

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

26.11.2019

ЗВІТ

ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

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

ВСТАНОВЛЕННЯ ЗВ'ЯЗКУ ПОЛІМОРФНИХ САЙТІВ ГЕНІВ BGLAP, ENPP1 І VEGF-A ІЗ РОЗВИТКОМ СИНДРОМУ ДІАБЕТИЧНОЇ СТОПИ ТА ВІЯВЛЕННЯ УЛЬТРАМІКРОСКОПІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ РЕГЕНЕРАЦІЇ ТКАНИН НИЖНЬОЇ КІНЦІВКИ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ (проміжний)

Керівник НДР,
канд. мед. наук, с.н.с.

26.11.2019

О.О. Тимошенко

2019

Результати роботи розглянуто науковою радою Сумського державного університету, протокол від 26 листопада 2019 р. № 4

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, к.мед.н., с.н.с кафедри фізіології і патофізіології	26.11.2019	О.О. Тимошенко (розділ 1.2, розділ 3, висновки)
Відповідальний виконавець: аспірант кафедри морфології	26.11.2019	О.С. Максимова (вступ, розділ 4, висновки)
Аспірант кафедри морфології	26.11.2019	Д.В. Муравський (розділ 1.1, розділ 2)
Аспірант кафедри фізіології і патофізіології	26.11.2019	Я.Д. Чумаченко (вступ, розділ 1.1, розділ 2, висновки)
Аспірант кафедри морфології	26.11.2019	Є.С. Дудченко (розділ 1.2)
Фахівець	26.11.2019	Д.В. Годовас (передмова, перелік посилання)
Студентка медичного інституту	26.11.2019	М.І. Даниленко (розділ 1.2, розділ 3)
Студент медичного інституту	26.11.2019	Н.С. Мчедлішвілі (розділ 3, розділ 4)
Студентка медичного інституту	26.11.2019	В.О. Кір'ян (розділ 3, розділ 4)
Студент медичного інституту	26.11.2019	В.М. Удовенко (розділ 2)
Студентка медичного інституту	26.11.2019	Є.А. Гарбузова (розділ 1.1, розділ 2)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 56 с., 4 ч., 2 рис., 10 табл., 94 джерела.

ГІПЕРГЛІКЕМІЯ, ГЕНЕТИЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ, РЕГЕНЕРАЦІЯ, СКЕЛЕТНІ М'ЯЗИ, *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 подальшим аналізом довжин рестрикційних фрагментів, біохімічний, спектрофотометричний, мікро- та ультраструктурний аналіз та методи статистичного аналізу.

Результати досліджень показали відсутність асоціації поліморфного локусу rs997509 гена *ENPP1* із виникненням синдрому діабетичної стопи (СДС). Проте, було показано, що в осіб із ожирінням локус rs997509 пов'язаний із розвитком СДС. Так, у носіїв мінорного Т-алеля ризик розвитку СДС у 9,1 рази вищий ($P = 0,036$), ніж у гомозигот за основним С-алелем. Разом із цим не виявлено зв'язку між поліморфним сайтом С936Т гена *VEGFA* і розвитком СДС. Як до, так і після поправки на коваріати (вік, стать, куріння, індекс маси тіла, ожиріння та артеріальну гіпертензію) жоден із генотипів не був асоційований із ризиком розвитку СДС у пацієнтів з ЦД2 ($P > 0,05$).

Результати експериментальних досліджень на тваринах показали, що у локусах відновного міогістогенезу щурів із хронічною гіперглікемією (ХГ) детектується значне зростання вмісту Na ($P = 0,031$) і Mg ($P = 0,015$) на фоні зменшення концентрації Ca ($P = 0,008$), Fe ($P = 0,025$), Zn ($P = < 0,001$) і Cu ($P = 0,033$). Морфологічно процес регенерації скелетних м'язів щурів із ХГ виявляє себе зменшенням площі регенеруючих м'язових волокон на фоні наявності значної кількості пошкоджених м'язових волокон.

ЗМІСТ

Перелік скорочень, умовних познач, одиниць і термінів	5
Передмова	6
Вступ	7
1 Огляд літератури з питань біохімічних властивостей ENPP1 і VEGF-A та морфологічних характеристик клітин, що задіяні у м'язовій регенерації	9
1.1 Білок та ген ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 та судинного ендотеліального фактору росту А	9
1.2 Морфологічна характеристики клітин, що задіяні у посттравматичному відновленні посмугованої мускулатури	15
2 Аналіз зв'язку генетичного поліморфізму із розвитком синдрому діабетичної стопи в пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу	20
3 Хіміко-аналітична характеристика регенерації скелетних м'язів щурів за умов хронічної гіперглікемії	31
4 Морфологічна характеристика різних фаз відновлення посмугованих м'язів щурів за умов дії на організм хронічної гіперглікемії	37
Висновки	45
Перелік джерел посилання	46

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ

АТ – артеріальний тиск

СДС – синдром діабетичної стопи

ХГ – хронічна гіперлікемія

ЦД – цукровий діабет

ІМТ – індекс маси тіла

BGLAP – кістковий Gla-протеїн (остеокальцин)

ENPP1 – ектонуклеотид пірофосфатаза/фосфодіестераза 1

SNP – однонуклеотидний поліморфізм

VEGF-A – судинний ендотеліальний фактор росту А

G – гуанін

A – аденін

T – тимін

C – цитозин

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 із цим 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 в 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 синдрому діабетичної стопи в пацієнтів із цукровим діабетом 2 типу а також буде реалізовано вивчення структурних особливостей відновних процесів тканин нижньої кінцівки за умов дії на організм хронічної гіперглікемії. Робота у цьому напрямі може мати важливе практичне значення, оскільки знання про нові генетичні маркери дозволить прогнозувати ризик розвитку синдрому діабетичної стопи у хворих із цукровим діабетом 2 типу 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 БІОХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ENPP1 І VEGF-A ТА МОРФОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛІТИН, ЩО ЗАДІЯНІ У М'ЯЗОВІЙ РЕГЕНЕРАЦІЇ

1.1 Білок та ген ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 та судинного ендотеліального фактору росту А

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-B-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 C [29], фактори росту фібробластів [30], цитокіни (IL-1 β і TNF- α) [31]. A. Abhishek і M. 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].

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, активізація 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 неангіогенезу 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 рiст 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 дiмеризації відбувається бiк-у-бiк 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-й 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.

1.2 Морфологічна характеристики клітин, що задіяні у посттравматичному відновленні посмугованої мускулатури

Перші повідомлення про те, що до регенерації м'язів можуть бути залучені нерезидентні стовбурові клітини, було отримане в результаті трансплантаційних досліджень стовбурових клітин, отриманих з кісткового мозку [54]. Група Ferrari et al. показала, що після трансплантації стовбурові клітини кісткового мозку мігрували у ділянку пошкодження скелетного м'яза і диференціювалися у міогенні прогенітори, що в кінцевому рахунку призвело до відновлення пошкоджених волокон.

На сьогодні показано, що інша субпопуляція циркулюючих стовбурових клітин, що мають антиген CD133+ на своїй поверхні, також експресують міогенні маркери. Результати експериментів продемонстрували, що клітини CD133+ можуть не тільки підтримувати клітинні популяції кісткового мозку, диференціюватися в ендотеліальні клітини, але також беруть участь у міогенезі після кокультивації з міобластами [55]. Було також відмічено, що цей тип клітин задіяний як безпосередньо у регенерації м'язів, так і у підтриманні пулу супутникових клітин.

Сьогодні існують докази того, що значна кількість міогенних клітин локалізується в інтерстиційному просторі скелетних м'язів. Одна з популяцій інтерстиційних стовбурових клітин, що селективно мігрує до ушкоджених м'язових волокон, називається мезоангіобластами [56]. Останні є підгрупою пов'язаних із судинами стовбурових клітин, які здатні диференціюватись у кілька типів мезенхімальних клітин, включаючи скелетні м'язи [57].

На відміну від інших типів циркулюючих стовбурових клітин, мезангіобласти мігрують до ушкоджених м'язів. В експериментах на тваринних

моделях м'язової дистрофії було показано, що після доставки до ділянки м'язового ушкодження системним кровообігом ці клітини мігрують за межі судини і відновлюють структуру і функцію мускулатури [58].

Нещодавні дослідження показали, що залучення мезангіобластів до місця м'язового ураження відбувається за допомогою макрофагів, які під час запальної фази секретують у кровообіг такі фактори, як HMGB1, TNF- α і MMP-9 [59]. Крім цього експерименти *in vitro* та *in vivo* показали, що макрофаги здатні регулювати диференціацію мезангіобластів у м'язові прогенітори через систему сигналізації IL-10/IL-10R [60].

Інша фракція інтерстиційних стовбурових м'язових клітин представлена так званими *muscle side population cells* (MSP). Імунологічні аналізи показали, що вони не експресують c-kit, CD43 і CD45 або будь-які інші маркери супутникових клітин. Молекулярним референтом фенотипу MSP є мембранний білок Abcg2 (ATP-binding cassette sub-family G member 2) [61]. На основі експресії Abcg2 в інтерстиції було встановлено, що клітини MSP розташовуються назовні від базальної пластинки м'язового волокна і здебільшого локалізуються біля ендотелію та зовнішнього шару кровоносних судин. Експериментально було показано, що Abcg2-позитивні клітини під час м'язового відновлення дають початок як ендотеліоцитами і перицитам, так і міогенним клітинам [61].

Іншою популяцією м'язових стовбурових клітин є інтерстиційні клітини PW1+/Pax7 (PIC). Уперше вони були виявлені в інтерстиції скелетних м'язів під час вивчення впливу TNF на стовбурові м'язові клітини. Було встановлено, що PIC-клітини експресують PW1 – медіатор клітинного стресу, що задіяний у сигнальній системі TNF-NF κ B [62]. Дослідження *in vitro* показало, що ці клітини здатні давати початок як гладким, так і посмугованим м'язовим клітинам [63].

Однією із провідних сучасних концепцій біології стовбурових клітин є те, що кровоносні судини є системним джерелом клітин-прогеніторів [64]. Мультипотентні стовбурові клітини були виділені з усіх шарів стінки кровоносних судин скелетних м'язів та різних інших органів: інтима містить ендотеліальні клітини-попередники, у медії дрібних кровоносних судин містяться

перипіцити, у медії великих судин – прогенітори гладком'язових клітин, а зовнішній шар містить адвентиційні клітини [65]. Перетин біології камбіальних клітин судин та посмугованих м'язів відкриває нові погляди на регенерацію скелетних м'язів та відкриває цікаві перспективи.

Нещодавно між волокнами посмугованої мускулатури біоптатів скелетних м'язів людини за допомогою конфокальної мікроскопії поблизу судин мікроциркуляторного русла були ідентифіковані міогенні ендотеліальні клітини (MECs) [66]. Ці клітини характеризувались експресією як маркерів супутникових клітин (Pax7 і CD56), так і ендотеліальних маркерів (фактор Віллебранда, VE-кадгерин, CD34).

Колективом Chen et al. експериментально було показано, що після трансплантації MECs реалізували регенерацію м'язових волокон у скелетних м'язах мишей після кардіотоксин-індукованої травми більш ефективно, ніж скелетні міобласти [67].

Сьогодні до клітин міогенного пулу відносять також перипіцити, що являють собою гетерогенну популяцію клітин з точки зору походження, морфології та маркерної експресії.

Встановлено, що окрім свого класичного призначення, перипіцити мають значну фенотипову пластичність і розглядаються у якості мультипотентних клітини-попередників зі здатністю диференціюватися в адипоцити, остеобласти, хондроцити та міобласти [68].

Периваскулярні CD146+ перипіцити, виділені зі скелетних м'язів щурів, пошкоджених кардіотоксином, показали особливості мезенхімальних стовбурових клітин з довгостроковим міогенним потенціалом. Поряд із цим результати експериментів Dellavalle et al. продемонстрували, що судинно-асоційовані перипіцити сприяють постнатальному росту м'язів, проліферації пулу супутникових клітин, а їх кількість значно підвищується під час регенерації м'язів [69].

Останнім часом у сполучнотканинному просторі скелетних м'язів була продемонстрована наявність нового типу клітини із назвою телоцити [70].

Морфологічний аналіз показав, що ці клітини характеризуються малим діаметром тіла (приблизно 10 мкм), бідною на органели цитоплазмою, тонкими і довгими (до сотень мкм) відростками, що створюють значні розгалуження і організують лабіринтоподібні системи. Телоцити константно експресують різні білкові маркери, такі як c-kit, кавеолін-1, CD34, віментин [70], що полегшує їх ідентифікацію за допомогою імуногістохімії.

Крім цього дослідження також показали, що телоцити здатні продукувати VEGF [71]. Таким чином, вони можуть функціонувати як клітинна популяція, що бере участь у процесі ангіогенезу під час новоутворення та ремоделювання тканин.

Також припускається, що телоцити можуть становити продовження фенотипу, що починається від фібробластів, що секретують позаклітинний матрикс, до скорочувальних клітин зі скорочувальним фенотипів, таких як перицити, гладком'язові клітини та міоцити [72].

Нещодавно новий регуляторний механізм міогенезу був виявлений у посмугованій мускулатурі щурів. Було показано, що він включає в себе Tcf4-позитивні фібробласти, що здебільшого локалізуються у сполучнотканинних перетинках посмугованих м'язів [73]. Використовуючи трансгенних щурів автори продемонстрували, що фібробласти м'язів регулюють розвиток і дозрівання м'язових волокон.

Подальші дослідження показали, що взаємодія таких клітин із міосателітоцитами сприяє ефективній регенерації м'язів. Murphy et al. встановили, що пригнічення функціонування Tcf4-позитивних фібробластів на фоні незміненої активності супутникових клітин призводить до гальмування міогенної диференціації останніх та зменшення розмірів новоутворених м'язових волокон [74]. Цікаво, що пригнічення функціонування клітин-супутників не тільки погіршує відновлення м'язів, але також значно знижує активність фібробластів.

Іншу популяція клітин, що перебувають у м'язовому інтерстиції та активуються у відповідь на пошкодження, називають фібро/адипогенними попередниками (FAPs) [75]. Було встановлено, що FAPs експресують рецептор

фактору росту тромбоцитів α (PDGFR α), Sca-1 і CD34 та здатні диференціюватися в бік остеобластних, гладком'язових клітин та міоцитів. Повідомляється, що кількість цих клітин збільшується під час процесу регенерації скелетних м'язів, тоді як їх диференціація гальмується безпосереднім зіткненням з новоутвореними волокнами [76].

2 АНАЛІЗ ЗВ'ЯЗКУ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ІЗ РОЗВИТКОМ СИНДРОМУ ДІАБЕТИЧНОЇ СТОПИ В ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2-ГО ТИПУ

Для дослідження типу «випадок-контроль» була використана венозна кров 154 пацієнтів із ЦД2, ускладненого СДС, які перебували на стаціонарному лікуванні в КУ «Сумська міська клінічна лікарня №5» у відділеннях судинної хірургії і відділенні хірургії №3 протягом 2011-2013 років. Діагноз СДС виставлявся на підставі наказу МОЗ України від 21.12.2012 № 1118 «Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при цукровому діабеті 2 типу». У дослідження не включалися хворі з гострими або хронічними запальними процесами у стадії загострення, онкологічними і системними захворюваннями, вираженою нирковою і печінковою недостатністю, бронхіальною астмою, травмами або великим хірургічним втручаннями.

Контрольна група складалася із 124 осіб без цукрового діабету і порушень толерантності до глюкози. Відсутність інших мультифакторіальних хвороб підтверджували шляхом збору анамнестичних даних, зняття електрокардіограми, вимірювання артеріального тиску, проведення біохімічних досліджень.

Робота виконана відповідно до принципів Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людини в якості об'єкта дослідження» і схвалена Комісією з біоетики Медичного інституту Сумського державного університету. Перед включенням в дослідження всі учасники дали письмову інформовану згоду на використання крові в генетичних дослідженнях.

Для визначення генотипів пацієнтів венозну кров набирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл з калієвої сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти в якості антикоагулянту («Sarstedt», Німеччина) і зберігали при температурі -20°C . Виділення геномної ДНК проводили з використанням комерційного набору «GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit

(Thermo Fisher Scientific, США). Генотипування проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP).

Ділянку гена *ENPP1*, що містить rs997509-сайт, ампліфікували за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (forward) 5'CTACCAAATATGGGCCACTGAT3' і зворотного (reverse) 5'CTGGACCAAGTGTTACCACAAA3' («Metabion», Німеччина). Суміш для ампліфікації складалася з 50-100 нг ДНК, 5 мкл 5-кратного PCR-буфера, 1,5 ммоль сульфату магнію, 150 мкм суміші чотирьох нуклеозидтрифосфатів, по 15 рМ кожного з праймерів і 0,75 ОД Таq-полімерази («Thermo Scientific», США). Обсяг суміші доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Полімеразну ланцюгову реакцію (PCR) проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 («Applied Biosystems», США). Ампліфікація фрагмента 1-го інтрону, що містить C43822T-сайт, складалася з 35 циклів: 1 цикл – 94°C (4 хв), з 2 по 34 цикл – денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – 64°C (40 с) і елонгація – 72°C (1 хв), 35 цикл – 72° С (5 хв). Потім 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 16 годин з 2 ОД рестриктази SsiI (AciI) («Thermo Scientific», США) в буфері О наступного складу: 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ хлориду магнію, 100 мМ хлориду натрію і 0,1 мг/мл альбуміну. Результати рестрикційного аналізу оцінювали наступним чином: якщо в 43822-й позиції гена *ENPP1* знаходився цитозин, ампліфікат (475 пар основ), розщеплювався рестриктазою SsiI на два фрагмента – 223 і 252 пар основ; у разі заміни цитозину на тимін сайт рестрикції для SsiI був відсутній, і в суміші виявлявся один фрагмент розміром 475 пар основ. Ампліфікати досліджуваного фрагмента 1-го інтрону гена *ENPP1* після проведення рестрикції розділяли в 2,5% агарозному гелі, який містив бромистий етидій. Горизонтальний електрофорез (0,1А; 140V) проводили протягом 30 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора «Біоком».

Ділянку гена *VEGFA*, що містить поліморфний локус C936T (rs3025039), ампліфікували за допомогою пари специфічних праймерів: прямий (sense) – 5'-

AAGGAAGAGGAGACTCTGCGCAGAGC-3' і зворотній (antisense) – 5'-TAAATGTATGTATGTGGGTGGGTGTGTCTACAGG-3'. Праймери були синтезовані фірмою Metabion (Німеччина). Для проведення ПЛР брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містить 5 мкл 5-кратного ПЛР-буфера, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 пмоль/л кожного з праймерів і 1 ОД Taq-полімерази (ThermoFisher Scientific, США), обсяг доводили до 25 мкл деіонізованою водою. ПЛР проводили у термоциклері GeneAmpPCR System 2700 (ThermoFisher Scientific, США). Ампліфікація складалася із 33 циклів: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація – 59°C (60 с) і елонгація – 72°C (60 с). Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукту ампліфікації (208 п.н.) інкубували при 37°C протягом 18 год з додаванням 5 ОД рестриктази *Hin1II* (*NlaIII*) (ThermoFisher Scientific, США). Якщо в +936-у положенні 3'-нетрансльованої ділянки гена *VEGFA* знаходився цитозин, ендонуклеаза не знаходила сайту рестрикції і вихідний фрагмент 208 п.н. залишався без змін. У разі заміни цитозину на тимін, рестриктаза *Hin1II* розщеплювала ампліфікат на два фрагмента – 122 п.н. і 86 п.н. Фрагменти рестрикції розділяли за допомогою електрофорезу в 2,0% агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора «Біоком».

Статистичну обробку даних проводили за допомогою пакету програм SPSS-17. Безперервні дані представлені у вигляді середнього значення \pm SD (стандартне відхилення), номінальні дані представлені у вигляді кількісних та відсоткових значень. Перевірку безперервних даних на нормальність розподілу здійснювали за допомогою тесту Колмогорова-Смірнова. Визначення достовірності відмінностей середніх значень між двома вибірками проводили за допомогою *t*-критерію Стьюдента. Для порівняння розподілу генотипів в експериментальній і контрольній групах а також для перевірки відповідності цього розподілу рівновазі Харді-Вайнберга застосовували χ^2 -критерій Пірсона. Для встановлення ризику розвитку СДС у носіїв СТ-генотипу розраховували відношення шансів (OR) і 95% довірчий інтервал (CI). Такі фактори ризику ЦД2, як вік, стать, ІМТ, куріння,

наявність ожиріння та артеріальної гіпертензії (АГ) були застосовані в якості коваріат під час мультіваріабельного логістичного регресійного аналізу. Усі тести були двосторонніми, значення $P < 0,05$ вважали статистично значущими.

У таблиці 2.1 наведено клінічну характеристику 154 пацієнтів із СДС та 124 осіб контрольної групи. Не виявлено достовірної різниці між групами порівняння у значеннях середніх показників діастолічного АТ ($P = 0,109$), а також у співвідношенні осіб, що палять ($P = 0,173$), осіб, що мають ІМТ > 25 кг/м² ($P = 0,060$) та пацієнтів із АГ ($P = 0,121$). Разом з цим значення ІМТ ($P = 0,007$) і вмісту глюкози плазми крові ($P < 0,001$) у хворих з СДС були значно вищими, порівняно з контролем ($P < 0,001$), а показник систолічного АТ ($P < 0,001$), навпаки, був вищим в осіб без СДС. Також групи порівняння відрізнялися за співвідношенням чоловіків та жінок ($P = 0,038$) і наявності осіб із ожирінням ($P = 0,027$). Слід окремо вказати, що середній вік осіб групи контролю ($76,6 \pm 10,2$ року) був значно вищим, ніж у хворих із СДС ($P < 0,001$). Це збільшувало надійність контролю, оскільки зменшувалася ймовірність настання ЦД2 і його ускладнень у цих осіб в майбутніх етапах їхнього життя.

Таблиця 2.1 – Загальна характеристика осіб груп порівняння

Показник	СДС (n = 154)	Контроль (n = 124)	P
Вік, років	64,7 ± 8,2	76,6 ± 10,2	<0,001
Стать, жінки / чоловіки	75/79	45/79	0,038
ІМТ, кг/м ²	29,3 ± 4,9	27,7 ± 4,9	0,007
АТ сист., мм рт.ст.	144,1 ± 17,6	152,8 ± 23,2	<0,001
АТ діаст., мм рт.ст.	88,5 ± 9,6	86,4 ± 12,3	0,109
Глюкоза натще, ммоль/л	10,2 ± 3,5	5,29 ± 0,7	<0,001
ІМТ > 25 кг/м ² , n (%)	122 (79,2)	86 (69,4)	0,060
Ожиріння, n (%)	59 (38,3)	32 (25,8)	0,027
Курці, n (%)	50 (32,5)	31 (25,0)	0,173
Артеріальна гіпертензія, n (%)	108 (70,1)	76 (61,3)	0,121

Примітка. n – кількість пацієнтів, СДС – синдром діабетичної стопи, ІМТ – індекс маси тіла, АТ сист. – систолічний артеріальний тиск, АТ діаст. – діастолічний артеріальний тиск. Порівняння категоріальних змінних реалізовано із використанням χ^2 -тесту, безперервних змінних – t-тесту.

Генотипування пацієнтів із СДС та осіб групи контролю дало можливість встановити частоту алелів та генотипів за поліморфним локусом rs997509 гена ENPP1 у групах порівняння (табл. 2.2). Так, у дослідній групі співвідношення гомозигот СС, гетерозигот СТ і гомозигот ТТ склало 89,6 %, 10,4 % і 0 %, тоді як в контролі 91,4%, 8,1 % і 0 % відповідно. У хворих частота основного (С) і мінорного (Т) алелей склала 95 % та 5 %, а серед здорових – 96 % та 4 %. Представлений розподіл алелів в обох групах не мав достовірних відхилень від рівноваги Харді-Вайнберга ($P > 0,05$). Разом із цим не було виявлено достовірної відмінності частот генотипів між хворими з СДС та групою контролю ($P = 0,508$).

Таблиця 2.2 – Частота алелів і генотипів за rs997509-локусом гена ENPP1 у хворих із СДС та осіб контрольної групи

	СДС (n = 154)	Контроль (n = 124)
Гомозиготи СС, n (%)	138 (89,6)	114 (91,9)
Гетерозиготи СТ, n (%)	16 (10,4)	10 (8,1)
Гомозиготи ТТ, n (%)	0 (0,0)	0 (0,0)
С-алель	0,95	0,96
Т-алель	0,05	0,04
χ^2	0,46	0,22
P_{HW}	> 0,05	> 0,05
P	0,508	

Примітка. n – кількість пацієнтів; СДС – синдром діабетичної стопи; χ^2 і P_{HW} відображають відхилення в кожній групі від рівноваги Харді-Вайнберга; P – показник відмінності розподілу генотипів між групами порівняння.

Як відомо, надмірна вага та ожиріння є однією з основних причин розвитку цукрового діабету. За даними ВООЗ надлишкова маса тіла – причина цукрового діабету в 44 % випадків. У таблиці 2.3 показано, що співвідношення генотипів за rs997509-сайтом у дослідній і контрольній групах окремо серед осіб з $IMT < 25$ кг/м² та $IMT \geq 25$ кг/м² достовірно не відрізнялось ($P = 0,902$ та $P = 0,684$ відповідно). Не було виявлено різниці в розподілі генотипів між групами порівняння і в осіб без ожиріння ($P = 0,065$). При цьому в осіб з

ожирінням частота генотипів за досліджуваним локусом гена *ENPP1* значущо відрізнялась між хворими з СДС та представниками контрольної групи ($P = 0,017$).

Таблиця 2.3 – Розподіл генотипів за rs997509-поліморфізмом гена *ENPP1* в осіб з надмірною масою тіла та ожирінням

Група	n	Генотип, n (%)			P
		C/C	C/T	T/T	
ІМТ < 25 кг/м²					
СДС	54	31 (96,9)	1 (3,1)	0 (0)	0,902
Контроль	93	37 (97,4)	1 (2,6)	0 (0)	
ІМТ ≥ 25 кг/м²					
СДС	263	107 (87,7)	15 (12,3)	0 (0)	0,684
Контроль	209	77 (89,5)	9 (10,5)	0 (0)	
Без ожиріння					
СДС	191	92 (96,8)	3 (3,2)	0 (0)	0,065
Контроль	223	83 (90,2)	9 (9,8)	0 (0)	
Ожиріння					
СДС	126	46 (78,0)	13 (22,0)	0 (0)	0,017
Контроль	79	31 (96,9)	1 (3,1)	0 (0)	

Примітка. n – кількість пацієнтів, ІМТ – індекс маси тіла, СДС – синдром діабетичної стопи.

Результати регресійного аналізу зв'язку генотипів за rs997509-локусом гена *ENPP1* із розвитком СДС представлені в таблиці 2.4. Методом бінарної логістичної регресії було виявлено значущу асоціацію досліджуваного поліморфного сайту з ризиком настання СДС лише в осіб із ожирінням ($OR_C = 8,761$; 95% CI = 1,090-70,430; $P_C = 0,041$). Після поправки на вік, стать, звичку курити, ІМТ, наявність артеріальної гіпертензії, цей висновок був підтверджений. Показано, що в осіб із ожирінням, які є носіями мінорного T-алеля, ризик розвитку СДС достовірно вище, ніж у CC-гомозигот ($OR_{II} = 9,707$; 95% CI = 1,159-81,290; $P_{II} = 0,036$).

Таблиця 2.4 – Аналіз зв'язку генотипів за rs997509-локусом гена *ENPP1* із ризиком настання СДС в осіб різних підгруп

	Модель	P_c	OR _c (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	OR _{попр} (95 % CI)
Загальна група					
	CT vs CC	0,509	1,322 (0,577–3,025)	0,818	1,347 (0,110–16,578)
ІМТ					
ІМТ < 25 кг/м ²	CT vs CC	0,902	1,194 (0,072–19,876)	0,994	1,031 (0,012–21,042)
ІМТ ≥ 25 кг/м ²	CT vs CC	0,684	1,199 (0,499–2,882)	0,926	1,044 (0,423–2,574)
Ожиріння					
Без ожиріння	CT vs CC	0,079	0,301 (0,079–1,148)	0,053	0,257 (0,065–1,015)
Ожиріння	CT vs CC	0,041	8,761 (1,090–70,430)	0,036	9,707 (1,159–81,290)

Примітки. 95% CI – 95% довірчий інтервал; P_c – спостережуване значення P (без поправки на коваріати); OR_c – спостережуване відношення шансів; $P_{\text{попр}}$ – значення P після поправки на вік, стать, звичку палити, ІМТ, наявність ожиріння і АГ; OR_{попр} – відношення шансів після поправки на коваріати.

Отримані нами результати підтверджують наявні дані про асоціацію rs997509-локусу гена *ENPP1* із ризиком настання ЦД2 і його важливу роль у розвитку ожиріння. Так, групою Vochenski J. і співавт. показано, що поліморфний сайт rs997509 1-го інтрона гена *ENPP1* пов'язаний із високим ризиком ЦД2 в осіб з ожирінням у польській популяції [77]. Колективом Santoro N. і співавт. під час дослідження впливу rs997509-локусу гена *ENPP1* на розвиток метаболічного синдрому і порушення толерантності до глюкози при ожирінні зафіксовано, що діти із ожирінням, які є носієм мінорного Т-алеля за rs997509-поліморфним локусом, мають більш високу концентрацію інсуліну в плазмі крові, більш високий індекс інсулінорезистентності (НОМА – Homeostasis Model Assessment) та нижчі показники індексу чутливості до інсуліну (WBISI – whole body insulin sensitivity index) [78]. Автори зробили висновок про те, що Т-алель за сайтом rs997509 може бути асоційований із розвитком метаболічного синдрому та

інсулінорезистентності у дітей з ожирінням. Разом із цим у роботі вчених Matsha T. і співавт. встановлена значна різниця у співвідношенні T-алеля за rs997509-сайтом між пацієнтами із ожирінням і контрольною групою у південноафриканській популяції [79]. Автори зробили висновок про те, що наявність T-алеля за вказаним сайтом підвищує ризик ожиріння у його носіїв.

На сьогодні відсутні дослідження щодо встановлення ролі rs997509-поліморфізму гена ENPP1 у розвитку хронічних ускладнень ЦД2, зокрема синдрому діабетичної стопи. Таким чином, наше дослідження є першим щодо встановлення можливого зв'язку rs997509-локусу із ризиком СДС. Разом з цим слід сказати, що вплив на розвиток деяких ускладнень ЦД2 виявлений для добре дослідженого rs1044498-сайту гена ENPP1 [79]. З огляду на ту обставину, що в більшості досліджуваних популяцій поліморфний сайт rs997509 гена ENPP1 знаходиться в нерівноважному зчепленні з поліморфним локусом rs1044498 цього гена, а також той факт, що гаплотипний аналіз є більш ефективним в якості пошуку генетичних предикторів, ніж аналіз поліморфізму поодиноких нуклеотидів, наші подальші дослідження будуть спрямовані на генотипування пацієнтів представлених в даній роботі груп за rs1044498-сайтом з метою подальшого аналізу зв'язку гаплотипів гена ENPP1 із розвитком СДС в осіб із цукровим діабетом 2-го типу.

У таблиці 2.5 представлені частоти основного (C) і мінорного (T) алелей і наведений розподіл генотипів за C936T-поліморфним сайтом 3'UTR гена *VEGFA* у хворих із СДС і представників групи контролю. Показано, що частоти зазначених генотипів у контрольній і дослідній групах не відхилялись від рівноваги Харді-Вайнберга ($P > 0,05$). Порівняння частот трьох можливих варіантів генотипів, утворених поліморфним локусом C936T гена *VEGFA*, між пацієнтами з СДС та представниками групи контролю показало відсутність значущої різниці ($P = 0,413$).

Таблиця 2.5 – Частота алелів і генотипів за С936Т-поліморфізмом гена *VEGFA* у групах порівняння

	СДС (n = 154)	Контроль (n = 124)
Гомозиготи СС, n (%)	73 (47,4)	62 (50,0)
Гетерозиготи СТ, n (%)	64 (41,6)	54 (43,5)
Гомозиготи ТТ, n (%)	17 (11,0)	8 (6,5)
С-алель	0,68	0,72
Т-алель	0,32	0,28
χ^2	0,27	0,69
P	> 0,05	> 0,05

Примітки. n – кількість пацієнтів; СДС – синдром діабетичної стопи; χ^2 і P відображають відхилення в кожній групі від рівноваги Харді-Вайнберга

Результати регресійного аналізу зв'язку генотипів за С936Т-поліморфізмом гена *VEGFA* із розвитком СДС у рамках домінантної, рецесивної, наддомінантної та адитивної моделей успадкування показані в таблиці 2.6. Застосування бінарної логістичної регресії не виявило достовірної асоціації досліджуваного локусу з розвитком СДС в рамках жодної з моделей ($P > 0,05$). Після цього була використана мультіваріабельна логістична регресія. Однак, і після поправки на вік, стать, ІМТ, наявність ожиріння, АГ і звичку палити значущого зв'язку різних генотипів за поліморфним локусом 3'UTR гена *VEGFA* із розвитком СДС встановити не вдалося ($P > 0,05$).

Однонуклеотидний поліморфізм rs3025039 являє собою заміну цитозину на тимін у +936 положенні 3'-нетрансльованої ділянки гена *VEGFA*. Така точкова заміна може запобігати приєднанню транскрипційного фактору AP-4 (transcription factor activating enhancer binding protein 4), що, у свою чергу, може впливати на якісні і кількісні характеристики майбутньої мРНК [80]. Відповідно до цього, на сьогодні продемонстровано зв'язок 936Т-локусу гена *VEGFA* зі зниженням рівня його експресії та плазмової концентрації його білка [81].

Таблиця 2.6 – Аналіз зв'язку С936Т-поліморфізму гена *VEGFA* з СДС у рамках різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	OR _{спост} (95% CI)	$P_{\text{попр}}$	OR _{попр} (95% CI)
Домінантна	0,667	1,110 (0,691-1,781)	0,743	1,085 (0,667-1,765)
Рецесивна	0,189	1,799 (0,749-4,320)	0,218	1,761 (0,716-4,333)
Супердомінантна	0,739	0,922 (0,571-1,487)	0,701	0,908 (0,556-1,484)
Адитивна ^а	0,979	1,007 (0,613-1,653)	0,962	0,988 (0,594-1,643)
	0,201	1,805 (0,729-4,466)	0,239	1,751 (0,690-4,447)

Примітки. 95% CI – 95% довірчий інтервал; $P_{\text{спост}}$ – спостережуване значення P (без поправки на коваріати); OR_{спост} – спостережуване відношення шансів; $P_{\text{попр}}$ – значення P після поправки на вік, стать, звичку до паління, ІМТ, наявність ожиріння і АГ; OR_{попр} – відношення шансів після поправки на коваріати.

^а Перший рядок в адитивній моделі відображає порівняння СТ-генотипу із СС-генотипом, другий рядок – порівняння ТТ-генотипу із генотипом СС.

За останні роки виконано ряд робіт, присвячених вивченню впливу rs3025039-поліморфізму гена *VEGFA* на розвиток ЦД2 та його ускладнень. Так, колективом Sellami et al. показано зв'язок цього локусу із розвитком та тривалістю перебігу ЦД2 серед населення Тунісу [82]. Групою російських авторів Klimontov et al. встановлено зв'язок С936Т-сайту з концентрацією *VEGFA* у плазмі крові та розвитком ішемічної хвороби серця у пацієнтів із ЦД2 [83]. А результати мета-аналізу, виконаного Han et al., продемонстрували міцний зв'язок С936Т-поліморфізму гена *VEGFA* із ризиком розвитку діабетичної ретинопатії серед населення Китаю [84].

У нашій роботі вперше був проведений аналіз зв'язку С936Т-поліморфного сайту гена *VEGFA* із ризиком розвитку СДС серед українських пацієнтів із ЦД2. Порівняння частот генотипів за вказаним локусом між пацієнтами експериментальної і контрольної груп, а також регресійний аналіз без і з поправкою на різні фактори ризику цукрового діабету не дозволили встановити зв'язку поліморфного сайту С936Т гена *VEGFA* із розвитком СДС в українській популяції.

Однак, роботами декількох колективів на сьогодні вже доведено зв'язок інших поліморфних локусів гена *VEGFA* з розвитком СДС. Групою Xiaolei et al. продемонстрована протективна роль rs699947-локусу гена *VEGFA* щодо розвитку СДС у китайських пацієнтів [85]. Подібний захисний ефект щодо розвитку СДС, а також зв'язок із вмістом білка в плазмі крові був виявлений Li et al. для поліморфного сайту G-634C гена *VEGFA* [86].

З ХІМІКО-АНАЛІТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГЕНЕРАЦІЇ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ

Для виконання експерименту використано 80 лабораторних білих щурів-самців зрілого віку (7-9 місяців): 40 тварин – контрольна група; 40 тварин – дослідна група (тварини зі змодельованою ХГ).

Щури спостерігались відповідно до вимог та положень щодо догляду за лабораторними тваринами («Правила проведення робіт з використанням експериментальних тварин», додаток 4, затверджений наказом Міністерства охорони здоров'я № 755 від 12 серпня 1997 р., «Про заходи щодо подальшого удосконалення організаційних форм роботи з використанням експериментальних тварин»; «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах», ухвалені Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.); Хельсинська декларація Генеральної асамблеї Всесвітньої медичної асоціації (2000); положення «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985). Під час проведення дослідження норми моралі та етики порушені не були. Тварини находились у приміщенні віварію за умов постійної температури (24-25 °С), вологості ($60 \pm 5\%$) та за умов 12-годинного циклу зміни темряви та освітлення.

ХГ у тварин експериментальної групи моделювали за допомогою двотижневого навантаження 10 % розчином фруктози з подальшим одноразовим інтраперитонеальним уведенням стрептозотоцину у цитратному буфері (рН буфера – 4,5; доза стрептозотоцину – 40 мг/кг) і нікотинової кислоти (1 мг/кг). Тварини групи контролю отримували одноразову ін'єкцію стерильного цитратного буферу.

Механічну травму у тварин обох груп відтворювали на триголовому м'язі литки шляхом лінійного розрізу перпендикулярно ходу м'язових волокон із подальшим зіставленням та зшиванням країв рани. Перед втручанням щурам внутрішньом'язово вводили ксилазин (3 мг/кг) та кетамін (8 мг/кг).

Щурів обох груп виводили із експерименту на 3, 7, 14 та 28 добу за допомогою передозування тіопенталового наркозу (4мг/100 г маси тіла).

Визначення вмісту K, Na, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu у регенератах посмугованих м'язів щурів проводили методами атомно-абсорбційної спектрометрії з електротермічною та полуменевою атомізацією. Триголовий м'яз литки обсушували фільтрувальним папером для видалення надлишку рідин. Зразки зважували у фторопластових стаканах на електронних вагах ANG100C II класу («AXIS», Україна). Після зважування стакани зі зразками скелетних м'язів переносили у фторопластовий автоклав і вносили 3 мл нітратної кислоти для кислотної мінералізації. Контроль вмісту елементів у реактивах та на стінках посуду здійснювали за допомогою «холостої проби».

Автоклави нагрівали на лабораторній електричній плитці Saturn ST-EC1161 (Чехія) із термостатом (температура 150-160 °C) упродовж 2 годин, охолоджували, вміст стаканів переносили в мірні пробірки і доводили бідистилятом до 10 мл. Після автоклавної мінералізації отримували безбарвні прозорі рідини, придатні для визначення вмісту хімічних елементів атомно-абсорбційними методами.

Концентрацію K, Na та Ca визначали на спектрофотометрі S-115-M1 AT («Selmi», Україна) з полуменевою атомізацією в режимі емісії (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Спектральні умови вимірювання та атомізації для K, Na, Ca

Елемент	Довжина хвилі, нм	Спектральна щілина, нм	Горючий газ	Окисник	Тем-ра полум'я	Тип полум'я
K	769,9	0,4	C ₂ H ₂	Повітря	2300	Окисне
Na	589,0	0,4	C ₂ H ₂	Повітря	2300	Окисне
Ca	422,7	0,4	C ₂ H ₂	N ₂ O	2950	Стехіометричне

Визначення концентрації Mg, Fe, Zn та Cu проводили на атомно-абсорбційному комплексі CAS-120.1 («Selmi», Україна) з електротермічним атомізатором А-5 і графітовою піччю Carl Zeiss Jena (Німеччина) в режимі адсорбції (табл. 3.2).

Таблиця 3.2 – Спектральні та температурно-часові режими вимірювань

Елемент	Довжина хвилі, нм	Ширина щілини, нм	Піроліз		Атомізація	
			T, °C	τ, с	T, °C	τ, с
Mg	202,6	0,4	1 000	10	2 200	5
Fe	372,0	0,4	1 000	10	2 500	5
Zn	213,9; 307,4	1,0	600	10	2 100	5
Cu	324,7	0,4	1 000	10	2 500	5

Проби відміряли і вносили в піч дозатором FAA-50 об'ємом 10 мкл. Аналітичний сигнал сканували з кроком 0,016 с та обробляли програмою «AAS-SPECTR3».

Математичний аналіз даних здійснювали за допомогою електронного пакету SPSS (version 17.0). Розподіл величин у групах порівняння перевіряли на нормальність послуговуючись критерієм Колмогорова-Смірнова. Числові дані представлені у вигляді $M \pm SD$. Достовірність відмінностей між дослідною та контрольною групами визначали за допомогою *t*-критерію Стьюдента для незалежних вибірок. Відмінність вважали достовірною, якщо вірогідність випадкової різниці не перевищувала 0,05 ($P < 0,05$).

У таблиці 3.3 представлені результати визначення вмісту K, Na, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu у скелетних м'язах щурів груп порівняння у різні терміни посттравматичної регенерації.

Показано, що на 3-у добу після ушкодження у місцях дефекту посмугованих м'язів тварин із ХГ концентрація Ca достовірно знизилась на 30,8 % ($P = 0,011$), концентрація Fe – на 15,8 % ($P = 0,035$), концентрація Zn – на 83,7 % ($P < 0,001$), а вміст Cu – на 17,9 % ($P = 0,028$), порівняно із щурами контрольної групи. Вміст K, Na та Mg у вказаний термін статистично значимо не відрізнявся між групами порівняння ($P > 0,05$).

На 7-у добу від початку експерименту у місцях ураження скелетних м'язів щурів із ХГ вміст Ca був значимо меншим на 28,2 % ($P = 0,016$), вміст Fe – на 13,6 % ($P = 0,037$), вміст Zn – на 80,3 % ($P < 0,001$), ніж у тварин групи контролю. При

цьому різниці в концентрації K, Na, Mg та Cu між обома групами виявлено не було ($P > 0,05$).

Таблиця 3.3 – Вміст макро- та мікроелементів у скелетних м'язах щурів без та з хронічною гіперглікемією

Група	Елемент						
	K (мг/г)	Na (мг/г)	Ca (мг/г)	Mg (мг/г)	Fe (мкг/г)	Zn (мкг/г)	Cu (мкг/г)
3 доба							
Контроль (n = 10)	4,11 ± 0,47	0,72 ± 0,27	0,39 ± 0,07	0,40 ± 0,12	19,56 ± 2,71	101,49 ± 20,03	0,39 ± 0,07
Експеримент (n = 10)	3,77 ± 0,44	0,75 ± 0,26	0,27 ± 0,11	0,41 ± 0,15	16,47 ± 3,31	16,56 ± 5,81	0,32 ± 0,07
P	0,120	0,793	0,011	0,844	0,035	< 0,001	0,028
7 доба							
Контроль (n = 10)	3,96 ± 0,49	0,79 ± 0,21	0,39 ± 0,09	0,41 ± 0,10	19,92 ± 2,37	100,82 ± 19,63	0,39 ± 0,06
Експеримент (n = 10)	3,68 ± 0,32	0,81 ± 0,23	0,28 ± 0,10	0,46 ± 0,13	17,21 ± 2,97	19,88 ± 4,95	0,35 ± 0,06
P	0,159	0,852	0,016	0,368	0,037	< 0,001	0,092
14 доба							
Контроль (n = 10)	3,88 ± 0,35	0,71 ± 0,13	0,39 ± 0,04	0,39 ± 0,09	20,18 ± 2,36	95,60 ± 14,39	0,37 ± 0,06
Експеримент (n = 10)	3,58 ± 0,39	0,82 ± 0,11	0,33 ± 0,05	0,47 ± 0,10	17,88 ± 1,96	19,29 ± 4,66	0,29 ± 0,06
P	0,089	0,045	0,016	0,081	0,030	< 0,001	0,018
28 доба							
Контроль (n = 10)	3,86 ± 0,30	0,75 ± 0,14	0,38 ± 0,03	0,39 ± 0,08	20,31 ± 2,09	92,49 ± 10,22	0,36 ± 0,05
Експеримент (n = 10)	3,66 ± 0,32	0,88 ± 0,10	0,33 ± 0,04	0,50 ± 0,08	18,33 ± 1,48	19,65 ± 2,14	0,29 ± 0,07
P	0,176	0,031	0,008	0,015	0,025	< 0,001	0,033

Примітки. результати представлені у вигляді $M \pm SD$. Порівняльний аналіз виконаний методом t-критерію для незалежних вибірок.

Починаючи з 14-ї доби відмінність умісту елементів була більш виразною. Так, на 14-у добу після механічної травматизації у регенератах триголового м'яза литки щурів із ХГ кількість Na була на 15,5 % більшою ($P = 0,045$), ніж у відповідному контролі. При цьому концентрація Ca виявилась меншою на 15,4 %

($P = 0,016$), концентрація Fe – на 11,4 % ($P = 0,030$), уміст Zn – на 79,8 % ($P < 0,001$), а вміст Cu – на 21,6 % ($P = 0,018$), якщо порівнювати із тваринами контрольної серії. Концентрації K і Mg у цей термін не відрізнялись між дослідною та контрольною групами ($P > 0,05$).

На 28-у добу різниця в концентрації хімічних елементів у регенеруючих скелетних м'язах між групами порівняння була відсутньою лише для K ($P = 0,176$). Поряд із цим уміст Na і Mg у регенератах тварин із ХГ виявився більшим відповідно на 17,3 % ($P = 0,031$) та 28,2 % ($P = 0,015$), порівняно із групою контролю. Натомість концентрація Ca у місцях відновного міогенезу щурів експериментальної групи була меншою на 13,2 % ($P = 0,008$), концентрація Fe – на 9,7 % ($P = 0,025$), уміст Zn – на 78,8 % ($P < 0,001$), а вміст Cu – на 19,4 % ($P = 0,033$), ніж у регенератах контрольних тварин.

На сьогодні, найбільш поширеною причиною ураження м'язів вважається механічна травма [87]. Вона призводить до порушення цілісності базальної пластинки і плазматичної мембрани м'язового волокна, що викликає масивне затікання позаклітинних іонів кальцію та призводить до деградації м'язових білків і некрозу. Після цього відбувається фокальна дегенерація скелетного м'язу, що виявляє себе набуханням та утворенням гематоми. Після початкової дегенерації розпочинається, опосередкований міосателітоцитами, процес регенерації м'язів. При цьому відомо, що ХГ є причиною зниження кількості і міогенної здатності сателітних клітин, що у кінцевому рахунку стає причиною пригнічення посттравматичної регенерації скелетних м'язів [88].

Разом із цим на сьогодні показано, що розлади гомеостазу різних хімічних елементів мають вагоме значення для розвитку як гіперглікемічних станів, так і порушень відновного міогенезу. Так, наприклад, показано, що дефіцит Ca і Mg може бути причиною гіпоінсулінемії, а у крові пацієнтів із ЦД2 спостерігається зменшення концентрації Fe, Cu, Zn, та Mn [89]. Поряд із цим у роботі Jinno et al. показано, що дефіцит цинку призводить до затримки регенерації скелетних м'язів щурів після їх ураження кардіотоксином [90].

У нашій попередній роботі [91] було виявлено, що у посмугованій мускулатурі щурів зі змодельованою ХЗ спостерігається зменшення концентрації К, Са, Zn, Fe та Cu, порівняно із тваринами групи контролю. Ці дані здебільшого співпадають із результатами Presley et al. [92]. Проте, ними було повідомлено також і про збільшення вмісту Na і Mg у скелетних м'язах тварин із надмірним вмістом глюкози крові.

4 МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РІЗНИХ ФАЗ ВІДНОВЛЕННЯ ПОСМУГОВАНИХ М'ЯЗІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ДІЇ НА ОРГАНІЗМ ХРОНІЧНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ

Для експерименту було використано 90 лабораторних білих щурів-самців зрілого віку (7-9 місяців): 40 щурів – контрольна група; 40 щурів – дослідна група (тварини зі змодельованою ХГ); 10 щурів – група контролю гіперглікемії. Тварини доглядалися відповідно до загальноприйнятих рекомендацій, вимог та положень щодо догляду за лабораторними тваринами («Правила проведення робіт з використанням експериментальних тварин», додаток 4, затверджений наказом Міністерства охорони здоров'я № 755 від 12 серпня 1997 р., «Про заходи щодо подальшого удосконалення організаційних форм роботи з використанням експериментальних тварин»; «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах», ухвалені Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.); Хельсинська декларація Генеральної асамблеї Всесвітньої медичної асоціації (2000); положення «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985). Під час проведення експериментальних робіт норми етики і моралі порушені не були. Щури знаходились у кімнаті віварію за умов сталої температури (24-25 °С), вологості ($60 \pm 5\%$) та за умов 12-годинного циклу зміни темряви та освітлення.

Моделювання ХГ у тварин дослідної групи та групи контролю гіперглікемії проводили наступним чином. Протягом двох тижнів щури замість питної води вживали 10 % водний розчин фруктози. Після цього кожній істоті було одноразово виконане внутрішньоочеревинне введення стрептозотоцину у цитратному буфері (рН буфера – 4,5; доза стрептозотоцину – 40 мг/кг) та нікотинової кислоти (1 мг/кг). Щурам контрольної групи була зроблена одноразова внутрішньоочеревинна ін'єкція стерильного цитратного буферу.

Тварини групи контролю гіперглікемії слугували для оцінки стану глюкозного гомеостазу та підтвердження наявності гіперглікемії. Для цього на 60 добу після відтворення моделі визначали показники вмісту глюкози натще,

інсуліну, глікозильованого гемоглобіну та С-пептиду в плазмі крові тварин. Також у рамках біохімічного аналізу крові визначали у щурів показники ліпідного обміну.

Після 60-и діб від відтворення ХГ щурам дослідної та контрольної груп була змодельована механічна травма триголового м'яза литки. Перед операцією тваринам внутрішньом'язово вводили спочатку ксилазин (3 мг/кг), а через 5 хвилин – кетамін (8 мг/кг). Травму відтворювали шляхом лінійного глибокого розрізу перпендикулярно ходу м'язових волокон з подальшим зіставленням та зшиванням країв рани.

Вивчення морфологічних особливостей регенерації скелетних м'язів проводили на 3, 7, 14 та 28 добу після нанесення механічної травми. Тварин із експерименту виводили по 10 істот з групи у кожний термін шляхом передозування тіопенталового наркозу (4мг/100 г маси тіла).

З метою вивчення мікроскопічної будови відпрепаровані ділянки м'яза з візуальним дефектом фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну протягом двох діб. Зразки зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації та проводили заливку в парафін. З одержаних препаратів робили поздовжні (по ходу м'язових волокон) та поперечні (поперек м'язових волокон у місці дефекту) зрізи на санному мікротомі МС-2 з товщиною зрізів 4-6 мкм. Далі гістологічні зрізи фіксували на знежирені предметні скельця та висушували. Фарбування проводили гематоксилін-еозином та пікросиріусом червоним. У кожній підгрупі забір зразків триголового м'яза на гістологічний аналіз проводили від усіх 10 щурів.

Світлову мікроскопію проводили з використанням мікроскопу Olympus BH-2 (Японія) (біокуляр $\times 10$, $\times 15$, об'єктиви $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$). Фотографування гістологічних препаратів виконували цифровою камерою Baumer/optronic Тур: CX 05с. Мікроморфометричний аналіз здійснювали за допомогою мікросітки, мікролінійки та з використанням універсальної обчислювальної програми «Digimizer». Вивчення гістологічних препаратів проводили у зоні безпосереднього дефекту, у перицентральної ділянці (зона м'язу, що безпосередньо прилягає до місця дефекту) та у прикорайовій ділянці (зона м'язу,

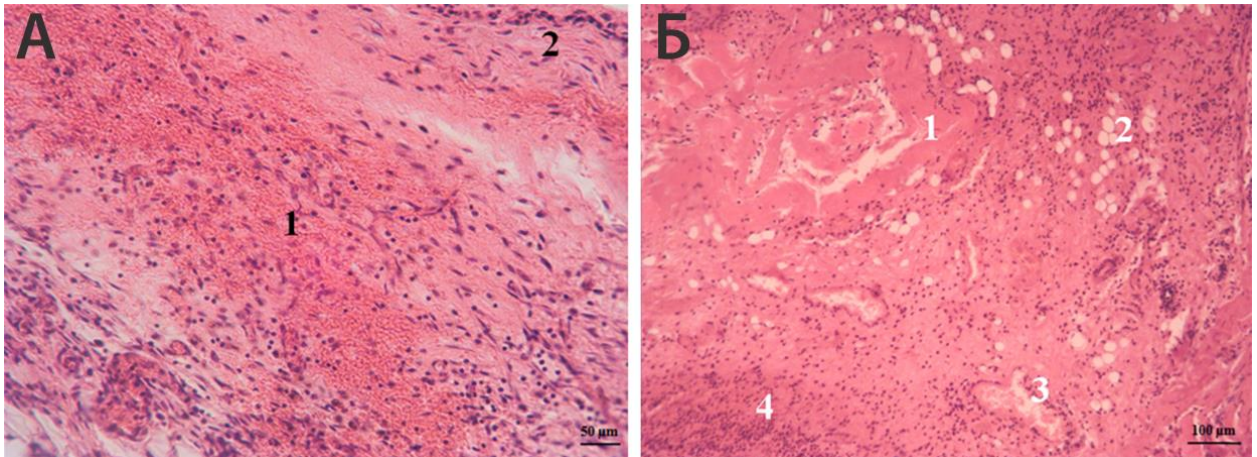
що прилягає до неураженої частини органу). Морфометричний аналіз включав визначення кількості різних м'язових волокон та площі їх поперечного перетину. Усі м'язові волокна були розділені на три типи: нормальні м'язові волокна (НМВ), пошкоджені м'язові волокна (ПМВ) та регенеруючі м'язові волокна (РМВ).

Статистичне опрацювання проводили із використанням пакету програм SPSS-17. Безперервні дані представлені у вигляді середньої арифметичної (M) та середнього квадратичного відхилення (SD). Величини на нормальність розподілу перевіряли за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова. Визначення достовірності відмінностей між вибірками проводили із використанням параметричного критерію Стьюдента (t) для дох незалежних вибірок. Відмінність вважали достовірною, якщо значення P не перевищувало 0,05 ($P < 0,05$).

Морфологічний аналіз регенераторного процесу триголового м'яза литки показав, що у щурів контрольної групи на 3-у добу після нанесення травми місце дефекту було інфільтровано еритроцитами, нитками фібрину, фібробластами та клітинами лейкоцитарного ряду (рисунок 4.1А). Клітини мали відносно упорядковане розміщення вздовж пучків молодих колагенових волокон різної щільності. Процес міогенезу на цій стадії також характеризувався вираженим неоангіогенезом.

У тварин із хронічною гіперглікемією на 3 добу експерименту місце дефекту було заповнено запальним детритом з великою кількістю лейкоцитів та жирових клітин (рисунок 4.1Б). Біля країв рани відзначалися некротизовані м'язові волокна. Проростання мікросудин відбувалось менш інтенсивно, порівняно із контролем. Капіляри мали розширені просвіти, неправильну форму та неповноцінні деструктуризовані стінки.

Рисунок 4.1 – Ділянка дефекту триголового м'яза литки щурів груп порівняння



Примітки. А: Ділянка дефекту триголового м'яза литки щурів контрольної групи на 3-у добу після нанесення травми. 1 – еритроцити в центральній зоні дефекту; 2 – молоді колагенові волокна. Б: Ділянка дефекту триголового м'яза литки щура дослідної групи на 3-у добу після нанесення травми. 1 – некротичні м'язові волокна; 2 – ліпоцити; 3 – капіляри; 4 – детрит. Забарвлення гематоксиліном і еозином.

У таблиці 4.1 представлені результати морфометричного аналізу. Показано, що на 3-у добу після травми у тварин груп порівняння кількість НМВ у перичентральній та крайовій зонах була однаковою ($P = 0,185$ та $P = 0,876$, відповідно). Поряд із цим у щурів із ХГ кількість ПМВ у перичентральній зоні була на 8,1 % ($P = 0,023$), а у крайовій зоні – на 20,2 % ($P < 0,001$) вищою, якщо порівнювати із контролем. РМВ на цій стадії не визначались.

У групі контролю на 7-у добу після травми м'язові волокна, що знаходились у перинекротичній зоні, були дезорганізованими. У цих ділянках спостерігався перивазальний набряк та повнокрів'я судин. Центральне місце дефекту було заповнено багаточисленними фібробластами та пучками невпорядковано розміщених колагенових волокон.

Таблиця 4.1 – Кількість м'язових волокон різного типу у зонах регенерації скелетних м'язів щурів груп порівняння

Доба	Кількість нормальних м'язових волокон					
	Перицентральнона зона			Крайова зона		
	Контроль	Гіперглікемія	P	Контроль	Гіперглікемія	P
3	63,0 ± 4,8	60,3 ± 3,9	0,185	347,6 ± 21,1	346,1 ± 21,2	0,876
7	56,4 ± 6,6	54,0 ± 3,3	0,317	343,7 ± 21,8	312,7 ± 15,3	0,002
14	72,2 ± 4,8	66,4 ± 4,4	0,011	339,6 ± 21,7	319,1 ± 18,1	0,034
28	114,6 ± 8,5	100,1 ± 9,3	0,002	401,8 ± 22,4	365,6 ± 17,8	0,001
Доба	Кількість пошкоджених м'язових волокон					
	Перицентральнона зона			Крайова зона		
	Контроль	Гіперглікемія	P	Контроль	Гіперглікемія	P
3	210,4 ± 15,9	227,4 ± 14,6	0,023	135,2 ± 8,9	162,5 ± 10,1	< 0,001
7	202,7 ± 23,7	225,4 ± 14,0	0,018	129,5 ± 8,3	175,7 ± 8,7	< 0,001
14	197,2 ± 12,9	283,3 ± 18,9	< 0,001	59,9 ± 3,9	108,0 ± 6,2	< 0,001
28	47,4 ± 3,5	150,1 ± 14,0	< 0,001	18,3 ± 1,1	45,7 ± 2,3	< 0,001
Доба	Кількість регенеруючих м'язових волокон					
	Перицентральнона зона			Крайова зона		
	Контроль	Гіперглікемія	P	Контроль	Гіперглікемія	P
3	0	0	–	0	0	–
7	22,5 ± 2,7	5,9 ± 0,3	< 0,001	25,1 ± 1,7	9,6 ± 0,5	< 0,001
14	211,5 ± 14,1	92,9 ± 6,2	< 0,001	100,1 ± 6,3	87,5 ± 5,1	< 0,001
28	512,3 ± 38,7	375,0 ± 35,2	< 0,001	188,8 ± 10,4	159,8 ± 7,7	< 0,001

Примітки. Результати представлені у вигляді M ± SD.

У дослідній групі на 7 добу дослідження в місці дефекту та серед пучків м'язових волокон, прилеглих до некротичного вогнища, відбулось значне розростання сполучної тканини. Разом із цим зберігались жирові клітини, ділянки еритроцитарної та лейкоцитарної інфільтрації. Щільність капілярів була нижчою, порівняно з контрольною групою. У прикрайовій зоні дефекту м'язові волокна зазнавали подальшого руйнування, тим самим розширюючи ділянку ушкодження.

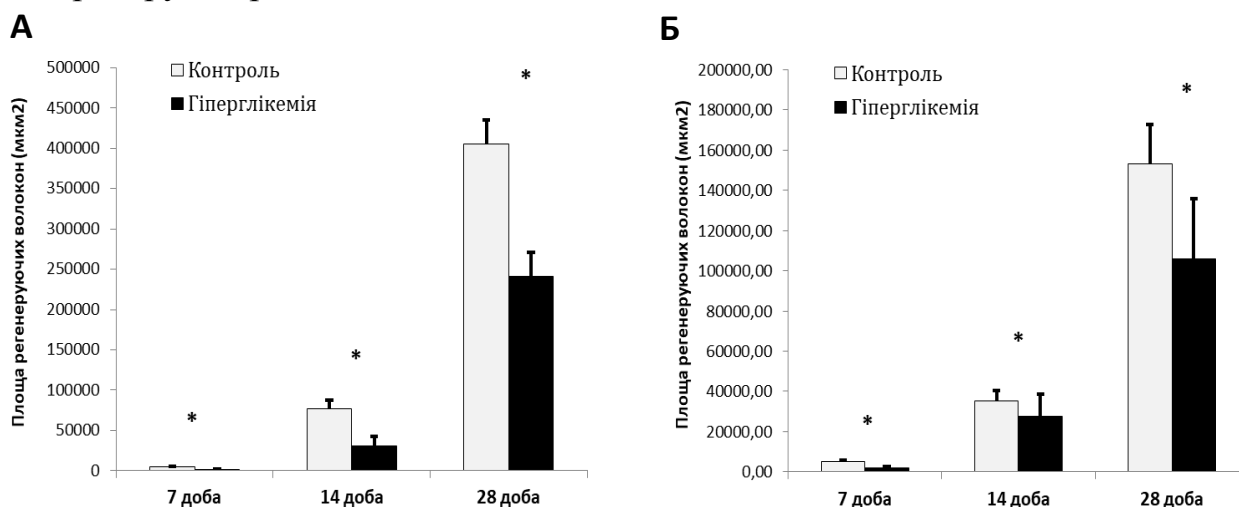
Результати морфометрії продемонстрували, що в обох групах кількість НМВ у перичентральній зоні була однаковою ($P = 0,317$). Тоді як у крайовій зоні їх кількість у щурів експериментальної групи була на 9 % меншою ($P = 0,002$). Кількість ПМВ у тварин дослідної групи була більшою на 11,2 % ($P = 0,018$ – у перичентральній зоні) та на 35,7 % ($P < 0,001$ – у крайовій зоні). А кількість РМВ у цих щурів була меншою. Так у перичентральній зоні їх було менше на 73,8 % ($P < 0,001$), а у прикрайовій зоні – на 61,8 % ($P < 0,001$). На рисунку 4.2 представлені результати порівняння загальної площі РМВ між контрольними та дослідними тваринами. Показано, що на 7-у добу після ураження у щурів експериментальної групи показник наведеного параметру був значущо меншим ($P < 0,001$ – для перичентральної та крайової зон).

На 14-у добу м'язовий регенерат тварин контролю був заповнений міогенними клітинами різної форми, розміщеними серед пучків колагенових волокон та фібробластів. Відбувалось більш активне проростання місця дефекту мікросудинами порівняно з попередніми строками. Також у частині новостворених судин мікроциркуляторного русла спостерігалися структурні зміни, що полягали у розширенні їх просвітів, внаслідок чого відбувалося пропотівання формених елементів крові у навколишні тканини.

На 14-у добу після травмування триголового м'яза литки у тварин дослідної групи в місці дефекту зросла синтетична активність фібробластів. Разом із цим більш інтенсивно, порівняно з попередніми термінами, відбувалось проростання мікросудин.

Морфометричний аналіз встановив, що кількість НМВ у дослідній групі була меншою на 8 % ($P = 0,011$ – для перичентральної зони) і на 6 % ($P = 0,034$ – для крайової зони). Кількість ПМВ у щурів з гіперглікемією була більшою на 43,7 % ($P < 0,001$ – для перичентральної зони) і на 80,3 % ($P < 0,001$ – для прикрайової зони). У перичентральній зоні кількість РМВ у щурів групи експерименту була меншою на 56,1 % ($P < 0,001$), а у прикрайовій – на 12,6 % ($P < 0,001$). Сумарна площа РМВ у щурів дослідної групи була достовірно меншою в обох зонах спостереження ($P < 0,001$).

Рисунок 4.2 – Загальна площа регенеруючих волокон у скелетних м'язах щурів груп порівняння



Примітки. А – периферійна зона. Б – периферійна зона. * – статистично значуща достовірність відмінності між групами порівняння

На 28-у добу дослідження після нанесення травми місце дефекту щурів контрольної серії було заповнено сполучнотканинно-м'язовим регенератом з переважанням сполучної тканини. Подальший розвиток міогенних клітин у м'ясопласти не відбувався.

На 28-у добу у дослідній групі місце дефекту було заповнено фрагментованими м'язовими волокнами, багаточисленними вакуолями, м'язовим детритом та сполучнотканинними елементами. Судини мікроциркуляторного русла зберігали свою неповноцінність. У крайових ділянках дефекту простежувалися ознаки посттравматичного міогістогенезу.

Картина морфометричних особливостей регенератів скелетних м'язів щурів груп порівняння у кінцевий термін експерименту не відрізнялась від намічених раніше тенденцій. У периферійній зоні кількість НМВ у щурів із гіперглікемією була меншою на 12,7 % ($P = 0,002$), а у периферійній – на 9,0 % ($P = 0,001$). Показник кількості ПМВ у щурів експериментальної серії був значущо вищим: на 216,7 % у периферійній зоні ($P < 0,001$) і на 149,7 % у периферійній зоні ($P < 0,001$). Кількість РМВ у дослідних тварин була меншою на

26,8 % ($P < 0,001$ – для перичентральної зони) і на 15,4 % ($P < 0,001$ – для прикрайової зони). Значущо меншою у цих тварин, порівняно із контролем, була загальна площа РМВ ($P < 0,001$ – для перичентральної та крайової зон).

Результати представленої дослідження демонструють, що у щурів із попередньо змодельованою ХГ спостерігається затримка процесів відновлення скелетної мускулатури після їх механічної травматизації. Структурними проявами цього виступають затримка утворення нових м'язових волокон та нових судин у зоні ураження, що спостерігаються на фоні накопичення адипоцитів, лейкоцитарних клітин та значного розвитку сполучної тканини.

Схожі результати були отримані в роботі Krause et al. на мишах лінії Akita з мутацією в гені інсуліну. Дослідники продемонстрували, що після травматичного ушкодження в м'язах тварин піддослідної групи визначається зменшення площі регенеруючих волокон, зростання площі некротичної ділянки, збільшення вмісту колагену та зменшення кількості макрофагів і сателітних клітин, порівняно із контрольною групою [93].

Разом із цим колектив Nguyen et al. в експерименті на трансгенних щурах із мутацією у гені лептину та гені його рецептору виявили значне порушення посттравматичної регенерації м'язів у цих тварин, що виявило себе зниженням кількості і площі регенеруючих м'язових волокон, порушенням ангиогенезу та зниженням накопичення макрофагів у зоні регенерації [94].

ВИСНОВКИ

1. У загальній популяції не виявлено зв'язку поліморфного сайту rs997509 гена *ENPP1* із розвитком синдрому діабетичної стопи. Проте, в осіб із ожирінням локус rs997509 асоційований із настанням СДС. Так, у носіїв мінорного Т-алеля ризик розвитку СДС значущо вищий, ніж у гомозигот за основним С-алелем.
2. У представників української популяції відсутній зв'язок між поліморфізмом С936Т гена *VEGFA* і розвитком СДС. Як до, так і після поправки на вік, стать, звичку палити, індекс маси тіла, наявність ожиріння і артеріальну гіпертензію жоден із генотипів не був асоційований із ризиком розвитку СДС у пацієнтів з ЦД2.
3. У місцях відновного міогістогенезу тварин із хронічною гіперглікемією спостерігається підвищення вмісту Na і Mg, що може бути свідченням більш вираженої та тривалої руйнації клітинних структур.
4. У ділянках регенерації скелетних м'язів щурів із хронічною гіперглікемією виявляється зменшення концентрації Ca, Fe, Zn і Cu, що може бути наслідком порушення кровопостачання ділянки неогістогенезу та результатом загальнометаболічних змін.
5. Процес відновлення посмугованих м'язів у щурів із хронічною гіперглікемією виявляє себе незавершеним міогенезом, значним розвитком сполучної тканини та затримкою утворення нових судин. Показано, що основними морфометричними особливостями процесу посттравматичної регенерації скелетних м'язів щурів із ХГ є зменшення площі регенеруючих м'язових волокон на фоні наявності значної кількості пошкоджених м'язових волокон

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-Schmiedebergs 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 // *Phlugers. 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. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors / G. Ferrari, G. Cusella-De Angelis, M. Coletta [et al.] // *Science.* 1998. – Vol. 279 (5356). – P. 1528–1530.
55. Human circulating AC133+ stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle / Y. Torrente, M. Belicchi, M. Sampaolesi [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation.* – 2004. – Vol. 114 (2). – P. 182–195.

56. Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability / B. G. Galvez, M. Sampaolesi, S. Brunelli [et al.] // *Journal of Cell Biology*. – 2006. – Vol. 174. – P. 231–243.
57. Mesoangioblasts, vessel-associated multipotent stem cells, repair the infarcted heart by multiple cellular mechanisms: a comparison with bone marrow progenitors, fibroblasts, and endothelial cells / D. Galli, A. Innocenzi, L. Staszewsky [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2005. – Vol. 25. – P. 692–697.
58. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs / M. Sampaolesi, S. Blot, G.D'Antona [et al.] // *Nature*. – 2006. – Vol. 444. – P. 574–579.
59. Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1- and MMP-9- dependent pathways / K. Lolmede, L. Campana, M. Vezzoli [et al.] // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2009. – Vol. 85. – P. 779–787.
60. Transplanted mesoangioblasts require macrophage IL-10 for survival in a mouse model of muscle injury / L. Bosurgi, G. Corna, M. Vezzoli [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2012. – Vol. 188. – P. 6267–6277.
61. Abcg2 labels multiple cell types in skeletal muscle and participates in muscle regeneration / M. J. Doyle, S. Zhou, K. K. Tanaka [et al.] // *Journal of Cell Biology*. – 2011. – Vol. 195. – P. 147–163.
62. Tumor necrosis factor- α inhibition of skeletal muscle regeneration is mediated by a caspase-dependent stem cell response / A. Moresi, A. Prister`a, B. M. Scicchitano [et al.] // *Stem Cells*. – 2008. – Vol. 26. – P. 997–1008.
63. Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development / K. J. Mitchell, A. Pann`erec, B. Cadot [et al.] // *Nature Cell Biology*. – 2010. – Vol. 12 (3). – P. 257–266.
64. Emerging biology of vascular wall progenitor cells in health and disease / D. Tilki, H. Hohn, B. Erg`un [et al.] // *Trends in Molecular Medicine*. – 2009. – Vol. 15. – P. 501–509.

65. Human adult vena saphena contains perivascular progenitor cells endowed with clonogenic and proangiogenic potential / P. Campagnolo, D. Cesselli, A. Al Haj Zen [et al.] // *Circulation*. – 2010. – Vol. 121. – P. 1735–1745.
66. Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle / B. Zheng, B. Cao, M. Crisan [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2007. – Vol. 25. – P. 1025–1034.
67. Human blood vessel-derived stem cells for tissue repair and regeneration / C. Chen, M. Corselli, B. P'eaault [et al.] // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. – 2012. – Vol. 2012. Article ID 597439, 9 P.
68. The adult human brain harbors multipotent perivascular mesenchymal stem cells / G. Paul, I. Ozen, N. S. Christophersen [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. Article ID e35577.
69. Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells / A. Dellavalle, G. Maroli, D. Covarello [et al.] // *Nature Communications*. – 2011. – Vol. 2. Article ID 499.
70. Identification of telocytes in skeletal muscle interstitium: implication for muscle regeneration / L. M. Popescu, E. Manole, C. S. Serboiu [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2011. – Vol. 15. – P. 1379–1392.
71. Telocytes in human term placenta: morphology and phenotype / L. Suci, L. Popescu, M. Gherghiceanu [et al.] // *Cells Tissues Organs*. – 2010. – Vol. 192. – P. 25–39.
72. Endothelial/pericyte interactions / A. Armulik, A. Abramsson, C. Betsholtz [et al.] // *Circ Res*. – 2005. – Vol. 97. – P. 512–523.
73. Connective tissue fibroblasts and Tcf4 regulate myogenesis / S. J. Mathew, J. M. Hansen, A. J. Merrell [et al.] // *Development*. – 2011. – Vol. 138. – P. 371–384.
74. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration / M. M. Murphy, J. A. Lawson, S. J. Mathew [et al.] // *Development*. – 2011. – Vol. 138. – P. 3625–3637.

75. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis / A.W. Joe, L. Yi, A. Natarajan [et al.] // *Nature Cell Biology*. – 2010. – Vol. 12. – P. 153–163.
76. Moyer A. L. Regeneration versus fibrosis in skeletal muscle / A. L. Moyer and K. R. Wagner // *Current Opinion in Rheumatology*. – 2011. – Vol. 23 (6). – P. 568–573.
77. New polymorphism of ENPP1 (PC-1) is associated with increased risk of type 2 diabetes among obese individuals / Bochenski J, Placha G, Wanic K [et al.] // *Diabetes*. – 2006. – Vol. 55(9). – P. 2626-2630.
78. Effect of the rs997509 polymorphism on the association between ENPP1, metabolic syndrome and impaired glucose tolerance in childhood obesity / Santoro N, Cirillo G, Lepore MG [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2009. – Vol. 94(1). – P. 300-305.
79. Association of the ENPP1 rs997509 polymorphism with obesity in South African mixed ancestry learners / T. Matsha, Y. Yako, S. Hassan [et al.] // *East Afr Med J*. – 2010. – Vol. 87(8). – P. 323-329.
80. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels / W. Renner, S. Kotschan, C. Hoffmann [et al.] // *J Vasc Res*. – 2000. – Vol. 37. – P. 443-448.
81. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk / P. Krippel, U. Langsenlehner, W. Renner [et al.] // *Int J Cancer*. – 2003. – Vol. 106(4). – P. 468-471.
82. Association of VEGFA variants with altered VEGF secretion and type 2 diabetes: A case-control study / N. Sellami, L. Lamine, A. Turki [et al.] // *Cytokine*. – 2018. – Vol. 106. – P. 29-34.
83. Association of Serum Levels and Gene Polymorphism of Vascular Endothelium Growth Factor With Ischemic Heart Disease in Type 2 Diabetic Patients / Klimontov VV, Tyan NV, Orlov NB [et al.] // *Kardiologiya*. – 2017. – Vol. 57(5). – P. 17-22.

84. The associations between VEGF gene polymorphisms and diabetic retinopathy susceptibility: a meta-analysis of 11 case-control studies / L. Han, L. Zhang, W. Xing [et al.] // *J Diabetes Res.* – 2014. – Vol. 2014. – e:805801.
85. Association between VEGF genetic variants and diabetic foot ulcer in Chinese Han population: A case-control study / Li X, Lu Y, Wei P. [et al.] // *Medicine (Baltimore).* – 2018. – Vol. 97(20). – e10672.
86. Li X. The association between MCP-1, VEGF polymorphisms and their serum levels in patients with diabetic foot ulcer / X. Li // *Medicine (Baltimore).* – 2018. – Vol. 97(24). – e10959.
87. Laumonier T. Muscle injuries and strategies for improving their repair / T. Laumonier, J. Menetrey // *J Exp Orthop.* – 2016. – Vol. 3. – P. 15.
88. Teng S. The effect of type 2 diabetes mellitus and obesity on muscle progenitor cell function / S. Teng, P. Huang // *Stem Cell Res Ther.* – 2019. – Vol. 10. – P. 103.
89. Praveena S. Trace Elements in Diabetes Mellitus / S. Praveena, P. Sujatha, K. Sameera // *J Clin Diagn Res.* – 2013. – Vol. 7(9). – P. 1863-1865.
90. Jinno N. Marginal zinc deficiency negatively affects recovery from muscle injury in mice / N. Jinno, M. Nagata, T. Takahashi // *Biol Trace Elem Res.* – 2014. – Vol. 158(1). – P. 65-72.
91. Ртайл Р.А. Вивчення особливостей макро- та мікроелементного складу скелетних м'язів щурів за умов хронічної гіперглікемії / Р.А. Ртайл, Г.Ф. Ткач // *Актуальні проблеми сучасної медицини.* – 2018. – Т. 3(63). – С. 185-189.
92. The variation of macro- and micro-minerals of tissues in diabetic and non-diabetic rats / Presley T., Duncan A., Jeffers A. [et al.] // *J Trace Elem Med Biol.* – 2017. – Vol.39. – P. 108-115.
93. Impaired macrophage and satellite cell infiltration occurs in a muscle-specific fashion following injury in diabetic skeletal muscle / M. Krause, D. Al-Sajee, D. D'Souza [et al.] // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8. – e70971.

94. Nguyen M. Impaired muscle regeneration in ob/ob and db/db mice / M. Nguyen, M. Cheng, T. Koh // *Sci. World J.* – 2011. – Vol. 11. – P. 1525-1535.