

УДК: 617.58-002.4-003.93-08:616.379-008.64

УКПП

№ держреєстрації 0117U003926

Інв. №

Міністерство освіти і науки України
Сумський державний університет
(СумДУ)

40007, Україна, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2, тел. (0542) 33 41 08

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
д-р. фіз-мат. наук, проф.

_____ А.М. Черноус
29.11.2017

ЗВІТ

ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

Молекулярно-генетичні та морфологічні особливості регенерації тканин нижньої кінцівки за умов хронічної гіперглікемії

МЕТОДИКА ГЕНОТИПУВАННЯ ЗА ПОЛІМОРФІЗМАМИ ГЕНІВ BGLAP,
ENPP1 І VEGF-A ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ МОДЕЛЮВАННЯ ХРОНІЧНОЇ
ГІПЕРГЛІКЕМІЇ У ТВАРИН
(проміжний)

Начальник НДЧ,
канд. фіз-мат. наук, с.н.с.

29.11.2017

Д.І. Курбатов

Керівник НДР,
канд. мед. наук, с.н.с.

29.11.2017

Є.І. Дубовик

2017

Результати роботи розглянуто науковою радою Сумського державного університету, протокол від 29 листопада 2017 р. №2

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, к.мед.н., асистент кафедри фізіології і патофізіології	29.11.2017	Є.І. Дубовик (розділ 3, висновки)
Відповідальний виконавець: к.мед.н., асистент кафедри стоматології	29.11.2017	О.О. Тимошенко (вступ)
Виконавці: к.мед.н., асистент кафедри фізіології і патофізіології	29.11.2017	О.І. Матлай (розділ 1.2)
Аспірант кафедри фізіології і патофізіології	29.11.2017	Т.Б. Олешко (розділ 2)
Аспірант кафедри фізіології і патофізіології	29.11.2017	І.В. Марченко (розділ 1.1)
Аспірант кафедри фізіології і патофізіології	29.11.2017	І.Г. Фоменко (передмова)
Фахівець	29.11.2017	Д.В. Годовас (розділ 4)
Лаборант	29.11.2017	Б.М. Літовченко (розділ 4)
Студентка медичного інституту	29.11.2017	О.С. Максимова (висновки)
Студентка медичного інституту	29.11.2017	О.В. Сухонос (розділ 1.1)
Студентка медичного інституту	29.11.2017	Є.А. Гарбузова (розділ 1.2)
Студентка медичного інституту	29.11.2017	В.С. Колбунова (вступ)
Студентка медичного інституту	29.11.2017	К.О. Пастухова (перелік посилання)
Студент медичного інституту	29.11.2017	Є.О. Шаперовський (передмова)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 37 с., 1 ч., 3 табл., 2 рис., 66 джерела.

ГІПЕРГЛІКЕМІЯ, МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ, ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ, РЕГЕНЕРАЦІЯ, ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ, ENPP1, VEGF-A, BGLAP

Об'єкт дослідження – процес регенерації тканин за умов хронічної гіперглікемії.

Мета роботи – встановлення молекулярно-генетичних та морфологічних особливостей регенерації тканин нижньої кінцівки за умов хронічної гіперглікемії

Методи дослідження – полімеразна ланцюгова реакція з наступним аналізом довжин рестрикційних фрагментів, біохімічний, спектрофотометричний, мікро- та ультраструктурний аналіз та методи математичного аналізу.

Проведено забір біологічного матеріалу (венозна кров) та виділено ДНК 163 пацієнтів із цукровим діабетом 2 типу та 110 осіб контрольної групи. Створено клінічну базу даних представників груп порівняння з урахуванням демографічних, клінічних показників та відомостей про результати лабораторного та інструментального обстеження. Підібрані структури прямих та зворотніх праймерів, режими ампліфікації та ферменти рестрикція для локусів rs1044498 (ген ENPP1), rs699946 (ген VEGF-A) та rs1800247 (BGLAP).

Відтворена та напрацьована методика моделювання хронічної гіперглікемії у щурів шляхом двотижневого навантаження 10 % водним розчином фруктози з подальшим одноразовим внутрішньоочеревенним введенням стрептозотоцину.

Отримані результати стануть базисом для виявлення нових генетичних маркерів цукрового діабету 2 типу та синдрому діабетичної стопи а також для створення нових шляхів корекції процесів регенерації тканин за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Цим може бути досягнуто важливий економічний і соціальний ефект, який полягає в зменшенні захворюваності і смертності від ускладнень цукрового діабету. Наукові результати будуть доповнювати банк даних про поширеність різних видів поліморфізму генів серед населення України та зв'язок цього явища з виникненням патологічних процесів та хвороб.

ЗМІСТ

Перелік скорочень, умовних познач, одиниць і термінів.....	5
Передмова.....	6
Вступ.....	7
1 Огляд літератури з питань структурних та біохімічних властивостей ENPP1 і VEGF-A	
1.1 Будова та біохімічні властивості ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1.....	9
1.2 Структура та функція судинного ендотеліального фактору росту А	11
2 Створення клінічної бази пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу та осіб групи контролю.....	20
3 Генотипування за поліморфними сайтами генів ENPP1, BGLAP та VEGF-A ...	23
4 Моделювання хронічної гіперглікемії та механічної травми скелетних м'язів задньої кінцівки щурів.....	26
Висновки.....	30
Перелік джерел посилання.....	31

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ

ЦД – цукровий діабет

АТ – артеріальний тиск

ІМТ – індекс маси тіла

ENPP1 – ектонуклеотид пірофосфатаза/фосфодіестераза 1

SNP – однонуклеотидний поліморфізм

G – гуанін

A – аденін

T – тимін

C – цитозин

BGLAP – кістковий Gla-протеїн (остеокальцин)

VEGF-A – судинний ендотеліальний фактор росту A

ПЕРЕДМОВА

До числа найтяжчих проявів цукрового діабету відносять порушення регенерації тканин, що відіграє провідну роль у патогенезі синдрому діабетичної стопи. Згідно з даними Міжнародної федерації діабету, понад 50 % пацієнтів з цукровим діабетом (кількість яких на сьогодні у світі перевищує 300 млн осіб) знаходяться у групі ризику розвитку цього небезпечного стану. У майже половини з них хвороба діагностується на пізніх стадіях, що потребує ампутації ураженої кінцівки та збільшує ймовірність летального наслідку у 2 рази. Слід також відмітити, що вартість лікування синдрому діабетичної стопи на запущених стадіях у 3 рази вища, ніж у ранній період.

За даними сучасних клінічних досліджень, своєчасна діагностика із залученням методів молекулярно-генетичного аналізу та своєчасне лікування діабетичної стопи дозволяють знизити ризик ампутації на 43-85 %. Враховуючи нещодавно відкриту роль білка остеокальцину в регуляції метаболізму глюкози шляхом посилення її захоплення міоцитами, впливу на експресію гена інсуліну і проліферацію β -клітин підшлункової залози генетична варіабельність *BGLAP*, як і *ENPP1*, білковий продукт якого здатен впливати на чутливість клітин до інсуліну, може стати новим діагностичним маркером та предиктором як цукрового діабету, так і ймовірності розвитку його ускладнень, що пов'язані з порушенням процесів регенерації. Крім того, однією з важливих патогенетичних ланок розвитку діабетичної стопи є порушення васкуляризації в дистальних відділах нижніх кінцівок. Ймовірність такої події можна оцінити шляхом визначення структурних особливостей гена *VEGF-A*, що кодує судинний фактор росту – основний регулятор неоваскулогенезу.

Поряд з цим актуальність вивчення морфологічних особливостей перебігу регенераторних процесів тканин нижньої кінцівки за умов хронічної гіперглікемії на мікроскопічному та ультрамікроскопічному рівні базується на відсутності таких даних, які б дозволили більш повно зрозуміти перебіг вказаних процесів та створити теоретичне підґрунтя для розробки ефективних шляхів їх корекції.

ВСТУП

Упродовж останніх десятиліть активно вивчаються клітинні та молекулярно-генетичні механізми розвитку захворювань ендокринної, м'язової та кісткової систем [1]. Більшість сучасних досліджень присвячені вивченню асоціації поліморфізму гена VDR та BGLAP із біохімічними маркерами кісткового ремоделювання і ступенем демінералізації кісткової тканини [2]. Поряд з тим нещодавно було показано, що остеокальцин здатний регулювати експресію гена інсуліну і стимулювати проліферацію β -клітин підшлункової залози [3]. Тривале лікування остеокальцином попереджає збільшення маси тіла і виникнення порушень вуглеводного обміну при високожировому харчуванні [4].

Револьюційним виявилось дослідження, в якому у остеокальцин-дефіцитних тварин спостерігався фенотип із порушенням толерантності до глюкози, інсулінорезистентністю і вісцеральним ожирінням [5]. *In vitro* було показано, що остеокальцин підвищує секрецію інсуліна острівцями Лангерганса і збільшує чутливість адипоцитів до інсуліну [6]. Введення рекомбінантного остеокальцину щурам із ожирінням підсилює проліферацію β -клітин підшлункової залози, стимулює секрецію інсуліну та покращує чутливість тканин до інсуліну [7]. Імуногістохімічна картина підшлункової залози щурів, які отримували інфузії остеокальцина демонструє збільшення числа острівців і β -клітинної маси [8]. При морфологічному аналізі скелетних м'язів методом просвічуючої електронної мікроскопії було доведено збільшення числа і розміру мітохондрій у тих тварин, які отримували остеокальцин.

Що стосується перебігу регенерації тканин нижніх кінцівок у хворих на цукровий діабет, то це питання мало вивчене. Більшість дослідників вважають, що цукровий діабет уповільнює репаративні процеси, що призводить до частих ускладнень, зокрема до синдрому діабетичної стопи, та подовженню термінів регенерації [9]. Разом з тим ряд вчених стверджують, що у хворих з компенсованим цукровим діабетом терміни репаративних процесів мало чим відрізняються від таких у пацієнтів, які не страждають на це захворювання. Дані

різних авторів про репаративні можливості у хворих на цукровий діабет засновані здебільшого на клінічних спостереженнях. Експериментальних же робіт з цього питання вкрай мало.

Таким чином, у роботі буде вперше вивчено роль генетичної варіабельності *BGLAP*, *ENPP1* та *VEGF-A* із розвитком цукрового діабету та синдромом діабетичної стопи та реалізовано експериментальне дослідження щодо вивчення морфологічних особливостей регенераторних процесів тканин нижньої кінцівки за умов хронічної гіперглікемії. Робота у цьому напрямі може мати важливе практичне значення, оскільки знання про нові генетичні маркери дозволить прогнозувати ризик розвитку цукрового діабету 2 типу та його гіпорегенераторних ускладнень та, спираючись на це, пропонувати засоби превентивного лікування та ефективної профілактики, що поліпшить якість життя і його тривалість у населення України.

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ З ПИТАНЬ СТРУКТУРНИХ ТА БІОХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ENPP1 і VEGF-A

1.1 Будова та біохімічні властивості ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1

Ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестераза 1 (ENPP1) є одним із членів сімейства нуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази, що складається з ізоферментів зі структурно спорідненими каталітичними доменами. Всі члени сімейства пронумеровані від ENPP1 до ENPP7 відповідно до порядкового номера клонування. Лише три ферменти сімейства – ENPP1, ENPP2 і ENPP3 – здатні гідролізувати пірофосфатні та фосфодієфірні зв'язки [10].

ENPP1 – фермент, що має широку специфічність: проявляє свою пірофосфатазну активність шляхом розщеплення АТФ до АМФ із виділенням 22 неорганічного пірофосфату (PPi), фосфодіестеразну активність – шляхом утворення АМФ із цАМФ [11].

ENPP1 є гомодимерним трансмембранним білком, що міститься в плазматичних мембранах клітин і матричних везикулах. Білок ENPP1 людини складається з 925 амінокислотних залишків та має молекулярну масу приблизно 125 кДа [12]. Протеїн зазнає посттрансляційної модифікації у вигляді аутофосфорилування як частини каталітичного циклу в активуванні пірофосфатази/фосфодіестерази 1, а також глікозилювання N-кінця.

Молекула білка ENPP1 складається з 5 частин: внутрішньоклітинного домену (із N-кінцевою спіраллю), двох соматомедин-B-подібних доменів і двох каталітичних позаклітинних доменів (фосфодіестеразоподібного і нуклеазоподібного) [13, 14].

Внутрішньоклітинний домен містить аміногрупу і складається з 24–76 залишків. Більша частина домену знаходиться в мембрані, і лише незначна частина – у цитоплазмі. Це є специфічною особливістю 3 ферментів сімейства – ENPP1, ENPP2, ENPP3 – і відрізняє їх від інших членів, N-кінець яких розміщений поза клітиною [15].

Два багатих на цистеїн соматомедин-В-подібних (SMB-1 і SMB-2) домени довжиною 40–50 амінокислотних залишків знаходяться між трансмембранним і каталітичним доменами. На думку Н. Zimmermann et al., таке розміщення SMB-доменів забезпечує стабілізацію молекули ENPP1 [16]. Свою каталітичну активність фермент виявляє у формі гомодимеру. Об'єднання відбувається за рахунок утворення дисульфідних містків між молекулами цистеїну SMB-доменів двох мономерів ENPP1 [17]. Необхідно зазначити, що досліджений K121Q поліморфізм міститься в домені SMB-2 білка ENPP1 [18]. Сьогодні не відомий можливий механізм зв'язку заміни лізину (K) на глутамін (Q) у 121-му положенні молекули з каталітичною активністю ферменту.

Фосфодіестеразоподібний домен знаходиться між SMB-2 і нуклеазоподібним доменом і складається приблизно з 400 амінокислот. 23 Фосфодіестеразна активність білка здійснюється шляхом утворення АМФ із цАМФ [19]. Нуклеазоподібний домен містить карбоксильну групу, спрямовану в позаклітинне середовище. Довжина цього домена приблизно 250 амінокислот [18, 19]. ENPP1 проявляє свою пірофосфатазну активність шляхом розщеплення АТФ до АМФ із виділенням неорганічного пірофосфату (PPi). С. Stefan et al. довели, що каталітичні домени ENPP1 мишей мають високу ідентичність із людськими ізоформами (до 60 % амінокислот) [20].

Ira D. Goldfine et al. зазначають, що каталітичні домени забезпечують розщеплення глюкозофосфатних, фосфосульфатних, пірофосфатних і фосфодіестеразних зв'язків [21]. Автори зазначають, що активний центр ферменту пірофосфатази і фосфодіестерази містить залишок треоніну-204. Каталітична активність ENPP1 залежить від двовалентних катіонів та оптимальна при рН 9–10 [19].

Білок ENPP1 експресується в епітеліальних клітинах дихальних шляхів [22], печінки [23], нирках [24], судинах [24], відіграючи важливу роль у функціонуванні вищезазначених органів і тканин. Відомо, що ENPP1 є інгібітором інсулінових рецепторів. Взаємодіючи з α -субодиницею рецептора, він пригнічує активність тирозинкінази, викликаючи інсулінорезистентність [25].

Miao-Pei Chen et al. зазначають, що рівень інсулінорезистентності залежить від активності ENPP1 [25].

Ген ENPP1 міститься на довгому плечі 6 (6q22–23q) хромосоми, має 25 екзонів і 24 інтрони [26, 27]. Регуляцію експресії гена ENPP1 контролює ціла низка регулювальних чинників, зокрема глюкокортикоїди [28], активатори протеїнкінази С [29], фактори росту фібробластів [30], цитокіни (IL-1 β і TNF- α) [31]. А. Abhishek і М. Doherty зазначають, що експресія гена ENPP1 залежить від TGF- β (трансформуючого фактора росту- β), IGF1 (інсуліноподібного фактора росту 1), CILP (cartilage intermediate layer protein). За даними вчених, TGF- β і CILP підвищують експресію ENPP1, IGF1 та IL-1 β її зменшують [32]. На сьогодні відомо близько 2 тисяч однонуклеотидних поліморфізмів (SNP) гена *ENPP1* людини. Найкраще дослідженими з яких є K121Q (rs1044498), IVSdelT-11 (rs1799774), A/G +1044TGA (rs7754561) [33, 34].

1.2 Структура та функція судинного ендотеліального фактору росту А

Фактор росту ендотелію судин (vascular endothelial growth factor – VEGF) – сімейство білків, що мають схожу структуру і разом з рецепторами (VEGFR) відіграють важливу роль у розвитку і регуляції діяльності кровоносних та лімфатичних судин. VEGF відповідає за формування судинної системи у період ембріогенезу та ранній постнатальний період. Рівень його експресії зменшується після народження і у дорослої людини тримається на мінімальному рівні за виключенням місць активного ангиогенезу (оварії, матка, шкіра). Крім того, експресія VEGF суттєво посилюється під час патологічного ангиогенезу (ішемія міокарду, сітківки, запалення, атеросклеротична бляшка, пухлини) [35-38].

VEGF має вузьку специфічність тканин-мішеней. Виявляючи сильний мітотичний вплив на ендотеліальні клітини артеріальних, венозних та лімфатичних судин, він, проте, позбавлений помітної мітотичної активності щодо інших типів клітин [39].

VEGF був виділений у 1989 році американцем італійського походження Napoleon Ferrara, ним же клонована ДНК білка [40]. VEGF був відкритий у пухлинах як неідентифікований фактор, що збільшує проникність мікросудин для рідини (судинний фактор проникності, VPF). Пізніше було показано, що білок може чинити мітогенний вплив на ендотеліальні і моноцитарно-макрофагальні клітини, які мають на поверхні рецептори до нього [35].

Сімейство VEGF складається з 8 членів: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F і плацентарних факторів PlGF-1, PlGF-2 [41].

Основним представником сімейства факторів росту ендотелію судин є VEGF-A, всі ефекти якого поділяють на судинні та позасудинні. VEGF-A є потужним мітогеном клітин ендотелію судин, забезпечує міграцію ендотеліоцитів, їх інвазію у колагеновий гель і утворення нових судин. VEGF-A необхідний не тільки для формування нормальних судин, але і для їх дозрівання і виживання. Як надлишок так і нестача його веде до смерті ембріона в результаті порушення васкуло- і ангиогенезу [35]. Тривале зниження концентрації або блокада VEGF у дорослих призводить до погіршення виживання ендотеліальних клітин, зменшенню в тканинах термінальних артеріол і капілярів, підвищенню артеріального тиску [42].

Важливою функцією VEGF є його здатність підвищувати проникність судинної стінки за рахунок утворення фенестр в ендотеліальних клітинах [43]. Доведено, що при взаємодії з рецептором VEGF підвищує як парацеллюлярну, так і трансцеллюлярну проникність інтактних судин і моношару ендотеліальних клітин. Збільшення парацеллюлярної проникності відбувається за рахунок активації комплексу актин-міозин, що змінює форму ендотеліальних клітин і збільшує ширину міжклітинних контактів [44]. Трансендотеліальний транспорт збільшується в результаті об'єднання внутрішньоклітинних везикул з утворенням трансендотеліальних каналів [45]. Доведено, що саме цей VEGF забезпечує підвищену проникність судин у пухлинах [46].

Вазодилатуючий ефект VEGF показаний в експериментах на тваринах. Доведено, що VEGF стимулює вивільнення NO і дозозалежне підвищення вмісту як мРНК ендотеліальної NOSинтетази так і самого ферменту [47, 48].

Роль VEGF у запаленні пов'язана не тільки з впливом на проникність ендотеліальних клітин, але й на активацію хемотаксису і інфільтрацію тканин моноцитами, макрофагами і лімфоцитами. Тучні клітини при запаленні з одного боку продукують сам VEGF, а з іншого вивільнюють гепаринази, які вивільняють VEGF із комплексу з гепарансульфатпротеогліканом, що збільшує судинну проникність, хоча і значно слабкіше, ніж VEGF [49]. Еозинофіли експресують VEGFR1, активація яких призводить до їх дегрануляції. через взаємодію з VEGF. Активація VEGFR1 при взаємодії з PlGF запускає молекулярний каскад спрямований на реалізацію прозапальних змін за умов неоангіогенезу і атеросклерозу [50].

Позасудинні ефекти реалізуються за рахунок взаємодії VEGF-A з рецепторами стовбурових гемопоетичних клітин, мегакаріоцитів, моноцитів, нейронів, клітин глії, альвеолярного епітелію і епітелію кришталика [51]. Доведено, що взаємодія VEGF-A з VEGFR2 та NRP1 чинить нейропротекторну дію, як за рахунок посиленого ангіогенезу, так і за рахунок прямої стимуляції функцій нейронів. За умов експериментальної ішемії VEGF-A підвищує ріст і виживання нейронів та їх попередників [52].

Усі члени сімейства VEGF у своїй структурі мають загальний гомологічний домен. Він представлений мотивом цистеїнового вузла що складається з 8 цистеїнових залишків. Останні беруть участь у створенні міжмолекулярних та внутрішньомолекулярних бісульфідних зв'язків на одному кінці консервативного чотирьохскладчастого бетта-листу кожного мономера. З'єднання мономерів під час димеризації відбувається бік-у-бік в антипараллельному напрямі.

VEGF-A – гомодимерний глікопротеїн з молекулярною масою 34 - 42-kDa, що містить залежно від ізоформи від 110 до 206 амінокислот. Відомі 8 основних ізоформ VEGF-A, 7 з яких є результатом альтернативного сплайсингу транскриптів первинної мРНК, - VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₄₈, VEGF-A₁₆₅,

VEGF-A₁₈₃, VEGF-A₁₈₉, VEGF-A₂₀₆ і одна - VEGF-A₁₁₀ – результатом протеолітичного розщеплення [49]. Ізоформи відрізняються за величиною поліпептидного ланцюга (110, 121, 145, 148, 165, 183, 189 і 206 амінокислот відповідно). У нормальних і трансформованих клітинах, що секретують VEGF-A переважно виявляється ізоформа VEGF-A₁₆₅, зріла форма якої є гомодимером з молекулярною масою 45 кДа. VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₈₉ також утворюються у достатній кількості, тоді як ізоформа VEGF-A₂₀₆ зустрічається вкрай рідко. Різні ізоформи відрізняються між собою фізіологічними властивостями – мітогенним потенціалом, хемотоксичною здатністю, сигнальною трансдукцією та ін. Так, VEGF-A₁₁₀ і VEGF-A₁₂₁ виявляють у 100 разів менший мітогенний потенціал щодо ендотеліальних клітин, ніж VEGF-A₁₆₅.

Структурні особливості ізоформ VEGF-A впливають на їх фізико-хімічні властивості. VEGF-A₁₂₁ повністю розчинюється після секреції у позаклітинне середовище, має слабокислотні властивості і не зв'язується з гепарином. VEGF-A₁₆₅ секретується з клітин, але при цьому залишається в зв'язаному стані на клітинній поверхні або в позаклітинному матриксі, є гепарин-зв'язуючим білком. Ізоформи VEGF-A₁₈₉ і VEGF-A₂₀₆ знаходяться у зв'язаному з позаклітинним матриксом стані, характеризуються вираженими основними властивостями і виявляють високу спорідненість до гепарину. Зв'язані форми VEGF-A вивільнюються під впливом гепарину, гепаринази або плазміну [53].

Ген VEGF-A знаходиться на короткому плечі 6 хромосоми 6p21.3. Як вже зазначалось, він є основою всіх ізоформ VEGF-A, а молекулярна неоднорідність пептидів пов'язана з альтернативним сплайсингом. Ген складається з 8 екзонів, що розділені 7 інтронами. 1 екзон кодує сигнальну послідовність, 2- N-термінальний кінець молекули протеїна, 3 - домен димеризації, VEGFR1-зв'язуючий домен та сайт N-глікозилювання, 4 - VEGFR2-зв'язуючий домен, 5 - сайт розщеплення плазміну, 8 - COOH-термінальний кінець. Амінокислоти, що кодуються в екзонах 1, 2, 3, 4, 5, 8 є консервативними для всіх ізоформ, за виключенням VEGF-A₁₄₅. Ідентичність кожної ізоформи VEGF-A визначається варіабельним включенням екзонів 6a, 6b, 7a і 7b, які кодують гепарин-зв'язуючий домен. У VEGF-A₁₆₅

відсутні залишки, які кодуються екзоном 6, в той час як VEGF-A₁₂₁ відсутні залишки, які кодуються екзонами 6 і 7. Наявність або відсутність цих доменів впливає на розчинність білка і його зв'язування з рецептором. Ізоформи, що містять цей домен (VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₈₉, і VEGF-A₂₀₆) тісно пов'язані гепаринвмісними протеогліканами клітинної поверхні, у той час як ті, у яких відсутній цей домен вільно дифундують у клітинний матрикс.

Після синтезу, VEGF-A підлягає посттрансляційній модифікації, що полягає у глікозилюванні первинної молекули. Проте вважають, що для виявлення біологічних властивостей поліпептидна частина молекули не потребує вуглеводного компоненту. Так, рекомбінантний VEGF, експресований *Escherichia coli*, не відрізняється від білка *in vivo* за своєю біологічною активністю [54].

Аналіз промоторного регіона виявив наявність одного транскрипційного сайту, безпосередньо біля специфічного сайту зв'язування *Sp1*, а також декілька потенційних специфічних сайтів зв'язування факторів транскрипції AP-1 и AP-2.

Регуляція експресії гена VEGF-A забезпечується цілою низкою факторів. По-перше, це такі фактори середовища, як рН, тиск, концентрація кисню [55], трансформація структури клітин під дією механічних сил [56]. Одним із найважливіших з них є гіпоксія. В ендотеліальних клітинах гіпоксія-індукований білковий комплекс HIF-1, зв'язуючись з енансер послідовностями гена VEGF-A, посилює його експресію. У трофобласті HIF-1 стимулює не тільки експресію VEGF, а й експресію sVEGFR-1. Було доведено, що при преєклампсії, гіпоксична плацента виробляє VEGF і sVEGFR-1 у надлишку. Внаслідок взаємодії VEGF і sVEGFR-1, кількість вільного VEGF, здатного взаємодіяти з мембранним рецептором і виявляти ангіогенні ефекти, залишається низькою [57, 58].

Дані щодо рівня експресії генів рецепторів за умов гіпоксії отримані *in vitro* та *in vivo* відрізняються. Доведено, що у культивованих ендотеліальних клітинах гіпоксія індукує підвищення VEGFR-1-мРНК тоді як експресія VEGFR-2 залишається незмінною, або помірно знижується. Цю відмінність можна пояснити відсутністю у промоторній ділянці гена VEGFR-2 сайту зв'язування з HIF-1. Проте у дослідях *in vivo* отримані інші результати - гіпоксія підвищує експресію обох

рецепторів. Оскільки ген VEGFR-2 не має сайту зв'язування HIF в промоторній ділянці, відповідь при гіпоксії *in vivo*, можливо, можна пояснити посттранскрипційним збільшенням стабільності мРНК і стимулюючим ефектами ще невстановленого паракринного посередника, що виділяє ішемічна тканина, який відсутній в супернатанті ендотеліальних клітин. Таким чином, вчені зробили висновок, що в умовах гіпоксії посилюється експресія як VEGFR-1 так і VEGFR-2 [58].

У досліджах *in vitro* показано, що ізольоване механічне розтягнення у культурі клітин сприяє виділенню VEGF. Посилення кровотоку, зростання напруги зсуву і трансформація ендотеліальних клітин в умовах фізичного навантаження призводить як до підвищення експресії VEGF, так і збільшення кількості VEGFR [59].

Одним із можливих механізмів впливу факторів середовища може бути опосередкована через VEGF стимуляція важливих для ангиогенезу факторів, включаючи антиапоптичні білки, молекули клітинної адгезії і металлопротеїнази [60].

Друга група регуляторів експресії VEGF-A – численні фактори росту, цитокіни та інші медіатори, серед яких епідермальний фактор росту, трансформуючий фактор росту альфа (TGF-альфа), FGF-2, TGF-бета, фактор росту кератиноцитів, фактор некрозу пухлини, інтерлейкін -1 і інтерлейкін-6, інсуліноподібний фактор росту 1, фактор росту гепатоцитів, і простагландини E1 і E2 [56].

Крім того, стимулюють транскрипцію гена VEGF-A й деякі гормони. Так, естрогени та прогестини, посилюють інтенсивність експресії VEGF-A, викликають стабілізацію VEGF-мРНК, збільшуючи період напіврозпаду транскриптів. Не дивлячись на те, що 5'ділянка не містить класичних estrogen response element, проте вона містить декілька AP-1 and Sp1 sites - відомих посередників у дії естрогенів. Тестостерон також викликає збільшення VEGF-A експресії і стабілізацію мРНК. Вплив тестостерону на експресію VEGF-A було вивчено в андрогенозалежній лінії S115 ракових клітин молочної залози миші і

людської простати. не містить будь-яких або гонадотропіну. Проте, встановлено, що регуляторні елементи для зв'язування андрогену у промоторній ділянці гена VEGF відсутні і його дія моделюється через комплекс AP-1 [58].

Дія VEGF на клітини-мішені опосередкована його взаємодією з VEGFR. Існує 3 типи рецепторів VEGF — VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) та VEGFR-3(Flt-4), що належать до сімейства тирозинкіназних рецепторів. Рецептори VEGF експресуються переважно в ендотеліальних клітинах кровоносних судин, забезпечуючи регуляцію ангиогенезу, стабілізацію утворених судин, регуляцію їх проникності та дилатацію. У значно меншій кількості вони також представлені у стовбурових гемопоетичних клітинах, мегакаріюцитах, моноцитах, нейронах та пухлинних клітинах, викликаючи позасудинні ефекти VEGF [43]. Рецептори є трансмембранними білками. Позаклітинна, лігандзв'язуюча частина рецептору, складається з 7 імуноглобулінподібних доменів. Внутрішньоклітинна частина – тирозинкіназний домен – розділена на 2 ділянки короткою послідовністю (інтеркіназною вставкою), що специфічна для кожного типу рецепторів [61]. При взаємодії з лігандом відбувається гомо-або гетеродимеризації рецепторів (VEGFR1 з VEGFR1, VEGFR2 з VEGFR2 або VEGFR1 з VEGFR2) з наступною активацією їх каталітичної активності [62]. VEGFR3 у дорослому організмі експресується переважно у ендотелії лімфатичних судин. У дослідях з трансгенними мишами, показано, що у шкірі цих мишей гіперекспресія VEGF-C (одного з лігандів VEGFR3) призводила до гіперплазії лімфатичних, а не кровоносних судин. Рецепторну функцію щодо VEGF-A₁₆₅ і PlGF-2 можуть виявляти нейропілін-1 та нейропілін-2.

Експресія нейропілінів виявлена у нейронах, ендотеліюцитах ембріональної кровоносної системи, мезенхімальних клітинах, що оточують кровоносні судини, клітинах ендокарду ембріонального серця. У дослідях на нокаутуваних за геном нейропіліну-1 мишах смерть ембріону наставала у зв'язку з порушеннями у формування серцево-судинної системи. Однак, підвищена експресія нейропіліну-

1 також призводить до смерті у зв'язку з порушеннями у нервовій та серцево-судинній системах.

Слід зауважити, що недивлячись на те, що VEGFR-2 має нижчу афінність до VEGF-A, основні судинні та позасудинні ефекти VEGF-A пов'язані саме з його взаємодією VEGFR2 [63]. Наслідками активації VEGFR2 є посилення проліферації, міграції та дифереґціації ендотеліальних клітин, підвищення судинної проникності, мобілізація попередикв ендотеліальних клітин із кісткового мозку [64]. Лігандами для нього можуть бути також VEGF-C, VEGF-D і VEGF-E.

Роль VEGFR-1 в функції ендотеліальних клітин менш зрозміла. VEGFR-1 має набагато більш слабку активність кінази і не може генерувати мітогенетичні відгук в ендотеліальних клітинах при стимуляції VEGF, хоча рецептор і має найвищу афінність до VEGF-A. Показано, що VEGFR-1 модулює розподіл ендотеліальних клітин на ранніх стадіях розвитку судин з четвертого по п'ятий день дифереґціювання ендотеліальних клітин, як раз перед формуванням перших примітивних кровеносних судин. Ембріони і дифереґційовані ендотеліальні клітини, позбавлені VEGFR-1 (VEGFR-1-/-) показують збільшення васкуляризації і кількості ендотеліальних клітин, що супроводжується збільшенням індексу мітозу ендотеліальних клітин. Kearney і ін. [65] припустив, що VEGFR-1 модулює ендотеліальний клітинний цикл шляхом впливу на один або кілька молекулярних сигнальних шляхів. Потенційно, VEGFR-1 може негативно модулювати патологічну васкуляризації (гальмувати) і таким чином притупляти (зупиняти) проангіогенних ефекти VEGFR-2, але потрібне подальше дослідження. VEGFR-1 також має важливе значення в міграції клітин. Зв'язування VEGF-A₁₆₅ з VEGFR-1 індукує спрямовану міграцію фагоцитів через моношар клітин ендотелію, а також їх активацію, на основі експресії тканинного фактора прокоагулянтної активності. Взаємодія між VEGF-A₁₆₅ and VEGFR-1 крім того індукує хемотаксис в поліморфноядерних клітинах. Важливо відзначити, що моноцити і поліморфноядерні клітини експресують тільки ген VEGFR-1 і не VEGFR-2.

Основним нейтралізатором ефектів VEGF є sVEGFR1. Оскільки цей рецептор знаходиться в розчинній формі і не пов'язаний з клітинною мембраною, його взаємодія з лігандом не призводить до розвитку каскаду внутрішньоклітинних реакцій [43]. Запобігаючи зв'язуванню VEGF з VEGFR2, sVEGFR1 сприяє зменшенню ангіогенеза, зниженню судинної проникності і зменшенню запалення.

2 СТВОРЕННЯ КЛІНІЧНОЇ БАЗИ ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2-ГО ТИПУ ТА ОСІБ ГРУПИ КОНТРОЛЮ

Однією з необхідних умов досягненні поставленої у проєкті мети є створення клінічної бази пацієнтів із цукровим діабетом 2 типу та осіб без цієї патології з подальшим забором від них біологічного матеріалу для виконання молекулярно-генетичних досліджень. Протягом першого етапу виконання проєкту виконавцями був проведений забір венозної крові 163 пацієнтів із підтвердженим діагнозом «цукровий діабет 2 типу» та 110 осіб без вказаної патології.

Пацієнтів із ЦД 2-го типу було відібрано у Сумській обласній клінічній лікарні, Сумській міській клінічній лікарні №5 та Тростянецькій районній лікарні. За допомогою анамнестичних даних, клінічних та біохімічних методів досліджень згідно з рекомендаціями експертів ВООЗ у обстежених хворих було встановлено або підтверджено діагноз цукрового діабету 2-го типу. Основним критерієм залучення пацієнтів до дослідження було наявність в анамнезі, підтвердженого лабораторними методами діагностики цукрового діабету 2-го типу.

До дослідження не залучались пацієнти з гострими чи хронічними запальними процесами на стадії загострення, онкологічними та системними захворюваннями, вираженою нирковою та печінковою недостатністю, бронхіальною астмою, травмою або великим хірургічним втручанням, а також особи, які отримують препарати, що потенційно здатні впливати на рівень глюкози у крові.

Відсутність ЦД 2-го типу у здорових індивідуумів підтверджували за допомогою збору анамнезу, вимірюванням рівня глікемії натще та дослідження клінічних і біохімічних показників крові і сечі.

Окрім біологічного матеріалу були отримані відомості про демографічні, антропометричні, клінічні показники осіб груп порівняння, а також дані про результати лабораторного та інструментального обстеження. Останнє дозволило створити клінічну базу даних осіб дослідної та контрольної групи, що у

майбутньому дозволить проводити аналіз зв'язку алелів та генотипів за поліморфними сайтами досліджуваних генів не лише з ризиком настання цукрового діабету 2 типу і його ускладнень, а й з показниками лабораторних та інструментальних тестів, а також аналізувати вплив поліморфних локусів на розвиток хвороби в умовах поправки на інші, негенетичні фактори.

Клінічна характеристика 163 пацієнтів із ЦД 2-го типу та 110 осіб контрольної групи представлена у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 – Загальна клінічна характеристика пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу та осіб контрольної групи

Показник	Хворі з ЦД2 (n = 163)	Контрольна група (n = 110)	P
Вік, років	65,2 ± 0,64	54,02 ± 0,74	< 0,001
Стать, ж/ч	87/76	32/78	< 0,001
Маса тіла, кг	83,48 ± 1,14	74,33 ± 1,1	< 0,001
Зріст, см	168,2 ± 0,62	165,7 ± 0,96	0,035
ІМТ, кг/м ²	29,5 ± 0,35	27,1 ± 0,41	< 0,001
Надмірна вага (%)	141 (86,5)	78 (70,9)	0,002
САТ, мм рт. ст.	150,8 ± 1,67	124,6 ± 0,97	< 0,001
ДАТ, мм рт. ст.	89,8 ± 0,88	80,2 ± 0,7	< 0,001
ПАТ, мм рт. ст.	61,04 ± 1,26	44,4 ± 0,73	< 0,001
Артеріальна гіпертензія (%)	131 (80,4)	36 (32,7)	< 0,001
Курці (%)	26 (16,0)	29 (26,4)	0,035
Глюкоза крові, ммоль/л	8,69 ± 0,2	5,25 ± 0,74	< 0,001

Примітка: n – кількість пацієнтів; ж – жінки; ч – чоловіки; P – статистична значущість відмінностей, ІМТ – індекс маси тіла; САТ – систолічний артеріальний тиск; ДАТ – діастолічний артеріальний тиск; ПАТ – артеріальний тиск пульсовий; Категоріальні змінні були порівняні за допомогою χ^2 -тесту, кількісні змінні – за допомогою t-тесту

Показано, що середні значення маси тіла, зросту, систолічного АТ, діастолічного АТ, пульсового АТ, концентрації глюкози крові у хворих з ЦД 2-го типу були істотно вищими, ніж у контролі (P < 0,05). Поряд із цим статистично значуща різниця між групами порівняння була виявлена під час аналізу за співвідношенням осіб різної статі (P < 0,001), середніми показниками ІМТ (P <

0,001), кількістю осіб із надмірною вагою ($P = 0,002$), кількістю курців ($P = 0,035$), кількість осіб з артеріальною гіпертензією ($P < 0,001$). Також слід окремо зауважити, що середній вік представників дослідної групи був значущо вищим, ніж у пацієнтів контролю ($P < 0,001$).

У табл. 2.2. подано клінічну характеристику хворих з ЦД 2-го типу різної статі.

Таблиця 2.2 – Загальна клінічна характеристика хворих із цукровим діабетом 2-го типу

Показник	Жінки (n = 87)	Чоловіки (n = 76)	P
Вік, років	66,4 ± 0,86	63,8 ± 0,94	0,043
Маса тіла, кг	80,4 ± 1,4	87,0 ± 1,76	0,004
Зріст, см	163, 2 ± 0,6	173,9 ± 0,69	< 0,001
ІМТ, кг/м ²	30,2 ± 0,49	28,7 ± 0,5	0,034
САТ, мм рт. ст.	152,8 ± 2,48	148,6 ± 2,17	0,210
ДАТ, мм рт. ст.	91,1 ± 1,27	88,2 ± 1,19	0,101
ПАТ, мм рт. ст.	61,7 ± 1,8	60,3 ± 1,77	0,582
Глюкоза крові, ммоль/л	8,76 ± 0,28	8,6 ± 0,3	0,697

Примітка: n – кількість пацієнтів; ж – жінки; ч – чоловіки; P – статистична значущість відмінностей, ІМТ – індекс маси тіла; САТ – систолічний артеріальний тиск; ДАТ – діастолічний артеріальний тиск; ПАТ – артеріальний тиск пульсовий; Категоріальні змінні були порівняні за допомогою χ^2 -тесту, кількісні змінні – за допомогою *t*-тесту

Із одержаних результатів, можна бачити, що чоловіки хворіють на ЦД 2-го типу у більш ранньому віці, ніж жінки: середній вік хворих на ЦД 2-го типу осіб чоловічої статі становив (63,8 ± 0,94) років, а у хворих на ЦД 2-го типу осіб жіночої статі – (66,4 ± 0,86) років ($P = 0,043$). У чоловіків виявилися достовірно вищими величини маси тіла ($P = 0,004$) та зросту ($P < 0,001$), проте серед осіб жіночої статі показник ІМТ був достовірно вищим ($P = 0,034$). За рівнем АТ сист. ($P = 0,210$), АТ діаст. ($P = 0,101$), АТ пул. ($P = 0,582$) та глюкози крові натще ($P = 0,697$) серед хворих на ЦД 2-го типу різної статі достовірних відмінностей не виявлено.

3 ГЕНОТИПУВАННЯ ЗА ПОЛІМОРФНИМИ САЙТАМИ ГЕНІВ *ENPP1*, *BGLAP* ТА *VEGF-A*

Наступним етапом роботи стало розроблення методики генотипування пацієнтів за поліморфними сайтами генів *ENPP1*, *BGLAP* та *VEGF-A*. Методом дослідження генотипів осіб груп порівняння стала полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ)

ДНК для генотипування виділяли з лейкоцитів венозної крові. Виділення геномної ДНК проводили з використанням комерційного набору «Diatom DNA Prep 100» (Isogene Lab Ltd). Метод базується на застосуванні лізуючого реагенту із гуанідинізоціанатом, призначеним для лізису клітин, солюбілізації клітинного дебрису, а також для денатурації клітинних нуклеаз. За наявності лізуючого реагенту ДНК активно сорбується на NucleoSTM-сорбенті, потім легко відмивається від білків та солей спиртовим розчином. Згодом ДНК екстрагують із сорбенту та переносять у стерильні вільні від ДНК та РНК мікропробірки. У процесі виділення ДНК дотримувалися рекомендацій, наведених у комерційному наборі, та проводили маніпуляції згідно з таким протоколом.

Для визначення поліморфізму K121Q (rs1044498) гена *ENPP1* ділянку вказаного гена, що містила названий поліморфний сайт, ампліфікували за допомогою пари специфічних праймерів: прямий (sense) - 5'CTGTGTTCACTTTGGACATGTTG3' та зворотній (antisense) - 5'GACGCTGGAAGATAACCAGGCTG3'. Праймери були синтезовані фірмою Metabion (Німеччина). Для проведення ПЛР брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного ПЛР-буферу, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 пмоль/л кожного з праймерів і 0,75 ОД Таq-полімерази (ThermoFisher Scientific, США), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. ПЛР проводили в термоциклері GeneAmpPCR System 2700 (Applied Biosystems, США). Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукту ампліфікації (238 п.н.) інкубували при 37°C протягом 18 год з 5 ОД рестриктази *Eco47I* (*AvaII*) (ThermoFisher Scientific, США). Якщо в

48213-у положенні 4-го екзону знаходився цитозин, рестриктаза *Eco47I* утворювала два фрагменти довжиною 148 та 90 п.н. Заміна цитозину на аденін перешкоджала рестрикції, і ампліфікований фрагмент 4-го екзону (238 п.н.) лишався без змін.

Для дослідження поліморфного сайту *HindIII* (rs1800247) гена *BGLAP* ділянку, що містила вказаний поліморфний локус, ампліфікували за допомогою пари специфічних праймерів: прямий (sense) - 5'CCGCAGCTCCCAACCACAATAAGCT3' та зворотній (antisense) - 5'CAATAGGGCGAGGAGT3'. Праймери були синтезовані фірмою Metabion (Німеччина). Для проведення ПЛР брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного ПЛР-буферу, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 пмоль/л кожного з праймерів і 1,0 Од Таq-полімерази (ThermoFisher Scientific, США), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. ПЛР проводили в термоциклері GeneAmpPCR System 2700 (Applied Biosystems, США). Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукту ампліфікації (253 п.н.) інкубували при 37°C протягом 20 год з 3 Од рестриктази *HindIII* (ThermoFisher Scientific, США). Таким чином, для гомозиготи НН був характерним один фрагмент завдовжки 253 п.н., для гетерозигот – два фрагменти 253 та 232 п.н., а для гомозигот за мінорним h-алелем відзначався один фрагмент 232 п.н.

Вивчення поліморфізму +405 G/C (rs2010963) гена *VEGF-A* ділянку гена, що містила досліджуваний SNP, ампліфікували за допомогою пари специфічних праймерів: прямий (sense) - 5'ATTTATTTTGGCTTGCCATT33' та зворотній (antisense) - 5'GTCTGTCTGTCTGTCCGTCA3'. Праймери були синтезовані фірмою Metabion (Німеччина). Для проведення ПЛР брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного ПЛР-буферу, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 пмоль/л кожного з праймерів і 1,0 Од Таq-полімерази (ThermoFisher Scientific, США), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. ПЛР проводили в термоциклері GeneAmpPCR System 2700 (Applied Biosystems, США). Для

рестрикційного аналізу 6 мкл продукту ампліфікації (304 п.н.) інкубували при 56°C протягом 15 год з 3 ОД рестриктази *BsmFI* (ThermoFisher Scientific, США). Наявність G-алеля в +405 положенні гена призводило до розщеплення вихідного ампліфікату на два фрагменти – 193 та 111 п.о., тоді як присутність цитозину перешкоджала взаємодії рестриктази із молекулами ДНК, і в суміші містився один фрагмент завдовжки 304 п.н.

Фрагменти рестрикції розділяли за допомогою електрофорезу у 2,5% агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора («Біоком»).

4 МОДЕЛЮВАННЯ ХРОНІЧНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ ТА МЕХАНІЧНОЇ ТРАВМИ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ЗАДНЬОЇ КІНЦІВКИ ЩУРІВ

Іншим напрямом виконання проекту є морфологічне дослідження особливостей репаративних процесів у тканинах кінцівки за умов дії на організм хронічної гіперглікемії. Дослідження такого плану є суто експериментальним та виконується на лабораторних тваринах – щурах.

Для відпрацювання методики моделювання хронічної гіперглікемії в експерименті було задіяно 9 білих щурів-самців лінії Wistar зрілого віку.

Перед початком експерименту щури піддавались огляду, враховуючи їх рухову активність і стан зовнішніх покривів. Після цього тварини підлягали двотижневій карантинізації. Піддослідні щури доглядалися в умовах віварію Медичного інституту Сумського державного університету відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом із біоетики (Київ, 2001).

Під час експерименту у приміщенні віварію підтримувалася стала температура повітря, щурам надавався належний догляд. Упродовж усього терміну досліджень тварин годували сухим гранульованим кормом, що характеризувався збалансованим вмістом необхідних для повноцінної життєдіяльності інгредієнтів.

Моделювання хронічної гіперглікемії у дослідній групі здійснювали за допомогою двотижневого навантаження тварин 10 % водним розчином фруктози з подальшим одноразовим інтраперитонеальним введенням стрептозотоцину у дозі 40 мг/кг [66]. Згідно з обраною моделлю станом гіперглікемії слід вважати концентрацію глюкози натще вище, ніж 160 мг/дл. У таблиці 3.1 наведені значення виміру вмісту глюкози крові щурів інтактної серії та тварин експериментальної групи протягом 14 діб. Показано, що концентрація глюкози щурів контролю коливалась в межах 98-119 мг/дл, тоді як в експериментальній

групі вміст глюкози натще становив від 185 мг/дл – найменше значення до 244 мг/дл – найвище значення.

Таблиця 3.1 – Вміст глюкози крові натще щурів контрольної та експериментальної групи (мг/дл)

Доба	Контроль			Експериментальна група					
	1	2	3	1	2	3	4	5	6
1	110	103	104	197	202	197	214	226	198
2	107	104	104	192	214	203	207	217	197
3	105	109	105	196	198	208	216	196	187
4	111	108	118	201	204	206	195	194	188
5	103	111	112	189	198	195	172	187	231
6	99	103	113	220	204	198	203	199	220
7	106	105	110	201	216	216	204	210	225
8	105	100	1119	198	188	185	196	222	221
9	110	98	114	182	197	188	209	208	244
10	117	103	109	199	198	183	201	205	236
11	112	106	112	194	202	191	205	202	229
12	104	103	115	189	205	184	200	209	237
13	105	109	115	194	209	189	197	212	241
14	102	111	109	198	200	185	201	207	232

Механічну травму у щурів контрольної та дослідної групи відтворювали на довгій головці триголового м'яза литки шляхом лінійного глибокого розрізу перпендикулярно ходу м'язових волокон з подальшим зіставленням та зшиванням країв рани.

Для вивчення мікроскопічної будови регенератів посмугованих м'язів із місця нанесення механічної травми триголового м'яза литки вирізали шматочки розміром 10 мм³. Далі проводили фіксування відібраних зразків у 10 % розчині нейтрального формаліну упродовж двох діб. Потім з одержаних препаратів робили поздовжні (за ходом м'язових волокон) та поперечні (поперек м'язових волокон) зрізи на санному мікротомі МС-2 із товщиною зрізів 4 – 6 мкм. Гістологічні зрізи фіксували на знежирених (ячний білок та гліцерин 1:1) предметних скельцях та висушували. Фарбування проводили гематоксилін-еозином. Світлову мікроскопію проводили із використанням мікроскопа Olympus

ВН-2 (Японія) (бінокляр $\times 10$, $\times 15$, об'єктиви $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$). Фотографування гістологічних препаратів виконували цифровою камерою Baumer/optronic Тур: СХ 05с.

Ультрамікроскопічне дослідження реалізовували за допомогою електронного мікроскопа ПЭМ-100м (Суми, Україна) із напругою прискорення 75 – 100 кВ. Фото досліджуваних препаратів при збільшенні у 4800 – 12600 разів одержували із використанням цифрової відеокамери Baumer/optronic Тур: СХ 05с.

На рисунку 3.1 відображена гістологічна картина раннього етапу регенераторного процесу скелетного м'яза задньої кінцівки щура експериментальної групи після нанесення механічної травми.

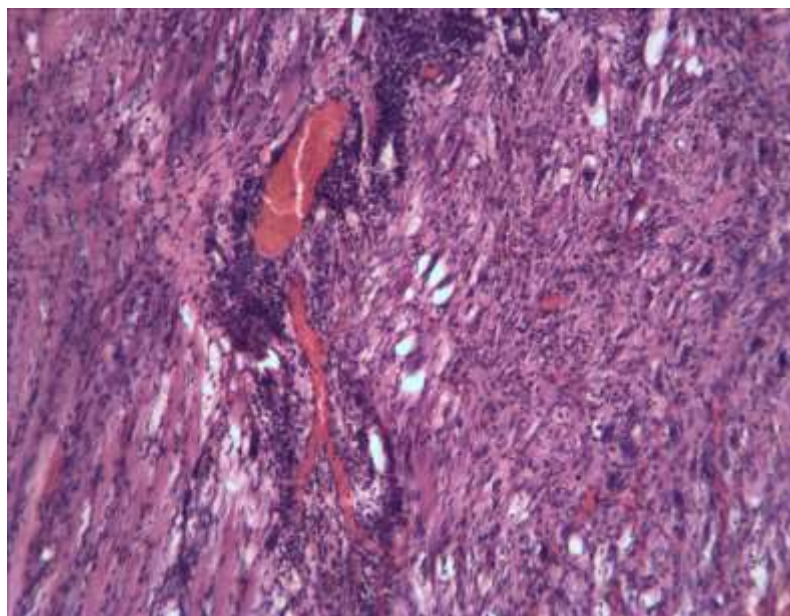


Рисунок 3.1 – триголовий м'яз литки щура із хронічною гіперглікемією на першу добу після нанесення механічної травми. Світлова мікроскопія.

На рисунку 3.2 показана ультрамікроскопічна картина регенерату посмугованого м'яза щура після моделювання механічного ушкодження. На електронограмі чітко відзначається шовний матеріал.

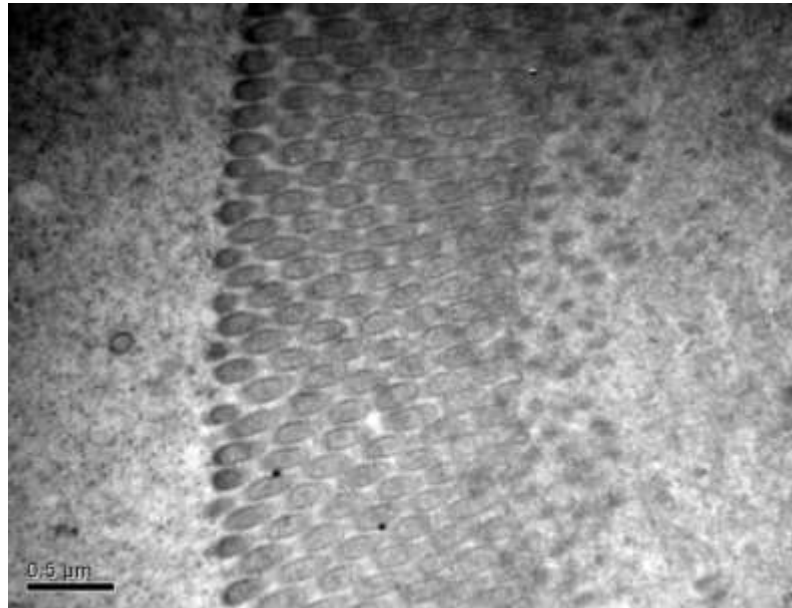


Рисунок 3.2 – триголовий м'яз литки щура із хронічною гіперглікемією на першу добу після нанесення механічної травми. Зображення шовного матеріалу. Електронна мікроскопія.

ВИСНОВКИ

1. Створено клінічну базу даних представників груп порівняння з урахуванням демографічних, антропометричних, клінічних показників та відомостей про результати лабораторного та інструментального обстеження.
2. Проведений забір біологічного матеріалу (венозна кров) та виділено ДНК 163 пацієнтів із цукровим діабетом 2 типу та 110 осіб контрольної групи.
3. Підібрані структури праймерів, режими ампліфікації та ферменти рестрикції для локусів rs1044498 (ген *ENPP1*), rs699946 (ген *VEGF-A*) та rs1800247 (*BGLAP*).
4. Відтворена та напрацьована методика моделювання хронічної гіперглікемії у щурів шляхом двотижневого навантаження 10 % водним розчином фруктози з подальшим одноразовим уведенням стрептозотоцину.
5. Напрацьована методика створення механічної травми триголового м'яза литки щурів.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Karasik D. The genetics of bone mass and susceptibility to bone diseases / D. Karasik, F. Rivadeneira, M.K. Johnson // *Nature Reviews Rheumatology*. – 2016. – Vol. 12. – P. 323-334.
2. Association between the vitamin D receptor gene polymorphism and osteoporosis / J. Wu, D. P. Shang, S. Yang [et al.] // *Biomedical Reports*. – 2016. – Vol. 5(2). – P. 233-236.
3. Biology of bone tissue: structure, function and factors that influence bone cells / R. Florencio-Silva, G. Rodrigues, E. Sasso-Cerri [et al.] // *Bio Med Research International*. – 2015. – Vol. 17. – P. 1-17.
4. Панкратова Ю. В. Витамин К-зависимые белки: остеокальцин, матриксный Gla-белок и их внекостные эффекты / Ю. В.Панкратова, Е. А. Пигарова, Л. К. Дзеранова // *Ожирение и метаболизм*. – 2013. – № 2. – С. 11-18.
5. Genetic evidence points to an osteocalcin-independent influence of osteoblasts on energy metabolism / Y. Yoshikawa, A. Kode, L. Xu [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2012. – Vol. 26 (9). – P. 2012-2025.
6. Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice / M. Ferron, M. McKee, R. Levine [et al.] // *Bone*. – 2012. – Vol. 50 (2). – P. 568-575.
7. Bone-specific insulin resistance disrupts whole-body glucose homeostasis via decreased osteocalcin activation / J. Wei, M. Ferron, C. Clarke [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2014. – Vol. 24. – P. 1-13.
8. Lecka-Czernik B. Energy Excess, Glucose Utilization, and Skeletal Remodeling: New Insights / B. Lecka-Czernik, C. Rosen // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2015. – Vol. 30 (8) – P. 1356-1361.
9. Histological and biomechanical analysis of the effects of streptozotocin-induced type one diabetes mellitus on healing of tentomized chilles tendons in rats / Z. Mohsenifar, M. Feridoni, M. Reza [et al.] // *Foot and Ankle Surgery*. – 2014. – Vol. 20 – P. 186-191.

10. Stefan C. Modulation of purinergic signaling by NNP-type ectophosphodiesterases / C. Stefan, S. Jansen, M. Bollen // *Purinergic. Signal.* – 2006. – Vol. 2. – P. 361–370.
11. Johnson K. Inorganic pyrophosphate (PPI) in pathologic calcification of articular cartilage / K. Johnson, R. Terkeltaub // *Front Biosci.* – 2005. – Vol. 10. – P. 988–997.
12. The role of membrane glycoprotein plasma cell antigen 1/ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 in the pathogenesis of insulin resistance and related abnormalities / I. D. Goldfine, B. A. Maddux, J. F. Youngren et al. // *Endocrine Reviews.* – 2008. – Vol. 29, № 1. – P. 62–75.
13. Stefan C. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity / C. Stefan, S. Jansen, M. Bollen // *Trends in Biochemical Sciences.* – 2005. – Vol. 30 (10). – P. 542–550.
14. Generalized arterial calcification of infancy and pseudoxanthoma elasticum can be caused by mutations in either ENPP1 or ABCC6 / Y. Nitschke, G. Baujat, U. Botschen et al. // *The American Journal of Human Genetics.* – 2012. – Vol. 90. – P. 25–39.
15. Differential detergent resistance of the apical and basolateral NPPases: relationship with polarized targeting / J. L. Delaunay, M. Breton, J. W. Goding et al. // *J. Cell Sci.* – 2007. – Vol. 120. – P. 1009–1016.
16. Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides / H. Zimmermann // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* – 2000. – Vol. 362. – P. 299–309.
17. Gijsbers R. Functional characterization of the non-catalytic ectodomains of the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase NPP1 / R. Gijsbers, H. Ceulemans, M. Bollen // *Biochem. J.* – 2003. – Vol. 371. – P. 321–330.
18. Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases on the move / M. Bollen, R. Gijsbers, H. Ceulemans, C. Stefan // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 35. – P. 393–432.

19. Biochemical and molecular characterization of a novel choline-specific glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family / H. Sakagami, J. Aoki, Y. Natori et al. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 23084–23093.
20. Zimmermann H. Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases / H. Zimmermann, M. Zebisch, N. Sträter // *Purinergic Signalling.* – 2012. – Vol. 8. – P. 437–502.
21. The role of membrane glycoprotein plasma cell antigen 1/ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 in the pathogenesis of insulin resistance and related abnormalities / I. D. Goldfine, B. A. Maddux, J. F. Youngren et al. // *Endocrine Reviews.* – 2008. – Vol. 29, № 1. – P. 62–75.
22. Picher M. Metabolism of P2 receptor agonists in human airways – implications for mucociliary clearance and cystic fibrosis / M. Picher, L. H. Burch, R. C. Boucher // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 20234– 20241.
23. Chen G. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation / G. Chen, C. Deng, Y. P. Li // *Int. J. Biol. Sci.* – 2012. – Vol. 8, № 2. – P. 272–288.
24. Counter-regulatory phosphatases TNAP and NPP1 temporally regulate tooth root cementogenesis / L. E. Zweifler, M. K. Patel, F. H. Nociti et al. // *International Journal of Oral Science.* – 2014. – Vol. 1. – P. 1–15.
25. ENPP1 K121Q polymorphism is not related to type 2 diabetes mellitus, features of metabolic syndrome, and diabetic cardiovascular complications in a Chinese population / M. P. Chen, F. M. Chung, D. M. Chang et al. // *The Review of Diabetic Studies.* – 2006. – Vol. 3, № 1. – P. 21–30.
26. Loss-of-function ENPP1 mutations cause both generalized arterial calcification of infancy and autosomal-recessive hypophosphatemic rickets / B. LorenzDepiereux, D. Schnabel, D. Tiosano et al. // *The American Journal of Human Genetics.* – 2010. – Vol. 86. – P. 267–272.

27. The Mutational Spectrum of ENPP1 as Arising After the Analysis of 23 Unrelated Patients with Generalized Arterial Calcification of Infancy (GACI) / N. Ruf, B. Uhlenberg, R. Terkeltaub et al. // *Mutation in Brief*. – 2005. – Vol. 768. – P. 1–7.
28. Glucocorticoid hormones increase the activity of plasma membrane alkaline phosphodiesterase I in rat hepatoma cells / G. G. Rousseau, A. Amar-Costesec, M. Verhaegen, D. K. Granner // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1980. – Vol. 77, № 2. – P. 1005–1009.
29. Expression of the nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase PC-1 is induced by basic fibroblast growth factor (bFGF) and modulated by activation of the protein kinase A and C pathways in osteoblast-like osteosarcoma cells / J. L. Solan, L. J. Deftos, J. W. Goding, R. A. Terkeltaub // *J. Bone Miner. Res.* – 1996. – Vol. 11. – P. 183–192.
30. Regulation of purified hepatic PC-1 (phosphodiesterase-I/nucleotide pyrophosphatase) by threonine auto(de)phosphorylation and by binding of acidic fibroblast growth factor / M. Uriarte, W. Stalmans, S. Hickman, M. Bollen // *Biochem. J.* – 1995. – Vol. 306. – P. 271–277.
31. Interleukin 1 β suppresses transforming growth factor-induced inorganic pyrophosphate (PPi) production and expression of the PPi-generating enzyme PC-1 in human chondrocytes / M. Lotz, F. Rosen, G. McCabe et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1995. – Vol. 92. – P. 10364–10368.
32. Abhishek A. Pathophysiology of articular chondrocalcinosis – role of ANKH / A. Abhishek, M. Doherty // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2011. – Vol. 7. – P. 96–104.
33. Common variants in the ENPP1 gene are not reproducibly associated with diabetes or obesity / H. N. Lyon, J. C. Florez, T. Bersaglieri et al. // *Diabetes*. – 2006. – Vol. 55. – P. 3180–3184.
34. Haplotype structure of the ENPP1 gene and nominal association of the K121Q missense single nucleotide polymorphism with glycemic traits in the Framingham Heart Study / E. S. Stolerman, A. K. Manning, J. B. McAteer et al. // *Diabetes*. – 2008. – Vol. 57. – P. 1971–1977.

35. Гавриленко Т.И. Сосудистый эндотелиальный фактор роста в клинике внутренних заболеваний и его патогенетическое значение / Т.И. Гавриленко, Н.А. Рыжкова, А.Н. Пархоменко // Укр. кардіол. журн. – 2011. – Т. 4. – С. 87-95.
36. Vascular endothelial growth factor synergistically enhances induction of E-selectin by TNF- α / A.K. Stannard, R. Khurana, I.M. Evans [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – Vol. 27. – P. 494-502.
37. Vascular protection: a novel nonangiogenic cardiovascular role for VEGF / I. Zachary, A. Mathur A., Yla-Herttuala S. [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – Vol. 20. – P. 1512-1520.
38. Inhibition of VEGF or TGF signaling activates endothelium and increases leucocyte rolling / T.E. Walshe, V.S. Dole, A. Maharaj [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – Vol. 29. – P. 1185-1192.
39. Ferrara N., Davis–Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor / N. Ferrara, T. Davis–Smyth // *Endocr. Rev.* – 1997. – Vol. 18. – P. 4–10.
40. Ferrara N. The biology of vascular endothelial growth factor / N. Ferrara, T. Davis–Smyth // *Endocr. Rev.* – 1997. – Vol. 18. – P. 4–10.
41. Otrrock Z.K. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review / Z. Otrrock, J. Makarem, A. Shamseddine // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2007. – Vol. 38. – P. 258–268.
42. Kamba T. Mechanisms of adverse effects of anti VEGF therapy for cancer / T. Kamba, D. McDonald // *Br. J. Cancer.* – 2007. – Vol. 96. – P.1788-1795.
43. A systemic biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role & therapeutic use / F.T. Wu, M.O. Stefanini, F. Mac Gabhann [et al.] // *J. Cell Mol. Med.* – 2010. – Vol. 14. – P. 528-552.
44. Mehta D. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability / D. Mehta, A. B. Malik // *Physiol. Rev.* – 2006. – Vol. 86. – P. 279-367.
45. Bates D.O. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors / D. O. Bates, S. Harper // *Vasc. Pharmacol.* – 2002. – Vol.39. – P. 225-237.

46. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells / D. T. Connolly, D. M. Heivelman, R. Nelson [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1989. – Vol. 4. – P. 1470-1478.
47. Bouloumie A. Vascular endothelial growth factor upregulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells / A. Bouloumie, V. SchiniKerth, R. Busse // *Cardiovasc. Res.* – 1999. – Vol. 41. – P. 773-780.
48. Egginton S. Invited review: activity-induced angiogenesis / S. Egginton // *Phlogers. Arc.* – 2009. – Vol. 457. – P. 963-977.
49. Dvorak H. F. Vascular permeability factor / Vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy / H. F. Dvorak // *J. Clin. Oncol.* – 2002. – Vol.20. – P. 4368-4380.
50. De Falko S. The discovery of placental growth factor and its biological activity / S. De Falko // *Exp. Mol. Med.* – 2012. – Vol. 44. – P. 1-9.
51. A systemic biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role & therapeutic use / F. T. Wu, M. O. Stefanini, F. Mac Gabhann [et al.] // *J. Cell Mol. Med.* – 2010. – Vol. 14. – P. 528-552.
52. D'Amore P.A. Vascular endothelial cell growth factor A. Not just for endothelial cells anymore / P. A. D'Amore // *Am. J. Pathol.* – 2007. – Vol. 171. – P.14-18.
53. Heparan sulfat regulates VEGF165 and VEGF121 mediated vascular hyperpermeability / D. Xu, M. Fuster, R. Lawrence [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286. – P. 737-745.
54. Nicosia R. What Is the Role of Vascular Endothelial Growth Factor-Related Molecules in Tumor Angiogenesis? / R. Nicosia // *Am J Pathol.* – 1998. – Vol. 153(1). – P. 11-16.
55. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells / A. Namiki, E. Brogi, M. Kearney [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 31189-31905.
56. Systems biology of proangiogenic therapies targeting the VEGF system / F. Mac Gabhann, A. Qutub, B. Annex [et al.] // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* – 2010. – Vol. 2. – P. 694-707.

57. Hypoxia is responsible for soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) but not for soluble endoglin induction in villous trophoblast / C Munaut, S. Lorquet, C. Pequeux [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2008. – Vol. 23. P – 1407-1415.
58. Mechanism of hypoxia-induced GCM1 degradation: implications for the pathogenesis of preeclampsia / M. Chiang, F. Liang, C. Chen [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 284. – P. – 17411-17419.
59. Systems biology of proangiogenic therapies targeting the VEGF system / F. Mac Gabhann, A. Qutub, B. Annex [et al.] // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* – 2010. – Vol. 2. – P. 694-707
60. Tsutsumi Y. Double face of VEGF / Y. Tsutsumi, D. Losordo // *Circulation.* – 2005. – Vol. 112. – P. 1248-1250.
61. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis / A. Hoeben, B. Landuyt, M. Highley [et al.]// *Pharmacol Rev.* – 2004. – Vol. 56, №4, – P. 549-580.
62. Rahimi N. VEGFR1 and VEGFR2: two nonidentical twins with a unique physiognomy / N. Rahimi // *Front Biosci*–2006. – Vol. 11. – P. 818-829.
63. A two compartment model of VEGF distribution in the mouse / P. Yen, S. Finley, E. Stefanini [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – P. 27514-27521.
64. Maharaj A.S. Roles for VEGF in adult / A. S. Maharaj, P. A. D'Amore // *Microvasc. Res.* – 2007. – Vol. 74. – P. 100-113.
65. Vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 negatively regulates developmental blood vessel formation by modulating endothelial cell division / J. Kearney, C. Ambler, K. Monaco [et al.] // *Blood.* – 2008. – Vol. 99. – P. 2397-2407.
66. Wilson R.D. Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes / R.D. Wilson, M.S. Islam // *Pharmacological Rep.* – 2012. – Vol. 64. – P. 129-139.