное средство? / Э.Б. Арушанян // Экспериментальная и клиническая фармакология: двухмесячный научно-теоретический журнал. – 2005. Т. 68, №3. – С.74-79.
8. Арушанян Э.Б. Гормон эпифиза мелатонин и его лечебные возможности / Э.Б. Арушанян // Русский медицинский журнал. – 2005. – Т. 13, №26. – С. 1755-1760.

9. Астахова В.С. Клонування стромальних клітин – попередників кісткового мозку людини за умов зниженого парціального тиску / В.С. Астахова, В.Я. Березовський, А.Н. Панченко та ін. // Фізіологічний журнал. – 2001. – Т.47, №1 (част.2). – С. 40-44.
10. Барабашова З.И. Динамика повышения резистентности организма и адаптивных реакций на клеточном уровне в процессе адаптации к гипоксии / З.И. Барабашова // Успехи. физиол. наук. – 1970. – Т.1, №3. – С. 70-71.
11. Березовский В. А. Физиологические механизмы саногенных эффектов горного климата / В.А. Березовский, В.Г. Дейнега // Наукова думка. – 1988. – 224 с.
12. Березовский В.А. Аллопатический и гомеопатический принципы в лечении заболеваний, связанных с кислородным голоданием / В.А. Березовский // Молекулярные аспекты адаптации к гипоксии. – К.: Наук. думка. – 1979. – С. 224-231.
13. Березовский В.А. Цветок Гильгамеша. Природная и инструментальная оротерапия (очерки о горах и их влияния на организм человека) / В.А. Березовский // Донецк: Издатель Заславский А.Ю. – 2012. – 304 с.
14. Березовський В. Я. Вплив екзогенного мелатоніну на ліпідний та амінокислотний склад органічного матриксу кісткової тканини / В. Я. Березовський, І. Г. Літовка, С. П. Весельський, Т. М. Заморська, Р. В. Янко // Космічна наука і технологія. - 2012. - Т. 18. № 3. - С. 78–82.
15. Березовський В.А. Введение в оротерапию / В.А. Березовский, М.И. Левашов // Киев. – Академия проблем гипоксии. – 2000. – 76 с.
16. Березовський В.Я. Вплив екзогенного мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини / В.Я. Березовський, І.Г. Літовка, С.П. Весельський, Р.В. Янко, У.О. Жернокльов // Фізіол. журн. – 2015. – Т. 61, №3. – С.64-69.
17. Березовський В.Я. Вплив мелатоніну на процеси фізіологічної регенерації кісткової тканини молодих і дорослих щурів / Березовський

- В.Я., Літовка І.Г., Костюченко О.С., Янко Р.В. // Космічна наука і технологія. - 2008. – Т.14, №3. – С.75-81.
- 18.Березовський В.Я. Дозовані біофізичні впливи стабілізують маркери формування кісткової тканини при остеопенії розвантаження / В.Я. Березовський, І.Г. Літовка, О.С. Костюченко // Космічна наука і технологія. – 2005. – Т.11, №1/2. – С.93-97.
 - 19.Березовський В.Я. Дослідження стану паренхіми печінки щурів різних ліній після впливу екзогенного мелатоніну / В.Я. Березовський, Р.В. Янко, О.Г. Чака, І.Г. Літовка, М.І. Левашов // Вісник Запорізького національного університету - 2015. №1. – С.77-85.
 - 20.Березовський В.Я. Фізіологічна регенерація кісткової тканини за умов дозованої нормобаричної гіпоксії / В.Я. Березовський, І.Г. Літовка, О.С. Костюченко // Фізіол. журнал. – 2007. – Т.53, №6. – С.40-45.
 - 21.Богомолець О.О. Вибрані твори / О.О. Богомолець // К.: Наук. Думка. - 1969.– 422 с.
 - 22.Будко Г.Ю. Морфологічні особливості регенерації кісткової тканини в умовах гіпоксії та впливу загального опромінення і солей важких металів / Г.Ю. Будко. – Харків. – 2005. – 19 с.
 - 23.Булатова М.М. Среднегорье, высокогорье и искусственная гипоксия в системе подготовки спортсменов / М.М. Булатова, В.Н. Платонов // Спорт. медицина. – 2008. - №1. – С.95-115.
 - 24.Булатова М.М. Среднегорье, высокогорье и искусственная гипоксия в системе подготовки спортсменов // Спорт. медицина. – 2008. – №1. – С.95-119.
 - 25.Бур'янов О.А. Лекція для студентів медичних навчальних закладів України на тему: “Запальні захворювання системи руху та опори” / О.А.Бур'янов, Є.Т.Скляренко, О.І.Волошин та ін. // Літопис травматології та ортопедії. – 2014. – № 1-2. – С. 189-206.
 - 26.Вайда В. М. Вікові та статеві особливості мінеральної щільності кісткової тканини / В. М. Вайда, В. В. Поворознюк, Н. І. Дзерович //

- Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. - 2011. - Вип. 4. - С. 329-335.
- 27.Весельский С.П. Спосіб підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи / С.П. Весельский, П.С. Лященко, С.І. Костенко, З.А. Горенко, Л.Ф. Куровська // Деклараційний патент на винахід №33564А, 15.02.2001р. (Україна), заявлено 11.03.1999 р. – Бюл.№1, реєстрація 15.02.2001р.
 - 28.Волков Н.М. Физиология метаболизма костной ткани и механизмы развития метастазов в кости / Н.М. Волков // Практическая онкология. – 2011. – Т.12, №3. – С. 97-102.
 - 29.Воложин А.И. Изменение кальциевого и фосфорного обмена в костях и зубах при кислородном голодании / А.И. Воложин, Т.И. Ленецкая // Патол. физиология и эксперим. медицина. – 1970. – Т.14, №5. – С.16-20.
 - 30.Гавенаускас Б.Л. Вплив інтервального гіпоксичного тренування на показники адаптації щурів до гіпоксії навантаження / Б.Л. Гавенаускас, І.М. Маньковська, В.І. Носар та ін. // Фізіол. журн. – 2004. – Т.50, №6. – С.32-42.
 - 31.Григорьев А.И. Минеральный обмен у человека в условиях изменённой микрогравитации / А.И. Григорьев, А.И. Воложин, Г.П. Ступаков // Пробл. косм. биол. — М.: Наука. - 1994.—Т.74.—214 с.
 - 32.Гудушари О.Н. Гентологическое и гистохимическое изучение опорно-двигательного аппарата при общей гипоксии организма / О.Н. Гудушари // Сообщение АНССР. – 1981. – Т.103, №1. – С.193-195.
 - 33.Гук Ю. М. Ремоделювання кісткової тканини при недосконалому остеогенезі: з'ясовані і нез'ясовані питання та перспективи їх вирішення / Ю. М. Гук, О. М. Магомедов, А. М. Зима, Т. А. Кінча-Поліщук // Травма. - 2013. - Т. 14, № 6. - С. 32-38.
 - 34.Гюльназарова С.В. Возможности гипербарической оксигенации в коррекции сниженной минеральной плотности кости у больных с

- несращиванием переломов / С.В. Гюльназарова, А.Ю. Кучнев // Травматология и ортопедия России. – 2007. – Т.3, №45. – С.27-30.
35. Давидова Н.В. Особливості впливу мелатоніну на окремі біохімічні показники плазми крові щурів за умов алоксанового діабету // ВІСНИК ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». – 2016. - Том 16, Випуск 4 (56) частина 1 – С. 242-244.
36. Данильченко Л. І. Забезпеченість вітаміном D, маркери кісткового ремоделювання і механічна міцність кісткової тканини у жінок у постменопаузі / Л. І. Данильченко // Одеський медичний журнал. - 2015. - № 6. - С. 47-50.
37. Дедух Н. В. Костная ткань в норме и при остеопорозе: препараты кальция и витамина D (обзор литературы) / Н. В. Дедух, Е. А. Побел // Ортопедия, травматология и протезирование. - 2013. - № 3. – С. 92–98.
38. Дорогой А.П. Мелатонін – основний гормон передньої долі епіфізу (шишковидної залози). Біологічне і клінічне значення гормону в кардіологічній практиці / А.П. Дорогой // Український кардіологічний журнал. – 2006. - №1. – С. 99-105.
39. Загорська І.О. Метод морфометрії у вивченні структурно-функціонального стану кісткової тканини / І.О. Загорська // Вісник ортопедії, травматології та протезування. – 2002. – № 3. – С. 84-86.
40. Зацепин С.Т. Костная патология у взрослых: Руководство для врачей / С.Т. Зацепин // М.: Медицина. – 2001. – 640 с.
41. Зенина О.Ю. Хронофизиология и хронопатология сердечно-сосудистой системы (обзор литературы) / О.Ю. Зенина, И.И. Макарова, Ю.П. Игнатова, А.В. Аксенова // Экология человека. – 2017. - №01. – с. 25-33.
42. Ивантер Э.В. Адаптивные особенности мелких млекопитающих / Э.В. Ивантер, Т.В. Ивантер, И.Л. Туманов //Л. – 1985. – 318 с.
43. Игнатенко Г.А. Современные возможности адаптационной медицины / Г.А. Игнатенко // Здоров'я України. – 2008. - №11-12. – С.56-57.

44. Казначеева А.И. Содержание свободных аминокислот у практически здоровых лиц в плазме крови, эритроцитах и моче / А.И. Казначеева, Н.З. Злыднев // Лабораторное дело. – 1976. - №8. – С. 479-480.
45. Калабухов Н.И. Спячка млекопитающих / Н.И. Калабухов // М.: Наука. - 1985. – 269 с.
46. Камилов Ф.Х. Ремоделирование костной ткани при действии хлорпроизводных низкомолекулярных алифатических углеводов / Ф.Х. Камилов, Т.И. Ганеев, Е.Р. Фаршатова и др. // Медицинский вестник Башкортостана. – 2011. – Т. 6., вып. 2. – С. 305-309.
47. Кветной И.М. Экстрапинеальный мелатонин: место и роль в нейроэндокринной регуляции гомеостаза / И.М. Кветной, Н.Т. Райхлин, В.В. Южаков, И.Э. Ингель // БЭБиМ. - 1999. - Т.127, № 4. - С.364–370.
48. Кляцкин С.А. Определение гликозаминогликанов орциновым методом в крови больных / С.А. Кляцкин, Р.И. Лифшиц // Лабораторное дело. – 1989. – №10. – С.51-53.
49. Колчинская А.З. Кислород. Физическое состояние, работоспособность / А.З. Колчинская // К.: Наукова думка. – 1991. – 205 с.
50. Комісаренко Ю.І. Показники мінерального обміну та метаболічних маркерів у хворих з поєднаною ендокринною патологією на фоні дефіциту вітаміну D3 / Ю.І. Комісаренко // Лікар. справа. – 2013. - №4. – С. 51-55.
51. Коробейникова Э.М. Определение содержания свободных аминокислот в сыворотке крови и моче здоровых детей / Э.М. Коробейникова, Г.В. Мещерякова // Лабораторное дело. – 1981. - №4. – С. 221-224.
52. Кривошеков С.Г. Физиологические механизмы гипоксической стимуляции неспецифической резистентности организма / С.Г. Кривошеков // Матер. симпоз. с межд. участием «Актуальные проблемы адаптации к природным и экосоциальным условиям среды».- Ульяновск, 2002. —С.96-97.

- 53.Левченко О.О. Основні механізми ремоделювання кісткової тканини / О.О. Левченко // ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України», дерматологія та венерологія.- 2016. - № 2 (72) - С.5 – 12.
- 54.Леонтьев В.К. Биохимические методы исследования в кинической и экспериментальной стоматологии / В.К. Леонтьев, В.К. Петрович // Омск. - 1976. – 93 с.
- 55.Литовка И.Г. Дозированая гипоксия как фактор коррекции остепени бездействия / И.Г. Литовка // Космічна наука і технологія. – 2002. – Т.8, №4. – С.81-85.
- 56.Литовка И.Г. Органический матрикс в адаптации и ремоделировании костной ткани / И.Г. Литовка, В.А. Березовский – Донецк: Издатель Заславский А.Ю., 2014. – 256 с.
- 57.Літовка І.Г. Вплив мелатоніну на ліпіди кісткової тканини дорослих щурів / І.Г. Літовка, С.П. Весельський, В.Я. Березовський, Т.М. Заморська // Український морфологічний альманах. – 2010. - Том 8, №2. – С. 120-122.
- 58.Літовка І.Г. Кісткова тканина в умовах дефіциту навантаження: моногр. / І.Г. Літовка // К.:ДП «Інформаційно-аналітичне агентство». - 2011. – 243 с.
- 59.Літовка І.Г. Корекція змін стану кісткової тканини при дефіциті навантаження / І.Г. Літовка // Фізіол. Журн. – 2010. – Т.56, №3. – С.41-48.
- 60.Літовка І.Г. Ремоделювання кісткової тканини після впливу екзогенного мелатоніну / І.Г. Літовка, В.Я. Березовський, С.П. Весельський, У.О. Жернокльов // Фізіол. журн. – 2016. – Т. 62, №3. – С. 48-53.
- 61.Маев Э.З. Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты / Э.З. Маев, П.В. Козырев, Н.В. Виноградов и др. // М. - 2004. – С.569-578.

- 62.Марущак А. В. Зміни пероксидного окиснення ліпідів і стану антиоксидантного захисту в спонтанно-гіпертензивних щурів під час експериментального лікування раміприлом та кандесартаном / А. В. Марущак, Є. І. Шоріков, Д. В. Шорікова, І. Р. Тимофійчук, В. С. Гайдичук // Медична та клінічна хімія. - 2016. - Т. 18. № 1. – С.51-55.
- 63.Минченко Б.И. Биохимические показатели метаболических нарушений в костной ткани (часть 1) / Б.И. Минченко // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 1. – С. 8-15.
- 64.Минченко Б.И. Биохимические показатели метаболических нарушений в костной ткани (часть 2) / Б.И. Минченко // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 4. – С. 11-17.
- 65.Мірчук Б. М. Вплив ортодонтичного переміщення зубів на механізми ремоделювання кісткової тканини (огляд літератури) / Б. М. Мірчук, О. В. Суслова, А. Е. Деньга // Вісник стоматології. - 2011. - № 4. - С. 88-92.
- 66.Нетюхайло Л.Г. Метаболізм кісткової тканини в нормі та при патології (огляд літератури) / Л.Г.Нетюхайло, Л.К. Іщейкіна. // «Молодий вчений». – 2014. - № 6 (09). - С.152 – 158.
- 67.Ньюмен У. Минеральный обмен кости: Пер. с англ. Под ред. Проф. Н.И. Демина / У. Ньюмен, М. Ньюмен // М.: Изд-во «Иностранная литература». – 1961. – 270 с.
- 68.Пальцев М.А. Патологическая анатомия: в 2 т. / М.А. Пальцев, Н.М. Аничков // М.: Медицина. – 2001. – Т.2, ч. II. – 680 с.
- 69.Петровский В.И. Экстракция, разделение и количественное определение липидных фракций сыворотки крови / В.И. Петровский, Т.И. Регеранд, Е.И. Лизенко //Лаб. дело. – 1986. - №6. – С.339.
- 70.Плотнікова Л.М. Вплив зниженої концентрації кисню та сірководню на амінокислотний метаболізм і проліферацію мезенхімальних клітин / Л.М. Плотнікова, В.Я. Березовський, С.П. Весельський // Фізіологічний журнал. – 2015. – Т.61, №1. – С. 56-62.

71. Поворознюк В.В. Мінеральна щільність та якість кісткової тканини в чоловіків з ожирінням / Поворознюк В.В., Мусієнко А.С. // Міжнародний ендокринологічний журнал. – 2017. - Том 13, № 1. – С. 4-12.
72. Поворознюк В.В. Остеопроз у населення України: Роль вітаміну, кальцію та інших мікроелементів / В.В. Поворознюк, Н.В. Григор'єва, Н.І. Балацька // Медико-гідрогеохімічні чинники геологічного середовища України. – К: Видавничий дім «Букрек». 2015. – 77 с.
73. Прохончуков А.А. Гомеостаз костной ткани в норме и при экспериментальном воздействии / А.А. Прохончуков, Н.А. Жижина, Р.А. Тигранян // Пробл. косм. биол. — М.: Наука, 1984.—Т.49.—200 с.
74. Разсолов Н.А. Нормобарическая гипокситерапия / Н.А. Разсолов, А.Я. Чижов, Б.Г. Потиевский и др. // Методические рекомендации для авиационных врачей. – Москва. – 2002. – 19 с.
75. Риггз Л. Б. Остеопороз. Этиология, диагностика, лечение / Л. Б. Риггз, Ш. Мелтон // СПб.: ЗАО “Изд-во БИНОМ”. - 2000. – 560 с.
76. Родионова Н.В. Функциональная морфология клеток в остеогенезе / Н.В. Родионова. // К.: Наукова думка - 2006. – 204 с.
77. Романюк А.М. Реакція кісткової тканини на негативні впливи фізичних та хімічних факторів зовнішнього середовища / А.М. Романюк, О.М. Гортинська, Г.Ю. Будко // Вісник Сумського державного університету. Серія: Медицина. – 2002. – Т.14, №11. – С. 5-11.
78. Сазонтова Т.Г. Роль активных форм кислорода и редокс-сигнализации при адаптации к изменению содержания кислорода / Т.Г. Сазонтова, Н.А. Анчишкина, А.Г. Жукова и др. // Фізіол. журн. – 2008. – Т.54, №2. – С. 18-32.
79. Серебровська Т.В. Індивідуальні особливості адаптації людини до періодичної гіпоксії: пошук можливих генетичних механізмів / Т.В. Серебровська, О.В. Коркушко, В.Б. Шатило // Фізіол. журн. – 2007. – Т.53, №2. – С.16-17.

80. Сиротинин Н.Н. Горы и здоровье / Н.Н. Сиротинин // К.: Наук. думка, - 1974. – С.30.
81. Сиротинин Н.Н. О лечебном и профилактическом действии высокогорного климата / Н.Н. Сиротинин // Тр. конф. по высокогорью и холодовой травме. – 1964. – С.3-12.
82. Слоним А.Д. О физиологических механизмах адаптации человека к природным факторам среды / А.Д. Слоним // Новосибирск: Книга. – 1967. – 158 с.
83. Статинова Е.А. Роль эндогенных и экзогенных факторов в развитии остеопороза у детей (обзор литературы) / Е.А. Статинова, Р.Я. Омельченко, Л.С. Васковская, С.А. Сохин // Травма. – 2013. – Т. 14, № 5. – С. 89-93.
84. Стрелков Р.Б. Прерывистая нормобарическая гипоксия в профилактике, лечении и реабилитации / Р.Б. Стрелков, А.Я. Чижов // Уральский рабочий. - 2001. – 399 с.
85. Фаламаева О.В. Научные основы профилактики остеопороза в детском, подростковом, и юношеском возрасте на популяционном уровне / О. В. Фаламаева // Новосибирск. – 2008. – 22 с.
86. Чака Е.Г. Изменения биофизических свойств костной ткани после разгрузки и ограничения поступления кислорода // Дис.канд.биол.наук 03.00.02.-Киев, 2001.- 123 с.
87. Шараев П.Н. Определение гиалуронидазной активности в биологических жидкостях / П.Н. Шараев, Н.С. Стрелков, В.В. Гунчев, Л.Л. Сосулина // Клиническая лабораторная диагностика. – 1996. - №3. – С. 21-22.
88. Шевченко Ю.Л. Гипоксия. Адаптация, патогенез, клиника / Под общей редакцией Ю.Л. Шевченко // ООО «ЭЛБИ-СПб» - 2000. – 384 с.
89. Шостак Н.А. Остеопороз: настоящее и будущее / Н.А. Шостак // Клиницист. – 2006. - №3. – С.4-6.

- 90.Шуба Н.М. Остеопороз –актуальная проблема XXI века: современное представление о патогенезе и терапии / Н.М. Шуба // Укр. ревматол. журн. – 2008. – Т.32, №2. – С. 5-14.
- 91.Щуцька Г. В. Особливості ремоделювання кісткової тканини в умовах гіпокінетичного остеопорозу та політравми в есперименті / Г. В. Щуцька, А. А. Гудима, Р. М. Борис // Актуальні проблеми транспортної медицини: навколишнє середовище; професійне здоров'я; патологія. - 2013. - № 1. - С. 112-117.
- 92.Яким'юк Д.І. Сучасні уявлення про ріст, розвиток та формоутворення кісткового скелета людини / Д.І. Яким'юк, В.В. Кривецький, Б.Ю. Банул, І.В. Кривецький // Буковинський державний медичний університет – 2013. – Т.17, № 2 (66). – С.181-185.
93. Янко Р.В. Реакція щитоподібної залози спонтанно-гіпертензивних щурів на дію дозованої нормобаричної гіпоксії в осінній період / Р.В. Янко, В.Я. Березовський, У.О. Жернокльов, І.Г. Літовка // Проблеми ендокринної патології. – 2017. – №1. – С.80-86.
- 94.Abbas M. M. Biochemical changes in serum lipid fractions, calcium, magnesium and phosphorus levels in women with subclinical hypothyroidism / M. M. Abbas, A. H. Mahmoud, W. El-Desouky // Nature Sci. – 2013. – Vol. 11, № 5. – P. 113 – 118.
- 95.Acuna Castroviejo D. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases / D. Acuna Castroviejo, G. Escames, A. Carazo, J. Leon, H. Khaldy, R.J. Reiter // Curr. Top. Med. Chem. – 2002. – Vol. 2. – P. 133–151.
- 96.Agarwal N. Circannual testis and moult cycles persist under photoperiods that disrupt circadian activity and clock gene cycles in spotted munia / N. Agarwal, I. Mishra, R. Komal et al. // Journal of Experimental Biology. – 2017. – Vol. 220. – P. 4162-4168.

97. Arnett J.R. Hypoxia is a major stimulation of osteoclast formation and bone resorption / J.R. Arnett, D.C. Gibbons, I.C. Utting, I.R. Orriss // *J. Cell Physiol.* – 2003. – Vol.196. – P. 2-8.
98. Arora H. Melatonin as a pro-osteogenic agent in oral implantology: a systematic review of histomorphometric outcomes in animals and quality evaluation using ARRIVE guidelines / H. Arora, S. Ivanovski // *J Periodont Res.* – 2017. – Vol.52. – P. 151–1610.
99. Asher M.A Hyperoxia in vitro bone resorption / M.A. Asher, C.B. Sledge // *Clin Orthop Relat Res.* – 1968. – Vol.61. – P. 48-51.
100. Baltaci, A.K. Opposite effects of zinc and melatonin on thyroid hormones in rats / A.K. Baltaci, R. Mogulkoc, A. Kul, C.S. Bediz, A. Ugur // *Toxicology.* - 2004. – Vol. 195 (1). – P. 69–75.
101. Bassett J.H. Thyroid hormone receptor α mutation causes a severe and thyroxine-resistant skeletal dysplasia in female mice / Bassett J.H. A. Boyde, T. Zikmund, et al // *Endocrinology.* – 2014. – Vol. 155. – P. 3699–3712.
102. Bassett J.H. Thyroid status during skeletal development determines adult bone structure and mineralization / J.H. Bassett, K. Nordström, A. Boyde, et al. // *Mol Endocrinol.* – 2007. – Vol. 21. – P.1893–1904.
103. Bassett J.H. Role of Thyroid Hormones in Skeletal Development and Bone Maintenance / J.H. Bassett, G. R. Williams // *Endocrin. Rev.* - 2016.- Vol. 37 (2). - P. 135-87.
104. Berezovskii V.A. Low oxygen tension may defence the bone tissue from unloading simulated osteopenia / V.A. Berezovskii, I.G. Litovka, A.S. Kostyuchenko // *J. of Gravitational Physiology.* – 2004. – Vol.11, №2. – P.153-154
105. Bergh van den J.P. Assessment of individual fracture risk: FRAX and beyond / J.P. van den Bergh, T.A. van Geel, W.F. Lems, P.P. Geusens // *Current Osteoporosis Reports.* – 2010. – Vol. 8. – P. 131-137.
106. Bouxsein M. Bone quality: Where do we go from here? / M. Bouxsein // *Osteoporos. Int.* – 2003. – Vol. 14. – P. 118-127.

107. Boyle W.J. Osteoclast differentiation and activation. / W.J Boyle, W.S. Simonet, D.L. Lacey // *Nature*. – 2003. Vol. 423. – P. 337–42.
108. Burton B. Bone embrittlement and collagen modifications due to high-dose gamma-irradiation sterilization/ B. Burton et al. // *Bone*.- 2014. – Vol. 61. P. 71 – 81.
109. Cakmak H.A. The relationships between blood pressure, blood glucose, and bone mineral density in postmenopausal Turkish women / H.A. Cakmak, B.D. Cakmak, A.E. Yumru et al. // *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2015. – Vol.11. – P. 1641-1648.
110. Calvo J.R. The role of melatonin in the cells of the innate immunity: a review / J.R. Calvo, C. González-Yanes, M.D. Maldonado // *J Pineal Res*. – 2013Ю – Vol. 55(2). – P. 103-20.
111. Cardinali D. P. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives / D. P. Cardinali, M. G. Ladizesky, V. Boggio, R. A. Cutrera, C. Mautalen // *J. of Pineal Research*. - 2003. - Vol.34, №2. – P.81–87.
112. Cardoso L. F. The multiple effects of thyroid disorders on bone and mineral metabolism / L. F. Cardoso, L. M. Maciel, F. J. de Paula // *Arq. Bras. Endocrinol. Metab*. – 2014. – Vol. 58, № 5. – P. 452 – 463.
113. Cardoso L.F. The multiple effects of thyroid disorders on bone and mineral metabolism / L. F. Cardoso, L.M. Z. Maciel, F. J. A.de Paula // *Arq Bras Endocrinol Metab*. – 2014. - Vol.58 №5.
114. Celik I.H. A common problem for neonatal intensive care units: late preterm infants, a prospective study with term controls in a large perinatal center / I.H. Celik, G. Demirel, F.E. Canpolat, U. Dilmen // *J Matern Fetal Neonatal Med*. – 2013. – Vol. 26. – P. 459–62.
115. Clafshenkel W.P. A novel calcium aluminate-melatonin scaffold enhances bone regeneration within a calvarial defect / W.P. Clafshenkel, J.L. Rutkowski, R.N. Palchesko, et al. // *J Pineal Res*. – 2012. – Vol. 53. P. 206- 218.

116. Clafshenkel W.P. A novel calcium aluminate-melatonin scaffold enhances bone regeneration within a calvarial defect / W.P. Clafshenkel, J.L. Rutkowski, R.N. Palchesko, et al. // *J Pineal Res.* – 2012. – Vol. 53. – P. 206- 218.
117. Colleen W. Oxygen-sensing PHDs regulate bone homeostasis through the modulation of osteoprotegerin / W. Colleen, E.B. Rankin, L. Castellini // *Genes Dev.* - 2015. – Vol. 29(8). – P. 817–831.
118. Conconi S. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells / S. Conconi, E. Hertens, K. Skwarlo-Sonta, M. Markowska, G.J.M. Maestroni // *J.of Pineal Research.* –2000.– Vol.28, №4. –P.193–202.
119. Cutando A. A new perspective in Oral health: Potential importance and actions of melatonin receptors MT1, MT2, MT3, and RZR/ROR in the oral cavity / A. Cutando, J. Aneiros-Fernandez, A. Lopez-Valverde, S. Arias-Santiago, J. Aneiros-Cachaza, R.J. Reiter // *Arch. Oral Biol.* – 2011. – Vol. 56. – P. 944–950.
120. Cutando A. Effect of gingival application of melatonin on alkaline and acid phosphatase, osteopontin and osteocalcin in patients with diabetes and periodontal disease / A. Cutando, A. López-Valverde, R. Gómez-de-Diego, S. Arias-Santiago, J. de Vicente-Jiménez // *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* – 2013. – Vol.18 (4). – P. 657-63.
121. Cutando A. Melatonin: potential functions in the oral cavity / A. Cutando, G. Gómez-Moreno, C. Arana, D. Acuña-Castroviejo, R.J. Reiter // *J Periodontol.* – 2007 – Vol.78, №6. – P.1094-1102.
122. Dam T.T. Bone mineral density and fractures in older men with chronic obstructive pulmonary disease or asthma / T.T. Dam, S. Harrison, H.A. Fink et al. // *Osteoporosis International.* – 2010. – Vol. 21. – P. 1341-1349.
123. Dandajena T.C. Hypoxia triggers a HIF-mediated differentiation of peripheral blood mononuclear cells into osteoclasts / T.C. Dandajena, M.A.

- Ihnat, B. Disch, J. Thorpe, G.F. Currier // *Orthod Craniofac Res.* – 2012. – Vol. 1, №1Ю – P. 1–9.
124. De Vries F. Fracture risk with intermittent high-dose oral glucocorticoid therapy / De Vries F., M. Bracke, H.G. Leufkens, et al. // *Arthritis Rheum.* – 2007. – Vol. 56, №. 1. – P. 208-214.
 125. Desjardin C. Chondrocytes play a major role in the stimulation of bone growth by thyroid hormone / C. Desjardin, C. Charles, C. Benoist-Lasselín, et al. // *Endocrinology.* – 2014. – Vol. 155. – P. 3123–3135.
 126. Dodd J. S. Osteocyte hypoxia: a novel mechanotransduction pathway // J.S. Dodd, J.A. Raleigh, T.S. Gross // *Amer. J. Physiol.* – 1999. – Vol. 277, №3. – P. 958-602.
 127. Dominguez-Rodriguez A. Melatonin and circadian biology in human cardiovascular disease / A. Dominguez-Rodriguez, P. Abreu-Gonzalez, J.J. Sanchez-Sanchez, J.C. Kaski, R.J. Reiter // *J. Pineal Res.* – 2010. – Vol. 49. – P. 14–22.
 128. Duncan J.H. Role of thyroid hormones in skeletal development and bone maintenance / J. H. Duncan, Bassett and Graham R. Williams // *Endocr Rev.* - 2016. – Vol. 37(2). P. 135–187.
 129. Durand M. In vivo hypobaric hypoxia performed during the remodeling process accelerates bone healing in mice / M. Durand, J. Collombet, S. Frasca, L. Begot, J. Lataillade, M. Le Bousse-Kerdilès, X. Holy // *Stem Cells Transl Med.* – 2014. – Vol. 3(8). – P. 958–968.
 130. Egermann M. Pinealectomy affects bone mineral density and structure - an experimental study in sheep / M. Egermann, C. Gerhardt, A. Barth, G.J. Maestroni, E. Schneider, M. Alini // *BMC Musculoskelet Disord.* –2011. – Vol.24, №12. – P.271-280.
 131. Egermann M. Pinealectomy affects bone mineral density and structure - an experimental study in sheep / M. Egermann, C. Gerhardt, A. Barth, G. J Maestroni, E. Schneider, M. Alini // *BMC Musculoskeletal Disorders.* – 2011. – Vol. 12 (271). –P. 1-9.

132. Emet M. A review of melatonin, its receptors and drugs / M. Emet, H. Ozcan, L. Ozel, M. Yayla, Z. Halici, A. Hacimuftuoglu // *Eurasian J. Med.* – 2016. – Vol. 48. – P. 135–141.
133. Ernst M. Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-I, and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cell form calvariae and long bones / M. Ernst, J.K. Heath, G.A. Rodan // *Endocrinology.* – 1989. – V.152, №2. – P.825-833.
134. Fan L. The hypoxia-inducible factor pathway, prolyl hydroxylase domain protein inhibitors, and their roles in bone repair and regeneration / L. Fan, J. Li, Z. Yu, X. Dang, K. Wang // *BioMed Research International.* – 2014. – P. 239356.
135. Feng X. Disorders of bone remodeling / X. Feng, J.M. McDonald // *Annual review of pathology.* – 2011. – Vol.6. – P. 121-145. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130203.
136. Fidan N. Bone mineral density and biochemical markers of bone metabolism in predialysis patients with chronic kidney disease / N. Fidan, A. Inci, M. Coban et al. // *J. Investig. Med.* – 2016. – Vol. 64, № 4. – P. 861-866.
137. Fraser J. H. E. Hydrogen peroxide, but not superoxide, stimulate bone resorption in mouse calvariae / J. H. E. Fraser, M. H. Helfrich, H. M. Wallace, S. H. Ralston // *Bone* - 1996. - Vol.19, №3. – P. 223–226.
138. Fuwu W. Cytoprotective effect of melatonin against hypoxia/serum deprivation-induced cell death of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro / W. Fuwu, Z. Huaiyu, D. Zhaoxia et. all. // *European Journal of Pharmacology.* – 2015. – Vol.748, №5. – P. 157-165.
139. Gallagher J. C. Molecular biology of bone remodeling: implications for new therapeutic targets for osteoporosis / J. Chris Gallagher and A. J. Sai Creighton // *University Medical Center, Bone Metabolism Unit.* – 2011. – Vol. 65(4). – P. 301–307.

140. Gohel M. G. A study of serum calcium, magnesium and phosphorous level in hypothyroidism patients / M. G. Gohel, A. M. Shah, A. M. Shah et al. // *Int. J. Med. Health Sci.* – 2014. – Vol. 3, № 4. – P. 308 – 312.
141. Goldhaber P. The effect of hyperoxia on bone resorption in tissue culture / P. Goldhaber // *AMA Arch Pathol.* – 1958. – Vol. 66, №5. – P. 635-41.
142. Gomez-Moreno G. Melatonin in diseases of the oral cavity / G. Gomez-Moreno , J. Guardia, M.J. Ferrera, A. Cutando, R.J. Reiter // *Oral Dis.* – 2010. – Vol. 16. – P. 242–247.
143. Graham R. Williams. Actions of thyroid hormones in bone / Graham R. Williams // *Polish Journal of Endocrinology.* – 2009. – Vol. 60, № 5. – P.
144. Graham R. Williams. Thyroid hormone actions in cartilage and bone / R. Graham // *Eur Thyroid J.* – 2013. – Vol. 2(1). – P. 3–13.
145. Gray D.H. The effect of varying oxygen tensions on hydroxyproline synthesis in mouse calvaria in vitro / D.H. Gray, J.M. Katz, K.S. Speak // *Clin Orthop Relat Res.* – 1980. – Vol. 146. – P. 276-81.
146. Greenspan S.L. The effect of thyroid hormone on skeletal integrity / S.L. Greenspan, F.S. Greenspan // *Ann Intern Med.* – 1999. – Vol. 30. – P. 750-758.
147. Gwinner E. Circannual rythms: endogenous annual clocks in the organisation of seasonal processes / E. Gwinner // *Zoophysiology.* – 1984. - - Vol. 18. - P.152.
148. Hakanson D. O. Calcemic responses to photic and pharmacologic manipulation of serum melatonin / D. O. Hakanson, R. Penny, W. H. Bergstrom // *Pediatric Research.* – 1987. -Vol.22, №4. – P.414–416.
149. Hakanson D. O. Phototherapyinduced hypocalcemia in new born rats: prevention by melatonin / D. O. Hakanson, W. H. Bergstrom // *Science.* – 1981. – Vol.214, № 4522. – P. 807–809.

150. Han Y. Melatonin promotes osteoblast differentiation by regulating Osterix protein stability and expression / Y. Han, Y.M. Kim, H.S. Kim, K.Y. Lee // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7(1). – P. 5716.
151. Harada K. Polyphosphate-mediated inhibition of tartrate-resistant acid phosphatase and suppression of bone resorption of osteoclasts / K. Harada, H. Itoh, Y. Kawazoe, et al // *Heymann.* – 2013. – Vol. 8, №11. – P. 78612.
152. Hoffmann B.R. Vascular endothelial growth factor-A signaling in bone marrow-derived endothelial progenitor cells exposed to hypoxic stress / B.R. Hoffmann, J.R. Wagner, A.R. Prisco, A. Janiak, A.S. Greene // *Physiological Genomics.* – 2013. – Vol. 45(21). – P.1021-1034.
153. Hu K. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair / K. Hu, B.R. Olsen. *The Journal of Clinical Investigation.* – 2016. –Vol. 126(2). P. 509-526.
154. Ipach I. The influence of ibandronate treatment on bone density and biochemical bone markers in patients with osteogenesis imperfecta / I. Ipach, T. Kluba, P. Wolf, B. Pontz, F. Mittag // *Orthopedic Reviews.* – 2012. – Vol. 4, №3. – P. 29.
155. Karasek M. Melatonin, human aging, and age-related diseases / M. Karasek // *Experimental Gerontology.* - 2004. - Vol.39, № 11-12. – P.1723–1729.
156. Kim G. Transient intermittent hypoxia exposure disrupts neonatal bone strength / G. Kim, O. Elnabawi, D. Shin D, E.K. Pae // *Front. Pediatr.* – 2016. – Vol. 4. – P. 15.
157. Kim H. J. Suppression of osteoclastogenesis by melatonin: a melatonin receptor-independent action/ H. J. Kim // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18(6). – P. 1142.
158. Knowles H. J. Hypoxic regulation of osteoclast differentiation and bone resorption activity / H. J. Knowles // *Hypoxia.* – 2015. – Vol. 3. – P.73-82.

159. Kochetov A.G. Statistical methods of medical data / A.G. Kochetov, O.V. Liang, V.P. Masenko, et al. // RKNPK. - 2012. - 42 p.
160. Kono H. Mechanism of osteoporosis in adolescent idiopathic scoliosis: experimental scoliosis in pinealectomized chickens / H. Kono, M. Machida, M. Saito, Y. Nishiwaki, H. Kato, N. Hosogane, K. Chiba, T. Miyamoto, M. Matsumoto, Y. Toyama // J Pineal Res. 2011. – Vol.51, №4. – P.387-393.
161. Kononenko N. The study of the circannual relationship between the activity of the epiphysis and gonads in rats of different sex and age / N. Kononenko, V. Hnatiuk // Malaysian J Pathol. - 2017. – V.39, №1. – P. 39 – 45.
162. Kotlarczyk M.P. Melatonin osteoporosis prevention study (MOPS): A randomized, double-blind, placebo-controlled study examining the effects of melatonin on bone health and quality of life in perimenopausal women / M.P. Kotlarczyk; H.C. Lassila, C.K. O’Neil; F. D’Amico, L.T. Enderby; P.A. Witt-Enderby; J.L. Balk // J. Pineal Res. – 2012. – Vol. 52. – P. 414–426.
163. Koyama H. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation / H. Koyama, O. Nakade, Y. Takada, T. Kaku, K.H. Lau // J. Bone Miner. Res. – 2002. – Vol. 17. – P. 1219–1229.
164. Kramer I. Osteocyte Wnt/ β -catenin signaling is required for normal bone homeostasis / I. Kramer, Ch. Halleux, H. Keller // Molecular and Cellular Biology. – 2010. – Vol. 30, № 12. – P. 3071-3085.
165. Krane S. M. Genetic control of bone remodeling—insights from a rare disease / S. M. Krane // New England Journal of Medicine. - 2002. - Vol.347, № 3. – P.210–212.
166. Kular J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level / J. Kular, J. Tickner, S.M. Chim, J. Xu // Clin. Biochem. – 2012. – Vol. 45. – P. 863–873.

167. Kuma Y. Impairment of nasal airway under intermittent hypoxia during growth period in rats / Y. Kuma, R. Usumi-Fujita, J. Hosomichi, S. Oishi, H. Maeda, H. Nagai, et al. // Arch. Oral Biol. – 2014. – Vol. 59. – P. 1139–1145.
168. Ladizesky M.G. Melatonin effect on bone metabolism in rats treated with methylprednisolone / M.G. Ladizesky, V. Boggio, R.A. Cutrera, N. Mondelo, S. Mastaglia, J. Somoza, D.P. Cardinali // J. Pineal Res. – 2006. – Vol. 40. – P. 297–304.
169. Langdahl B. Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis / B. Langdahl, S. Ferrari, D.W. Dempster // Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease. – 2016. – Vol. 8, №6. – P. 225-235.
170. Lei X.I. Intermittent Hypoxia and Human Diseases / X.I. Lei, T.V. Serebrovskaya (Ed.) // Springer-Verlag London. - 2012. – 316 p.
171. Leon J. Melatonin and mitochondrial function/ J. Leon, D. Acuna-Castroviejo, R.M. Sainz, J.C. Mayo, D.X. Tan, R.J. Reiter // Life Sci. – 2004. – Vol. 75. – P. 765–790.
172. Lian C. Melatonin reversed tumor necrosis factor-alpha-inhibited osteogenesis of human mesenchymal stem cells by stabilizing SMAD1 protein / C. Lian, Z. Wu, B. Gao, et al // J Pineal Res. – 2016. – Vol. 61. – P. 317- 327.
173. Lippuner K. The future of osteoporosis treatment – a research update / K. Lippuner // Swiss Medical Weekly. – 2012. – Vol. 142, №13624. - P. 1 – 11.
174. Lissoni P. Clinical results with the pineal hormone melatonin in advanced cancer resistant to standard antitumor therapies / P. Lissoni, S. Barni, G. Cattaneo // Oncology. – 1991.– Vol.48, №6. – P.448–450.
175. Liu J. Melatonin effects on hard tissues: bone and tooth / J. Liu, F. Huang, H. He // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – Vol. 14. – P. 10063-10074.

176. Liu X. Melatonin mediates protective effects on inflammatory response induced by interleukin-1 beta in human mesenchymal stem cell / X. Liu, Y. Gong, Xiong K., Y. Ye, Y. Xiong, Z. Zhuang, Y. Luo, Q. Jiang, F. He // J. Pineal Res. – 2013. – Vol.54, №1. – P.67-72.
177. Lombardi G. Circannual rhythm of plasmatic vitamin D levels and the association with markers of psychophysical stress in a cohort of Italian professional soccer players / G. Lombardi, J. A. Vitale, S. Logoluso, G. Logoluso, N. Cocco, G. Cocco, G. Banfi // Chronobiology International. - 2017. - Vol. 34 (4). – P.10-15.
178. Lopez-Martinez F. Melatonin: bone metabolism in oral cavity / F. Lopez-Martinez , P.N. Olivares Ponce, M. Guerra Rodriguez, R. Martinez Pedraza // Int. J. Dent. – 2012. – Vol. 2012. – P. 628406:1–628406:5.
179. Machida M. Experimental scoliosis in melatonin-deficient C57BL/6J mice without pinealectomy / M. Machida, J. Dubousset, T. Yamada // J. of Pineal Research. - 2006. - Vol.41, №1. – P.1-7.
180. Maeda H. Intermittent-hypoxia induced autophagy attenuates contractile dysfunction and myocardial injury in rat heart / H. Maeda, H. Nagai, G. Takemura, et al. // Biochim. Biophys. Acta. – 2013. – Vol. 1832(8). – P. 1159-66.
181. Maes C. Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease / C. Maes, G. Carmeliet, E. Schipani// Nat. Rev. Rheumatol. 2012. – Vol. 8. – P. 358–366.
182. Magri F. Qualitative and quantitative changes of melatonin levels in physiological and pathological aging and in centenarians / F. Magri, S. Sarra, W. Cinchetti //J. of Pineal Research. - 2004. - Vol.36, №4. – P.256–261.
183. Malik I. Effect of hypothyroid state on bone metabolism and renal handling of biochemical parameters / I. Malik, A. Sachdeva, V. S. Ghalaut et al. // Sch. Acad. J. Biosci. – 2015. – Vol. 3, № 2. – P. 120 – 123.

184. Mamalis A. A. The therapeutic potential of oxygen tension manipulation via hypoxia inducible factors and mimicking agents in guided bone regeneration / A. A. Mamalis, D. L., A. Cochran / Arch. Oral. Biol. – 2011. – Vol. 56. – P. 1466–1475.
185. Man G.C. Abnormal melatonin receptor 1B expression in osteoblasts from girls with adolescent idiopathic scoliosis / G.C. Man, J.H. Wong, W.W. Wang, G.Q. Sun // J. Pineal Res. – 2011. – Vol.50, №4. – P.395-402.
186. Manchester L.C. Melatonin: An ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable / L.C. Manchester, A. Coto-Montes, J.A. Boga, L.P. Andersen, Z. Zhou, A. Galano, J. Vriend, D.X. Tan, R.J. Reiter // J. Pineal Res. – 2015. – Vol. 59. – P. 403–419.
187. Manolagas S. C. Steroids and osteoporosis: the quest of mechanisms / C. Manolagas Stavros // J. Clin. Invest. – 2013. Vol. 123, №5. – P. 1919-1921.
188. Manolagas S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis / S.C. Manolagas // Endocr Rev. – 2000. - V. 21. – P.115–137.
189. Marenzana M. The key role of the blood supply to bone / M. Marenzana, T.R. Arnett // Bone Research. 2013. – Vol. 1, №3. – P. 203-215.
190. Montesi M. Hypoxia mediates osteocyte ORP150 expression and cell death in vitro / M. Montesi, K. Jähn, L. Bonewald, S. Stea et al. // Molecular Medicine Reports. – 2016. – Vol. 14. – P. 4248-4254.
191. Mukherjee K. Combined Bone Ingrowth and Remodelling around Uncemented Acetabular Component: a Multiscale Mechanobiology based Finite Element Analysis / K. Mukherjee , S. Gupta // ASME. J Biomech Eng. – 2017. – Vol. 139(9). - doi:10.1115/1.4037223
192. Muzylak M. Hypoxia induces giant osteoclast formation and extensive bone resorption in the cat / M. Muzylak, J. Price, M. Horton // Calcif Tissue Int. – 2006. – Vol.79, №5. – P. 301-309.

193. Nagai H. Pulmonary macrophages attenuate hypoxic pulmonary vasoconstriction via β 3AR/iNOS pathway in rats exposed to chronic intermittent hypoxia // H. Nagai, I. Kuwahira, D.O. Schwenke et al. // Shirai MPLoS One. – 2015. – Vol. 10(7). – P. 0131923.
194. Nakade O. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro / O. Nakade, H. Koyama, A. Arijima, T. Kaku // J Pineal Res. – 1999. – Vol. 27, №2/ - P. 106–110.
195. Neubauer J. A. Invited review: physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia / J.A. Neubauer // Journal of Applied Physiology. - 2001. – Vol. 90, №4. - P. 1593-1599.
196. Noble B.S. The osteocyte lineage / B. S. Noble // Arch Biochem Biophys. – 2008. – Vol. 473. – P. 106–11.
197. O'Brien E.C. Season and vitamin D status are independently associated with glucose homeostasis in pregnancy / E.C. O'Brien, E.J. O'Sullivan et al. // Nutrition & Metabolism. – 2017. – Vol. 14. – P. 50.
198. Oishi S. Intermittent hypoxia influences alveolar bone proper microstructure via hypoxia-inducible factor and VEGF expression in periodontal ligaments of growing rats / S. Oishi, Y. Shimizu, J. Hosomichi, Y. Kuma, et al. // Front Physiol. – 2016. – Vol. 7. – P. 416.
199. Ojanen X. Tissue viscoelasticity is related to tissue composition but may not fully predict the apparent-level viscoelasticity in human trabecular bone – an experimental and finite element study / X. Ojanen et al. // Journal of Biomechanics. – 2017. – Vol. 65. – P. 96–105.
200. Opie L.H. Melatonin has multiorgan effects / L.H. Opie; S. Lecour // Eur. Heart J. Cardiovasc. Pharmacother. - 2016. – Vol. 2. – P. 258–265.
201. Ostrowska Z. Influence of lighting conditions on daily rhythm of bone metabolism in rats and possible involvement of melatonin and other hormones in this process / Z. Ostrowska, B. Kos-Kudla, B. Marek, D. Kajdaniuk // Endocrine Regulations. – 2003. – V. 37. – P. 163-174.

202. Ostrowska Z. Melatonin and bone status / Z. Ostrowska, K. Wolkowska-Pokrywa, B. Kos-Kudla et al. // *Pol. Mercur. Lekarski*. – 2006. – V. 21, №124. – P. 389-393.
203. Ostrowska Z. The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham-operated and pinealectomized rats / Z. Ostrowska; B. Kos-Kudla; M. Nowak, E. Swietochowska; B. Marek; J. Gorski; D. Kajdaniuk, K. Wolkowska // *Endocr. Regul.* – 2003. – Vol. 37. – P. 211–224.
204. Ostrowska Z. The relationship between the daily profile of chosen biochemical markers of bone metabolism and melatonin and other hormones secretion in rats under physiological conditions / Z. Ostrowska, K. Kos-Kudla, B. Marek et al. // *Neuroendocrinol. Lett.* – 2002. – Vol. 23, №5– 6. – P.417– 425.
205. Oyama J. Bipedal ambulation induces experimental scoliosis in C57BL/6J mice with reduced plasma and pineal melatonin levels / J. Oyama, I. Murai, K. Kanazawa, M. Machida // *J. of Pineal Research*. - 2006. - Vol.40, №3. – P.219–224.
206. Palacios S. Impact of osteoporosis and bone fracture on health-related quality of life in postmenopausal women / S. Palacios, J.L. Neyrob, Fernández de Caboc S. et al. // *Climacteric*. – 2014. – Vol. 17, Iss. 1. – P. 60-70.
207. Parhami F. Role of lipids in osteoporosis / F. Parhami, A. Garfinkel, L. Demer // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – Vol. 20, №11. – P. 2346-2348.
208. Park K.H. Melatonin promotes osteoblastic differentiation through the BMP/ ERK/Wnt signaling pathways / K.H. Park, J.W. Kang, E.M. J.S. Lee, Kim, Y.H. Rhee, M. Kim, et al. // *J Pineal Res.* – 2011. – Vol. 51. – P. 187-94.

209. Park T. J. Fructose-driven glycolysis supports anoxia resistance in the naked mole-rat / T. J. Park, J. Reznick, L. Bethany et al. // *Science*. – 2017. – Vol. 356, Is. 6335. – P. 307-311.
210. Patnirapond S. Molecular regulation of bone resorption by hypoxia / S. Patnirapond, P. Hauschika // *OJHMS*. – 2007. – Vol.9. – P.72-75.
211. Paula A. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms / A. Paula, P. Witt-Bennett, J. Bennett et al. // *Life Sciences*. – 2003. – Vol. 72. – P. 2183-2198.
212. Penarrocha D. M. Implantologia oral / D. M. Penarrocha, M.J. Oltra Moscardo, J.M. Sanchis Bielsa // *Ars Medica*. - 2005. – P.3–17.
213. Peng J. Dimethyloxalylglycine prevents bone loss in ovariectomized C57BL/6J mice through enhanced angiogenesis and osteogenesis / J. Peng, Z. G. Lai, Z. L. Fang, S. Xing, K. Hui, C. Hao, et al. // *PLoS ONE*. - 2014. – Vol. 9(11). – P.112744.
214. Permuy M. Melatonin: a review of its potential functions and effects on dental diseases // M. Permuy, M. López-Peña et al. // *Int. J. Mol. Sci*. – 2017. – Vol. 18. – P. 865.
215. Prashanjit L. Effect of exogenous melatonin on thyroxine (T4), thyrotropin (TSH) hormone levels and expression patterns of melatonin receptor (MT1 and MT2) proteins on thyroid gland during different age groups of male and female Swiss albino / L. Prashanjit, A. Samik, S. Shankar // *Mice. Adv. Biores.* – 2015. - Vol 6 (1). – P. 7-14.
216. Quignodon L. A point mutation in the activation function 2 domain of thyroid hormone receptor $\alpha 1$ expressed after CRE-mediated recombination partially recapitulates hypothyroidism / L. Quignodon, S. Vincent, H. Winter, J. Samarut, F. Flamant // *Mol Endocrinol*. – 2007. – Vol. 21. – P. 2350–2360.
217. Radio N.M. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling

- cascade / N.M. Radio, P.A. Witt-Enderby // J. Pineal Res. – 2006. – Vol. 40. – P. 332–342.
218. Reiter R. J. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence / R. J. Reiter, D.-X. Tan, L. C. Manchester, W. Qi // Cell Biochemistry and Biophysics. - 2001. - Vol.34, №2. – P.237–256.
219. Reiter R. J. Reducing oxidative/nitrosative stress: a new discovered genre for melatonin / R. J. Reiter, S. D. Paredes, L. C. Manchester, D. X. Tan // Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. - 2009. - Vol. 44, №2. – P.175–200.
220. Roach R.C. Hypoxia. From genes to the bedside / R.C. Roach, P.D. Wagner, P.N. Hochett // Springer. – 2002. – 462 p.
221. Roth JA. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation / J.A. Roth, B.G. Kim, W.L. Lin, M. Cho // J Biol Chem. – 1999. – Vol. 274 (31) - P. 22041–47.
222. Russell R. G. The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action / R. G. Russell, M.J. Rogers, J.C. Frith et al. // J. Bone Miner. Res. – 1999. – Vol.14 (Suppl.2). – P. 53-65.
223. Saad F. Biochemical markers of bone turnover and clinical outcomes in men with prostate cancer / F. Saad, J.A. Eastham, M.R. Smith // Urologic Oncology. – 2012. – Vol.30, №4. – P. 369-378.
224. Sanchez-Barcelo E.J. Scientific basis for the potential use of melatonin in bone disease: osteoporosis and adolescent idiopathic scoliosis / E.J. Sanchez-Barcelo, M.D. Mediavilla, D.X. Tan, R.J. Reiter // J. of Osteoporosis. – 2010. – V.2010, №1. – P. 10.
225. Sanchez-Hidalgo M. Melatonin inhibits fatty acid-induced triglyceride accumulation in ROS17/2.8 cells: implications for osteoblast differentiation and osteoporosis / M. Sanchez-Hidalgo, Z. Lu, D.-X. Tan, M. D. Maldonado, R. J. Reiter, R. I. Gregerman // Am. J. of Physiology. – 2007. - Vol. 292, №6. – P. 2208–2215.

226. Satomura K. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo / K. Satomura, S. Tobiume, R. Tokuyama // J. Pineal Research. – 2007. – Vol. 42(3). – P. 231–39.
227. Schipani E. Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF / E Schipani., C. Maes, G. Carmeliet, G. Semenza // Bone Miner. Res. – 2009. – Vol. 24. – P. 1347–1353.
228. Schroeder A. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces / A. Schroeder, E. Van Der Zypen, H. Stich, F. Sutter // J. of Maxillofacial Surgery. –1981. – Vol.9, №1. – P.15–25.
229. Seeman E. Age- and menopause-related bone loss compromise cortical and trabecular microstructure / E. Seeman // J Gerontol A Biol Sci Med Sci. – 2013. – Vol. 68. – P. 1218-1225.
230. Sethi S. Determination of the minimal melatonin exposure required to induce osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells and these effects on downstream signaling pathways / S. Sethi, N.M. Radio, M.P. Kotlarczyk, et al. // J Pineal Res. – 2010. – Vol. 49. – P. 222- 238.
231. Sforza E. Obstructive sleep apnea is associated with preserved bone mineral density in healthy elderly subject / E. Sforza, T. Thomas, J. C. Barthélémy, P. Collet, F. Roche // Sleep. – 2013. – Vol. 36. – P. 1509–1515.
232. Shao P. Circadian rhythms in serum bone markers and the relation to the effect of etidronate in rats / P. Shao, Y.A. Ohtsuka-Iso, H. Shinoda // Chronobiol. Int. – 2003. – Vol.20, №2. – P.325– 326.
233. Sharan K. Regulation of bone mass through pineal-derived melatonin-MT2 receptor pathway / K. Sharan, K. Lewis, T. Furukawa, V.K. Yadav // J Pineal Res. – 2017. – Vol.63 (2). – P. 1-12.
234. Shaw J.A. The effects of varying oxygen concentrations on osteogenesis and embryonic cartilage in vitro / J.A. Shaw, L. Joseph, C.

- Bassett, L. Andrew // J. of Bone and Joint Surg. – 1967. – Vol. 49-a, №1. – P. 73-80.
235. Shino H. Melatonin enhances vertical bone augmentation in rat calvaria secluded spaces / H. Shino, A. Hasuike, Y. Arai, M. Honda, K. Isokawa, S. Sato // Med Oral Patol Oral Cir Bucal. – 2016. – Vol. 21(1). – P. 122-6.
236. Shinoda H. Diurnal rhythms in Ca transfer into bone, Ca release from bone, and bone resorbing activity in serum of rats / H. Shinoda, P.H. Stern // Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 1992. – Vol.262, iss.2. – P.235 – 240.
237. Shweta R. H. Study of serum calcium, magnesium and phosphorous levels in patients with thyroid disorders / R. H. Shweta, K. Nagarajappa, B. J. Sushma et al. // Int. Res. J. Phar. Plant Sci. – 2014. – Vol. 2, № 2. – P. 148 – 156.
238. Skelly J.R. Respiratory control and sternohyoid muscle structure and function in aged male rats: decreased susceptibility to chronic intermittent hypoxia / J.R. Skelly, D. Edge, C.M. Shortt et al. // Respir. Physiol. Neurobiol. – 2012. – Vol. 180(2-3). – P. 175-82.
239. Son J.H. A novel combination treatment to stimulate bone healing and regeneration under hypoxic conditions: photobiomodulation and melatonin / J.H. Son, B.S. Park, I.R. Kim, I.Y. Sung, Y.C. Cho, J.S. Kim, Y.D. Kim // Lasers Med Sci. – 2017. – Vol. 32, №3. – P.533-541.
240. Son J.H. Melatonin promotes osteoblast differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells under hypoxic conditions through activation of PKD/p38 pathways / J.H. Son, Y.C. Cho, I.Y. Sung et al // J. Pineal Res. – 2014. – Vol. 57. – P. 385-392.
241. Steflik D.E. Osteoblast activity at the dental implant-bone interface: transmission electron microscopic and high voltage electron microscopic observations / D.E. Steflik, G.R. Parr, A.L. Sisk et al. // J. of Periodontology. – 1994. – Vol.65, №5. – P.404–413.

242. Strachna O. Molecular imaging of expression of vascular endothelial growth factor A (VEGF A) in femoral bone grafts transplanted into living mice / O. Strachna, D. Torrecilla, M.K. Reumann et al. // Cell transplantation. – 2014. – Vol. 23(7). – P. 901-912.
243. Suzuki N. Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish / N. Suzuki, A.J. Hattori // Pineal Res. – 2002. – Vol. 33. – P. 253–258.
244. Swanson C.M. Obstructive sleep apnea and metabolic bone disease: insights into the relationship between bone and sleep / C.M. Swanson, S.A. Shea, K.L. Stone, J.A. Cauley, C.J. Rosen, S. Redline, et al. // J Bone Miner Res. – 2015. – Vol. 30. – P. 199–211.
245. Tan D.X. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: Synthesis and metabolism / D.X. Tan, L.C. Manchester, E. Esteban-Zubero, Z. Zhou, R.J. Reiter // Molecules. – 2015. – Vol. 20. – P. 18886–18906.
246. Tanyildizi S. In vitro effects of melatonin on hyaluronidase activity and sperm motility in bull semen / S. Tanyildizi, T. Bozkurt, O. Çiftç, F. Sakin. // Turk J Vet Anim Sci. – 2006. – Vol. 30. – P. 89-93.
247. Tomlinson R.E. Skeletal blood flow in bone repair and maintenance. Bone research / R.E. Tomlinson, M.J. Silva // Bone Research. – 2013. – Vol.1, №4. – P. 311-322.
248. Tordjman S. Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits / S. Tordjman, S. Chokron, R. Delorme et al. // Current Neuropharmacology. – 2017. – Vol. 15, №3. – P. 434-443.
249. Tuli H.S. Molecular aspects of melatonin (MLT)-mediated therapeutic effects / H.S. Tuli, D. Kashyap et al // Life Sciences. – 2015. – Vol. 135. - P. 147–157.
250. Tuncay O. Oxygen tension regulates osteoblasts function / O. Tuncay, D. Ho, M. Baker // American J. Dentofacial Orthop. – 1994. – V.105, №5. – P.457-463.

251. Uttig J. Hypoxia inhibits the growth, differentiation and bone-forming capacity of rat osteoblasts / J.C. Uttig, S.P. Robins, A. Brandao-Burch et al. // *Experimental cell research*. – 2006. – Vol.312. – P.1693-1702.
252. Vaananen H.K. Osteoclast lineage and function / H.K. Vaananen, T. Laitala-Leinonen // *Arch Biochem Biophys*. – 2008. – Vol. 473. – P. 132–8.
253. Varoni E.M. The impact of melatonin in research / E.M. Varoni, C. Soru, R. Pluchino, C. Intra, M. Iriti // *Molecules*. – 2016. – Vol. 21. – P. 240.
254. Waung J.A. Thyroid hormone metabolism in skeletal development and adult bone maintenance / J.A. Waung, J.H.D. Bassett, G.R. Williams // *Trends Endocrinol Metab*. – 2011. – Vol. 23(4). – P. 155-62.
255. Witt-Enderby P.A. Effects on bone by the light/dark cycle and chronic treatment with melatonin and/or hormone replacement therapy in intact female mice / P.A. Witt-Enderby, J.P. Slater, N.A. Johnson, et al. // *J Pineal Res*. –2012. – Vol.53, №4. –P.374-384.
256. Wolden-Hanson T. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat / T. Wolden-Hanson, D. R. Mitton, R. L. McCants, S. M. Yellon, C. W. Wilkinson, A. M. Matsumoto, D.D. Rasmussen // *Endocrinology*.–2000.–Vol.41, №2.–P.487-497.
257. Yota T. Novel roles of glycosaminoglycans in the degradation of type I collagen by cathepsin K / T. Yota, S. Shinichiro, I. Ken // *Glycobiology*. – 2017. – Vol. 27, №12. – P. 1089–1098.
258. Zaidi M. Thyroid-stimulating hormone, thyroid hormones, and bone loss / M. Zaidi, T. F. Davies, A. Zallone et. al // *Curr. Osteoporos Rep*. – 2009.- Vol. 7, №2.- P. 47-52.
259. Zaminy A. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of rat adipose-derived stem cell / A. Zaminy, I. R. Kashani, M. Barbarestani, A. Hedayatpour et al. // *Indian Journal of Plastic Surgery*. - 2008. - Vol.41, №1. – P.8–14.

260. Zaminy A. Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells: melatonin as a differentiation factor / A. Zaminy, I. R. Kashani, M. Barbarestani, A. Hedayatpour et al. // Iranian Biomedical Journal. - 2008. - Vol.12, №3. – P.133–141.
261. Zamorskii I. Effect of melatonin on the intensity of adenosine production in the rat forebrain under conditions of acute hypoxia and varied photoperiodicity / I. Zamorskii, V. Pishak // Neurophysiology. – 2003. – Vol. 35. – P.44–47.
262. Zawilska J.B. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms / J.B. Zawilska, D.J. Skene, J. Arendt // Pharmacol. Rep. – 2009. – Vol. 61. – P. 383–410.
263. Zhernoklov U. Influence of exo- and endogenous factors on bone remodeling in Wistar rats / U. Zhernoklov, V. Berezovskyi, I. Litovka // European J. of Technical and Natural Sciences. – 2016. – Vol.4. – P.3-8.
264. Zhernoklov U. Remodeling of the bone tissue of rats of different lines after melatonin effect / U. Zhernoklov, V. Berezovskyi, I. Litovka // Eureka: Life Sciences. – 2016. – Vol. 6. – P.52-58.
265. Zofkova I. Bone tissue as a systemic endocrine regulator / I. Zofkova // Physiol. Res. – 2015. – Vol. 64. P. 439-445.
266. Zou W. Syk, c-Src, the $\alpha v \beta 3$ integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption / W. Zou, H. Kitaura, J. Reeve, F. Long, V. L. J. Tybulewicz, S. J. Shattil, M. H. Ginsberg, et al. // The Journal of Cell Biology . – 2007. - Vol. 176, №. 6. – P. 877–888.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1) Березовський В.Я. Літовка І.Г., Весельський С.П., Янко Р.В., **Жернокльов У.О.** Вплив екзогенного мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини// Фізіологічний журнал – 2015 – Т.61, №3. – С.64-69.

3) Літовка І.Г., Березовський В.Я., Весельський С.П., **Жернокльов У.О.** Ремодельовання кісткової тканини після введення екзогенного мелатоніну в різні сезони року // Фізіологічний журнал – 2016 – Т.62, №3. – С.48-53.

4) **Zhernoklov U.** Influence of exo- and endogenous factors on bone remodeling in Wistar rats / **U.Zhernoklov**, V.Berezovskyi, I. Litovka // European J. of Technical and Natural Sciences. – 2016. – Vol.4. – P.3-8 (doi: 10.20534/EJTNS-16-4-3-8).

5) **Zhernoklov U.** Remodeling of the bone tissue of rats of different lines after melatonin effect / **U.Zhernoklov**, V.Berezovskyi, I. Litovka // Eureka: Life Sciences. – 2016. – Vol. 6. – P.52-58 (doi:10.21303/2504-5695.2016.00247).

6) Litovka I. Seasonal features of exogenous melatonin and dosed hypoxia influences on bone remodeling of young rats / I. Litovka, V. Berezovskyi, S. Veselskyi, R. Yanko, **U. Zhernoklov** // IJIRR. – 2017 – Vol. 4, №4. – P. 3986-3991.

7) Янко Р.В. Реакція щитоподібної залози спонтанно-гіпертензивних щурів на дію дозованої нормобаричної гіпоксії в осінній період / Р.В. Янко, В.Я. Березовський, **У.О. Жернокльов**, І.Г. Літовка / Проблеми ендокринної патології. – 2017. – №1. – С.80-86 (doi.org/10.21856/j-PER.2017.1.09).

які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1) **Жернокльов У.О.** Вплив екзогенного мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини // Матеріали Х Міжнародної конференції молодих

науківців «Біологія від молекули до біосфери», 2-4 грудня, Харків, 2015. – С.61.

2) Янко Р.В., Плотнікова Л.М., **Жернокльов У.О.**, Березовський В.Я. Дослідження стану сполучної тканини щитоподібної залози після поєднаного впливу дозованої нормобаричної гіпоксії та мелатоніну // Матеріали XIV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна 2016: Біологічні науки», 6-8 квітня, Київ, 2016. – С.221-222.

3) **Жернокльов У.О.** Особливості поєднаного впливу екзогенного мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини у щурів // Матеріали IV Міжнародної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології», 12-14 квітня, Вінниця, 2016. – С.342-343.

4) **Жернокльов У.О.**, Літовка І.Г. Вплив керованої атмосфери та екзогенного мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини щурів // Сборник материалов Международного симпозиума., «Актуальные проблемы биофизической медицины, 12-15 травня, Київ, 2016. – С.47-49.

5) **У.О. Жернокльов.** Вплив екзогенного мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини у молодих щурів //Збірник наукових праць «Біологічні дослідження – 2016», Житомир, 2016. – С.266-267.

6) Янко Р.В., Чака Е.Г., **Жернокльов У.А.** Особенности влияния мелатонина на структуру печени в зависимости от уровня потребления кислорода // Матеріалах IV Всеукраїнської наукової конференції студентів та молодих вчених з фізіології з міжнародною участю «Фізіологія – медицині, фармації та педагогіці: актуальні проблеми та сучасні досягнення» (Харків, Україна, 2017).