

Міністерство охорони здоров'я України
УКРАЇНЬСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ
Міністерство охорони здоров'я України
УКРАЇНЬСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Ковальова Ірина Олександрівна

Прим. № 1

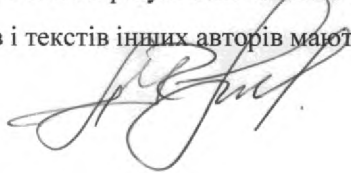
УДК 612.75/.76:599.323.4

ДИСЕРТАЦІЯ

МЕХАНІЗМИ МЕТАБОЛІЧНИХ І БІОМЕХАНІЧНИХ ПОРУШЕНЬ У
КІСТКАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ПОСДНАНОГО НАДЛИШКОВОГО
НАДХОДЖЕННЯ НІТРАТУ ТА ФТОРИДУ НАТРІЮ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ
222 Медицина

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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



І.О. Ковальова

Науковий керівник

Костенко Віталій Олександрович
доктор медичних наук, професор

Полтава – 2020

АНОТАЦІЯ

Ковальова І.О. Механізми метаболічних і біомеханічних порушень у кістках щурів за умов поєднаного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію та їх корекція. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина». – Українська медична стоматологічна академія МОЗ України, Полтава, 2020; Українська медична стоматологічна академія МОЗ України, Полтава, 2020.

У дисертації наведено теоретичне узагальнення і розв'язання наукової задачі, що полягає у з'ясуванні механізмів метаболічних і біомеханічних порушень у кістках щурів за умов поєднаного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію та дослідженні ефективності їхньої корекції з використанням інгібіторів транскрипційних факторів AP-1 та NF-κB, а також ентеросорбентів.

Експерименти виконані на 118 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 190-234 г. Використовували експериментальні, біохімічні, остеометричні, біофізичні та математико-статистичні методи дослідження.

30-денне поєднане введення фториду натрію (у щоденній дозі 10 мг/кг) та нітрату натрію (у щоденній дозі 500 мг/кг), на відміну від окремого застосування цих сполук, порушує механізм авторегуляції рівня монооксиду нітрогену в стегнових кістках щурів, збільшуючи активність загальної NO-синтази (на 51,3%, $P < 0,05$) та її індуцибельної ізоформи (на 80,0%, $P < 0,01$) на тлі зниження загальної аргіназної активності (на 53,6%, $P < 0,001$) з подальшим підвищенням у тканинах концентрації пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів (на 24,4%, $P < 0,001$), що свідчить про розвиток нітрозативного стресу. Це

супроводжується високим кістковим обміном з підвищеною резорбцією, яка не компенсується реакцією формування кістки, збільшенням вмісту продуктів деполімеризації колагену, протеогліканів і сіалоглікопротеїнів (вільного оксипроліну, гексуранових кислот та N-ацетилнейрамінової кислоти) у стегнових кістках (на 13,7%, $P < 0,01$, 51%, $P < 0,01$, та 69,5%, $P < 0,001$, відповідно) та хребцях (на 18%, $P < 0,01$, 47%, $P < 0,02$, та 70%, $P < 0,01$, відповідно), що перевищує такий при поодинокому введенні солей фторної та нітратної кислот.

За цих умов істотно змінюються остеометричні та біомеханічні характеристики кісток: зменшується маса, щільність та мінеральна насиченість стегнових кісток (на 11,7%, $P < 0,001$, 19,6%, $P < 0,01$, та 23,5%, $P < 0,02$, відповідно) і хребців (на 13%, $P < 0,01$, 13,3%, $P < 0,01$, та 17,4%, $P < 0,05$, відповідно), знижується міцність і пружність стегнових кісток (при лінійному розриві та при випробовуванні на згин).

Інгібітори транскрипційних чинників AP-1 та NF- κ B (SR 11302, амонію піролідиндитіокарбамат та водорозчинна форма кверцетину) відновлюють за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію механізм авторегуляції рівня NO в стегнових кістках щурів, зменшуючи загальну активність NO-синтази (на 64%, $P < 0,001$, 74%, $P < 0,001$, та 80%, $P < 0,001$, відповідно) та активність її індукційної ізоформи (на 75%, $P < 0,001$, 86%, $P < 0,001$, та 89%, $P < 0,001$, відповідно) при реципрокному збільшенні загальної аргіназної активності (на 88%, $P < 0,001$, 95%, $P < 0,001$, та вдвічі, $P < 0,001$, відповідно), та обмежуючи утворення пероксинітриту. Це супроводжується зменшенням активності ферментів-маркерів резорбції кістки (кислої фосфатази та її кісткової ізоформи) та обмеженням деполімеризації колагену, протеогліканів та сіалоглікопротеїнів сполучної (кісткової) тканини стегнових кісток і хребців.

Інгібітори транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB за умов поєднаного введення фториду та нітрату натрію нормалізують масу стегнових кісток і хребців, при цьому SR 11302 і амонію піролідиндитіокарбамат збільшують щільність, мінеральну насиченість, міцність і пружність стегнових кісток, а також щільність, мінеральну насиченість і міцність хребців (зменшується остеометричний індекс Simon), а водорозчинна форма кверцетину (корвітин) підвищує щільність і міцність стегнових кісток (збільшується розривне навантаження, межа міцності) без істотного впливу на показники мінеральної насиченості та пружності.

Суспензія нанодисперсного кремнезему відновлює за умов поєднаного введення фториду та нітрату натрію функціонування фізіологічного механізму авторегуляції рівня NO в крові та стегнових кістках щурів. У гомогенаті кісток це призводить до зменшення загальної активності NO-синтаз (на 81,7%, $P < 0,001$), активності її індукцйбельної ізоформи (на 90,7%, $P < 0,001$), збільшення загальної аргіназної активності (на 89,2%, $P < 0,001$) та обмеження утворення пероксинітриту (на 9,9%, $P < 0,01$), що супроводжується обмеженням деполімеризації колагену, протеогліканів та сіалоглікопротеїнів сполучної (кісткової) тканини стегнових кісток і хребців.

Застосування суспензії нанодисперсного кремнезему суттєво не позначається за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію на кількісних показниках структурної композиції стегнових кісток, але покращує їхні остеометричні (маса збільшується на 11,2%, $P < 0,001$) та біомеханічні властивості при лінійному розриві (розривне навантаження підвищується на 22,1%, $P < 0,01$; відносне подовження – на 7,9%, $P < 0,05$) та при випробовуванні на згин (розривне навантаження збільшується на 26,5%, $P < 0,001$, модуль Юнга – 90,4%, $P < 0,001$, межа міцності – на 27,7%, $P < 0,05$).

Призначення суспензії нанодисперсного кремнезему за умов надходження фториду та нітрату натрію підвищує щільність хребців (на 12,6%, $P < 0,05$) без істотного впливу на їхню мінеральну насиченість, а за результатами остеометричного дослідження – збільшує масу та міцність (зменшується індекс Simon) 3-го поперекового хребця.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше виявлено, що поєднане надходження до організму ссавців фториду та нітрату натрію, на відміну від окремого їх впливу, порушує механізм авторегуляції рівня монооксиду нітрогену в стегнових кістках з подальшим розвитком нітрозативного стресу. Це супроводжується високим кістковим обміном з підвищеною резорбцією, яка не компенсується реакцією формування кістки, деполімеризацією колагенових і не колагенових білків кісткової тканини, змінами остеометричних і біомеханічних характеристик кісток (зменшується маса, щільність та мінеральна насиченість стегнових кісток і хребців, знижується міцність і пружність стегнових кісток при лінійному розриві та при випробовуванні на згин).

Вперше виявлено, що інгібітори транскрипційних чинників AP-1 та NF- κ B (SR 11302, амонію піролідиндитіокарбамат та водорозчинна форма кверцетину) відновлюють за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію механізм авторегуляції рівня NO в стегнових кістках щурів, зменшують активність ферментів-маркерів резорбції кістки, обмежують деполімеризацію колагену, протеогліканів та сіалоглікопротеїнів сполучної (кісткової) тканини стегнових кісток і хребців, збільшують щільність та покращують біомеханічні властивості кісток.

Вперше виявлено, що суспензія нанодисперсного кремнезему відновлює за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію функціонування фізіологічного механізму авторегуляції рівня NO в крові та стегнових кістках щурів, обмежує деполімеризацію колагену,

протеогліканів та сіалоглікопротеїнів сполучної (кісткової) тканини стегнових кісток і хребців, покращує остеометричні та біомеханічні характеристики кісток.

Практичне значення одержаних результатів. Авторкою з'ясовано закономірності розвитку метаболічних і біомеханічних порушень у кістках щурів за умов поєднаного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію, поглиблено уявлення про молекулярні механізми дії цих сполук на організм ссавців, що має практичне значення для розробки ефективних остеопротективних засобів. Розроблено нові підходи до корекції остеопенії та остеопорузу за умов сумісної дії нітратів і фторидів з використанням інгібіторів транскрипційних факторів AP-1 та NF-κB, а також ентеросорбентів (суспензії нанодисперсного кремнезему), що потребує подальших доклінічних і клінічних досліджень.

Результати роботи впроваджено у навчальний процес на кафедрі патофізіології Української медичної стоматологічної академії; кафедрах патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету, Національного фармацевтичного університету; Харківського національного медичного університету.

Ключові слова: окремий і поєднаний токсичний вплив нітратів і фторидів, губчасті та трубчасті кістки, авторегуляція монооксиду нітрогену, активні форми нітрогену, ремоделювання кісткової тканини, дезінтеграція органічного матриксу кісток, транскрипційні чинники каппа B та AP-1, ентеросорбенти.

SUMMARY

Kovaleva I.O. Mechanisms of metabolic and biomechanical disorders in rats' bones during combined excess nitrate and sodium fluoride intake and their correction. – Qualification research work. Manuscript.

Dissertation for a Doctor of Philosophy Degree, Specialty “Medicine”.
- Ukrainian Medical Stomatological Academy, Ministry of Health of Ukraine, Poltava, 2020; Ukrainian Medical Stomatological Academy, Ministry of Health of Ukraine, Poltava, 2020.

This dissertation presents a conceptual synthesis and solution of the scientific issue aimed at elucidating mechanisms of metabolic and biomechanical disorders in rats' bones during combined excess sodium nitrate and sodium fluoride intake and elaborating new methods for their correction by using inhibitors of transcription factors AP-1 and NF- κ B, and enterosorbents.

Series of experiments were performed on 118 Wistar white male rats weighing 190-234 g. Experimental, biochemical, osteometric, biophysical and mathematical-statistical methods of investigation were applied in this research.

It has been found out for the first time that 30-day co-administration of sodium fluoride (in a daily dose of 10 mg / kg) and sodium nitrate (in a daily dose of 500 mg / kg), in contrast to the separate administration of these compounds impairs the mechanism of autoregulation of nitrogen monoxide in the femoral bones of the rats, while increasing the activity of total NO synthase (by 51.3%, $P < 0.05$) and its inducible isoform (by 80.0%, $P < 0.01$) during the decrease in total arginase activity (by 53.6%, $P < 0.001$) with subsequent growth of peroxynitric concentration of alkali and alkaline earth metals (by 24.4%, $P < 0.001$) that points out the nitrosatitistic stress progression. This is accompanied by high bone metabolism with increased

resorption, which is not compensated by the bone formation reaction; by an increase in the content of collagen depolymerisation products, proteoglycans and sialoglycoproteins (free hydroxyproline, hexaronic acids and N-acetylneuramine acid) in the femoral bones (by 13.7%, $P < 0.01$, 51%, $P < 0.01$, and 69.5%, $P < 0.001$, respectively) and vertebrae (by 18%, $P < 0.01$, 47%, $P < 0.02$, and 70% $P < 0.01$, respectively). These values exceed the values obtained during the single administration of fluorine and nitric acid salts.

Under these conditions, the osteometric and biomechanical characteristics of the bones significantly change: the weight, density and mineral saturation of the femoral bones become reduced (by 11.7%, $P < 0.001$, 19.6%, $P < 0.01$, and 23.5%, $P < 0.02$, respectively) as well as the vertebrae do (by 13%, $P < 0.01$, 13.3%, $P < 0.01$, and 17.4%, $P < 0.05$, respectively); the strength and elasticity of the femoral bones decreases (with linear rupture and during the bending test).

The study has demonstrated that under the sodium nitrate and sodium fluoride co-administration, the inhibitors of transcription factors AP-1 and NF- κ B (SR 11302, ammonium pyrrolidindithiocarbamate and water soluble form of quercetin) renew the mechanism NO autoregulation in the femoral bones of rats, reducing the total activity of NO synthase (by 64%, $P < 0.001$, 74%, $P < 0.001$, and 80%, $P < 0.001$, respectively) and its inducible isoform (by 75%, $P < 0.001$, 86%, $P < 0.001$, and 89%, $P < 0.001$, respectively) against the reciprocal increase in total arginase activity (by 88%, $P < 0.001$, 95%, $P < 0.001$, and twice, $P < 0.001$, respectively), and limiting the peroxynitrite production. This is accompanied by lessening the activity of bone resorption marker enzymes (acid phosphatase and its bone isoform) and the restriction of the depolymerization of collagen, proteoglycans and sialoglycoproteins of the connective tissue (bone) of the femoral bones and vertebrae.

It has been shown that the inhibitors of the transcription factors AP-1 and NF- κ B during sodium fluoride and sodium nitrate co-administration

normalize the mass of femoral bones and vertebrae, while SR 11302 and ammonium pyrrolidindithiocarbamate increase the density, mineral saturation, strength and elasticity of the femoral bones, as well as density, mineral saturation and strength of the vertebrae (the Simon osteometric index decreases), and the water-soluble form of quercetin (corvitin) increases the density and strength of the femoral bones (the bursting load and the tensile strength grow) without any considerable effect on the values of mineral saturation and elasticity.

It has been found out for the first time that during the sodium fluoride and sodium nitrate co-administration the suspension of nanodispersed silica renew the functioning of the physiological mechanism of NO level autoregulation in the blood and femoral bones of rats. The analysis of bone homogenates has revealed that this leads to a decrease in the total activity of NO-synthase (by 81.7%, $P < 0.001$), the activity of its inducible isoform (by 90.7%, $P < 0.001$), increase in total arginase activity (by 89.2%, $P < 0.001$) and limitation of the peroxynitrite production (by 9.9%, $P < 0.01$) that is accompanied by restriction of depolymerization of collagen, proteoglycans and sialoglycoproteins of connective (bone) tissue in the femur and vertebrae.

Applying a suspension of nanodispersed silica under excess sodium fluoride and sodium nitrate produces no significant effect on quantitative parameters of the structural composition of the femur bones, but improves their osteometric (mass increases by 11.2%, $P < 0.001$) and biomechanical properties at linear rupture (breaking load increases by 22.1%, $P < 0.01$; relative elongation – by 7.9%, $P < 0.05$) and in the bending test (breaking load increases by 26.5%, $P < 0.001$, Young's modulus – by 90.4%, $P < 0.001$, ultimate strength – by 27.7%, $P < 0.05$).

Using the suspension of nanodispersed silica during the sodium fluoride and sodium nitrate increases the density of vertebrae (by 12.6%, $P < 0.05$) without any significant effect on their mineral saturation, and,

according to the findings of the osteometric investigation, promotes the growth of the mass and strength (the Simon index is decreased) of the 3rd lumbar vertebra.

Scientific relevance of obtained results. It has been found out for the first time that combined intake of sodium fluoride and sodium nitrate, unlike the separate administration of these compounds impairs the mechanism of nitrogen monoxide autoregulation in the femoral bones followed with the development of nitrosative stress. This is accompanied by bone metabolism with increased resorption, which is not compensated through the reaction of bone formation, depolymerization of collagenous and non-collagenous proteins of bone tissue, changes in osteometric and biomechanical characteristics of bones (decrease in mass, density and mineral saturation of the femoral bones and vertebrae, lowered density and elasticity of femoral bones under linear rupture and bend test.

It has been first established that the inhibitors of the transcription factors AP-1 and NF- κ B (SR 11302, ammonium pyrrolidindithiocarbamate and water-soluble form of quercetin) restore the mechanisms of NO autoregulation in femoral bones of the rats, reduces the activity of certain enzymes, which serve as bone resorption markers, restrict depolymerization of collagenes, proteoglycans and sialoglycoproteins of connective (bone) tissue in the femur and vertebrae, as well as enhance bone density and biomechanical properties.

This research is the first that has demonstrated the suspension of nanodispersed silica under co-administration of sodium fluoride and sodium nitrate restores functioning of the physiological mechanism of NO autoregulation in the blood and femoral bones in the rats, inhibits depolymerization of collagenes, proteoglycans and sialoglycoproteins of connective (bone tissues) in the femoral bones and vertebrae, and improves osteometric and biomechanical properties of the bones.

Practical relevance of obtained results. This dissertation has clarified the regularities of the development of metabolic and biomechanical disorders in rats' bones during combined sodium fluoride and sodium nitrate intake, as well as has contributed to a stronger understanding of the molecular mechanisms of the action of these compounds on the body of mammals that is of considerable clinical importance for the development of effective osteoprotective medication. This research work has also suggested new approaches towards the correction of osteopenia and osteoporosis by combining nitrates and fluorides and the inhibitors of transcription factors of AP-1 and NF- κ B, as well as enterosorbents (suspensions of nanodispersed silica), but they require further thorough preclinical and clinical studies.

The results obtained have been incorporated into the courses delivered by the Department of Pathophysiology, Ukrainian Medical Stomatological Academy; by the Departments of Pathological Physiology at Zaporizhzhia State Medical University, National Pharmaceutical University, and Kharkiv National Medical University.

Key words: separate and combined toxic effects of nitrates and fluorides, spongy and tubular bones, autoregulation of nitrogen monoxide, active forms of nitrogen, remodelling of bone tissue, disintegration of organic bone matrix, transcription factors kappa B and AP-1, enterosorbents.

Список публікацій здобувачки за темою дисертації

1) в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Функціонування аргіназного та NO-синтазного шляху метаболізму L-аргініну в крові щурів за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію та застосування суспензії нанодисперсного кремнезему / О.Є. Акімов, І.О. Ковальова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української

мед. стоматол. академії. – 2016. – Т.16, №1. – С. 169-173. (Безпосередньо дисертанці належать дані щодо NO-синтазної та аргіназної активності в крові щурів за умов поєднаного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію та застосування суспензії нанодисперсного кремнезему)

2. Влияние энтеросорбентов на метаболизм аргинина и процессы пероксидного окисления липидов в крови крыс в условиях хронической сочетанной интоксикации нитратом и фторидом натрия / О.Е. Акимов, И.А. Ковалёва, В.А.Костенко // Вестник Алматинского государственного института усовершенствования врачей (Казахстан). – 2016. – №3. – С.37-41. (Безпосередньо дисертанці належать дані щодо NO-синтазної та аргіназної активності в крові щурів за умов застосування різних ентеросорбентів при поєднаній інтоксикації нітратом і фторидом натрію).

3. Ковальова І.О. Вплив інгібіторів транскрипційного чинника каппа В на метаболічні та структурні порушення кісткової тканини за умов поєднаного надлишкового надходження фториду та нітрату натрію / І.О. Ковальова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2019. – Т.19, №1. – С. 65-70. (Особиста участь дисертантки – аналіз літературних даних, організація та проведення досліджень, інтерпретація результатів, написання статті).

4. Ковальова І.О. Вплив інгібітора транскрипційного чинника AP-1 на структурно-метаболічні та біомеханічні зміни кісткової тканини за умов поєднаного надлишкового надходження фториду та нітрату натрію / І.О. Ковальова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2019. – Т.19, №2. – С. 123-128. (Особиста участь дисертантки – аналіз літературних даних, організація та проведення досліджень, інтерпретація результатів, написання статті).

5. Correction of destructive changes in connective tissues of different organs during chronic nitrate and fluoride intoxication by nanosized silica oxide / O.Ye. Akimov, I.O. Kovalova, V.O. Kostenko // Journal of Education, Health and Sport. – 2019. – V.9, №5. – P. 547-555. (Безпосередньо дисертанткою одержано та проаналізовано результати щодо змін показників деструкції кісткової тканини за умов застосування суспензії нанодисперсного кремнезему при поєднаній інтоксикації нітратом і фторидом натрію).

2) які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. Ковалёва И.А. Роль пероксинитрита в процессах деполимеризации коллагена и протеогликанов в костях и коже крыс при сочетанном введении в организм нитрата и фторида натрия / И.А. Ковалёва, А.В. Богданов, Д.А. Хмиль // Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье : XIX международная медико-биологическая конференция молодых исследователей (Санкт-Петербург, 23 апреля 2016 г.) : тезисы. – СПб. : Изд-во СПбГУ, 2016. – С. 273-274. (Безпосередньо дисертантці належать дані щодо закономірностей зміни концентрації пероксинітриту та продуктів деполімеризації колагену і протеогліканів у кістках за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію).

7. Роль редокс-чутливих транскрипційних чинників у механізмах окисно-нітрозативного стресу / А.М. Єлінська, Ю.Д. Френкель, М.С. Коваль, І.О. Ковальова, О.О. Швайковська, І.В. Явтушенко, В.О. Костенко // Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм : X наук.-практ. конф. з міжнарод. участю (Тернопіль, 5–6 жовтня 2017 р.) : мат. – Тернопіль, 2017. – С. 16. (Безпосередньо дисертантці належать дані щодо ролі транскрипційних чинників NF-κB та AP-1 у механізмах окисно-нітрозативного стресу в

кістках за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію).

8. Роль інгібіторів та індукторів редокс-чутливих транскрипційних чинників у фармакологічній регуляції окисно-нітративного стресу / А.М. Єлінська, Ю.Д. Френкель, О.І. Белікова, М.С. Коваль, І.О. Ковальова, В.О. Костенко // V нац. з'їзд фармакологів України (Запоріжжя, 18–20 жовтня 2017 р.) : тези доп. – Запоріжжя, 2017. – С. 42. (Безпосередньо дисертантці належать дані щодо впливу інгібіторів транскрипційних чинників NF-κB та AP-1 на розвиток окисно-нітративного стресу в кістках за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію).

9. Акимов О. Е. Нитрат-индуцированные процессы в крови и сердце крыс / О.Е. Акимов, И.А. Ковалёва // Багаторівнева профілактика та діагностика в онкології : зб. тез наук.-практ. конф. з міжнар. участю. – Харків, 2018. – С. 8. (Безпосередньо дисертантці належать дані щодо змін показників системи NO в крові щурів за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію).

10. Інгібітори активації транскрипційних чинників NF-κB та AP-1 як засоби профілактики та патогенетичної терапії окисно-нітративного стресу / В.О. Костенко, А.М. Єлінська, І.О. Ковальова, С.М. Назаренко, Н.В. Соловійова, Ю.Д. Френкель, О.О. Швайковська, І.В. Явтушенко // Бюлл. XVII чтений им. В.В. Подвысоцкого (г. Одесса, 24–25 мая 2018 г.). – Одесса, 2018. – С. 110-111. (Безпосередньо дисертантці належать дані щодо впливу інгібіторів транскрипційних чинників NF-κB та AP-1 на розвиток окисно-нітративного стресу в кістках за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію).

11. Роль редоксчутливих чинників транскрипції в механізмах деструкції сполучної тканини / А.М. Єлінська, І.О. Ковальова, С.М. Назаренко, Ю.Д. Френкель, О.О. Швайковська, І.В. Явтушенко, В.О.

Костенко // Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм : XI наук.-практ. конф. з міжнарод. участю (Тернопіль, 4–5 жовтня 2018 р.) : мат. – Тернопіль, 2018. – С. 43- 44. (Безпосередньо дисертантці належать дані щодо впливу інгібіторів транскрипційних чинників NF-κB та AP-1 на показники деструкції кісткової тканини за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію).

12. Роль редоксчутливих чинників транскрипції в порушенні авторегуляції оксиду азоту в організмі ссавців / В.О. Костенко, Ю.М. Гришко, С.В. Денисенко, А.М. Єлінська, І.О. Ковальова, Н.В. Соловйова, О.О. Швайковська // Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики : VII пленум Укр. наук. тов. патофізіологів та наук.-практ. конф., присвячені 110-річчю з дня народження чл.-кор. АМН СРСР, проф. М.Н. Зайка : мат. доп. (Полтава, 11-12 жовтня 2018 р.). – Полтава, 2018. – С. 35-36. (Безпосередньо дисертантці належать дані щодо розладів авторегуляції рівня NO в кістках щурів за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію).

13. Роль активации ядерного транскрипционного фактора NF-κB в развитии гиперпродукции оксида азота в условиях хронической фторидной интоксикации / О.Е. Акимов, И.А. Ковалёва, А.В. Мищенко // Світова медицина: сучасні тенденції та фактори розвитку : збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції (м. Львів, 25–26 січня 2019 р.). – Львів : ГО «Львівська медична спільнота», 2019. – С. 109-112. (Безпосередньо дисертантці належать дані щодо ролі активації NF-κB на вироблення NO у кістках щурів за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію).

14. Влияние NF-κB фактора на развитие оксидационного стресса в крови крыс при фторидной интоксикации / О.Е. Акимов, И.А. Ковалёва,

А.В. Мищенко // Актуальні питання розвитку медичних наук у ХХІ ст. : міжнар. наук.-практ. конф. (Львів, 25-26 травня 2019 р.) : зб. матеріалів. – Львів, 2019. – С. 94–98. (Безпосередньо дисертантці належать дані щодо ролі активації NF-κB на продукування активних форм нітрогену в кістках щурів за умов інтоксикації фторидом натрію).

15. Ковальова І.О. Метаболічні, остеометричні і біомеханічні показники кістковій тканині щурів при поєднаному надлишковому надходженні в організм нітрату і фториду натрію / І.О. Ковальова, В.І. Макаренко // Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція : тези доповідей II Науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю (21 листопада 2019 р.). – Харків : Вид-во НФаУ, 2019. – С. 184. (Особиста участь дисертантки – аналіз літературних даних, організація та проведення досліджень, інтерпретація результатів, написання тез доповіді).

3) які додатково відображають наукові результати дисертації:

16. Молекулярні механізми впливу фторидів на організм ссавців / В.О. Костенко, О.Є. Акімов, І.О. Ковальова, А.В. Міщенко, Ю.Д. Френкель // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2018. – Т. 18, №1. – С. 303-308. (Безпосередньо дисертанткою проаналізовано дані літератури та власних досліджень щодо закономірностей впливу фторидів на кісткову тканину).

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	20
ВСТУП	22
РОЗДІЛ 1. МЕХАНІЗМИ ПАТОГЕННОЇ ДІЇ НІТРАТИВ І ФТОРИДІВ НА ПРОЦЕС РЕМОДЕЛЮВАННЯ КІСТОК ССАВЦІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	30
1.1. Механізми регуляторної та патогенної дії активних форм нітрогену на кісткову тканину	30
1.2. Вплив фторидів на механізми формування та резорбції кісток та їхня роль у розвитку остеопатології	41
1.3. Перспективи патогенетичної терапії порушень ремоделювання кісткової тканини за умов надлишкового надходження нітратів і фтори дів	47
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	56
2.1. Загальна характеристика матеріалів та методів дослідження	56
2.2. Методика моделювання хронічної інтоксикації нітратом натрію	58
2.3. Методика моделювання хронічної інтоксикації фторидом натрію	59
2.4. Методика застосування інгібіторів активації транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB	59
2.5. Методика застосування ентеросорбентів	60
2.6. Біохімічні методи дослідження	61
2.7. Визначення остеометричних характеристик кісток	65
2.8. Визначення показників структурної композиції кісток	65
2.9. Визначення біомеханічних характеристик кісток	65
2.10. Статистична обробка результатів експерименту	67

РОЗДІЛ 3. МЕТАБОЛІЧНІ ТА БІОМЕХАНІЧНІ ПОРУШЕННЯ КІСТОК ЗА УМОВ ПОЄДНАНОГО НАДЛИШКОВОГО НАДХОДЖЕННЯ ФТОРИДУ ТА НІТРАТУ НАТРІЮ	69
3.1 Функціонування аргіназного та NO-синтазного шляхів метаболізму L-аргініну в крові та кістках щурів	69
3.2 Маркери формування та резорбції кісток за умов експерименту	77
3.3 Закономірності деполімеризації біополімерів органічного матриксу кісткової тканини	80
3.4. Дослідження остеометричних характеристик кісток	83
3.5. Дослідження показників структурної композиції кісток та їхніх біомеханічних характеристик	86
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ ІНГІБІТОРІВ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ЧИННИКІВ AP-1 ТА NF-κB НА МЕТАБОЛІЧНІ ТА БІОМЕХАНІЧНІ ПОРУШЕННЯ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ЗА УМОВ ПОЄДНАНОГО НАДЛИШКОВОГО НАДХОДЖЕННЯ ФТОРИДУ ТА НІТРАТУ НАТРІЮ	93
4.1 Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на функціонування аргіназного та NO-синтазного шляхів метаболізму L- аргініну в кістковій тканині щурів	93
4.2. Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на маркери формування та резорбції кісток за умов експерименту	96
4.3 Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на деполімеризацію біополімерів органічного матриксу кісткової тканини	98
4.4. Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на остеометричні характеристики кісток	103
4.5. Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на показники структурної композиції кісток та їхні біомеханічні характеристики	106

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ ЕНТЕРОСОРБЕНТІВ НА МЕТАБОЛІЧНІ ТА БІОМЕХАНІЧНІ ПОРУШЕННЯ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ЗА УМОВ ПОЄДНАНОГО НАДЛИШКОВОГО НАДХОДЖЕННЯ ФТОРИДУ ТА НІТРАТУ НАТРІЮ	113
5.1. Вплив ентеросорбентів на функціонування аргіназного та NO- синтазного шляхів метаболізму L-аргініну в крові та стегнових кістках щурів	113
5.2. Вплив нанодисперсного кремнезему на маркери формування та резорбції кісток за умов експерименту	118
5.3 Вплив нанодисперсного кремнезему на деполімеризацію біополімерів органічного матриксу кісткової тканини	119
5.4. Вплив нанодисперсного кремнезему на остеометричні характеристики кісток	122
5.5. Вплив нанодисперсного кремнезему на показники структурної композиції кісток та їхні біомеханічні характеристики	124
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	129
ВИСНОВКИ	147
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	150
ДОДАТКИ	192

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФН	активні форми нітрогену
ПДТК	амонію піролідиндитіокарбамат
АО	альдегідоксидаза
AP-1	активаційний протеїн-1
cGMP	циклічний гуанозинмонофосфат
COX	циклооксигеназа
cNOS	конститутивні ізоформи NOS
eNOS	ендотеліальна ізоформа NOS
ERK	позаклітинна сигнал-регульована протеїнкіназа
FDA	Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів США
IFN	інтерферон
IκB	білок-інгібітор κB
IKK	IκB-кіназний комплекс
JNK	c-Jun N-кінцева кіназа
LOX	ліпооксигеназа
IL	інтерлейкін (и)
iNOS	індуцибельна ізоформа NOS
MAPK	мітоген-активована протеїнкіназа
M-CSF	макрофагальний колонієстимулювальний фактор
MMP	матриксна металопротеїназа
NADPH	нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
NANA	N-ацетилнейрамінова кислота
NOS	синтаза монооксиду нітрогену
nNOS	нейрональна ізоформа NOS
PKG	протеїнкіназа G

RANK	активатор рецептора NF-κB
RANKL	ліганд активатора рецептора NF-κB
NF-κB	нуклеарний фактор κB
SI	індекс Simon
SO	сульфітооксидаза
TGF	трансформувальний фактор росту
TNF	фактор некрозу пухлини
XOR	ксантиноксидоредуктаза

ВСТУП

Актуальність теми. Нітрати та фториди є потенційно небезпечними хімічними сполуками, які можуть надходити у концентраціях, що значно перевищують гранично допустимі. Так, за даними Регіональної цільової програми розвитку водного господарства та екологічного оздоровлення басейну річки Дніпро в Полтавській області на період до 2021 року, саме з нітратним забрудненням пов'язана небезпечна ситуація щодо якості ґрунтових вод. У воді переважної частини шахтних колодязів і в багатьох свердловинах Полтавської області виявлено перевищення норм вмісту нітратів, нітритів та амонійного азоту в декілька разів [62].

Вміст фторид-іонів у підземних джерелах питного водопостачання в середньому в країні становить 2,5-5 мг/дм (у Полтавській області – 2,5-8,8 мг/дм³) і більше (до 12 мг/дм³) [22, 39, 91]. При тривалому надходженні в організм людини сполуки фтору мають токсичну дію на серцево-судинну і центральну нервову систему, а також на роботу печінки, нирок, щитоподібної залози, викликають розвиток зубного і скелетного флюорозу [27, 41, 110, 289].

Проте саме ці речовини в найбільшій мірі викликають дискусію щодо характеру їхньої дії на кісткову тканину. З одного боку повідомляється, що нітрати, як донатори монооксиду нітрогену (NO), здатні підвищувати кісткову масу в експерименті на тваринах та у хворих на остеопороз [200, 325]. З іншого боку, надлишкове надходження нітрату натрію призводить до порушення метаболічних і біомеханічних властивостей кісток щурів, особливо за умов відтворення остеопорозу [84]. При цьому порушується їхній регенеративний потенціал [30]. Застосування органічних нітратів у клініці також не

завжди підвищує мінеральну щільність кісток та зменшує випадки переломів [166].

Повідомляється також про здатність фторидів підвищувати об'єм, масу та щільність кісток, але їхні біомеханічні властивості можуть знижуватися [157, 173]. Застосування лікарських засобів, що містять фториди, іноді супроводжується збільшенням ризику переломів кісток [172].

Нещодавно було показано, що поєднана дія нітрату та фториду натрію призводить до дизрегуляторних змін активності ферментів окисного (NO-синтазного) та неокисного (аргіназного) шляхів метаболізму L-аргініну в крові та різних органах [16, 105]. Це супроводжується розвитком окисно-нітрозативного стресу та дезінтеграцією сполучної тканини [16], що пов'язують зі здатністю фторидів активувати синтазу монооксиду нітрогену (NOS) [275] та пригнічувати аргіназний шлях метаболізму L-аргініну, що конкурує з NOS [290].

Примітно, що дія активних форм нітрогену та фторид-іонів сприяє активації таких транскрипційних чинників, як активаційний протеїн-1 (AP-1, від англ. Activator Protein 1) та нуклеарний фактор каппа В (NF-κB, англ. Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), що контролюють біосинтез прозапальних і прооксидантних чинників, у тому числі індукцибельної ізоформи NOS (iNOS) [163, 18, 187, 255]. Доведеним є вплив активації AP-1 і NF-κB на процес ремоделювання кісткової тканини [203], але наслідки цієї дії є суперечливими та важкопрогнозованими [37, 45, 103, 118], що потребує проведення подальших досліджень.

Нещодавно показана можливість засобів, що мають сорбційні властивості (яблучний пектин та пектиновмісні продукти) під час відтворення хронічної інтоксикації нітратом натрію обмежувати

дезорганізацію кісткової тканини, збільшувати щільність та міцнісні властивості губчастих і трубчастих кісток [82]. Проте вплив сучасних ентеросорбентів (зокрема, на основі нанодисперсного кремнезему) на метаболізм і біомеханічні характеристики кісток за умов поєднаної дії токсичних чинників не досліджувався.

Таким чином, істотне погіршення екологічної ситуації, можливість одночасної дії на організм людини та тварин двох потужних груп хімічних полютантів (нітратів, фторидів), відсутність даних щодо механізмів розвитку метаболічних, структурних і біофізичних змін у кістках, пов'язаних із поєднаним впливом цих сполук на організм ссавців, обґрунтовує актуальність цього експериментального дослідження. Перспективною є також розробка нових технологій патогенетичної терапії структурно-функціональних порушень у кістках при дії чинників навколишнього середовища, у т.ч. з використанням модуляторів транскрипційних чинників AP-1 і NF-κB, а також сучасних ентеросорбентів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана як самостійний фрагмент планової наукової роботи Української медичної стоматологічної академії МОЗ України «Роль активних форм кисню, системи оксиду азоту та транскрипційних факторів у механізмах патологічного системогенезу» (№ держреєстрації №0114U004941). Здобувачка є співвиконавцем теми.

Мета дослідження: Метою цієї роботи було з'ясування механізмів метаболічних і біомеханічних порушень у кістках щурів за умов поєднаного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію та дослідження ефективності їхньої корекції з використанням інгібіторів транскрипційних факторів AP-1 та NF-κB, а також ентеросорбенту.

Завдання дослідження:

1. Дослідити закономірності функціонування аргіназного та NO-синтазного шляхів метаболізму L-аргініну в крові та кістках щурів за умов окремої та поєднаної токсичної дії фториду та нітрату натрію.

2. Порівняти зміни біохімічних маркерів ремоделювання кісткової тканини та компонентів органічного матриксу трубчастих і губчастих кісток (стегнових кісток і хребців) за умов окремого та поєданого впливу фториду та нітрату натрію.

3. Вивчити зміни остеометричних і біомеханічних показників кісток за умов окремого та поєданого впливу фториду та нітрату натрію.

4. Дослідити дію інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на метаболічні та біомеханічні розлади кісток за умов поєданого надмірного надходження фториду та нітрату натрію.

5. На підставі застосування ентеросорбентів з різним механізмом дії визначити найбільш ефективний засіб корекції поєднаної токсичної дії фторидів і нітратів за оцінкою аргіназного та NO-синтазного шляхів метаболізму L-аргініну.

6. З'ясувати дію ентеросорбенту-лідера на метаболічні та біомеханічні розлади кісток за умов поєданого надмірного надходження фториду та нітрату натрію.

Об'єкт дослідження: патогенез порушень ремоделювання кісткової тканини у організмі ссавців за умов токсичної дії екологічних забруднювачів.

Предмет дослідження: механізми метаболічних і біомеханічних порушень у кістках щурів за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію та розробка нових методів їхньої корекції з використанням інгібіторів редоксчутливих транскрипційних факторів та ентеросорбентів.

Методи дослідження: поставлена мета досягнута шляхом використання експериментальних, біохімічних, остеометричних, біофізичних і математико-статистичних методів.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше виявлено, що поєднане надходження до організму ссавців фториду та нітрату натрію, на відміну від окремого їх впливу, порушує механізм авторегуляції рівня монооксиду нітрогену в стегнових кістках з подальшим розвитком нітрозативного стресу. Це супроводжується високим кістковим обміном з підвищеною резорбцією, яка не компенсується реакцією формування кістки, деполімеризацією колагенових і не колагенових білків кісткової тканини, змінами остеометричних і біомеханічних характеристик кісток (зменшується маса, щільність та мінеральна насиченість стегнових кісток і хребців, знижується міцність і пружність стегнових кісток при лінійному розриві та при випробовуванні на згин).

Вперше виявлено, що інгібітори транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB (SR 11302, амонію піролідиндитіокарбамат та водорозчинна форма кверцетину) відновлюють за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію механізм авторегуляції рівня NO в стегнових кістках щурів, зменшують активність ферментів-маркерів резорбції кістки, обмежують деполімеризацію колагену, протеогліканів та сіалоглікопротеїнів сполучної (кісткової) тканини стегнових кісток і хребців, збільшують щільність та покращують біомеханічні властивості кісток.

Вперше виявлено, що суспензія нанодисперсного кремнезему відновлює за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію функціонування фізіологічного механізму авторегуляції рівня NO в крові та стегнових кістках щурів, обмежує деполімеризацію колагену, протеогліканів та сіалоглікопротеїнів сполучної (кісткової) тканини

стегнових кісток і хребців, покращує остеометричні та біомеханічні характеристики кісток.

Практичне значення одержаних результатів. Авторкою з'ясовано закономірності розвитку метаболічних і біомеханічних порушень у кістках щурів за умов поєднаного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію, поглиблено уявлення про молекулярні механізми дії цих сполук на організм ссавців, що має практичне значення для розробки ефективних остеопротективних засобів. Розроблено нові підходи до корекції остеопенії та остеопорозу за умов сумісної дії нітратів і фторидів з використанням інгібіторів транскрипційних факторів AP-1 та NF-κB, а також ентеросорбентів (суспензії нанодисперсного кремнезему), що потребує подальших доклінічних і клінічних досліджень.

Результати роботи впроваджено у навчальний процес на кафедрі патофізіології Української медичної стоматологічної академії; кафедрах патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету, Національного фармацевтичного університету; Харківського національного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Особистий внесок здобувачки полягає у виборі та постановці мети, формулюванні завдань дослідження, у визначенні актуальності роботи. Дисертанткою самостійно проведено аналіз даних сучасної літератури щодо механізмів патогенної дії нітратів і фторидів на процес ремоделювання кісток ссавців. Здобувачка брала участь у відтворенні експериментальних моделей, проведенні біохімічних, остеометричних і біофізичних досліджень, провела статистичну обробку одержаних цифрових результатів, їхній аналіз, сформулювала висновки дисертаційної роботи. Частина дослідів проведено разом із співавторами статей або тез доповідей (аспірантами О.Є. Акімовим, О.В. Богдановим, Д.О. Хмільом,

докторанткою А.М. Єлінською), які досліджували інші органи та системи. У працях, опублікованих у співавторстві, здобувачці належать результати власних експериментальних досліджень, участь в аналізі та узагальненні отриманих даних.

Апробація результатів дослідження. Основні наукові положення і результати дисертації доповідалися та обговорювалися на XIX міжнародній медико-біологічній конференції молодих дослідників «Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 23 квітня 2016 р.), VII Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції» (Харків, 5–7 жовтня 2016 р.), X науково-практичній конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів» (Тернопіль, 5–6 жовтня 2017 р.), V Національному з'їзді фармакологів України (Запоріжжя, 18–20 жовтня 2017 р.), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Багаторівнева профілактика та діагностика в онкології», присвяченій 95-річчю з дня заснування Харківської медичної академії післядипломної освіти (Харків, 1-2 лютого 2018 р.), XVII читаннях ім. В.В. Підвисоцького (Одеса, 24–25 травня 2018 р.), XI науково-практичній конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів» (Тернопіль, 4–5 жовтня 2018 р.), VII Пленумі Українського наукового товариства патофізіологів та науково-практичній конференції «Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики», присвячені 110-річчю з дня народження члена-кореспондента АМН СРСР, професора М.Н. Зайка (Полтава, 10-12 жовтня 2018 р.), Міжнародній науково-практичній конференції «Світова медицина: сучасні тенденції та фактори розвитку» (Львів, 25–26 січня 2019 р.), Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання розвитку медичних

наук у ХХІ ст.» (Львів, 25-26 травня 2019 р.), II науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (Харків, 21 листопада 2019 р.).

Публікації. Результати дослідження опубліковано в 16 друкованих працях, з яких 4 статті у фахових журналах України, що реферуються міжнародними наукометричними базами даних *Index Copernicus International*, *Google Scholar*, *ПІНЦ*, 2 статті у фахових виданнях за кордоном (Польща, Казахстан), 10 тез доповідей у матеріалах конгресів і конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація викладена на 201 сторінці комп'ютерного набору, містить 32 таблиці та 15 рисунків. Складається з з анотації, вступу, огляду літератури, характеристики матеріалів і методів дослідження, 3-х розділів результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, який містить 325 джерел – 101 кирилицею та 224 латиницею, додатків.

РОЗДІЛ 1

МЕХАНІЗМИ ПАТОГЕННОЇ ДІЇ НІТРАТІВ І ФТОРИДІВ НА ПРОЦЕС РЕМОДЕЛЮВАННЯ КІСТОК ССАВЦІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Механізми регуляторної та патогенної дії активних форм нітрогену на кісткову тканину

Нині відомо, що нітрати будь-якого походження (як ті, що надходять з продуктами харчування, питною водою, у складі лікарських засобів, вихлопними газами, так і ендогенні) відновлюються в організмі ссавців до нітритів, а ті у свою чергу – до монооксиду нітрогену (NO) та інших активних форм нітрогену (АФН) [70, 147, 225, 226, 318]. Цей шлях вважається важливим регулятором низки фізіологічних і метаболічних процесів, особливо функції серцево-судинної та нервової систем, нирок, енергетичного метаболізму, вуглеводного та ліпідного обміну. В останні роки він розглядається як резервна система для утворення NO в ситуаціях, коли шлях L-аргінін / NO-синтаза є дисфункціональним, наприклад, при гіпоксії [147, 182, 226].

Біоактивація нітратів передбачає їхнє селективне накопичення в слинних залозах і активну секрецію в ротову порожнину з подальшим відновленням до більш активних нітрит-аніонів. Ця реакція переважно каталізується бактеріями ротової порожнини (після активної секреції нітрат-іонів в слині) та кишечника [54, 175, 206]. Подальший метаболізм нітритів для утворення NO та інших АФН відбувається системно в крові та тканинах і каталізується різними білками і ферментами, включаючи деоксигенований гемоглобін, міоглобін, нейроглобін, ксантиноксидоредуктазу (XOR), альдегідоксидазу (AO), сульфітоксидазу (SO), компоненти мітохондріального транспортного

ланцюга електронів і NOS [272]. На додаток до цього, існує неферментативний шлях відновлення нітрит-іонів при ацидифікації в травному тракті через розпад азотистої кислоти внаслідок протонування NO_2^- , а також за участю таких відновлювальних агентів, як поліфеноли, аскорбінова кислота, відновлений глутатіон і тіоціанати [227].

Відновлення нітратів і нітритів пов'язано не тільки з генерацією NO, так і з ініціацією через утворення N_2O_3 та $\bullet\text{NO}_2$ реакцій нітрозилування та нітрування біомолекул, наслідком чого є модифікація білків і ліпідів, утворення нітрованих жирних кислот (FA- NO_2), нітрозильних комплексів заліза (Fe-NO), нітрозамінів (RN-NO) і S-нітрозотіолів (RSNO). Fe-NO комплекси та RSNO вважаються «депо» монооксиду кисню та здатні забезпечувати його ефекти на певній відстані від місця синтезу. Ці сполуки можуть забезпечувати сигнальні процеси, необхідні для модуляції активності мітохондрій, вазодилатації, стимуляції ангіогенезу, модуляції метаболізму глюкози, регуляції імунної відповіді та запалення [80, 111, 130, 162, 208, 217, 233]. З іншого боку, реакції нітрозилування та нітрування можуть порушувати внутрішньо- та міжклітинну сигналізацію, призводячи до розвитку численних патологічних процесів [111]. Так, за участю АФН, що нітрозилують інгібіторний білок ІкВ з подальшим його протеолітичним розщепленням, відбувається активація транскрипційного чинника NF-кВ [234].

Існування відновлення нітратів *in vivo* стало очевидним з результатів дослідження J.O. Lundberg і M. Govoni [224]. Автори виявили 4-разове зростання вмісту нітриту плазми у здорових добровольців після прийому нітратів, що, на думку науковців, було пов'язано з ентеро-саліварною циркуляцією останніх. Цікаво, що навіть якщо екзогенні неорганічні нітросполуки не надходять до організму, системний рівень нітритів все ж таки залишається досить високим за

рахунок слини, що дослідники пояснюють в наступному теоретичному прикладі. Рівень нітриту в слинні натще зазвичай становлять близько 50-250 мкМ. Цей нітрит походить від нітрату слини, який, в свою чергу, утворюється головним чином за рахунок окиснення NO, що генерується NOS. З 1-1,5 л слини, виробленої щодня, загальне навантаження нітритом становить 50-400 мкмоль. Середня концентрація нітриту на основі вимірювань, виконаних у крові та різних тканинах, є нижчою за 0,5 мкМ, що дає загальний вміст нітритів <50 мкмоль у дорослого. Тобто, слина може бути основним постачальником нітритів у системному кровотоці.

До останнього часу під сумнів ставилася здатність власних ферментів ссавців відновлювати нітрат-іони. Проте дослідження E.A. Jansson et al. [189] спростовує це уявлення. Автори виявили значне зниження вмісту нітратів у гнотобіонтних мишей, які тривалий час отримували нітрати. При цьому нітратредуктазна активність значно послаблювалася інгібітором XOR алопуринолом. Введення нітратів у нормоксичних щурів також призводило до підвищених рівнів циркулюючого нітриту, які також були ослаблені алопуринолом. Аналогічні ефекти нітратів спостерігалися при дослідженні eNOS-дефіцитних мишей, що дозволяє уникнути активацію судинної NOS і бактерій як джерела нітриту.

Нині відомо, що крім XOR інші ферменти, що містять молібдоптерин, також можуть каталізувати відновлення нітритів до NO в крові і тканинах ссавців. До числа таких сполук належать AO, SO, та мітохондріальний амідоксим відновлювальний компонент (mARC) [280]. У мітохондріях відновлення нітрит-іонів здійснюють цитохром с, комплекс III та комплекс IV, а також мітохондрій-асоційований дезоксиміоглобін та убіхінол [152, 271, 280].

Гемвмісні глобіни (гемоглобін, міоглобін, нейроглобін) відновлюють нітрит-іони в результаті їхньої реакції з залізом активного центру в присутності протона. При цьому генерується NO та утворюється окиснений гем. Ферменти, що містять молібден (XOR, AO, SO) відновлюють нітрити на молібденовому сайті, особливо за умов гіпоксії, коли відновлення молібденового кофактора є максимальним. Цитохром с, як і нейроглобін, існує як гексакоординований гемовий білок. Цитохром с і нейроглобін ефективно відновлюють нітрити, коли зв'язок між залізом і дистальним гістидином змінюється так, що гем стає пентакоординованим [272].

Нормальний рівень нітратів у плазмі крові людини знаходяться в діапазоні від 20 до 40 мкМ, тоді як рівні нітритів істотно нижче 50-300 нМ [226]. Примітно, що внесок екзогенних неорганічних нітросполук у системний рівень нітратів є значно більшим, ніж тих, що утворюються в організмі внаслідок окиснення NO та нітрит-іонів. Наприклад, тарілка салату або шпинату забезпечує більшу концентрацію нітратів у крові, ніж це може зробити ендогенний механізм їхнього утворення протягом доби [226].

Основним джерелом ендогенних нітратів і нітритів у ссавців є шлях L-аргінін / NOS, який конститутивно активний у різних клітинах. За цих умов генерується NO, який окиснюється оксигемоглобіном і міоглобіном до нітрат-іонів, а цитохром с оксидазою та церулоплазміном до нітрит-іонів. Останні також зазнають нормоксичне окиснення ферментами цитохрому P450.

Слід зазначити, що в крові реакція NO з оксигемоглобіном виробляє в основному нітрат і метгемоглобін [226]. У тканинах утворюються значні кількості нітритів. У мишей з дефіцитом eNOS рівень циркулюючого нітриту може бути знижений до 70% [204], хоча

це значно варіюється в залежності від лінії, методу відбору проб і обробки, а також дієтичного вживання нітросполук [226].

Збільшення експресії eNOS призводить до більш високих рівнів циркуляції нітрату. При системних запальних розладах, таких як сепсис і важкий гастроентерит, рівень нітратів і нітритів значно збільшується, швидше за все, внаслідок масивної індукції iNOS. І, навпаки, при захворюваннях з ендотеліальною дисфункцією і зниженням активності cNOS, концентрацій нітритів і нітратів, як правило, знижуються [226].

Численні дослідження, підсумовані у авторитетних джерелах [68, 225, 243, 272], доводять, що NO-синтазний і нітритредуктазний шляхи синтезу NO можуть бути об'єднаними у єдиний цикл – цикл монооксиду нітрогену, який функціонує як механізм авторегуляції кількості NO в організмі. Суть цієї концепції зводиться до того, що нітрат- та нітрит-іони ($\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$) ендогенного походження можуть знову за участю нітрат- та нітритредуктазних систем замикаючи ланцюжок L-аргінін \rightarrow NO \rightarrow $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ у цикл. Кисень, зв'язуючись з гемом, пригнічує нітритредуктази. Таким чином, при різних патологічних процесах (наприклад, за умов гіпоксії, при ацидозі та наявності відновлених форм гемовмісних білків), нітритредуктазна компонента циклу NO стає домінуючою.

Наявність циклічної організації метаболічних процесів дозволяє не тільки ефективно «напрацювати» необхідні фізіологічно активні сполуки (у цьому випадку – NO), але і досить швидко їх елімінувати, що усуває токсичну дію АФН [51]. Відомо, що певна кількість NO відновлюється до N_2O , з якого утворюються інші АФН. Монооксид нітрогену може вступати у реакції з вільними радикалами, зокрема, з супероксидним і гідроксильним ($\bullet\text{OH}$). Так, у реакції з супероксидним аніон-радикалом ($\bullet\text{OO}^-$) утворюється високотоксичний пероксинітрит

($\text{NO} + \cdot\text{OO}^- \rightarrow \cdot\text{ONOO}^-$), який розкладається з утворенням NO_2 і надзвичайно реактогенного $\cdot\text{OH}$ [80, 111].

Крім того, на ефективність циклічної авторегуляції рівня NO може впливати стан конкурентного до NOS неокисного аргіназного шляху метаболізму L-аргініну [122, 265, 306]. Останній є загальним субстратом для аргінази та NOS. Аргіназа гідролізує L-аргінін до L-орнітину і сечовини, тоді як NOS використовує L-аргінін для генерування NO і L-цитруліну. Підвищена активність аргінази обмежує біодоступність L-аргініну, внаслідок чого змінюється активність NOS, що призводить до того, що цей фермент починає продукувати більше супероксидного радикала та менше NO [122].

Показано, що індуктори аргінази II, такі як дибутирил-цАМФ, простагландин E2, трансформувальний фактор росту β (TGF- β), знижують у клітинах синовіальної рідини хворих з різними формами артрити рівень NO . Індукція NO цитокінами Т-гелперів 1 типу, навпаки, пригнічує активність аргінази [137].

Відомо декілька ізоформ аргінази: цитоплазматична (тип I) та мітохондріальна (тип II) [122, 306]. Аргінази експресуються в багатьох різних типах клітин і можуть бути індуковані широким спектром агентів і умов [151, 123, 115, 303]. Обидві ізоформи знаходяться в ендотелії судин, а також у клітинах сполучної тканини (фіброблестах, остеоблестах, макрофагах). Активність аргінази має дві головні гомеостатичні цілі: спочатку вивільнити організм від аміаку через синтез сечовини, а по-друге, одержати орнітин (попередник поліамінів), пролін та інші фізіологічно активні сполуки [306]. Поліаміни, що утворюються за допомогою орнітиндекарбоксилази, необхідні для проліферації клітин і регулювання декількох іонних каналів [63, 253], сприяють диференціації остеобластів [215], запобігають втраті кісткової маси за рахунок зменшення активації остеокластів [311]. У присутності

екзогенних поліамінів посилюється мінералізація позаклітинного матриксу, що є маркером дозрівання остеобластів [215]. Пригнічення аргінази зменшує кількість поліамінів [253].

Пролін, який продукується за участю орнітинамінотрансферази, є необхідним для утворення колагену [107]. Індукція під дією протизапальних цитокінів (наприклад, TGF- β) аргінази I типу суттєво збільшує утворення проліну, що корелює з підвищенням продукції колагену I типу [122].

Примітно, що аргіназа 1 є маркером альтернативно активованих макрофагів M2, які можуть утворюватися з макрофагів M1 за умов впливу протизапальних цитокінів (наприклад, IL-4 і IL-13) [43, 168, 170]. Субпопуляція макрофагів M2, як відомо, має протизапальну активність і відповідає за тканинне ремоделювання, експресуючи білки CD163, CD206, лектин Ym1, хемокінові ліганди CCL1, CCL18, FIZZ1 та хітиназу (ChT), характеризується активацією сигнального шляху фактора транскрипції STAT-6, а також експресією скевенджер-рецепторів Stabilin-1 і манозного рецептора CD206, вивільняє низку протизапальних цитокінів і хемокінів (IL-10, IL-1ra і CCL18) [127, 167, 207, 210]. Цей підтип макрофагів секретує низку регуляторних остеогенних молекул, зокрема морфогенетичний білок кістки (BMP2) та TGF- β [43, 128].

Нещодавно показано перемикання фенотипу макрофагів з прозапального (M1) у протизапальний підтип M2 під час регенерації кісткової тканини [287, 308], що передбачає роль субпопуляцій макрофагів та цитокінів, які ними секретуються, в регуляції активності мезенхімних стовбурових клітин [171, 324]. Як відомо, кісткова тканина постійно піддається процесу фізіологічного ремоделювання через резорбцію кістки остеокластами у поєднанні з формуванням нової кістки остеобластами, що диференціюються з мезенхімних стовбурових клітин.

Окрім того, присутність макрофагів є необхідною для ефективної мінералізації кістки, а їхнє виснаження може призводити до зниження функцій остеобластів [126]. Показано, що макрофаги можуть змінювати ремоделювання кістки переважно за умов стресу та її пошкодження [113].

Примітно, що маркером макрофагів субпопуляції M1 є iNOS [43, 236]. Активація цих клітин та вироблення ними прозапальних цитокінів (IL-1, TNF- α , IL-6), на відміну від M2 макрофагів, сприяє посиленню диференціювання і резорбційної активності остеокластів.

Літературні джерела свідчать про неоднозначну дію NO на цикл кісткового ремоделювання, який, за даними літератури, поділяється на такі фази: 1) активації остеокластів; 2) резорбції кістки; 3) реверсії – активації остеобластів; 4) формування кістки; 5) мінералізації кісткового матриксу; 6) спокою [56, 112, 203, 232, 269].

Так, для диференціації й активації остеокластів необхідним є конститутивне продукування ними NO. Застосування інгібіторів cNOS пригнічує активність остеокластів *in vitro* [177]. Проте не завжди ефекти NO на остеокласти залежать від cGMP [201].

Показана роль активації iNOS у механізмах остеопенії та остеопорозу [140]. Доведена можливість IL-1-індукованої NO-залежної резорбції кістки *in vitro* та *in vivo* [178, 261].

R.J. van't Hof et al. [178] дослідили роль, яку відіграє шлях iNOS у механізмі IL-1-опосередкованої резорбції кістки. Досліди *in vitro* та *in vivo* показали, що миші, дефіцитні за iNOS, виявляють глибокі дефекти IL-1-індукованої резорбції кісткової тканини, але, як правило, реагують на Ca²⁺-тропні чинники, такі як 1,25-дигідроксихолекальциферол і паратиреоїдний гормон. Імуногістохімічні дослідження та аналіз зсуву електрофоретичної рухливості, виконані на культурах кісткового мозку iNOS-дефіцитних мишей, показали порушення IL-1-індукованої ядерної

транслокації компоненту p65 NF- κ B і його зв'язуванні з ДНК, що відновлювалося введенням донатора NO S-нітрозоацетилпенициламіну. Ці результати показують, що шлях iNOS є суттєвим для IL-1-індукованої резорбції кістки, що дозволяє авторам припустити, що ефекти NO можуть бути опосередкованими через IL-1-індуковану активацію NF- κ B у попередниках остеокластів.

У той же час деякі дослідники вказують на можливість пригнічення резорбції кістки при iNOS-залежному утворенні високих концентрацій NO при дії прозапальних цитокінів – IFN- γ , IL-1, TNF- α [222, 261]. Цей ефект може розглядатися як результат NO-індукованого апоптозу клітин-попередників остеокластів [176], або окисної модифікації катепсину K, який експресується остеокластами та активує колагеноліз і резорбцію кістки [256].

У остеобластах NO генерується у відповідь на механічну стимуляцію і вплив естрогенів [145, 198–201]. Провідна роль у механізмі регуляції активності остеобластів і формування кісток відводиться eNOS [177, 288]. Показано, що NO / cGMP-залежна вазодилатація судин, які забезпечують кров'ю кісткову тканину, збільшує у гризунів об'єм кісткових трабекул [150]. Виявлено взаємозв'язки між поліморфізмами гена eNOS та розвитком остеопорозу [129, 159, 220, 288].

Виявлено, що через активацію розчинної гуанілциклази (sGC) та протеїнкінази G (PKG) NO посилює проліферацію, диференціювання і виживання остеобластів [244]. При цьому цитозольні PKG I і мембранозв'язані PKG II відіграють різні, але комплементарні ролі. Експерименти на NOS-дефіцитних мишах також підтверджують важливу роль NO у функціонуванні остеобластів, а введення тваринам інгібіторів NOS блокує остеопротективні ефекти естрогену або механічної стимуляції [262, 263, 230].

Повідомляється про здатність донаторів NO стимулювати проліферацію остеобластів *in vitro* [121, 209, 229]. Низка багатоцентрових рандомізованих контрольованих досліджень свідчить про те, що застосування органічних нітратів (лікарських засобів, які вивільняють NO) підвищує мінеральну щільність кісткової тканини та знижує ризик переломів [119, 191–196, 258]. Показано, що нітрогліцерин запобігає втраті кісткової тканини після оваріектомії, а ізосорбід мононітрат поліпшує мінеральну щільність кісток у жінок у постменопаузі з встановленим остеопорозом [304, 305]. Інші донатори NO (нітрозил-кобінамід) також посилюють трабекулярну кісткову масу мишей, інтактних та з остеопорозом, шляхом посилення активності остеобластів і інгібування диференціації остеобластів [200].

Проте деякі дослідження не підтверджують істотний вплив донаторів NO на ріст і диференціювання остеобластів, за винятком їх високих концентрацій, які гальмують ці процеси [177, 228, 229]. Пригнічення процесу формування кісток, зокрема при дії прозапальних цитокінів, на думку деяких авторів, може бути пов'язане з індукцією NO апоптозу остеобластів [141, 239], що частково може опосередкуватися через cGMP [229].

Повідомляється про можливість негативної дії надмірного надходження в організм неорганічних нітратів на структурно-функціональні та метаболічні властивості кісток, що супроводжується сповільненням темпів їхнього росту, звуженням остеонного шару діафізів, розширенням діаметрів каналів остеонів, зменшеннях міцністних характеристик [76], уповільненням репаративної регенерації кісткової тканини у місці перелому нижньої щелепи, затримкою динаміки диференціювання остеобластів і клітинних елементів мікроциркуляторного русла у ділянці кісткового мозоля, порушенням формування первинних кісткових балок [31, 32].

Нещодавно показано, що за умов тривалого надмірного надходження неорганічних нітросполук у організм ссавців порушується функціонування циклу NO як механізму забезпечення негативного зворотного зв'язку [51]. При відтворенні хронічної інтоксикації нітратом натрію активність NOS (головним чином, iNOS) у різних органах щурів не тільки не знижується, але й значно підвищується, що супроводжується розвитком окисно-нітрозативного стресу [51, 54, 95].

У кістковій тканині підвищення функціональної активності iNOS та утворення пероксинітриду за умов відтворення глюкокортикоїдного остеопорозу на тлі надмірного нітратного навантаження викликає деполімеризацію колагену та протеогліканів, додатково знижує масу кісток, їхню щільність і міцність [85, 86]. Розвиток цих змін автори пов'язують з порушенням механізму авторегуляції кількості NO при його утворенні з екзогенного попередника.

У більшій мірі дизрегуляторні розлади у функціонуванні циклу NO виявляються при поєднаній нітратно-фторидній інтоксикації. При цьому змінюється характер реагування у різних органах щурів (тканинах слинних залоз, пародонта, шлунка) конкурентних NO-синтазних і аргіназних шляхів метаболізму L-аргініну: типове для окремого призначення нітрату натрію пригнічення загальної активності NOS змінюється на гіперактивацію цього ферменту, а активність аргінази та орнітиндекарбоксилази зменшується [16, 54, 87, 105].

Таким чином, численні літературні джерела на здатність неорганічних нітросполук впливати на структурно-функціональні та метаболічні властивості кісток. У низьких концентраціях продукти метаболізму нітрат- та нітрит-іонів виявляють ефекти сигнальних молекул, необхідні для адекватного кровопостачання кісткової тканини, диференціювання та проліферації остеокластів та остеобластів, утворення компонентів екстрацелюлярного матриксу. З позицій

доказової медицини показана ефективність застосування донаторів NO як засобів підвищення мінеральної щільності кісткової тканини при остеопенії та остеопорозі. Проте надмірна кількість нітратів, що надходить до організму, може порушувати механізми авторегуляції кількості NO в тканинах, що збільшує ризик утворення небезпечних активних форм нітрогену, що мають остеотоксичні властивості. В інших органах виявлено, що порушення механізмів регуляції NO та його агресивних метаболітів зростає при пригніченні ферментів аргіназного шляху обміну L-аргініну при дії фторид-іонів. Проте закономірності поєднаної дії неорганічних нітросполук і фторидів на кісткову тканину раніше не вивчалися.

1.2. Вплив фторидів на механізми формування та резорбції кісток та їхня роль у розвитку остеопатології

Відомо, що фтор є життєво важливим мікроелементом, необхідним для забезпечення життєдіяльності людини та тварин, має регуляторний вплив на клітини кісткової тканини (остеобласти, остеокласти, остецити) [110, 131, 133]. Добова потреба у фторі становить 1,5-4,0 мг.

Численні роботи показують кореляцію між дефіцитом фтору в питній воді та захворюваністю карієсом. Наприклад, більшість населення (до 81%) рудничних селищ страждає на карієс зубів. Встановлено орієнтовна межа мінімального вмісту фтору у воді – 0,8-1,0 мг / л [27].

Однак підвищений вміст фторидів також є вкрай небезпечним. У великих концентраціях ці сполуки викликають розвиток флюорозу. Токсичні дози фтору для людини варіюють у широкому діапазоні: для дорослих (16-64) мг/кг, для дітей (3-16) мг/кг [99, 110]. За деструктивною дією фтор розташовується відразу ж після ртуті [27].

Особливістю фторидів є їхня кумулятивна дія [27, 41, 110]. При пероральному надходженні добре розчинні сполуки фтору всмоктуються з шлунково-кишкового тракту в кров на 93-97% в результаті пасивної дифузії. У крові фториди зв'язуються в незначній мірі з альбумінами [99]. В організмі сполуки фтору розподіляються і накопичуються таким чином: кісткова тканина > емаль зубів > дентин > паренхіматозні органи [41].

У тканинах тварин неорганічний фтор представлений у вигляді вільних іонів, або в складі різних сполук і комплексів (наведено за [41]), зокрема, таких як:

- а) флуорид гідрогену (при низьких значеннях рН);
- б) комплекси фтору, зв'язані з іонами металів (Fe^{3+} , Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} та ін.);
- в) мінералоорганічні преципітати;
- г) фториди, інкорпоровані у апатитні елементи кісток і зубів.

Виведення фтору з організму відбувається через шкіру, травний тракт і сечовидільну систему. Період його напіввиведення становить від 2 до 9 годин [46]. Кістки відіграють важливу роль у регуляції концентрації фтору завдяки здатності швидко зв'язувати його надлишок і мобілізувати в позаклітинну рідину при дефіциті. При помірному надходженні фтору в кістках дорослих міститься 1-5 г/кг, у більшій мірі у губчастих кістках, ніж у трубчастих [99].

При зменшенні рН концентрація фторид-іонів знижується. Фтор, взаємодіючи з гідроксиапатитом, утворює фторапатит. Хоча на частку останнього припадає лише 1/40 частина апатиту, тим не менше, саме його присутність забезпечує кислоторезистентність і міцність зубів і кісток. Фториди сприяють фіксації кальцію у твердих тканинах і їхній мінералізації [99].

При надмірному вмісті фторидів розвивається хронічна фторидна інтоксикація – флюороз, що відноситься до полісистемних захворювань, при яких спостерігаються патологічні зміни в багатьох органах (печінці, нирках, зубах, нейроендокринній, серцево-судинній та кістковій системах) [99]. Розвиток скелетного флюорозу супроводжується остеосклерозом, кальцифікацією зв'язок і, нерідко, розвитком супутнього остеопорозу, остеомалаяції або остеопенії [302].

Показано, що ефекти фторидів на функції організму і метаболізм залежать від типу клітин, концентрації та тривалості дії [40, 42, 110, 289]. Так, в кістковій тканині фториди в мікромолярних концентраціях викликають клітинну проліферацію, тоді як в мілімолярних – пригнічують проліферацію і індукують апоптоз клітин [313, 314]. Найбільшу толерантність до високих концентрацій фтору мають остецити, остеокласти більш чутливі до змін дози фторидів. Діапазон анаболічної дії цих сполук на остеобласти є досить вузьким [197].

Дія фторидів на кісткову тканину пов'язана з реалізацією декількох механізмів. По-перше, можливою є безпосередня фізико-хімічної взаємодія фторидів з кістково-мінеральною матрицею [124, 169, 251]. Додавання *in vitro* мілімолярних концентрацій фторид-іонів призводить до перетворення карбонізованого гідроксилапатиту в карбонізований фторапатит, що змінює кристалічну структуру та знижує міцність кістки [149, 161, 273]. Виявлена здатність фторидів затримувати мінералізацію кісток та порушувати структуру їхніх кристалів [169, 241].

По-друге, крім фізико-хімічних впливів, концентрації фторидів (10^{-5} – 10^{-7}) М можуть впливати на матриксні металопротеїнази (ММР) в культурі кісткових клітин *in vitro*, змінюючи склад органічного матриксу та порушуючи подальшу мінералізацію [301].

Показано, що фторид-іони здатні діяти на остеобласти і остеокласти *in vivo* та *in vitro*. При цьому фторид натрію виявив себе як

анаболічний чинник, здатний збільшувати кісткову масу, хоча механізм цієї дії все ще залишається нез'ясованим [102, 157, 214]. Хоча фторид може збільшувати кісткову масу, але новоутворена кістка все ж таки не має нормальної структури та міцності [157, 278].

У трабекулярних кістках дія фториду викликає збільшення об'єму кісткової тканини та товщини трабекул без супутнього посилення їхньої зв'язності [102]. Саме відсутність останньої знижує біомеханічні властивості кістки, незважаючи на збільшення кісткової маси. Ці спостереження у людей було підтверджено експериментальними дослідженнями на гризунах [277, 293].

При застосування модифікованих фторидами зубних імплантатів спостерігається посилена диференціація остеобластів та формування кістки з підвищеною експресією остеогенних маркерів на місці імплантації [135, 240]. У разі імплантації *in vivo* фторапатиту з низьким вмістом фториду (0,5% за масою) спостерігається збільшення кісткоутворення, проте при збільшенні його кількості (2,2% за масою) формування нової кістки припиняється [184].

Фториди виявили здатність пригнічувати *in vitro* функцію ізольованих остеокластів при помірних концентраціях (0,5-1,0) мМ [248], або майже фізіологічному їхньому вмісті 15 мг/л (приблизно 0,8 мМ). У діапазоні концентрацій фториду натрію від 0,15 до 30 мг/л (приблизно 0,004 до 0,7 мМ) було описано двофазну дію цієї сполуки в залежності від його вмісту в культуральних середовищах (наведено за [157]). При 15-30 мг/л активність остеокластів гальмується, проте при 1 мг/л (приблизно 0,050 мМ) їхня функція посилюється. Автори не змогли визначити, чи була така активація остеокластів результатом прямої дії фторидів, або опосередковувалася через остеобласти, присутні в культуральній системі.

Обробка фторидом питної води (50 ppm F⁻ протягом 3-х тижнів) призводить до індукції остеокластогенезу у лінії інбредних мишей СЗН/HeJ (СЗН), про що свідчить збільшення кількості остеокластів вздовж поверхні великогомілкової кістки [312].

Серед механізмів зменшення резорбції кісток при дії мікромольних концентрацій фторидів припускається пригнічення MMP (зокрема MMP-9) та зменшення активації RANKL [116, 254]. Як наслідок, хворі на флюороз скелету мають остеосклероз як основну клінічну ознаку [254].

Можливість обмеження резорбції кісток, здавалося б, дає підставу для застосування препаратів, що містять фтор, для лікування остеопорозу. Проте комітет експертів National Osteoporosis Foundation (NOF) ставить під сумнів ефективність призначення фториду натрію як засобу стимулювання утворення нової кістки. За їхньою оцінкою, «якість отриманої таким чином кісткової маси є невизначеною, і докази того, що фторид знижує ризик переломів, є суперечливими і спірними» [138].

Підвищення процесів резорбції кісткової тканини з ризиком її деструкції при збільшенні концентрації фторидів до мілімолярних значень автори пояснюють активацією апоптозу остеобластів [157, 321].

Взагалі, за даними численних досліджень, фториди опосередковують свої остеотропні ефекти через редоксчутливі транскрипційні чинники (наприклад, NF-κB і AP-1) та MAPK-залежний сигнальний шлях, з відповідними змінами експресії генів, а також через апоптоз клітин та розвиток метаболічних стресів [157, 187, 254, 255, 321].

Показано, що фториди є модуляторами транскрипції в різних типах клітин кісткової тканини [245, 254, 187]. За допомогою методу рекомбінантних ДНК було виявлено 183 гена, експресія яких може

змінюватися при дії сполук фтору. В експериментах на лабораторних мишах показана активація експресії 34 гена та пригнічення експресії 63 генів [285]. За цих умов активуються гени транскрипційних чинників, що забезпечують внутрішньоклітинну сигналізацію, окисний стрес, апоптоз (наприклад, AP-1, NF-κB і p53). Знижується експресія генів, що регулюють гліколіз, окисне фосфорилування, клітинний цикл тощо.

Фториди беруть участь у регуляції процесу трансляції, наприклад, у остеобластах вони впливають на синтез *de novo* 28 білків [310]. Значна частина цих протеїнів при флюорозі регулює окисний метаболізм, апоптоз та фолдінг білків. Показано збільшення рівня теломерази, зворотної транскриптази, дисульфідізомерази, MAPK [223]. Окрім того, відбувається збільшення рівня білків-регуляторів процесів виживання / загибелі клітин – c-fos, c-jun, каспази 3 і 9 [319].

Відомо, що сполуки фтору мають проапоптотичну дію, викликають падіння мембранного потенціалу мітохондрій і відкриття пори в їхній зовнішній мембрані з вивільненням цитохрому c [188].

Y.-L. Zhang et al. [321] показали, що з підвищенням концентрації фториду натрію (з 20 до 80 мг/л) зростає експресія генів *Bim*, каспаз 9 і 14, *Bcl2* і *Bax*. Експресія каспази 3 знижується у середовищі з концентрацією 5 мг/л, але підвищується при концентрації >10 мг/л. Експресія гена каспази 10 зменшується зі збільшенням вмісту фториду. Автори роблять висновок, що індукований фторидом апоптоз остеобластів може реалізовуватися як через мітохондріальний шлях (включаючи механізм стресу ендоплазматичного ретикулума), так і через активацію рецептора смерті.

При збільшенні концентрації фториду до 100 мкМ у остеобластах знижується споживання кисню і збільшується вироблення супероксидного радикала [158]. Розвиток окисного стресу відбувається за умов фторид-індукованого зменшення активності антиоксидантних

ферментів – супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази. Порушення балансу про- і антиоксидантів призводить до активації вільнорадикальних процесів і пошкодження мембранних структур клітин різних органів і тканин [41, 109].

Таким чином, літературні джерела свідчать про те, що фтор є необхідним компонентом забезпечення життєдіяльності, має регуляторний вплив на різні органи та тканини, у тому числі кісткову. Проте все ще залишається нерозв'язаним питання щодо закономірностей впливу фторидів на цикл ремоделювання кісток. Показано дозозалежний характер такої дії. Проте значення поєданого надходження фторид-іонів з іншими сполуками, зокрема нітратами, досліджено недостатньо. За умов надлишкового надходження фторидів виявлено системні метаболічні порушення, пов'язані з активацією редоксчутливих транскрипційних чинників, наприклад, NF-κB. Беручи до уваги роль цих факторів у кістковому обміні можна припустити можливість корекції функціонально-метаболічних властивостей кісток при призначенні їх модуляторів.

1.3. Перспективи патогенетичної терапії порушень ремоделювання кісткової тканини за умов надлишкового надходження нітратів і фторидів

В останні роки саме з нітратами та фторидами пов'язана дискусія щодо характеру їхньої дії на кісткову тканину. З одного боку повідомляється про остеопротективну дію нітратів [119, 191-196, 258] і фторидів [102, 157, 214], можливість позитивного їх впливу у хворих на остеопороз. З іншого боку, показано, що надмірне надходження цих сполук може викликати порушення метаболічних і біомеханічних властивостей кісток [31, 76, 81, 157, 321].

Відомо, що розлад кісткового ремоделювання з підвищенням резорбції кісткової тканини і зниженням синтезу кістки лежить в основі такого системного захворювання як остеопороз [112, 294]. Як засоби базисної терапії цієї патології застосовуються препарати кальцію та вітаміну D [29]. Контрольовані клінічні випробування показали, що комбінація цих засобів зменшує ризик остеопоротичних переломів [213]. Але, за сучасними уявленнями, цей підхід все ж таки залишається недостатнім для попередження втрати кісткової маси у тяжких випадках захворювання [26, 279].

Більшість із засобів профілактики і лікування остеопорозу та остеопенії, схвалених Управлінням з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів США – FDA (Food and Drug Administration), спрямовано на пригнічення остеокласт-опосередкованої резорбції кісткової тканини. Препарати цієї групи підвищують мінеральну щільність кісток та їхню міцність, знижують ймовірність переломів. До числа таких засобів відносяться бісфосфонати, агоністи / антагоністи естрогену (селективні модулятори естрогенових рецепторів), а також інгібітор RANKL (деносумаб) [26, 33, 98, 108, 138, 266, 279]. Кальцитоніновмісні препарати, що також належать до цієї групи, було виключено з рекомендацій Європейського агентства з лікарських засобів EMEA (European Medicines Agency) у зв'язку з підвищенням ризику розвитку онкологічних захворювань при їх тривалому застосуванні [155].

Інший клас засобів для лікування остеопорозу та остеопенії, представлений рекомбінантним людським паратиреоїдним гормоном (терипаратид), який посилює процес формування кістки через переважне стимулювання остеобластів [66]. Стронцію ранелат хоч і має антирезорбтивні й анаболічні властивості щодо кісткової тканини [231, 238], але не належить до засобів, схвалених FDA [138].

Поряд з позитивними властивостями зазначених вище лікарських засобів у літературі також обговорюються їхні недоліки. Наприклад, бісфосфонати, що приймаються всередину, характеризуються низькою біодоступністю, побічними проявами з боку травної системи, відсутністю зручних схем прийому [26, 138, 180]. Середня тривалість лікування пероральними бісфосфонатами не перевищує 1-го року [139]. Агоністи / антагоністи естрогену підвищують ризик тромбозу глибоких вен і викликають судоми ніг [138]. Деносумаб хоч і розглядається як відносно безпечний препарат, але, за даними клінічних випробувань та постмаркетингового спостереження, він виявляє низку побічних ефектів (гіпокальціємію, розвиток атипових переломів і остеонекрозу щелепи, імуносупресію та ін.) [295].

Побічні ефекти терипаратиду включають судоми ніг, нудоту і запаморочення. У гризунів тривале застосування цього препарату викликає збільшення частоти остеосаркоми [138]. Стронцію ранелат при тривалому прийомі підвищує ризик венозних тромбозів [154] і розвитку гіперчутливості – медикаментозної реакція з еозинофілією і системними симптомами (DRESS синдром, drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms) [156], порушує проникаючу здатність рентгенівських променів, що ускладнює інтерпретацію динаміки мінеральної щільності кісткової тканини [154].

Таким чином, пошук нових медичних технологій, спрямованих на остеопротекцію, все ще залишається актуальним.

У останні роки показано, що процес ремоделювання кісткової тканини залежить від активації транскрипційного ядерного чинника κB (NF- κB), активатора його рецептора – RANK (Receptor Activator of NF- κB), ліганду цього рецептора – RANKL (Receptor Activator of NF- κB Ligand), які розглядаються як регулятори остеолізу за участю остеокластів [24, 45, 77, 78, 103, 112, 179, 190, 260, 292, 322]. Ця система

функціонує у тісному зв'язку з компонентами іншого редоксчутливого транскрипційного чинника – AP-1. Члени сімейства Fos, такі як c-Fos і Fra-1, є важливими регуляторами розвитку остеокластів та остеобластів [118, 299]. Примітно, що у регуляції AP-1 на рівні транскрипції генів Jun і Fos беруть участь MAPK, які також активно впливають на цикл ремоделювання кісток [299].

Інтерес щодо ролі NF-κB у фізіології та патології кісток проявився після спостережень за мишами, дефіцитними за такими компонентами сімейства цього транскрипційного чинника, як NF-κB1 (p50) та NF-κB2 (p52). За цих умов було виявлено порушення остеокластогенезу з розвитком у тварин остеопетрозу, коли щільні, деформовані кістки виявляють схильність до переломів [245].

Активація NF-κB пов'язана з його транслокацією NF-κB з цитоплазми у клітинне ядро, що відбувається через взаємодію RANK (експресується на гемопоетичних клітинах моноцитарного ряду – попередниках остеокластів, залежних від M-CSF) з сигнальним білком TRAF-6 [103, 144]. Після взаємодії RANK зі своїм лігандом, відомим як RANKL (конституційно експресується на поверхні остеобластів), клітини-попередники комітуються у напрямку остеокластів і збільшують експресію c-fos і NFATc1 – факторів транскрипції, необхідних для диференціювання [103, 245, 322].

Через активацію NF-κB також опосередковуються цитотоксичні ефекти АФН у клітинах-попередниках остеокластів [178], а також експресія стовбуровими клітинами кісткового мозку й остеобластами M-CSF [268]. Індукторами цього процесу є прозапальні цитокіни (IL-1, TNF-α), паратиреоїдний гормон, холекальциферол (вітамін D₃) [179, 190]. M-CSF через активацію тирозинкінази та залежної від неї сигнальної системи стимулює проліферацію та диференціацію клітин-попередників остеокластів [268]. Цей процес пригнічується естрогенами

та остеопротегерином, який є «хибним» рецептором RANKL. Остеопротегерин, зв'язуючи RANKL, запобігає активації RANK на поверхні остеокластів, що знижує остеокластогенез та резорбцію кісткової тканини [246, 260, 292].

RANKL здатний також стимулювати резорбтивну активність зрілих клітин [103, 179, 183, 309]. Миші, дефіцитні за RANKL або RANK, не продукують остеокласти. Важливими умовами остеокластогенезу є наявність RANKL-костимуляторного сигналу, що надходить з рецепторів, пов'язаних з ITAM-адаптерними білками (від англ. Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) DAP12 і FcR γ . Примітно, що активація NF- κ B вважається критичним компонентом серед інших M-CSF, RANKL і ITAM-залежних сигнальних систем (Ca²⁺/кальциневрин, MAPK, фосфатидилінозитол-3-кіназа і протоонкоген-тирозинпротеїнкіназа Src), необхідних для розвитку остеокластів [245].

В історичному аспекті NF- κ B не розглядався як чинник, необхідний для регуляції остеобластів, але низка недавніх досліджень виявила, що NF- κ B може впливати на диференціювання та активність цих клітин [245].

Y. Li et al. [219] показали, що TNF- α - і TNFR1-дефіцитні миші мають підвищену базальну кісткову масу *in vivo* і збільшене диференціювання остеобластів *in vitro*. Ці ефекти, за даними дослідників, залежать від активації NF- κ B, оскільки пептид NBD блокує дію TNF- α , тоді як гіперекспресія p65 / p50 імітує ефекти цього цитокіну.

Для вивчення впливу NF- κ B на зрілі остеобласти, незалежного від дії на диференціацію, J. Chang et al. [125] показали, що пригнічення комплексу IKK / NF- κ B у диференційованих остеобластах мишей специфічно збільшує кісткову масу та мінеральну щільність трабекулярних кісток, не впливаючи на функціонування остеокластів.

При цьому підтримується процес формування кістки, що запобігає її індуковану овариєктомією втрату. Примітно, що інгібування ІКК / NF-κB посилює експресію компоненту іншого транскрипційного чинника AP-1 (Fra-1 з підсімейства Fos), який залучається до формування кісткового матриксу *in vitro* та *in vivo*.

Звертає на себе увагу той факт, що AP-1 має неоднозначну дію на функціонування остеобластів та остеокластів. Так, характер експресії c-Fos під час остеогенезу свідчить про його вирішальну роль у ендохондральній осифікації, хоча дослідження c-Fos-дефіцитних мишей вказує на те, що c-Fos є необов'язковим для диференціації остеобластів [299]. У той же час, у остеобластах активність AP-1 індукується потужними регуляторами диференціювання та проліферації остеобластів (TGF-β, паратиреоїдним гормоном, 1,25-дигідроксихолекальциферолом) [300]. Причому експресія всіх білків сімейств Fos і Jun у динаміці продукування та мінералізації позаклітинного матриксу поступово знижується, а Fra-2 і Jun D стають основними компонентами комплексу AP-1 у повністю диференційованих остеобластах. Примітно, що, експресія Fra-1 може збільшувати також диференціацію остеокластів [235, 249].

Незважаючи на досить значну кількість досліджень щодо впливу редоксчутливих транскрипційних чинників на процеси ремоделювання кісткової тканини процес створення нових засобів патогенетичної терапії остеопорозу та остеопенії тільки починається. До таких препаратів, схвалених FDA, належить інгібітор RANKL деносумаб. Він є генно-інженерним препаратом і являє собою людські моноклональні антитіла до RANKL. Механізм його дії пов'язаний з пригніченням резорбції кісткової тканини через NF-κB-опосередкований механізм [26, 33, 98, 108, 138].

В останні роки на кафедрі патофізіології Української медичної стоматологічної академії було показано, що інгібітори транскрипційних чинників NF-κB (амонію піролідиндитіокарбамат, кверцетин) [36], AP-1 (SR 11302) [37], STAT-3 (імаїнібу мезилат) [34], а також індуктор сигнальної системи Keap1 / Nrf2 / антиоксидант-респонсивний елемент (епігалокатехін-3-галат) [316] за умов їхнього застосування при відтворенні ліпополісахарид-індукованої системної запальної відповіді є ефективними засобами корекції дезорганізації кісткової тканини альвелярного відростка щурів. Виявлено їхню здатність зменшувати рівень деполімеризації колагену, протеогліканів та глікопротеїнів, що супроводжується меншим ступенем кісткової резорбції.

Встановлено, що введення інгібітора активації NF-κB 4-метил-N-(3-фенілпропіл)бензол-1,2-діаміну при моделюванні поєднаної хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію зменшує колагеноліз та деполімеризацію протеогліканів у кістковій тканині пародонта [20]. Ці результати дають підстави сподіватися на можливість коригування метаболічних, структурних і біомеханічних властивостей інших губчастих і трубчастих кісток за умов спільної дії цих екологічно небезпечних агентів.

Інший підхід до зменшення остеотоксичних наслідків дії нітратів і фторидів може бути пов'язаний із застосуванням ентеросорбентів. Ці засоби здатні змінювати концентрацію неорганічних нітросполук і фторидів у крові [7, 64], поліпшувати функціонально-метаболічні наслідки поєднаної інтоксикації цими речовинами у крові та органах травлення [3, 4, 9, 106]. Так, суспензія нанодисперсного кремнезему знижує токсичність нітриту та фториду натрію при різних режимах введення останніх (за 30 хв. та через 30 хв.) у 1,9 і 2,3 раза та в 1,3 і 1,5 раза відповідно [64].

У літературних джерелах домінує точка зору, що до цього часу все ще не синтезовано ідеального сорбенту для потреб дезінтоксикаційної терапії хронічної інтоксикації нітратами та фторидами, але найбільш перспективними засобами можуть вважатися препарати на основі вуглецю (СКН), лігніну гідролізного та нанодисперсного кремнезему [7].

Раніше досліджувався вплив ентеросорбентів (яблучного пектину, пектиновмісного борошна вівсяної крупи) на метаболічні і біомеханічні характеристики кісток щурів за умов відтворення глюкокортикоїдного остеопорозу на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію [82]. При їх призначенні в меншій мірі відмічалася деполімеризація колагену та протеогліканів у тканині великогомілкових кісток, підвищувалися міцнісні властивості останніх.

Наведена інформація дає підстави вважати, що сорбція нітрат-іонів та їхніх метаболітів, а також сполук фтору, що супроводжується зменшенням концентрації цих речовин у внутрішньому середовищі організму, може змінювати дозозалежний характер негативної дії цих агентів на кісткову тканину. При зниженні концентрації активних форм нітрогену та фторидів їхня остеотоксична дія, на нашу думку, може змінюватися на остеопротективну з адекватним перебігом ремоделювання кісткової тканини. Низькі концентрації нітратів [119, 191–196, 258] і фторидів [102, 157, 214], як відомо, покращують процес формування кісткової тканини, поліпшують її метаболізм, щільність і міцнісні характеристики.

Таким чином, сучасні літературні джерела розкривають біологічне значення нових підходів до корекції механізму ремоделювання кісткової тканини, залежних від активності редоксчутливих транскрипційних чинників та локальної концентрації продуктів метаболізму нітратів і фторид-іонів. Проте залишається нез'ясованою роль цих чинників у механізмах метаболічних, структурних і біомеханічних порушень у

кістках за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію. Певні перспективи можуть бути пов'язані з розширенням методів профілактики та терапії екологічно обумовлених уражень кісток модуляторами активності факторів транскрипції NF-κB і AP-1, а також ентеросорбентами, що обґрунтовує доцільність і своєчасність цього дослідження.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Загальна характеристика матеріалів та методів дослідження

Експериментальні дослідження виконано на 118 білих щурах лінії Вістар масою 190-234 г.

Тварин утримували в умовах акредитованого віварію згідно зі «Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)». При роботі з тваринами дотримувалися вимог «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експерименті та інших наукових цілях» (Страсбург, 18 березня 1986 р.), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Київ, 2006 р.), Етичного кодексу лікаря України та Етичного кодексу науковця України. Комісією з питань біоетики Української медичної стоматологічної академії (протокол №175 від 26.09.2019 р.) порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

Тварини були розподілені на 10 груп (таблиця 2.1).

Таблиця 2.1.

Групування дослідів

№ серії дослідів	Умови експерименту	Кількість тварин
1	2	3
1-ша	Інтактні тварини	10

Продовження таблиці 2.1

1	2	3
2-га	Відтворення хронічної інтоксикації нітратом натрію (500 мг/кг маси тіла, 30 діб)	14
3-тя	Відтворення хронічної інтоксикації фторидом натрію (10 мг/кг маси тіла; 30 діб)	12
4-та	Відтворення поєднаної хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію (30 діб)	15
5-та	Введення інгібітора активації AP-1 – SR 11302, починаючи з 15-ї доби поєднаної інтоксикації фторидом і нітратом натрію	10
6-та	Призначення інгібітора активації NF-κB – амонію піролідіндитіокарбамату, починаючи з 15-ї доби поєднаної інтоксикації фторидом і нітратом натрію	10
7-ма	Введення водорозчинної форми кверцетину (препарат «Корвітин»), починаючи з 15-ї доби поєднаної інтоксикації фторидом і нітратом натрію	10
8-ма	Призначення суспензії матеріалу на основі АУТ-М («Карболайн»), починаючи з 15-ї доби поєднаної інтоксикації фторидом і нітратом натрію	12
9-та	Застосування суспензії лігніну гідролізного (препарат «Поліфепан»), починаючи з 15-ї доби поєднаної інтоксикації фторидом і нітратом натрію	15

Продовження таблиці 2.1

1	2	3
10-та	Введення суспензії нанодисперсного кремнезему, починаючи з 15-ї доби поєднаної інтоксикації фторидом і нітратом натрію	10

Тварин з експерименту виводили шляхом декапітації під інгаляційним ефірним наркозом. Для досліджень у щурів вилучали стегнові кістки та поперекові хребці, які ретельно скелетували [67]. Забір крові проводили за стандартною методикою [60].

2.2. Методика моделювання хронічної інтоксикації нітратом натрію

Нітрат натрію вводили щурам у дозі 500 мг/кг маси тіла у вигляді водного розчину [105]. Введення здійснювали інтрагастрально за допомогою спеціального зонду щоденно протягом 30 діб.

Контроль розвитку хронічної нітратної інтоксикації здійснювали разом зі співавторами шляхом визначення вмісту нітратів у крові за допомогою нітрат-селективного електроду; оцінки нітритів в крові та органах досліджуваних тварин (достовірне підвищення концентрації нітрит-іонів), рівня метгемоглобіну – 5-15%, зміни поведінки тварин (тест “Відкрите поле”). Результати тесту на 30-ту добу інтоксикації відмічали пригнічення центральної нервової системи (затримка переходу щурів на новий квадрат, зростання відвідування периферичних квадратів, збільшення кількості дефекацій та грумінгу).

2.3. Методика моделювання хронічної інтоксикації фторидом натрію

Фторид натрію вводили щурам у дозі 10 мг/кг маси тіла у вигляді 0,1% водного розчину [16]. Введення здійснювали інтрагастрально за допомогою спеціального зонду щоденно протягом 30 діб.

Контроль розвитку хронічної фторидної інтоксикації здійснювали разом зі співавторами шляхом визначення активності аргінази в крові та кістках, оскільки фториди є відомими її інгібіторами.

2.4. Методика застосування інгібіторів активації транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB

З метою оцінки ролі активації транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB застосовували їх інгібітори, наведені у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Перелік інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB, які використовували у дослідженні

Назва сполуки	Призначення	Виробник	Доза
1	2	3	4
SR 11302 ((E,E,Z,E)-3-methyl-7-(4-methylphenyl)-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraenoic acid)	Інгібітор активації AP-1	“Tocris Bioscience” (United Kingdom)	1 мг/кг [284]

Продовження таблиці 2.2

1	2	3	4
Амонію піролідиндитіокарбамат	Інгібітор активації NF-κB	“Sigma-Aldrich” (USA)	76 мг/кг [259]
Водорозчинна форма кверцетину (препарат «Корвітин») – комплекс кверцетину з полівінілпіролідом	Інгібітор активації NF-κB (інгібітор протеасоми)	ЗАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ» (Україна)	100 мг/кг (10 мг/кг у перерахунку на кверцетин) [93]

Зазначені препарати вводили внутрішньоочеревинно 3 рази на тиждень, починаючи з 15-ї доби поєднаної інтоксикації фторидом і нітратом натрію.

2.5. Методика застосування ентеросорбентів

Ентеросорбенти, які використовували у дослідженні (таблиця 2.3), вводили інтрагастрально у вигляді суспензії через зонд щоденно на тлі моделювання поєднаної інтоксикації фторидом і нітратом натрію.

Для виготовлення суспензії порошок нанодисперсного кремнезему розводили у 0,5% об'єм/об'єм водному розчині поліетиленоксиду-400 до утворення 5% маса/об'єм суспензії. Перед застосуванням проводили ресуспендування протягом 5 хв. [2].

Таблиця 2.3

Перелік ентеросорбентів, які використовували у дослідженні

Назва сполуки	Склад	Виробник	Доза
1	2	3	4
Карболайн	Сорбент на основі активованого вугілля	Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (м. Київ, Україна)	100 мг/кг мг/кг [8]
Поліфепан	Гідролізний лігнін деревини	Іркутський інститут хімії ім. А.Е. Фаворського СВ РАН (Іркутськ, Росія)	100 мг/кг [8]
Нанодисперсний кремнезем	Нанодисперсний оксид кремнію (розмір часток 25-45 нм)	“PlasmaChem GmbH” (Berlin, Bundesrepublik Deutschland)	100 мг/кг [2]

2.6. Біохімічні методи дослідження

Перелік біохімічних методів дослідження наведено в табл. 2.4.

Таблиця 2.1

Біохімічні методи дослідження

№	Параметр, що вивчається	Досліджувані матеріали	Літературні джерела
1	2	3	4
1	2	3	4

Продовження таблиці 2.4

1	2	3	4
1.	Загальна NO-синтазна активність, нітрити	Кров (після осадження гемоглобіну), гомогенат стегнової кістки	Akimov O.Ye., Kostenko V.O. (2016) [105]
2.	Активність конститутивних та індукційної ізоформ NO-синтази	Гомогенат стегнової кістки	Yelins'ka A.M. et al. (2019) [317]
3.	Концентрація пероксинітриту	Гомогенат стегнової кістки	Akimov O Ye, Kostenko VO. (2016) [105]
4.	Загальна аргіназна активність	Кров, гомогенат стегнової кістки	Akimov O Ye, Kostenko VO. (2016) [105]
5.	Активність лужної фосфатази	Сироватка крові	Набір реактивів фірми "Ольвекс діагностикум" (Росія)
6.	Активність кислої фосфатази	Сироватка крові	Набір реактивів фірми "Ольвекс діагностикум" (Росія)
7.	Активність тартратрезистентної кислої фосфатази	Сироватка крові	Набір реактивів фірми "Ольвекс діагностикум" (Росія)
8.	Концентрація загального кальцію	Плазма крові, сеча	Набір реактивів фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна)

Продовження таблиці 2.4

1	2	3	4
9.	Концентрація вільного оксипроліну	Гомогенат стегнової кістки, хребців	Тетянец С.С. (1985) [90]
10.	Концентрація N-ацетилнейрамінової кислоти	Гомогенат стегнової кістки, хребців	Кайдашев І.П. та співавт. (2003) [60]
11.	Концентрація гексуранових кислот	Гомогенат стегнової кістки, хребців	Шараев П.Н. и др. (1987) [100]

Наважку нативної кістки промивали ізотонічним розчином хлориду натрію. Потім її гомогенізували з додаванням 0,1 М трис-буфера (рН = 7,4), щоб досягти 10% гомогенату.

Загальну активність NO-синтаз (NOS) визначали за збільшенням концентрації нітрит-іонів (NO_2^-) після інкубації протягом 30 хв у такому інкубаційному розчині: 2,5 мл 0,1 М трис-буфера, 0,3 мл 320 мМ водного розчину L-аргініну та 0,1 мл 1 мМ розчину нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату відновленого. Концентрацію NO_2^- визначали на спектрофотометрі Ulab-101 за поглинанням на довжині хвилі 540 нм за утворенням забарвлених діазосполук у реакції з 1% сульфаніламідною кислотою з подальшим додаванням 1% 1-нафтиламіну (реактив Griss-Poswaj) [105]. Для визначення активності конститутивних NOS (cNOS) додавали 1% розчин аміногуанідину гідрохлориду (98%, "Sigma-Aldrich, Inc.", США) [317]. Активність iNOS оцінювали шляхом віднімання активності cNOS від загальної активності NOS.

Загальну активність аргіназ вимірювали на спектрофотометрі Ulab-101 за утворенням забарвлених продуктів реакції L-орнітину та нінгідрину (реактив Chinard) на довжині хвилі 515 нм [105].

Для оцінки утворення пероксинітриту в тканинах визначали концентрацію пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів на спектрофотометрі Ulab-101 (за поглинанням на довжині хвилі 355 нм) за утворенням у реакції пероксинітриту та йодиду калію атомарного йоду в присутності фосфатного буферного розчину (рН=7,0) [105].

Активність ферментів-маркерів формування та резорбції кісток (лужної фосфатази, кислої фосфатази та її кісткової тартратрезистентної ізоформи) визначали кінетичним методом з використанням набору реактивів фірми «Ольвекс діагностикум» (Росія).

Концентрацію загального кальцію у плазмі крові та сечі визначали фотометрично з використанням набору реактивів фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна). Ca^{2+} у лужному середовищі реагують з окрезолфталеїн комплексом і утворюють забарвлений комплекс. Інтенсивність фіолетового забарвлення комплексу пропорційна концентрації кальцію у дослідній пробі. Екскреція кальцію розраховували за умов спонтанного добового діурезу [101]. Щури знаходилися у метаболічних клітках з вільним доступом до води та корму.

Стан деполімеризації колагену визначали за вмістом у гомогенаті вільного оксипроліну [90]. Деполімеризацію інших (сіалоглікопротеїнів і протеогліканів) оцінювали шляхом визначення N-ацетилнейрамінової та гексуронових кислот відповідно [60, 100].

2.7. Визначення остеометричних характеристик кісток

Виділяли та скелетували стегнові кістки та 3-ті поперекові хребці. Остеометрію виконували за допомогою мікрометра МК 0-25 з точністю до 0,01 мм [57, 58]. При дослідженні загальної довжини стегнової кістки вимірювали відстань від її головки до площини, що проходить через найнижчі точки латерального і медіального виростків. Визначали масу кісток шляхом зважування на вагах з точністю до 1 мг. Розраховували індекс Simon (SI), як співвідношення максимальної довжини кістки (для хребця – висота його тіла) і кубічного кореня їхньої маси). SI є інтегративним показником ростових параметрів кісток, їх міцності і мінерального балансу [67, 274].

2.8. Визначення показників структурної композиції кісток

Визначали показники структурної композиції цілих сухих кісток, які кількісно відображають їхню щільність і мінеральну насиченість. Ступінь мінералізації кісткової речовини оцінювали за показником зольності. Ці параметри розраховували за формулами [88]: щільність = маса кістки / об'єм кістки; мінеральна насиченість = маса золи / об'єм кістки; зольність = маса золи / маса кістки $\times 100\%$.

Об'єм кісток визначали за допомогою градуйованої пробірки за об'ємом витісненої рідини. Озолення кісток проводили у муфельній печі при температурі 520°C протягом 12 годин.

2.9. Визначення біомеханічних характеристик кісток

Дослідження біомеханічних властивостей стегнової кістки проводили за 2-х точковою схемою (випробовування на лінійний розрив) та 3-х точковою схемою (випробовування на згин) з використанням машини розривної РМУ-0,05-1 з оцінкою розривного

навантаження (міцності) та відносного подовження кісток (пружності), а також за 4-х точковою схемою (випробовування на згин) за допомогою деформаційної установки МРК-1 з розрахунком модулю Юнга, межі міцності, відносної залишкової деформації до руйнування та відносного видовження до руйнування.

Товщину і ширину зразків вимірювали за допомогою мікрометра МК 0-25 з похибкою $\pm 0,01$ мм не менше ніж у трьох місцях поблизу середини діафіза стегнової кістки. Відстань між опорами вимірювали за допомогою штангенциркуля з похибкою $\pm 0,02$ мм.

При випробовуванні на деформаційній установці МРК-1 використовували пристрій, що забезпечував деформацію згину за 4-х точковою схемою навантаження. Зразок поміщали в робочу зону установки та здійснювали згин зі стабільною швидкістю $0,25 \pm 0,01$ мм/хв до руйнування кістки. Процес деформації фіксувався на діаграмній стрічці при швидкості її руху 12 мм/хв за допомогою самописця КСП-4 в координатах «навантаження-прогин». Калібрування діаграми здійснювалося тарувальним вантажем масою 5 кг.

За діаграмою визначали модуль Юнга для згину (E), межу пружності $\sigma_{пр}$, межу міцності $\sigma_{мі}$ та відносне залишкове видовження крайніх волокон до руйнування δ за стандартною методикою.

Модуль Юнга під час згину ($E_{зг}$) в МПа обчислювали за формулою:

$$E_{зг} = \frac{0,185 \cdot L_v^3 \cdot (F_2 - F_1)}{bh^3 \cdot (z_2 - z_1)}$$

де: L_v – відстань між опорами, мм; F_2 – навантаження, що відповідає величині відносної деформації крайніх волокон 0,3%, Н; F_1 – навантаження, що відповідає величині відносної деформації крайніх волокон 0,1%, Н; b – ширина зразка, мм; h – товщина зразка, мм; z_2 –

прогин зразка, який відповідає відносній деформації крайніх волокон 0,3%, мм; z_1 – прогин зразка, який відповідає відносній деформації крайніх волокон 0,1%, мм.

Відносну деформацію крайніх волокон (ε) обчислювали за формулою:

$$\varepsilon = \frac{zh}{0,185L_v^2},$$

де: L_v – відстань між опорами, мм; h – товщина зразка, мм; z – прогин зразка, мм.

Межа пружності та міцності (або тимчасовий опір) розраховувалися за формулою:

$$\sigma = \frac{F \cdot L_v}{bh^2},$$

де: F – навантаження, що відповідає відповідній межі, Н; L_v – відстань між опорами, мм; b – ширина зразка, мм; h – товщина зразка, мм.

Для розрахунку відносного видовження крайніх волокон до руйнування ε_{\max} (характеристика пластичності матеріалу) використовували максимальне значення прогину зразка.

Для визначення величини навантажень та стріли прогину за діаграмою деформації використовували масштаб за відповідними осями.

2.10. Статистична обробка результатів експерименту

Статистичні розрахунки проводили з використанням програми "StatisticSoft 6.0". Для перевірки розподілу на нормальність було застосовано розрахунок критерію w (Shapiro–Wilk test). Якщо варіаційні ряди відповідали нормальному розподілу, то для їхнього порівняння використовували критерій t (Student's t test) для незалежних вибірок. У разі, коли цифрові дані не підлягали нормальному розподілу,

статистичну обробку здійснювали з використанням непараметричний методу – U-тесту (Mann–Whitney test)

РОЗДІЛ 3

МЕТАБОЛІЧНІ ТА БІОМЕХАНІЧНІ ПОРУШЕННЯ КІСТОК ЗА УМОВ ПОЄДНАНОГО НАДЛИШКОВОГО НАДХОДЖЕННЯ ФТОРИДУ ТА НІТРАТУ НАТРІЮ

3.1. Функціонування аргіназного та NO-синтазного шляхів метаболізму L-аргініну в крові та кістках щурів

L-аргінін – амінокислота, що відіграє важливу роль в гомеостазі людини та інших ссавців. В організмі L-аргінін піддається ферментативному розщепленню за двома основними шляхами. Перший –NO-синтазний шлях метаболізму, який каталізується NO-синтазою. Виділяють три ізоформи NO-синтази: індукцибельну (iNOS), нейрональну (nNOS) та ендотеліальну (eNOS) [164, 282]. Нейрональна та ендотеліальна NOS є Ca^{2+} залежними ферментами, а iNOS – Ca^{2+} незалежною. Важливою особливістю останньої є те, що вона знаходиться здебільшого в клітинах макрофагального типу і активується підчас запалення. Спільним в діяльності NOS є продукти, що утворюються із L-аргініну за їхньої участі: L-цитрулін та NO. Останній є важливим біологічним регуляторним агентом, здатним розслабляти гладенькі м'язи судин, стимулюючи тим самим кровонаповнення органу. Але NO має і негативні риси, при його взаємодії із супероксидним аніон-радикалом відбувається синтез токсичного метаболіту – пероксинітриту ($ONOO^-$) [286]. Ця сполука здатна ініціювати пероксидне окиснення ліпідів клітинних мембран, наслідком чого є ушкодження клітини та її органел. Функціональний стан NO-синтазного шляху метаболізму L-аргініну детально вивчався в останнє десятиліття, але в останні роки все більшу увагу привертає до себе інший шлях метаболізму L-аргініну – аргіназний. Цей шлях регулюється

іншою групою ферментів – аргіназами, виділяють дві ізоформи аргінази: аргіназа-1 та аргіназа-2 [122]. При активації аргіназо-залежного метаболізму L-аргініну утворюється сечовина та L-орнітин. Аргінази та NOS є ферментами, що конкурують за спільний субстрат – L-аргінін [117, 153]. Є дані про те, що аргінази в декілька разів активніші (за швидкістю реакції) за NOS. Але у фізіологічних умовах переважає NO-синтазний шлях метаболізму L-аргініну. Це пов'язано з гальмівним впливом одного із продуктів NO-синтазного шляху – оксиду нітрогену. При достатній його кількості аргінази є менш неактивними [153].

Слід зазначити, що NO-синтазний шлях метаболізму L-аргініну є не єдиним джерелом ендogenous NO. Існує також і нітрат / нітритредуктазний шлях утворення NO, що є значно потужнішим [68, 225, 243, 272]. Тому в останні роки проводяться дослідження із вивчення функції цього шляху отримання NO в нормі та при різних патологічних станах. Активацію цього шляху проводять введенням в організм екзогенних нітратів [51–53, 68, 105]. При цьому йде їх перетворення спочатку у нітриту (NO_2^-), а потім із нітриту утворюється безпосередньо NO. Деякі речовини, наприклад, іони фтору при надлишковому надходженні здатні збільшувати генерацію супероксидних аніон-радикалів, створюючи при цьому умови, за яких NO йде не на виконання регуляторних функцій, а на утворення пероксинітриту [16, 19].

Аналіз результатів по вивченню в крові стану NO-синтазного та аргіназного шляху метаболізму L-аргініну (таблиця 3.1) при надмірній активації нітрат-нітрит редуктазного шляху утворення NO при введенні надлишкової кількості нітрату натрію показав зниження загальної аргіназної активності на 56% ($p < 0,01$). Ці дані свідчать про те, що за умов наявності надлишку екзогенних нітратів нітрат-нітритредуктазна система бере на себе основне навантаження по синтезу NO, а оскільки

останній наявний у великих кількостях, то аргіназний шлях інгібується [117, 153].

Таблиця 3.1

Функціональна активність шляхів метаболізму L-аргініну в крові щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію (M±m)

Групи	Загальна активність NOS, мккат/л	Загальна аргіназна активність, мккат/л
Інтактні (n=10)	193,75±33,3	27,35±5,4
Введення нітрату натрію (n=14)	156,85±17,44 **	12,19±1,34 *,**
Введення фториду натрію (n=12)	307,85±17,84*	6,53±0,52 *
Сукупне введення фториду та нітрату натрію (n=15)	104,19±14,12 *,**,***	21,94±3,49 **,***

Примітки (у таблицях розділу 3):

- 1) * – $p < 0,05$ у порівнянні з даними 1-ї групи (інтактні тварини);
- 2) ** – $p < 0,05$ у порівнянні з даними 2-ї групи (після введення нітрату натрію);
- 3) *** – $p < 0,05$ у порівнянні з даними 3-ї групи (після введення фториду натрію).

При введенні надлишкової кількості фториду натрію спостерігалось підвищення загальної активності NOS на 59% ($p < 0,01$), але одночасно спостерігається зниження активності аргіназ на 80% ($p < 0,01$). Ці зміни пояснюються з одного боку переходом частини NO в токсичний пероксинітрит [146], що призводить до активізації NOS; з іншого боку оскільки NOS та аргінази є конкурентами за L-аргінін, то

надмірна активізація NOS призведе до відсутності субстрату у аргіназ [227]. При поєднаному надлишковому надходженні нітрату та фториду натрію загальна активність NOS знизилась на 46% ($p < 0,01$) у той час як загальна активність аргінази статистично значуще не змінилась.

Тобто, хронічне надлишкове введення фториду натрію у кількості 10 мг/кг підвищує загальну активність NOS, одночасно зменшуючи загальну активність аргіназ. При хронічному надлишковому введенні нітрату натрію у кількості 500 мг/кг загальна активність NOS статистично значуще не змінюється, а загальна активність аргіназ зменшується. Поєднана активація нітрат- / нітритредуктазної системи та дія фториду знижує загальну активність NOS, але статистично значуще не впливає на активність аргінази.

Нами проаналізовано загальну активність NOS у стегнових кістках щурів за умов експерименту (таблиця 3.2). У інтактних тварин величина сумарної активності цього ферменту у стегнових кістках становила $0,76 \pm 0,04$ мкмоль $\text{NO}_2^-/\text{г} \cdot \text{хв}$. Активність cNOS – $0,16 \pm 0,02$ мкмоль $\text{NO}_2^-/\text{г} \cdot \text{хв}$.; iNOS – $0,60 \pm 0,04$ мкмоль $\text{NO}_2^-/\text{г} \cdot \text{хв}$.

Нині відомо, що cNOS у кістках представлена eNOS та nNOS. Перша ізоформа експресується стромальними клітинами кісткового мозку, остеобластами, остеоцитами й остеокластами [228]. Експресію мРНК nNOS також виявлено у кістках [174], наприклад, у остеоцитах [160].

Введення нітрату натрію супроводжувалося у стегнових кістках зменшенням сумарної активності NOS та її конститутивної та індукційної ізоформ до $0,34 \pm 0,09$; $0,09 \pm 0,03$ та $0,26 \pm 0,07$ мкмоль $\text{NO}_2^-/\text{г} \cdot \text{хв}$. відповідно, тобто на 55; 44 та 57%.

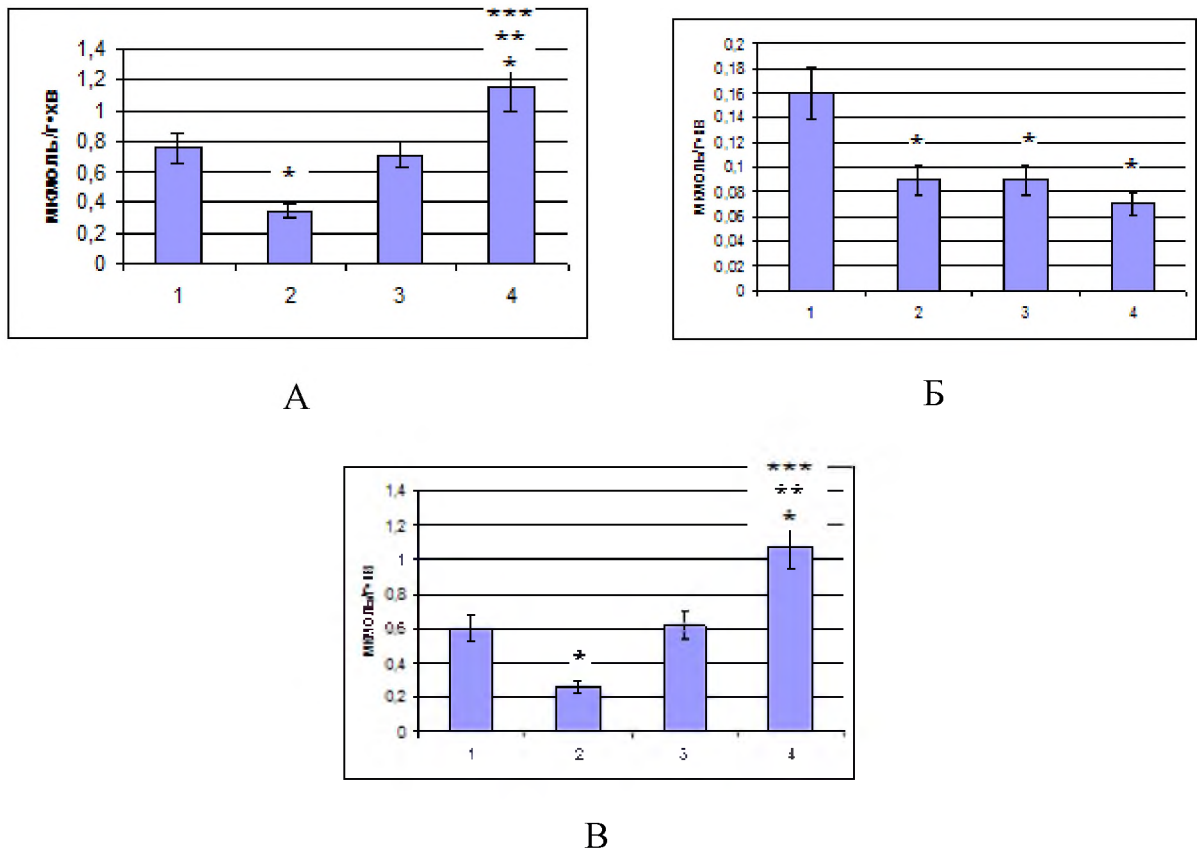


Рис. 3.1. Активність NOS сумарна (А), сNOS (Б), іNOS (В) у стегнових кістках інтактних тварин (1); при введенні нітрату натрію (2), фториду натрію (3), поєднаному введенні нітрату та фториду натрію (4). $P < 0,05$ порівняно зі значеннями: * 1-ї групи, ** 2-ї групи, *** 3-ї групи.

Це узгоджується з принципом циклічної організації механізмів авторегуляції рівня NO в тканинах ссавців, згідно з яким за фізіологічних умов NO синтезується у адекватній кількості тільки тоді, коли він є необхідним. При надлишковому утворення NO через нітрат / нітритредуктазний шлях роль NOS закономірно знижується [51, 225].

Застосування фториду натрію суттєво не позначалося у стегнових кістках на величині сумарної активності NOS та її індукційної ізоформи, проте достовірно зменшувало активність сNOS – до $0,09 \pm 0,01$ мкмоль $\text{NO}_2^-/\text{г} \cdot \text{хв.}$, тобто на 44%.

Проте при поєднаному введенні фториду та нітрату натрію спостерігалось суттєве підвищення у стегнових кістках сумарної активності NOS (за рахунок збільшення активності iNOS). Величина загальної активності NOS за цих умов збільшувалася до $1,15 \pm 0,13$ мкмоль $\text{NO}_2^-/\text{г} \cdot \text{хв.}$, що перевищувало результат 1-ї групи на 51%, 2-ї – в 3,4 рази, 3-ї – на 62%.

Активність iNOS підвищувалася до $1,08 \pm 0,13$ мкмоль $\text{NO}_2^-/\text{г} \cdot \text{хв.}$, що перевищувало результат 1-ї групи на 80%, 2-ї – в 4,2 рази, 3-ї – на 74%.

Звертає на себе увагу, що нітрат натрію на тлі одночасного введення фториду не включає фізіологічний механізм підтримки адекватного рівня NO (цикл оксиду азоту), при цьому роз'єднується функціонування двох його компонентів – нітрат / нітритредуктазного та NO-синтазного. Раніше такий патерн порушення авторегуляції рівня NO у кістковій тканині відмічався при надлишковому введенні нітратів з відтворенням станів, що супроводжуються гіперекспресією iNOS (травматичний процес, експериментальний остеопороз) [30, 85].

Показники загальної аргіназної активності у стегнових кістках щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію наведено на рис. 3.2. У інтактних тварин величина сумарної активності цього ферменту у стегнових кістках становила $1,4 \pm 0,03$ мкмоль/хв·г білка.

Введення нітрату натрію супроводжувалося у стегнових кістках вірогідним підвищенням загальної аргіназної активності до $1,61 \pm 0,02$ мкмоль/хв·г білка, тобто на 15%. Це узгоджується з поглядом на конкурентні відносини між NO-синтазним і аргіназним шляхами метаболізму L-аргініну, що реалізуються при фторидно-нітратній інтоксикації [16].

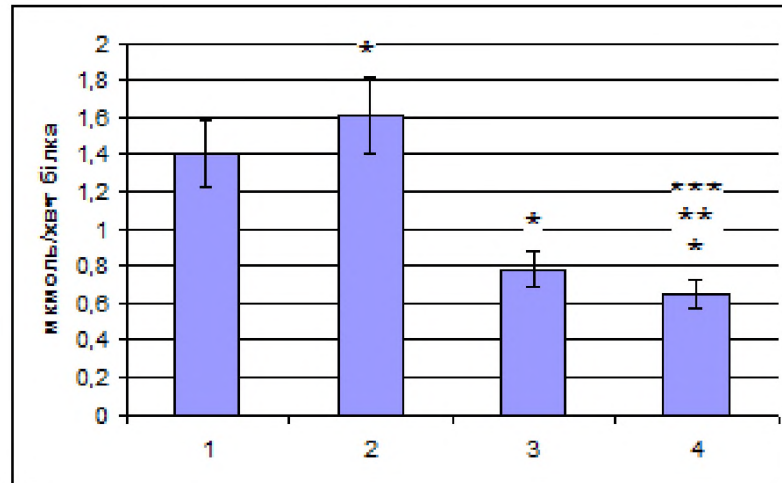


Рис. 3.2. Загальна аргіназна активність у стегнових кістках інтактних тварин (1); при введенні нітрату натрію (2), фториду натрію (3), поєднаному введенні нітрату та фториду натрію (4). $P < 0,05$ порівняно зі значеннями: * 1-ї групи, ** 2-ї групи, *** 3-ї групи.

Застосування фториду натрію зменшувало значення цього показника до $0,78 \pm 0,03$ мкмоль/хв·г білка, що становить 44%. Це відповідає точці зору про фторид-іони як неконкурентні інгібітори аргінази [23, 257, 290].

При поєднаному введенні фториду та нітрату натрію спостерігалось суттєве зменшення у стегнових кістках загальної аргіназної активності до $0,65 \pm 0,04$ мкмоль/хв·г білка, що достовірно поступалося значенню 1-ї групи на 54%, 2-ї – на 60%, 3-ї – на 17%.

Тобто фторид-іони ефективно зменшують загальну аргіназну активність не тільки за умов їхньої окремої дії на кістки, але і при поєднаному впливі разом з метаболітами нітратів. Цьому може сприяти дизрегуляція циклу NO, що супроводжується неузгодженим підвищенням функціонування його нітрат / нітритредуктазного та NO-синтазного компонентів. Закономірним наслідком гіперекспресії iNOS на тлі надлишкового утворення продуктів відновлення нітрат-іонів у

тканинах стегнової кістки є збільшення концентрації АФН, зокрема, пероксинітриту.

На рис. 3.3 наведено результати визначення концентрації пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів у стегнових кістках щурів за умов експерименту. У інтактних тварин значення цього показника у стегнових кістках становила $2,75 \pm 0,05$ мкмоль/г.

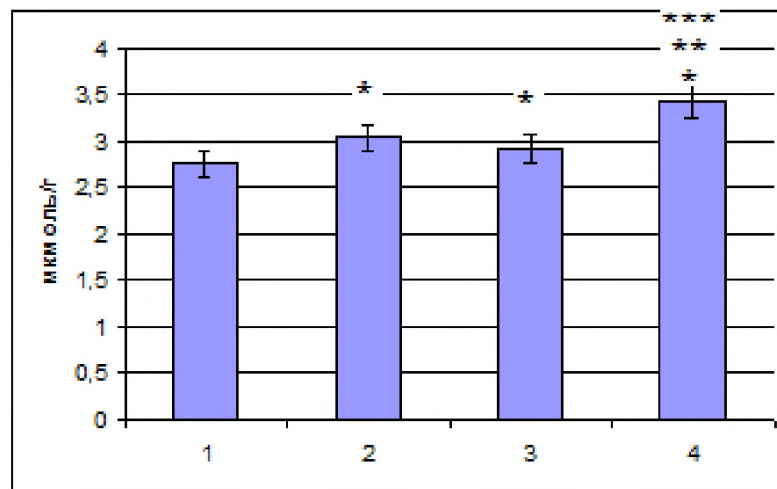


Рис. 3.3. Концентрація пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів у стегнових кістках інтактних тварин (1); при введенні нітрату натрію (2), фториду натрію (3), поєднаному введенні нітрату та фториду натрію (4). $P < 0,05$ порівняно зі значеннями: * 1-ї групи, ** 2-ї групи, *** 3-ї групи.

Введення нітрату натрію супроводжувалося вірогідним підвищенням концентрації пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів до $3,03 \pm 0,06$ мкмоль/г, тобто на 10%. Цей механізм, очевидно, не залежить від активності iNOS, яка зменшується за цих умов. Скоріше за все він пов'язаний з утворенням великої кількості NO внаслідок активації нітрат / нітритредуктазного шляху, або неферментативних механізмів метаболізму екзогенних нітратів [69, 71, 243]. За цих же умов значно підвищується генерація супероксидних аніон-радикалів різними

джерелами (мітохондріями, мікросомами, НАДФН-оксидазою фагоцитів) [4, 17, 35].

Застосування фториду натрію також достовірно збільшувало значення цього показника – до $2,92 \pm 0,04$ мкмоль/г.

При поєднаному введенні фториду та нітрату натрію спостерігалось суттєве підвищення у стегнових кістках концентрації пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів до $3,42 \pm 0,05$ мкмоль/г, що достовірно перевищувало результат 1-ї групи на 24%, 2-ї – на 13%, 3-ї – на 17%.

Таким чином, поєднане введення фториду та нітрату натрію, на відміну від окремого застосування цих сполук, порушує механізм авторегуляції рівня NO в стегнових кістках щурів, збільшуючи активність загальної NO-синтази та її індукцибельної ізоформи на тлі зниження загальної аргіназної активності з подальшим підвищенням у тканинах концентрації пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів, що свідчить про розвиток нітрозативного стресу.

3.2. Маркери формування та резорбції кісток за умов експерименту

Для оцінки процесів кісткового ремоделювання, особливо характеру резорбції та формування кісток, оцінювали активність маркерних ферментів у сироватці крові (табл. 3.2) – лужної фосфатази (маркер формування кістки), а також кислої фосфатази та її тартрат-резистентної ізоформи (маркери резорбції).

У інтактних тварин величина активності лужної фосфатази у сироватці крові становила $307,8 \pm 11,1$ од. акт. Активність кислої фосфатази та її тартрат-резистентної ізоформи – $11,8 \pm 0,7$ та $6,3 \pm 0,3$ од. акт. відповідно.

Таблиця 3.2

Показники формування та резорбції кісток у щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію ($M \pm m$, $n=20$)

Групи	Показники активності ферментів у сироватці крові		
	Лужна фосфатаза од. акт.	Кисла фосфатаза, од. акт.	Тартрат-резистентна кисла фосфатаза, од. акт.
Інтактні	307,8±11,1	11,8±0,7	6,3±0,3
Введення нітрату натрію	316,4±20,2	9,4±0,9	7,8±0,2 *
Введення фториду натрію	346,4±13,8	12,3±1,0	6,4±0,6
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	299,2±18,5	18,9±0,9 *, **, ***	8,5±0,3 *, ***

Застосування нітрату натрію суттєво не позначалося на величинах загальної активності лужної та кислої фосфатаз, але достовірно підвищувало активність тартрат-резистентної кислої фосфатази – до $7,8 \pm 0,2$ од. акт., тобто на 24%, що вказує на збільшення резорбції кісткової тканини.

Введення фториду натрію не супроводжувалося вірогідними змінами цих ферментів.

При поєднаному введенні фториду та нітрату натрію активність лужної фосфатази суттєво не змінювалася, проте активність кислої фосфатази значно підвищувалася – до $18,9 \pm 0,9$ од. акт., що перевищувало результат 1-ї групи на 60%, 2-ї – вдвічі, 3-ї – на 54%. Активність тартрат-резистентної кислої фосфатази збільшувалася до

8,5±0,3 од. акт., що перевищувало значення 1-ї групи на 35%, 3-ї – на 33%.

При дослідженні показників обміну кальцію (концентрації загального кальцію у плазмі крові та сечі, екскреції кальцію нирками) в усій групі тварин вірогідні зміни були відсутні (таблиця 3.5).

Таблиця 3.3

Показники обміну кальцію у щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію (M±m, n=20)

Групи	Показники обміну кальцію		
	Концентрація загального кальцію, ммоль/л		Екскреція кальцію, мкмоль/год /100 г
	Кров	Сеча	
Інтактні	2,29±0,19	2,82±0,26	0,62±0,07
Введення нітрату натрію	2,34±0,28	2,78±0,22	0,64±0,06
Введення фториду натрію	2,19±0,20	2,86±0,25	0,55 ±0,11
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	2,25±0,29	2,89±0,25	0,61±0,11

Таким чином, поєднане надлишкове введення фториду та нітрату натрію виявляє високий кістковий обмін з підвищеною резорбцією, яка не компенсується реакцією формування кістки, що підтверджується збільшенням активності маркерних ферментів резорбції кісткової тканини порівняно з окремим призначенням цих токсикантів. Показники

лужної фосфатази (маркеру формування кістки) та обміну кальцію істотно не змінюються.

3.3. Закономірності деполімеризації біополімерів органічного матриксу кісткової тканини

У нашому дослідженні ми оцінювали у гомогенаті стегнових кісток і хребців рівень деполімеризації колагену (колагеноліз), протеогліканів і глікопротеїнів за вмістом їхніх мономерів: вільного оксипроліну, гексуронових кислот та N-ацетилнейрамінової кислоти (NANA) відповідно.

На рис. 3.4 наведено результати визначення концентрації вільного оксипроліну за умов експерименту. У інтактних щурів значення цього показника у стегнових кістках і хребцях становила $3,64 \pm 0,10$ та $3,98 \pm 0,13$ мкмоль/г.

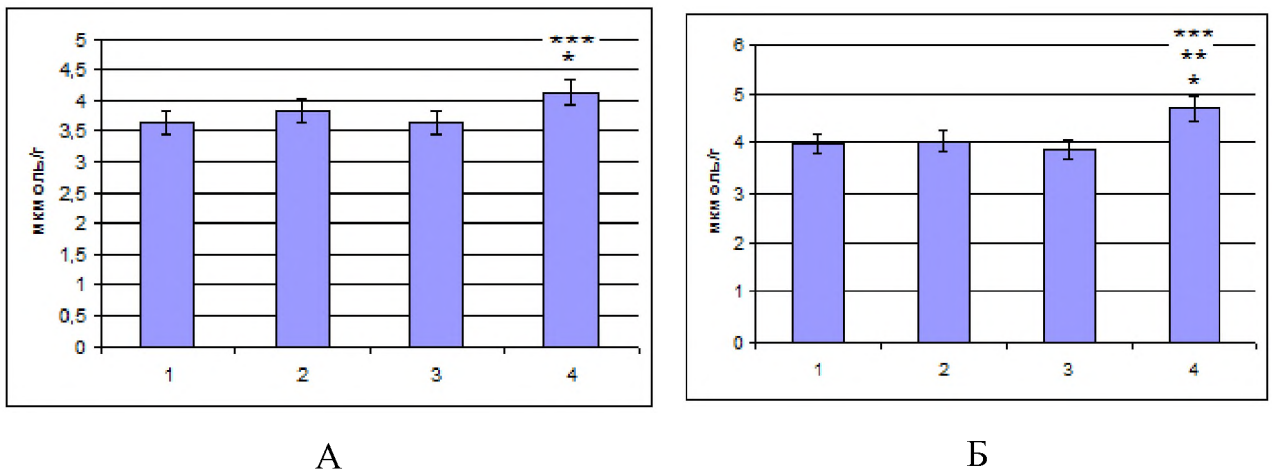


Рис. 3.4. Концентрація вільного оксипроліну в стегнових кістках (А) і хребцях (Б) інтактних тварин (1); при введенні нітрату натрію (2), фториду натрію (3), поєднаному введенні нітрату та фториду натрію (4). $P < 0,05$ порівняно зі значеннями: * 1-ї групи, ** 2-ї групи, *** 3-ї групи.

Призначення нітрату та фториду натрію суттєво не позначалося на величинах цього показника як у стегнових кістках, так і в хребцях.

При поєднаному введенні фториду та нітрату натрію спостерігалось суттєве підвищення у стегнових кістках концентрації вільного оксипроліну до $4,14 \pm 0,09$ мкмоль/г, що вірогідно перевищувало результат 1-ї групи на 13,7%, 3-ї – на 14%. За цих умов вміст вільного оксипроліну в хребцях збільшувався до $4,69 \pm 0,16$ мкмоль/г, що достовірно перевищувало значення 1-ї групи на 18%, 2-ї – на 16%, 3-ї – на 21%. Ці результати свідчать про суттєву активацію колагенолізу в кістках при поєднаному введенні фториду та нітрату натрію, чого не спостерігалось при окремому призначенні токсикантів.

На рис. 3.5 наведено результати визначення концентрації гексуронових кислот за умов експерименту. У інтактних тварин значення цього показника у стегнових кістках і хребцях становила $1,97 \pm 0,23$ та $2,17 \pm 0,26$ мкмоль/г.

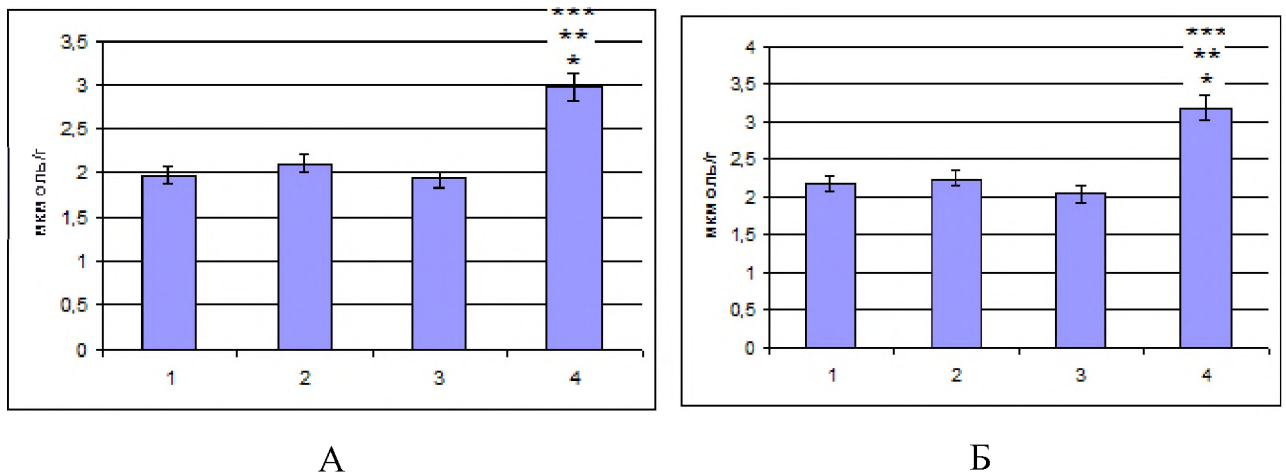


Рис. 3.5. Концентрація гексуронових кислот у стегнових кістках (А) і хребцях (Б) інтактних тварин (1); при введенні нітрату натрію (2), фториду натрію (3), поєднаному введенні нітрату та фториду натрію (4). $P < 0,05$ порівняно зі значеннями: * 1-ї групи, ** 2-ї групи, *** 3-ї групи.

Призначення нітрату та фториду натрію суттєво не позначалося на величинах цього показника як у стегнових кістках, так і в хребцях.

При поєднаному введенні фториду та нітрату натрію спостерігалось суттєве підвищення у стегнових кістках концентрації гексуранових кислот до $2,98 \pm 0,17$, що вірогідно перевищувало результат 1-ї групи на 51%, 2-ї – на 41%, 3-ї – на 54%. За цих умов вміст вільного оксипроліну в хребцях збільшувався до $3,18 \pm 0,16$ мкмоль/г, що достовірно перевищувало значення 1-ї групи на 47%, 2-ї – на 42%, 3-ї – на 57%. Ці результати свідчать про надмірну деполімеризацію протеогліканів у кістках при поєднаному введенні фториду та нітрату натрію, чого не спостерігалось при окремому призначенні токсичних агентів.

На рис. 3.6 наведено результати визначення концентрації N-ацетилнейрамінової кислоти за умов експерименту. У інтактних тварин значення цього показника у стегнових кістках і хребцях становила $2,20 \pm 0,20$ та $2,28 \pm 0,29$ мкмоль/г.

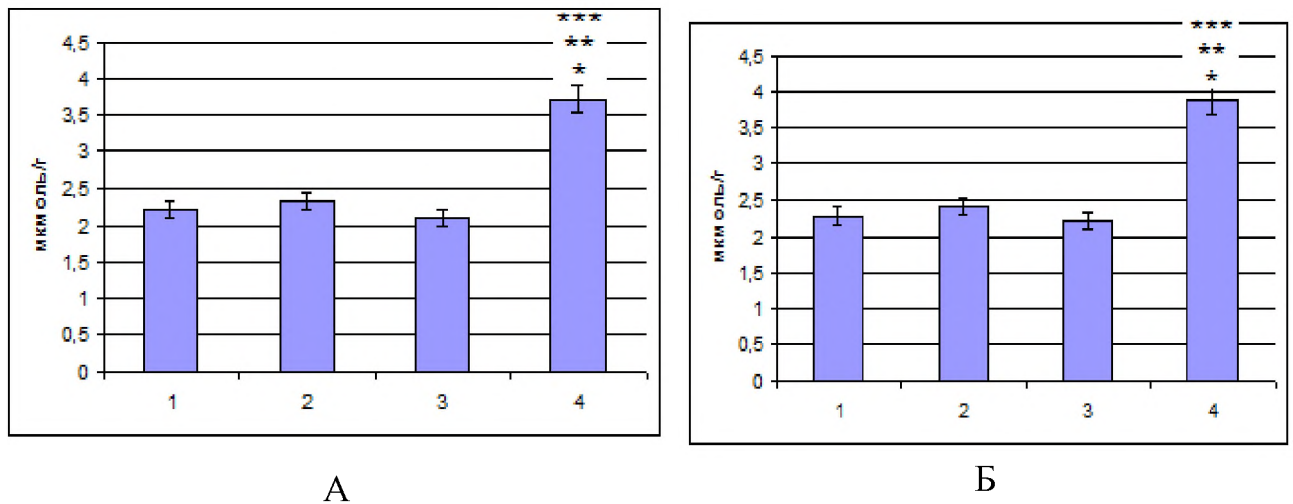


Рис. 3.6. Концентрація N-ацетилнейрамінової кислоти у стегнових кістках (А) і хребцях (Б) інтактних тварин (1); при введенні нітрату натрію (2), фториду натрію (3), поєднаному введенні нітрату та фториду натрію (4). $P < 0,05$ порівняно зі значеннями: * 1-ї групи, ** 2-ї групи, *** 3-ї групи.

Призначення нітрату та фториду натрію суттєво не позначалося на величинах цього показника як у стегнових кістках, так і в хребцях.

При поєднаному введенні фториду та нітрату натрію спостерігалось суттєве підвищення у стегнових кістках концентрації NANA до $3,73 \pm 0,22$, що вірогідно перевищувало результат 1-ї групи на 69,5%, 2-ї – на 60,8%, 3-ї – на 77,6%. За цих умов вміст вільного оксипроліну в хребцях збільшувався до $3,88 \pm 0,20$ мкмоль/г, що достовірно перевищувало значення 1-ї групи на 70%, 2-ї – на 60%, 3-ї – на 75,6%. Одержані результати свідчать про надмірну деполімеризацію сіалоглікопротеїнів у кістках при поєднаному введенні фториду та нітрату натрію, чого не спостерігалось при окремому призначенні хімічних сполук.

Таким чином, за умов поєданого надмірного надходження у організм фториду та нітрату натрію суттєво збільшується колагеноліз та деполімеризація протеогліканів і сіалоглікопротеїнів у стегнових кістках і хребцях, що не спостерігається при окремому введенні названих агентів.

3.4. Дослідження остеометричних характеристик кісток

У нашій роботі ми дослідили остеометричні характеристики стегнових кісток і 3-х поперекових хребців щурів: їхню максимальну довжину (висоту тіла хребця), масу та індекс Simon (SI), який інтегрує ростові параметри кісток, їхню міцність та мінеральний баланс [67, 274].

На рис. 3.7 наведено результати визначення остеометричних показників стегнової кістки за умов експерименту. У інтактних щурів максимальна довжина кістки становила $35,4 \pm 0,4$ мм, маса нативної кістки – $569,2 \pm 8,0$ мг, SI – $4,28 \pm 0,04$.

Призначення нітрату натрію суттєво не позначалося на величинах цих параметрів.

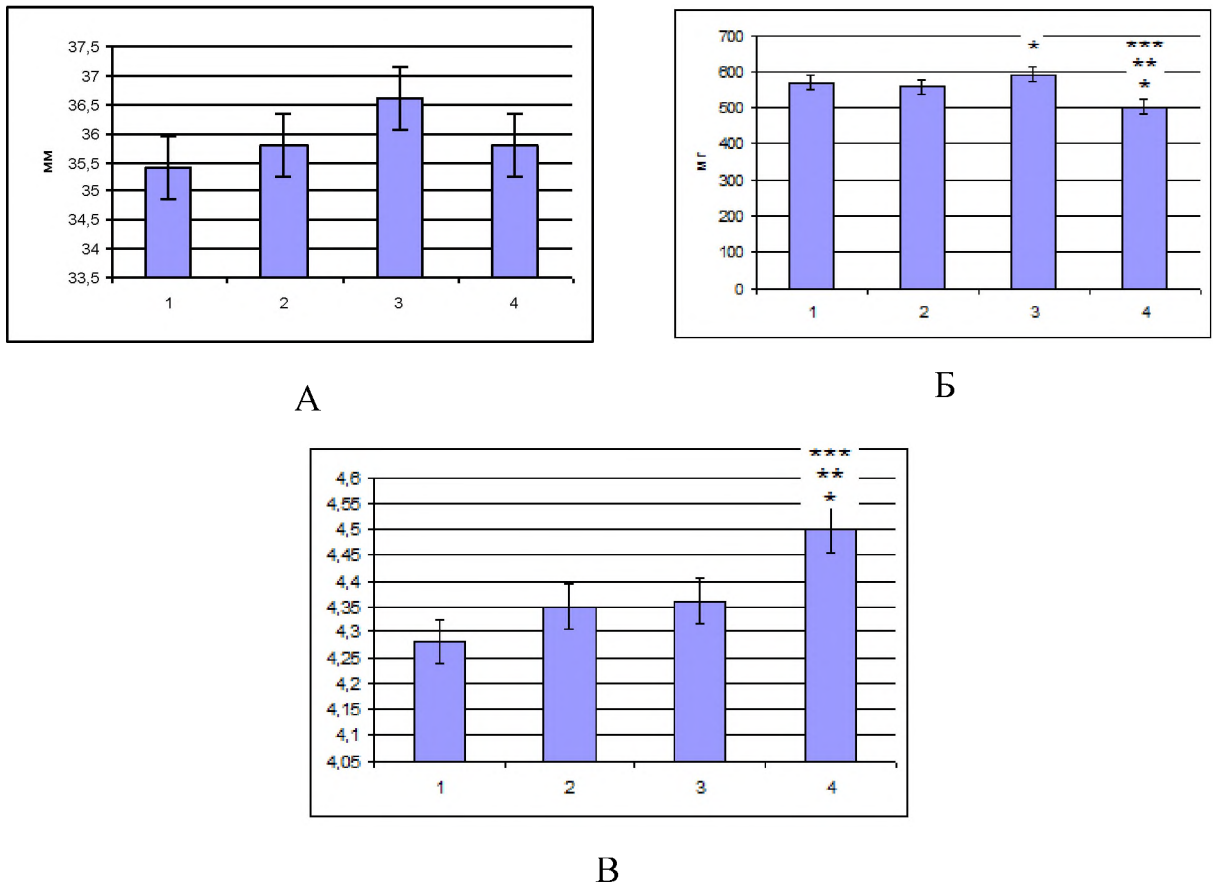


Рис. 3.7. Osteометричні характеристики стегнової кістки: її максимальна довжина (А), маса (Б), SI (В) у інтактних тварин (1); при введенні нітрату натрію (2), фториду натрію (3), поєднаному введенні нітрату та фториду натрію (4). $P < 0,05$ порівняно зі значеннями: * 1-ї групи, ** 2-ї групи, *** 3-ї групи.

Введення фториду натрію призводило до вірогідного підвищення маси нативної стегнової кістки – до $593,0 \pm 5,9$ мг (на 4,2%) без істотних змін максимальної її довжини та SI.

При поєднаному введенні фториду та нітрату натрію величини максимальної довжини стегнової кістки достовірно не змінювалися. Маса кістки зменшувалася до $502,6 \pm 2,9$ мг, що достовірно поступалося значенню 1-ї групи на 11,7%, 2-ї – на 10%, 3-ї – на 15,2%. При цьому

показник SI підвищувався до $4,50 \pm 0,03$, що вірогідно перевищувало результат 1-ї групи на 5,1%, 2-ї – на 3,4%, 3-ї – на 3,2%. Такі зміни SI вказують на зменшення міцності цієї кістки.

На рис. 3.8 наведено результати визначення остеометричних показників 3-го поперекового хребця. У інтактних щурів висота тіла хребця становила $6,4 \pm 0,1$ мм, маса нативного хребця – $200,1 \pm 4,7$ мг, SI – $1,08 \pm 0,01$.

Призначення нітрату натрію суттєво не позначалося на величинах цих параметрів.

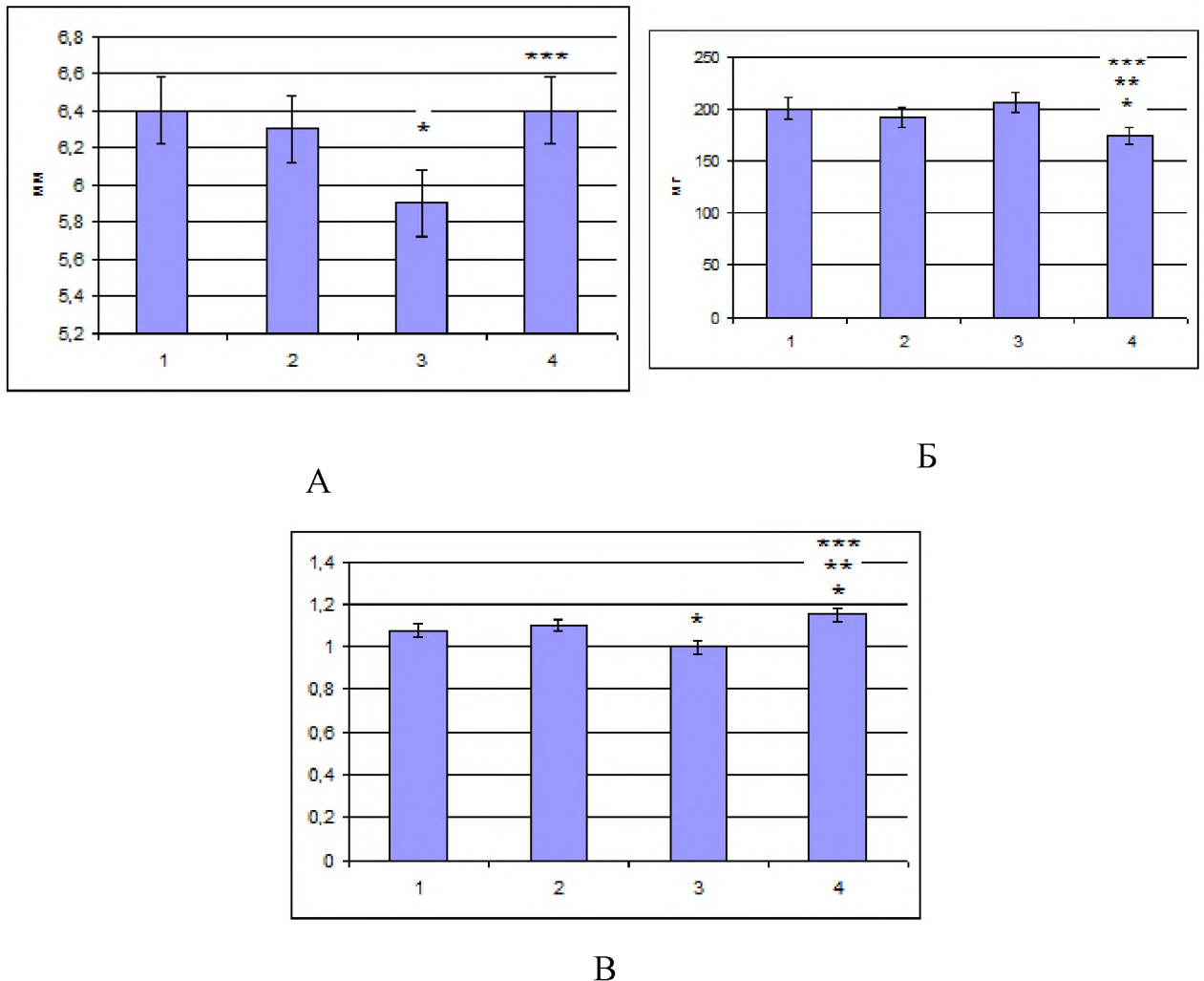


Рис. 3.8. Остеометричні характеристики 3-го поперекового хребця: висота тіла хребця (А), маса (Б), SI (В) у інтактних тварин (1); при введенні нітрату натрію (2), фториду натрію (3), поєданому введенні

нітрату та фториду натрію (4). $P < 0,05$ порівняно зі значеннями: * 1-ї групи, ** 2-ї групи, *** 3-ї групи.

Введення фториду натрію вірогідно зменшувало висоту тіла хребця до $5,9 \pm 0,1$ мм (на 7,8%) без істотних змін його маси. SI знижувався до $1,00 \pm 0,01$ (на 7,4%) порівняно з результатом інтактних тварин.

При поєднаному введенні фториду та нітрату натрію висота тіла хребця становила $6,4 \pm 0,1$ мм, що на 8,5% перевищувало дані 3-ї групи.

Маса нативного хребця зменшувалася до $174,1 \pm 2,7$ мг, що вірогідно було менше, ніж результат 1-ї групи на 13%, 2-ї – на 9,1%, 3-ї – на 15,7%. Показник SI збільшувався до $1,15 \pm 0,01$, що достовірно перевищувало результат 1-ї групи на 6,5%, 2-ї – на 4,5%, 3-ї – на 15%. Такі зміни SI вказують на зменшення міцності цієї кістки.

Таким чином, за умов поєданого надмірного надходження у організм фториду та нітрату натрію змінюються остеометричні характеристики стегнової кістки та 3-го поперекового хребця: зменшується їхня маса при збільшенні індексу Simon, що свідчить про розвиток остеопенії.

3.5. Дослідження показників структурної композиції кісток та їхніх біомеханічних характеристик

На рис. 3.9 наведено результати визначення показників структурної композиції стегнової кістки за умов експерименту. У інтактних щурів її щільність становила $0,92 \pm 0,02$ г/см³, мінеральна насиченість – $0,51 \pm 0,02$ г/см³, зольність – $55,2 \pm 1,9\%$.

Призначення нітрату натрію суттєво не позначалося на величинах цих параметрів.

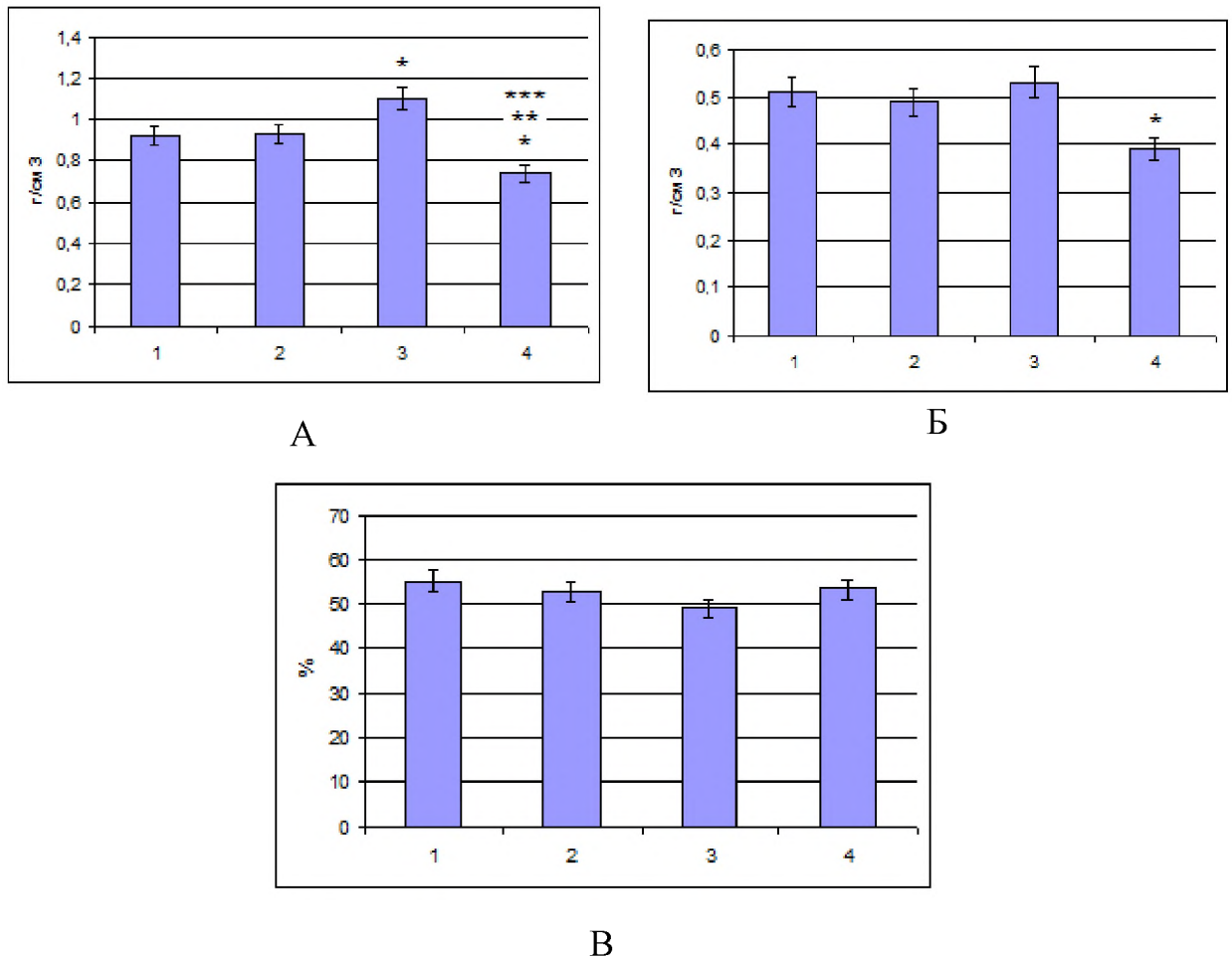


Рис. 3.9. Кількісні показники структурної композиції стегнової кістки: її щільність (А), мінеральна насиченість (Б), зольність (В) у інтактних тварин (1); при введенні нітрату натрію (2), фториду натрію (3), поєднаному введенні нітрату та фториду натрію (4). $P < 0,05$ порівняно зі значеннями: * 1-ї групи, ** 2-ї групи, *** 3-ї групи.

Введення фториду натрію вірогідно підвищувало щільність кістки до $1,10 \pm 0,04$ г/см³ (на 19,6%) без істотних параметрів мінеральної насиченості та зольності порівняно з результатом інтактних тварин.

При поєднаному введенні фториду та нітрату натрію спостерігалось суттєве зменшення щільності стегнової кістки – до $0,74 \pm 0,03$ г/см³, що вірогідно поступалося даним 1-ї групи на 19,6%, 2-ї – на 20,4%, 3-ї – на 32,7%. Саме за цих умов достовірно знижувалася

мінеральна насиченість – до $0,39 \pm 0,03$ г/см³, тобто на 23,5% порівняно зі значенням інтактних тварин. Показник зольності вірогідно не змінювався.

Дослідження біомеханічних властивостей стегнової кістки за умов експерименту проводили за 2-х точковою схемою (випробовування на лінійний розрив) та 3-х точковою схемою (випробовування на згин) з використанням машини розривної РМУ-0,05-1 з оцінкою розривного навантаження (міцності) та відносного подовження кісток (пружності), а також за 4-х точковою схемою (випробовування на згин) за допомогою деформаційної установки МРК-1 з розрахунком модулю Юнга, межі міцності, відносної залишкової деформації до руйнування та відносного видовження до руйнування.

У таблиці 3.4 наведено дані щодо оцінки біомеханічних властивостей стегнової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію з використанням машини розривної РМУ-0,05-1.

Таблиця 3.4

Оцінка біомеханічних властивостей стегнової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію з використанням машини розривної РМУ-0,05-1 (M±m, n=20)

Групи	Характер випробовування			
	На лінійний розрив (за 2-х точковою схемою)		На згин (за 3-х точковою схемою)	
	Розривне навантаження, Н	Відносне подовження, %	Розривне навантаження, Н	Відносне подовження, %
	2	3	4	5
1				

Продовження табл. 3.4

1	2	3	4	5
Інтактні	104,2±1,8	20,2±0,3	117,2±2,3	12,2±0,4
Введення нітрату натрію	102,2±3,3	19,9±0,8	120,7±2,9	11,9±0,4
Введення фториду натрію	110,7±2,1 *	21,2±0,7	114,8±2,7	11,2±0,6
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	63,4 ±2,8 *, **, ***	18,9±0,3 *, ***	77,4 ±2,7 *, **, ***	8,6±0,2 *, **, ***

Призначення нітрату натрію суттєво не позначалося на величинах цих параметрів.

Введення фториду натрію вірогідно підвищувало розривне навантаження за 2-х точковою схемою (лінійний розрив), але суттєво не позначалося на інших показниках біомеханічних властивостей стегнової кістки.

При поєднаному введенні фториду та нітрату натрію спостерігалось суттєве зменшення розривного навантаження при лінійному розриві та на згин, що вірогідно поступалося відповідним даним 1-ї групи на 39,2 та 34%, 2-ї – на 38 та 35,9%, 3-ї – на 42,7 та 32,6%. За цих умов відносно подовження кісток при лінійному розриві було достовірно менше значень 1-ї групи на 6,4%, 3-ї – на 10,8%. Відносно подовження кісток при випробовуванні на згин вірогідно поступалося результату 1-ї групи на 29,5%, 2-ї – на 27,7%, 3-ї – на 23,2%.

При оцінці біомеханічних властивостей стегнової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію при випробовуванні на згин за 4-х точковою схемою за допомогою деформаційної установки МРК-1 (таблиця 3.5) було виявлено вірогідне зменшення модулю пружності Юнга для згину 23,9% порівняно з результатами інтактної групи. Показники межі пружності та міцності, відносного видовження крайніх волокон до руйнування суттєво не змінювалися.

Таблиця 3.5

Оцінка біомеханічних властивостей стегнової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію при випробовуванні на згин за 4-х точковою схемою за допомогою деформаційної установки МРК-1 ($M \pm m$, $n=10$)

Групи	Показники			
	Модуль Юнга, E, МПа	Межа пружності $\sigma_{пр.}$, МПа	Межа міцності $\sigma_{міц.}$, МПа	Відносне видовження до руйнування ε_{max} , %
Інтактні	2832,9±146,6	55,4±3,0	65,8±3,8	3,2±0,8
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	2155,7±56,5 *	52,1±4,2	57,7±5,3	4,1±0,5

На рис. 3.12 наведено результати визначення показників структурної композиції хребців за умов експерименту. У інтактних щурів їхня щільність становила $1,28 \pm 0,02$ г/см³, мінеральна насиченість – $0,69 \pm 0,04$ г/см³, зольність – $53,8 \pm 2,6$.

Призначення нітрату натрію суттєво не позначалося на величинах цих параметрів.

Введення фториду натрію вірогідно підвищувало щільність хребців до $1,36 \pm 0,01$ г/см³ (на 6%) без істотних змін мінеральної насиченості та зольності порівняно з результатом інтактних тварин.

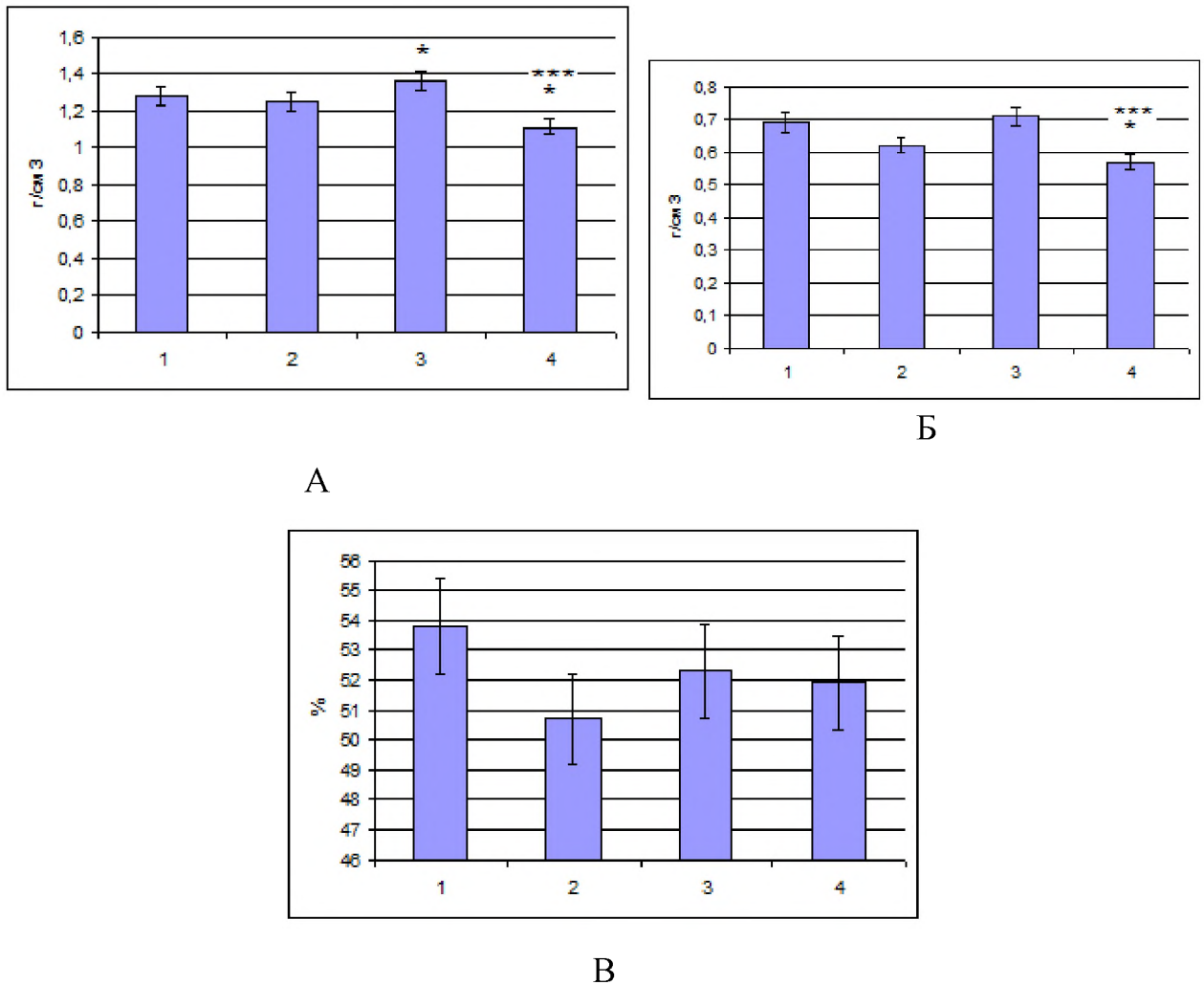


Рис. 3.12. Кількісні показники структурної композиції хребців: їхня щільність (А), мінеральна насиченість (Б), зольність (В) у інтактних тварин (1); при введенні нітрату натрію (2), фториду натрію (3), поєднаному введенні нітрату та фториду натрію (4). $P < 0,05$ порівняно зі значеннями: * 1-ї групи, ** 2-ї групи, *** 3-ї групи.

При поєднаному введенні фториду та нітрату натрію спостерігалось суттєве зменшення щільності хребців – до $1,11 \pm 0,04$ г/см³, що поступалося даним 1-ї групи на 13,3%, 3-ї – на 18,4%. При цьому достовірно знижувалася мінеральна насиченість – до $0,57 \pm 0,02$ г/см³, що вірогідно поступалося даним 1-ї групи на 17,4%, 3-ї – на 19,7%. Показник зольності вірогідно не змінювався.

Таким чином, за умов поєданого надмірного надходження у організм фториду та нітрату натрію, на відміну від окремого застосування цих сполук, зменшується щільність та мінеральна насиченість стегнових кісток і хребців, знижується міцність і пружність стегнових кісток (при лінійному розриві та при випробовуванні на згин).

Результати розділу відображено у статтях [3, 9, 104] і тезах [1, 5, 47, 50].

РОЗДІЛ 4
ВПЛИВ ІНГІБІТОРІВ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ЧИННИКІВ
AP-1 ТА NF-κB НА МЕТАБОЛІЧНІ ТА БІОМЕХАНІЧНІ
ПОРУШЕННЯ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ЗА УМОВ ПОЄДНАНОГО
НАДЛИШКОВОГО НАДХОДЖЕННЯ ФТОРИДУ ТА НІТРАТУ
НАТРІЮ

4.1. Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на функціонування аргіназного та NO-синтазного шляхів метаболізму L-аргініну в кістковій тканині щурів

У п. 3.1 нами показано, що поєднана дія нітрату та фториду натрію призводить до дизрегуляторних змін активності ферментів окисного (NO-синтазного) та неокисного (аргіназного) шляхів метаболізму L-аргініну в крові та кістках різних відділів скелету щурів. Такі зміни, як правило, супроводжується розвитком окисно-нітрозативного стресу [16],

Примітно, що надлишкова дія нітратів та фторидів сприяє активації редоксчутливих факторів транскрипції, що контролюють біосинтез прозапальних і прооксидантних чинників, у тому числі індукцйбельної NOS (iNOS) [18]. Доведеним є вплив AP-1 і NF-κB на процес ремоделювання кісткової тканини [118, 203].

У таблиці 4.1 наведено дані щодо впливу інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на загальну активність NOS у стегнових кістках щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

Так, введення інгібітора активації транскрипційного чинника AP-1 SR 11302 зменшувало сумарну активність NOS та активність її індукцйбельної ізоформи на 64 та 75% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи.

Таблиця 4.1

Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на загальну активність NOS та аргінази у стегнових кістках щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію (M±m, n=25)

Групи	Активність NOS, мкмоль NO ₂ ⁻ /Г·хв.			Загальна аргіназна активність, мкмоль/хв·Г білка
	Сумарна	cNOS	iNOS	
Інтактні	0,76 ±0,04	0,16 ±0,02	0,60 ±0,04	1,40 ±0,03
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	1,15 ±0,13 *	0,07 ±0,01 *	1,08 ±0,13 *	0,65 ±0,04 *
+ введення SR 11302	0,41 ±0,04 *,**	0,14 ±0,01 **	0,27 ±0,04 *,**	1,22 ±0,02 *,**
+ введення амонію піролідиндитіокарбамату	0,30 ±0,04 *,**	0,15 ±0,02 **	0,15 ±0,05 *,**	1,27 ±0,03 *,**
+ введення водорозчинної форми кверцетину	0,23 ±0,04 *,**	0,10 ±0,03	0,12 ±0,01 *,**	1,30 ±0,03 *,**

Примітки (у таблицях розділу 4):

- 1) * – p<0,05 у порівнянні з даними 1-ї групи (інтактні тварини);
- 2) ** – p<0,05 у порівнянні з даними 4-ї групи (після сукупного введення фториду та нітрату натрію).

Активність cNOS збільшувалася вдвічі, загальна аргіназна активність – на 88% порівняно з результатами 4-ї групи.

Призначення інгібітора ядерної транслокації NF-κB ПДТК зменшувало сумарну активність NOS та активності iNOS на 74 та 86% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи. Активність cNOS збільшувалася в 2,1 раза, загальна аргіназна активність – на 95% порівняно з результатами 4-ї групи.

Нещодавно показана здатність кверцетину пригнічувати убіквітинзалежний протеоліз комплексу NF-κB з інгібіторним білком IκB [204]. Відсутність деградації IκB під дією протеасоми унеможлиблює експресію NF-κB-підконтрольних генів [221]. Тобто кверцетин також може вважатися інгібітором активації NF-κB.

Введення водорозчинну форму кверцетину також зменшувало сумарну активність NOS та активності iNOS на 80 та 89% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи. Активність cNOS істотно не змінювалася, загальна аргіназна активність збільшувалася вдвічі порівняно з результатами 4-ї групи.

Примітно, що за умов введення SR 11302, ПДТК та водорозчинної форми кверцетину суттєво знижувалася концентрація пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів (рис. 4.1) – до $3,14 \pm 0,06$; $3,05 \pm 0,04$ та $3,12 \pm 0,05$ мкмоль/г відповідно, тобто на 8; 11 та на 9% порівняно з результатами 4-ї групи.

Таким чином, інгібітори транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB (SR 11302, амонію піролідиндитіокарбамат та водорозчинна форма кверцетину) відновлюють за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію механізм авторегуляції рівня NO в стегових кістках щурів, зменшуючи активність NO-синтази (загальну та її індукційної ізоформи) при реципрокному збільшенні загальної аргіназної активності, та обмежуючи утворення пероксинітриту.

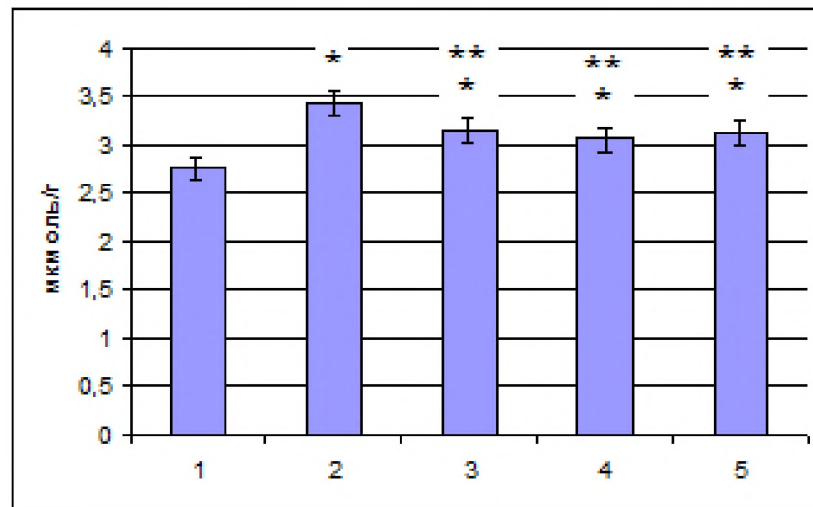


Рис. 4.1. Концентрація пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів у стегових кістках інтактних тварин (1); при поєднаному введенні нітрату та фториду натрію (2); при введенні за цих умов SR 11302 (3); амонію піролідиндитіокарбамату (4); водорозчинної форми кверцетину (5). $P < 0,05$ порівняно зі значеннями: * 1-ї групи, ** 4-ї групи.

4.2. Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на маркери формування та резорбції кісток за умов експерименту

У таблиці 4.2 наведено дані щодо впливу інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на показники формування та резорбції кісток у щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

Так, введення SR 11302 зменшувало активність кислої фосфатази та її татрат-резистентної ізоформи до $12,8 \pm 0,8$ та $6,8 \pm 0,6$ од. акт. відповідно, що на 32 та 20% поступалося значенню 4-ї групи. Це свідчить про обмеження під дією інгібітора активації транскрипційного

чинника AP-1 процесу резорбції кісток. Активність лужної фосфатази за цих умов істотно не змінювалася.

Таблиця 4.2

Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на показники формування та резорбції кісток у щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію (M±m, n=25)

Групи	Показники активності ферментів крові		
	Лужна фосфатаза од. акт.	Кисла фосфатаза, од. акт.	Тартрат-резистентна кисла фосфатаза, од. акт.
Інтактні	307,8±11,1	11,8±0,7	6,3±0,3
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	299,2±18,5	18,9±0,9 *	8,5±0,3 *
+ введення SR 11302	301,4±17,3	12,8±0,8 **	6,8±0,6 **
+ введення амонію піролідидитіокарбамату	299,2±23,1	12,2±0,6 **	6,5±0,3 **
+ введення водорозчинної форми кверцетину	312,1±14,0	13,1±0,8 **	7,0±0,4 **

Призначення ПДТК також знижувало активність кислої фосфатази та її тартрат-резистентної ізоформи до 12,2±0,6 та 6,5±0,3 од. акт. відповідно, що на 35,4 та 23,5% було нижчим за результат 4-ї групи. Активність лужної фосфатази за цих умов також істотно не змінювалася.

Застосування водорозчинної форми кверцетину зменшувало активність кислої фосфатази та її татрат-резистентної ізоформи до $13,1 \pm 0,8$ та $7,0 \pm 0,4$ од. акт. відповідно, що на 30,7 та 17,6% поступалося значенню 4-ї групи. Активність лужної фосфатази не зазнавала суттєвих змін.

Таким чином, інгібітори транскрипційних чинників AP-1 та NF- κ B (SR 11302, амонію піролідіндитіокарбамат та водорозчинна форма кверцетину) зменшують активність ферментів-маркерів резорбції кістки (кислої фосфатази та її кісткової ізоформи) за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію, але не впливають на активність ферменту-маркеру формування кістки (лужної фосфатази).

4.3. Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF- κ B на деполімеризацію біополімерів органічного матриксу кісткової тканини

Нині відомою є неоднозначна роль редоксчутливих транскрипційних чинників у експресії матриксних металопротеїназ (ММП), зокрема, колагенази. Промоторна ділянка низки ММП містить у своєму складі деякі функціональні місця зв'язування ехансером, такі як AP-1 та NF- κ B сайти [270].

Показано, що експресія c-Fos та c-Jun може більшувати транскрипцію промотору / репортера колагенази. Так, домінантно-негативні мутанти A-Fos і A-ATF2 знижували активність колагеназного промотора [284]. У той же час AP-1 здатний пригнічувати експресію деяких матриксних металопротеїназ, зокрема, 2/9 [320].

У таблиці 4.3 наведено результати дослідження впливу інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF- κ B на вміст вільного

оксипроліну, маркерного продукту колагенолізу, в кістках щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

Застосування SR 11302 за умов поєднаного введення фториду та нітрату натрію вірогідно зменшувало концентрацію вільного оксипроліну в стегнових кістках та хребцях на 7,7 та 12,2% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи.

Таблиця 4.3

Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на концентрацію вільного оксипроліну в кістках щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію (M±m, n=25)

Групи	Вільний оксипролін, мкмоль/г	
	Стегнова кістка	Хребці
Інтактні	3,64±0,10	3,98±0,13
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	4,14±0,09 *	4,69±0,16 *
+ введення SR 11302	3,82±0,09 **	4,12±0,16 **
+ введення амонію піролідиндитіокарбамату	3,75±0,07 **	4,05±0,16 **
+ введення водорозчинної форми кверцетину	3,80±0,09 **	4,22±0,14

Раніше було показано, що застосування SR 11302 за умов ліпополісахарид-індукованої системної запальної відповіді знижує у кістковій тканині пародонта деполімеризацію колагену, протеогліканів та сіалоглікопротеїнів, що супроводжується обмеженням резорбцію альвеолярного відростка щелеп [37].

Призначення інгібітора ядерної транслокації NF-κB ПДТК зменшувало вміст вільного оксипроліну в стегнових кістках та хребцях на 9,4 та 13,6% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи.

Нещодавно при дослідженні тканин шкіри було виявлено, що дія ПДТК за умов 30-денної інтоксикації нітратом натрію на тлі обмеження проявів окисно-нітрозативного стресу покращує регенераторні та біомеханічні властивості зразків (підвищує активність орнитіндекарбоксилази, обмежує колагеноліз і деполімеризацію глікозаміногліканів, збільшує їхню міцність і еластичність) [92]. Подібна дія на тканини шкіри притаманна також водорозчинній формі кверцетину (корвітину) [93, 96].

За нашими даними, введення водорозчинної форми кверцетину також знижувало вміст вільного оксипроліну в стегнових кістках (на 8,2%) порівняно з результатами 4-ї групи, але суттєво не впливало на зміни цього показника в гомогенаті хребців.

У таблиці 4.4 наведено результати дослідження впливу інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на вміст гексуронових кислот, маркерів деполімеризації протеогліканів, у кістках щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

Застосування SR 11302 за цих умов вірогідно зменшувало концентрацію гексуронових кислот у стегнових кістках та хребцях на 29,2 та 28% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи.

Таблиця 4.4

Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на концентрацію гексуранових кислот в кістках щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію ($M \pm m$, $n=25$)

Групи	Гексуранові кислоти, мкмоль/г	
	Стегнова кістка	Хребці
Інтактні	1,97±0,23	2,17±0,26
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	2,98±0,17 *	3,18±0,16 *
+ введення SR 11302	2,11±0,22 **	2,29±0,23 **
+ введення амонію піролідиндитіокарбамату	2,06±0,15 **	2,21±0,16 **
+ введення водорозчинної форми кверцетину	2,16±0,15 **	2,31±0,20 **

Призначення ПДТК за умов експерименту зменшувало вміст гексуранових кислот у стегових кістках і хребцях на 31 та 30,5% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи.

Введення водорозчинної форми кверцетину за цих умов також знижувало концентрацію гексуранових кислот у стегових кістках і хребцях на 27,5 та 27,4% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи.

У таблиці 4.5 наведено результати дослідження впливу інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на вміст N-ацетилнейрамінової кислоти, маркерного продукту деполімеризації

сіалоглікопротеїнів, в кістках щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

Застосування SR 11302 за цих умов вірогідно зменшувало концентрацію NANA у стегнових кістках та хребцях на 37,8 та 39,2% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи.

Таблиця 4.5

Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на концентрацію N-ацетилнейрамінової кислоти в кістках щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію (M±m, n=25)

Групи	N-ацетилнейрамінова кислота, мкмоль/г	
	Стегнова кістка	Хребці
Інтактні	2,20±0,20	2,28±0,29
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	3,73±0,22 *	3,88±0,20 *
+ введення SR 11302	2,32±0,18 **	2,36±0,12 **
+ введення амонію піролідиндитіокарбамату	2,26±0,13 **	2,34±0,13 **
+ введення водорозчинної форми кверцетину	2,33±0,14 **	2,40±0,15 **

Призначення ПДТК за умов експерименту зменшувало вміст NANA у стегнових кістках і хребцях на 39,4 та 39,7% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи.

При цьому введення водорозчинної форми кверцетину також знижувало концентрацію NANA у стегнових кістках і хребцях на 37,5 та 38,1% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи.

Таким чином, інгібітори транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB (SR 11302, амонію піролідіндитіокарбамат та водорозчинна форма кверцетину) є ефективними засобами обмеження деполімеризації колагену, протеогліканів та сіалоглікопротеїнів сполучної (кісткової) тканини стегнових кісток і хребців за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію.

4.4. Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на остеометричні характеристики кісток

У таблиці 4.6 наведено результати дослідження впливу інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на остеометричні характеристики стегнової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

Застосування SR 11302 за цих умов вірогідно підвищувало масу стегнової кістки (на 11,5%), але суттєво не змінювало значення її максимальної довжини та показника SI порівняно з результатами 4-ї групи.

Призначення ПДТК за умов експерименту достовірно збільшувало показник максимальної довжини стегнової кістки та її масу (на 13%) порівняно з результатами 2-ї групи, але істотно не позначалося на SI порівняно з результатами 4-ї групи.

Введення водорозчинної форми кверцетину за цих умов також збільшувало показник максимальної довжини стегнової кістки, її масу (на 12%) порівняно з результатами 4-ї групи.

Таблиця 4.6

Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на остеометричні характеристики стегнової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію (M±m, n=25)

Групи	Остеометричні показники		
	Максимальна довжина кістки, мм	Маса нативної кістки, мг	SI
Інтактні	35,4±0,4	569,2±8,0	4,28±0,04
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	35,8±0,3	502,6±2,9 *	4,50±0,03 *
+ введення SR 11302	36,7±0,4	560,4±7,0 **	4,45±0,05 *
+ введення амонію піролідіндитіокарбамату	37,0±0,3 *,**	566,0±4,8 **	4,47±0,04 *
+ введення водорозчинної форми кверцетину	36,8±0,2 *,**	563,0±7,2 **	4,46±0,03 *

У таблиці 4.7 наведено результати дослідження впливу інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на остеометричні характеристики 3-го поперекового хребця за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

Застосування SR 11302 за цих умов вірогідно підвищувало масу нативного хребця (на 9,3%), зменшувало показник SI (на 4,3%), але

суттєво не змінювало значення висоти тіла хребця порівняно з результатами 4-ї групи.

Таблиця 4.7

Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на остеометричні характеристики 3-го поперекового хребця за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію (M±m, n=25)

Групи	Остеометричні показники		
	Висота тіла хребця, мм	Маса нативного хребця, мг	SI
Інтактні	6,4±0,1	200,1±4,7	1,08±0,01
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	6,4±0,1	174,1±2,7 *	1,15±0,01 *
+ введення SR 11302	6,3±0,1	190,3±5,9 **	1,1±0,01 **
+ введення амонію піролідиндитіокарбамату	6,2±0,1	196,3±5,7 **	1,08±0,01 **
+ введення водорозчинної форми кверцетину	6,4±0,1	194,9±4,8 **	1,1±0,02

Призначення ПДТК за умов експерименту також достовірно збільшувало масу нативного хребця (на 12,8%), зменшувало показник SI (на 6,1%), але суттєво не змінювало значення висоти тіла хребця порівняно з результатами 4-ї групи.

Введення водорозчинної форму кверцетину за цих умов підвищувало масу нативного хребця (на 11,9%), але не впливало на висоту тіла хребця та величину SI.

Таким чином, інгібітори транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB (SR 11302, амонію піролідіндитіокарбамат та водорозчинна форма кверцетину) нормалізують масу стегнових кісток і хребців за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію, при цьому SR 11302 і амонію піролідіндитіокарбамат збільшують міцність хребців, про що свідчить зменшення остеометричного індексу Simon.

4.5. Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на показники структурної композиції кісток та їхні біомеханічні характеристики

У таблиці 4.8 наведено результати дослідження впливу інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на кількісні показники структурної композиції стегнової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

Таблиця 4.8

Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на кількісні показники структурної композиції стегнової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію (M±m, n=25)

Групи	Показники		
	Щільність, г/см ³	Мінеральна насиченість, г/см ³	Зольність, %
1	2	3	4
Інтактні	0,92±0,02	0,51±0,02	55,2±1,9

Продовження табл. 4.8

1	2	3	4
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	0,74±0,03 *	0,39±0,03 *	53,4±4,5
+ введення SR 11302	0,90±0,03 **	0,47±0,02 **	52,2±1,8
+ введення амонію піролідиндитіокарбамату	0,93±0,03 **	0,49±0,04 **	52,8±5,0
+ введення водорозчинної форми кверцетину	0,88±0,02 **	0,47±0,03	53,7±4,8

Застосування SR 11302 за цих умов вірогідно підвищувало щільність і мінеральну насиченість стегнової кістки: на 21,6 та 20,5% відповідно, але суттєво не змінювало показник зольності порівняно з результатами 4-ї групи.

Призначення ПДТК за умов експерименту також достовірно збільшувало щільність і мінеральну насиченість стегнової кістки: на 25,7 та 25,6% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи. Показник зольності не змінювався.

Введення водорозчинної форми кверцетину за цих умов також підвищувало щільність стегнової кістки (на 18,9%), але суттєво не змінювало величини мінеральної насиченості та зольності порівняно з результатами 4-ї групи.

У таблиці 4.9 наведено результати дослідження впливу інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на біомеханічні властивості стегнової кістки за 2-х точковою схемою (випробовування на лінійний розрив) та 3-х точковою схемою (випробовування на згин) за умов

надлишкового надходження фториду та нітрату натрію з використанням машини розривної РМУ-0,05-1

Застосування SR 11302 за цих умов вірогідно підвищувало розривне навантаження при лінійному розриві та дослідженні на згин на 29,7 та 19,3% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи. Відносне подовження кісток при випробовуванні на лінійний розрив і згин достовірно перевищувало відповідні значення 4-ї групи на 9 та 11,6 %.

Таблиця 4.9

Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на біомеханічні властивості стегнової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію при дослідженні на машині розривній РМУ-0,05-1 (M±m, n=25)

Групи	Характер випробовування			
	На лінійний розрив (за 2-точковою схемою)		На згин (за 3-точковою схемою)	
	Розривне навантаження, Н	Відносне подовження, %	Розривне навантаження, Н	Відносне подовження, %
1	2	3	4	5
Інтактні	104,2±1,8	20,2±0,3	117,2±2,3	12,2±0,4
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	63,4±2,8 *	18,9±0,3*	77,4±2,7 *	8,6±0,2*
+ введення SR 11302	82,2±2,5 *,**	20,6±0,3 **	92,3±3,1 *,**	9,6±0,3 *,**

Продовження табл. 4.9

1	2	3	4	5
+ введення амонію піролідин-дитіокарбамату	85,8±2,6 *,**	20,4±0,4 **	95,6±2,6 *,**	10,2±0,3 *,**
+ введення водорозчинної форми кверцетину	79,7±2,3 *,**	19,7±0,4	99,8±3,8 *,**	9,2±0,4 *

Призначення ПДТК за умов експерименту також достовірно збільшувало розривне навантаження при лінійному розриві та на згин на 35,3 та 23,5% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи. Відносне подовження кісток при випробовуванні на лінійний розрив і згин було більшим, ніж значення 4-ї групи на 7,9 та 18,6 %.

При введенні водорозчинної форму кверцетину за цих умов розривне навантаження при лінійному розриві та на згин перевищувало відповідні значення 4-ї групи на 25,7 та 28,9%. Проте відносне подовження кісток при випробовуванні на лінійний розрив і згин істотно не відрізнялося від даних 4-ї групи.

При оцінці біомеханічних властивостей стегнової кістки за умов призначення ПДТК при надмірному надходженні фториду та нітрату натрію при випробовуванні на згин за 4-х точковою схемою за допомогою деформаційної установки МРК-1 (таблиця 4.10) було виявлено вірогідне підвищення модулю пружності Юнга на 19,8% порівняно з результатами 4-ї групи. Проте показники межі пружності та міцності, відносного видовження крайніх волокон до руйнування суттєво не змінювалися.

Таблиця 4.10

Вплив інгібітора транскрипційного чинника NF-κB на біомеханічні властивості стегнової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію при випробовуванні на згин за 4-х-точковою схемою за допомогою деформаційної установки МРК-1 ($M \pm m$, $n=15$)

Групи	Показники			
	Модуль Юнга E, МПа	Межа пружності $\sigma_{пр.}$, МПа	Межа міцності $\sigma_{міц.}$, МПа	Відносне видовження до руйнування ϵ_{max} , %
Інтактні	2832,9±146,6	55,4±3,0	65,8±3,8	3,2±0,8
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	2155,7±56,5 *	52,1±4,2	57,7±5.3	4,1±0,5
+ введення амонію піролідиндітіокарбамату	2582,1±141,0 **	44,5±5,7	59,6±4.5	3,3±0,2

У таблиці 4.11 наведено результати дослідження впливу інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB на кількісні показники структурної композиції хребців за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

Застосування SR 11302 за цих умов вірогідно підвищувало щільність і мінеральну насиченість хребців: на 12,6 та 15,8% відповідно, але суттєво не змінювало показник зольності порівняно з результатами 4-ї групи.

Таблиця 4.11

**Вплив інгібіторів транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB
на кількісні показники структурної композиції хребців за умов
надлишкового надходження фториду та нітрату натрію (M±m, n=25)**

Групи	Показники		
	Щільність, г/см ³	Мінеральна насиченість, г/см ³	Зольність, %
Інтактні	1,28±0,02	0,69±0,04	53,8±2,6
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	1,11±0,04 *	0,57±0,02 *	51,9±2,9
+ введення SR 11302	1,25±0,03 **	0,66±0,03 **	52,7±2,0
+ введення амонію піролідиндитіокарбамату	1,29±0,04 **	0,72±0,04 **	55,8±2,3
+ введення водорозчинної форми кверцетину	1,35±0,03 **	0,67±0,02 **	49,6±2,5

Призначення ПДТК за умов експерименту достовірно збільшувало щільність і мінеральну насиченість хребців: на 16,2 та 26,3% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи. Показник зольності не змінювався.

Введення водорозчинної форму кверцетину за цих умов також підвищувало щільність і мінеральну насиченість хребців: на 21,6 та 17,5% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи. Показник зольності не змінювався.

Таким чином, інгібітори транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB за умов поєднаного введення фториду та нітрату натрію є ефективними остеопротективними засобами. При цьому SR 11302 і амонію

піролідиндитіокарбамат збільшують щільність, мінеральну насиченість, міцність і пружність стегнових кісток; щільність і мінеральну насиченість хребців, а водорозчинна форма кверцетину підвищує щільність і міцність стегнових кісток (збільшується розривне навантаження) без істотного впливу на показники мінеральної насиченості та пружності.

Результати розділу відображено у статтях [48, 49] і тезах [6, 44, 72, 73, 75].

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ ЕНТЕРОСОРБЕНТІВ НА МЕТАБОЛІЧНІ ТА

БІОМЕХАНІЧНІ ПОРУШЕННЯ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ЗА

УМОВ ПОЄДНАНОГО НАДЛИШКОВОГО НАДХОДЖЕННЯ

ФТОРИДУ ТА НІТРАТУ НАТРІЮ

5.1. Вплив ентеросорбентів на функціонування аргіназного та NO-синтазного шляхів метаболізму L-аргініну в крові та стегнових кістках щурів

Сорбент на основі активованого вугілля («Карболайн») не впливав на активність NOS в крові (таблиця 5.1), проте підвищував аргіназну активність на 64,1%. Застосування лігніну гідролізного як ентеросорбенту при поєднаній інтоксикації фторидом і нітратом натрію знижувало активність аргінази крові на 65,7%, при цьому активність NOS збільшувалася в 2,2 раза. Суспензія нанодисперсного кремнезему підвищувала активність NOS у 2,7 раза відносно поєднаної інтоксикації, активність аргінази знижувалася на 34,2%.

Таблиця 5.1

Вплив ентеросорбентів на нітроксидергічну та аргіназну системи в крові щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію ($M \pm m$, $n=62$)

Групи	Загальна активність NOS, мккат/л	Вміст нітритів, нмоль/л	Загальна аргіназна активність, мккат/л
1	2	3	4
Інтактні	193,75±33,3	3,91±0,47	27,35±5,4

Продовження табл. 5.1

1	2	3	4
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	104,19±14,12 *	36,69±0,96 *	21,94±3,49
+ суспензія матеріалу на основі АУТ-М («Карболайн»)	94,72±3,67	30,20±0,79**	36,01±0,87**
+ суспензія лігніну гідролізного	225,61±3,3**	19,81±1,00**	7,53±0,41**
+ суспензія нанодисперсного кремнезему	279,00±8,21**	20,53±2,59**	14,44±0,69**

Примітки (у таблицях розділу 5):

- 1) * – $p < 0,05$ у порівнянні з даними 1-ї групи (інтактні тварини);
- 2) ** – $p < 0,05$ у порівнянні з даними 4-ї групи (після сукупного введення фториду та нітрату натрію).

При порівнянні енеросорбентів між собою було встановлено, що суспензія нанодисперсного кремнезему збільшувала активність NOS щодо сорбенту на основі активованого вугілля в 2,9 раза, а щодо лігніну гідролізного на 23,7%. Активність аргінази знижувалася порівняно з сорбентом на основі активованого вугілля на 59,9%, але підвищувалася порівняно з лігніном гідролізним на 91,8%. Ці відмінності можуть бути пов'язані з різною здатністю ентеросорбентів поглинати фториди і нітрати.

Здатність поглинати екзогенні нітрати можна оцінити по рівню нітритів у сироватці крові. Останні утворюються з екзогенних нітратів

шляхом відновлення у нітратредуктазній системі організму. Важливо враховувати, що нітрити є небезпечними для організму речовинами, так як здатні брати участь у реакціях нітрозилування білкових молекул. Поєднана інтоксикація збільшувала вміст нітритів у 9 разів відносно інтактних тварин. Сорбент на основі активованого вугілля знижував кількість нітритів на 17,7%, лігнін гідролізний – на 46%, суспензія нанодисперсного кремнезему – на 44%.

У порівняльному аспекті суспензія нанодисперсного кремнезему знижувала кількість нітритів щодо сорбенту на основі активованого вугілля на 32% і не показувала статистично значущих відмінностей щодо лігніну гідролізного. Лігнін гідролізний знижував концентрацію нітритів щодо сорбенту на основі активованого вугілля на 34,4%. Тобто, суспензія нанодисперсного кремнезему більш ефективно поглинала нітрати порівняно із сорбентом на основі активованого вугілля і не поступалася в цьому відношенні лігніну гідролізованому.

Оцінити здатність до сорбції фторидів непрямим шляхом можна, проаналізувавши зміни активності аргінази. Фтор, за даними літератури, вважається класичним інгібітором аргіназного шляху метаболізму L-аргініну [23, 257, 290]. У п. 3.1 ми показали, що в умовах поєднаної інтоксикації інгібуючий ефект фторидів компенсується гальмуванням активності NOS.

У групі тварин, яким вводили сорбент на основі активованого вугілля відмічалася найвища активність аргінази разом з найбільшим вмістом нітритів. Оскільки активність цього ферменту зростала, а активність NOS статистично не змінювалася, можна зробити висновок, що збільшення активності аргінази було пов'язано зі зменшенням інгібуючого впливу фторид-іонів.

У групі лігніну гідролізного активність аргінази була найменша на тлі збільшеної активності NOS. Зниження активності аргінази може бути

пов'язано з інгібуючим ефектом фторидів і конкурентним субстратним пригніченням NOS.

Однак в групі нанодисперсного кремнезему активності NOS та аргінази були підвищеними щодо групи із застосуванням лігніну гідролізного, що дозволяє зробити висновок, що зменшенні активності аргінази в більшій мірі було пов'язаним з впливом іонів фтору, ніж із субстратним гальмуванням.

Таким чином, суспензія нанодисперсного кремнезему більш ефективно адсорбує нітрати порівняно з сорбентом на основі активованого вугілля («Карболайн»). Адсорбція фторидів суспензією нанодисперсного кремнезему є більш вираженою, ніж це відбувається при дії лігніну гідролізного. У зв'язку з цим як найбільш перспективний ентеросорбент, здатний коригувати метаболічні та біомеханічні порушення кісткової тканини за умов поєданого надлишкового надходження фториду та нітрату натрію, нами було обрано суспензію нанодисперсного кремнезему.

У таблиці 5.2 наведено дані щодо впливу суспензії нанодисперсного кремнезему на загальну активність NOS у стегнових кістках щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

Таблиця 5.2

Вплив нанодисперсного кремнезему на загальну активність NOS у стегнових кістках щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію (M±m, n=15)

Групи	Активність NOS, мкмоль NO ₂ ⁻ /г·хв.			Загальна аргіназна активність, мкмоль/хв·г білка
	Сумарна	cNOS	iNOS	
1	2	3	4	5

Продовження табл. 5.2

1	2	3	4	5
Інтактні	0,76 ±0,04	0,16 ±0,02	0,60 ±0,04	1,40 ±0,03
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	1,15 ±0,13 *	0,07 ±0,01 *	1,08 ±0,13 *	0,65 ±0,04 *
+ суспензія нанодисперсного кремнезему	0.21 ±0.02 *,**	0.11 ±0.01 **	0.10 ±0.02 *,**	1.23 ±0,02 *,**

Так, введення цього ентеросорбенту зменшувало сумарну активність NOS та активність її індукбельної ізоформи на 81,7 та 90,7% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи. Активність сNOS збільшувалася на 57,1%, загальна аргіназна активність – на 89,2% порівняно з результатами 4-ї групи.

Примітно, що за умов введення суспензії нанодисперсного кремнезему суттєво знижувалася концентрація пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів (рис. 5.1) – до $3,08 \pm 0,05$ мкмоль/г, тобто на 9.9% порівняно з результатами 4-ї групи.

Таким чином, суспензія нанодисперсного кремнезему здатна відновлювати функціонування фізіологічного механізму авторегуляції рівня NO в крові та стегнових кістках щурів за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію. У гомогенаті кісток це призводить до зменшення загальної активності NOS, активності її індукбельної ізоформи, збільшення загальної аргіназної активності та обмеження утворення пероксинітриту.

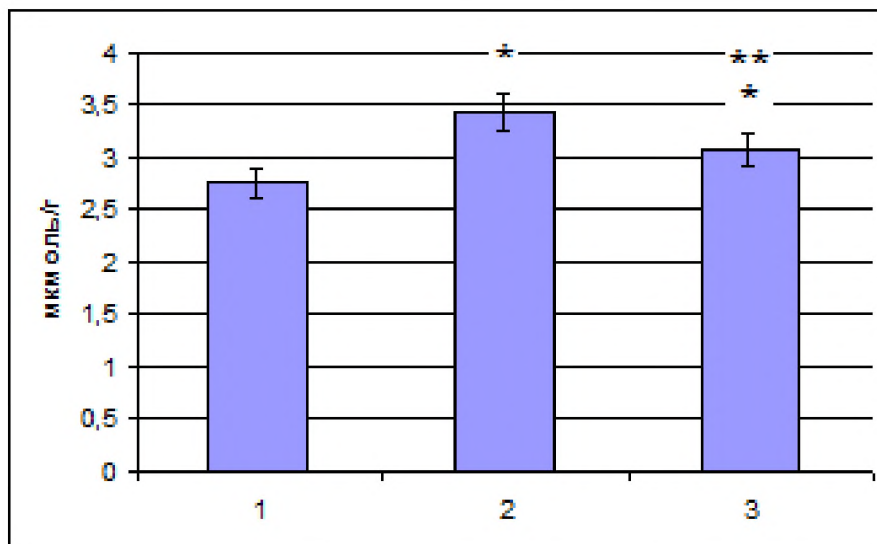


Рис. 5.1. Концентрація пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів у стегових кістках інтактних тварин (1); при поєднаному введенні нітрату та фториду натрію (2); при введенні за цих умов суспензії нанодисперсного кремнезему (3). $P < 0,05$ порівняно зі значеннями: * 1-ї групи, ** 4-ї групи.

5.2. Вплив нанодисперсного кремнезему на маркери формування та резорбції кісток за умов експерименту

У таблиці 5.3 наведено дані щодо впливу суспензії нанодисперсного кремнезему на показники формування та резорбції кісток у щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

Так, введення цього ентросорбенту зменшувало активність кислої фосфатази до $18,9 \pm 0,9$ од. акт., що на 24.9% поступалося значенню 4-ї групи. Проте ми не виявили достовірних змін активності саме її кісткового (татрат-резистентного) ізоферменту. Активність лужної фосфатази за цих умов також істотно не змінювалася.

Таблиця 5.3

Вплив нанодисперсного кремнезему на показники формування та резорбції кісток у щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію (M±m, n=15)

Групи	Показники активності ферментів крові		
	Лужна фосфатаза од. акт.	Кисла фосфатаза, од. акт.	Тартрат-резистентна кисла фосфатаза, од. акт.
Інтактні	307,8±11,1	11,8±0,7	6,3±0,3
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	299,2±18,5	18,9±0,9 *	8,5±0,3 *
+ суспензія нанодисперсного кремнезему	327,1±17,2	14,2±0,9 **	7,8±0,4

Таким чином, ми не виявили переконливих доказів щодо впливу суспензії нанодисперсного кремнезему на процеси формування або резорбції кістки за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію на підставі дослідження маркерних ферментів (лужної фосфатази, кісткової ізоформи кислої фосфатази).

5.3 Вплив нанодисперсного кремнезему на деполімеризацію біополімерів органічного матриксу кісткової тканини

Раніше було показано, що певні сполуки (наприклад, яблучний пектин та пектиновмісні продукти харчування) завдяки сорбції неорганічних нітросполук здатні зменшити дію останніх на біополімери

кісткової тканини, що виявилось в гальмуванні процесів колагенолізу та деполімеризації протеогліканів [82].

Нами досліджено вплив суспензії нанодисперсного кремнезему на маркери де полімеризації колагену та не колагенових білків у кістках щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

У таблиці 5.4 наведено результати дослідження впливу цього ентеросорбенту на вміст вільного оксипроліну.

Таблиця 5.4

Вплив нанодисперсного кремнезему на концентрацію вільного оксипроліну в кістках щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію ($M \pm m$, $n=15$)

Групи	Вільний оксипролін, мкмоль/г	
	Стегнова кістка	Хребці
Інтактні	3,64±0,10	3,98±0,13
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	4,14±0,09 *	4,69±0,16 *
+ суспензія нанодисперсного кремнезему	3,89±0,06 **	4.26±0,09 **

Так, застосування суспензії нанодисперсного кремнезему за умов поєднаного введення фториду та нітрату натрію вірогідно зменшувало концентрацію вільного оксипроліну в стегових кістках та хребцях на 6 та 9,2% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи.

У таблиці 5.5 наведено результати дослідження дії суспензії нанодисперсного кремнезему на вміст гексуронових кислот, маркерів

деполімеризації протеогліканів, у кістках щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

Введення цього ентеросорбенту за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію вірогідно зменшувало концентрацію гексуронових кислот у стегнових кістках та хребцях на 26,8 та 27% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи.

Таблиця 5.5

Вплив нанодисперсного кремнезему на концентрацію гексуронових кислот в кістках щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію (M±m, n=15)

Групи	Гексуронові кислоти, мкмоль/г	
	Стегнова кістка	Хребці
Інтактні	1,97±0,23	2,17±0,26
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	2,98±0,17 *	3,18±0,16 *
+ суспензія нанодисперсного кремнезему	2,18±0,18 **	2,32±0,18 **

У таблиці 5.6 наведено результати дослідження впливу суспензії нанодисперсного кремнезему на вміст N-ацетилнейрамінової кислоти, маркерного продукту деполімеризації сіалоглікопротеїнів, в кістках щурів за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

Застосування цього ентеросорбенту за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію вірогідно зменшувало концентрацію NANA у стегнових кістках та хребцях на 37 та 37.9% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи.

Таблиця 5.6

**Вплив нанодисперсного кремнезему на концентрацію
N-ацетилнейрамінової кислоти в кістках щурів за умов
надлишкового надходження фториду та нітрату натрію
($M \pm m$, $n=15$)**

Групи	N-ацетилнейрамінова кислота, мкмоль/г	
	Стегнова кістка	Хребці
Інтактні	2,2±0,20	2,28±0,29
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	3,73±0,22 *	3,88±0,20 *
+ суспензія нанодисперсного кремнезему	2,35±0,21 **	2,41±0,22 **

Таким чином, застосування суспензії нанодисперсного кремнезему за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію супроводжується обмеженням деполімеризації колагену, протеогліканів та сіалоглікопротеїнів сполучної (кісткової) тканини стегнових кісток і хребців.

5.4. Вплив нанодисперсного кремнезему на остеометричні характеристики кісток

У таблиці 5.7 наведено результати дослідження впливу суспензії нанодисперсного кремнезему на остеометричні характеристики стегнової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

Застосування цього ентеросорбенту за умов експерименту вірогідно підвищувало масу стегнової кістки (на 11,2%) та знижувало показник SI, але суттєво не змінювало значення максимальної довжини кістки порівняно з результатами 4-ї групи.

Таблиця 5.7

Вплив нанодисперсного кремнезему на остеометричні характеристики стегнової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію ($M \pm m$, $n=15$)

Групи	Остеометричні показники		
	Максимальна довжина кістки, мм	Маса нативної кістки, мг	SI
Інтактні	35,4±0,4	569,2±8,0	4,28±0,04
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	35,8±0,3	502,6±2,9 *	4,50±0,03 *
+ суспензія нанодисперсного кремнезему	36,3±0,2	559,0±7,8 **	4,41±0,02 *,**

У таблиці 5.8 наведено результати дослідження впливу суспензії нанодисперсного кремнезему на остеометричні характеристики хребців за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

Застосування ентеросорбенту за умов експерименту достовірно підвищувало масу нативного хребця (на 8.4%), зменшувало показник SI (на 3,5%), але суттєво не змінювало значення висоти тіла хребця порівняно з результатами 4-ї групи.

Таблиця 5.8

Вплив нанодисперсного кремнезему на остеометричні характеристики 3-го поперекового хребця за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію ($M \pm m$, $n=15$)

Групи	Остеометричні показники		
	Висота тіла хребця, мм	Маса нативного хребця, мг	SI
Інтактні	6,4±0,1	200,1±4,7	1,08±0,01
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	6,4±0,1	174,1±2,7 *	1,15±0,01 *
+ суспензія нанодисперсного кремнезему	6,4±0,1	188,7±3,1 **	1,11±0,01 **

Таким чином, застосування суспензії нанодисперсного кремнезему за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію супроводжується корекцією остеометричних показників остеопенії стегнових кісток і хребців: збільшується їхня маса та міцність (зменшується індекс Simon).

5.5. Вплив нанодисперсного кремнезему на показники структурної композиції кісток та їхні біомеханічні характеристики

У таблиці 5.9 наведено результати дослідження впливу суспензії нанодисперсного кремнезему на кількісні показники структурної композиції стегнової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

Застосування цього ентеросорбенту за умов експерименту достовірно не позначалося на показниках щільності, мінеральної насиченості та зольності порівняно з результатами 4-ї групи.

Таблиця 5.9

Вплив нанодисперсного кремнезему на кількісні показники структурної композиції стегнової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію ($M \pm m$, $n=15$)

Групи	Показники		
	Щільність, г/см ³	Мінеральна насиченість, г/см ³	Зольність,%
Інтактні	0,92±0,02	0,51±0,02	55,2±1,9
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	0,74±0,03 *	0,39±0,03 *	53,4±4,5
+ суспензія нанодисперсного кремнезему	0,87±0,04	45,0±0,04	52,4±5,2

У таблиці 5.20 наведено результати дослідження впливу суспензії нанодисперсного кремнезему на біомеханічні властивості стегнової кістки за 2-х точковою схемою (випробовування на лінійний розрив) та 3-х точковою схемою (випробовування на згин) за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію з використанням машини розривної РМУ-0,05-1.

Застосування цього засобу за умов експерименту вірогідно підвищувало розривне навантаження при лінійному розриві та дослідженні на згин на 22,1 та 26,5% відповідно порівняно з результатами 4-ї групи. Відносне подовження кісток при випробовуванні на лінійний розрив достовірно (на 7,9%) перевищувало

значення 4-ї групи, але істотно не відрізнялося від них при дослідженні на згин.

Таблиця 5.10

Вплив нанодисперсного кремнезему на біомеханічні властивості стегнової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію з використанням машини розривної РМУ-0,05-1 (M±m, n=25)

Групи	Характер випробовування			
	На лінійний розрив (за 2-точковою схемою)		На згин (за 3-точковою схемою)	
	Розривне навантаження, Н	Відносне подовження, %	Розривне навантаження, Н	Відносне подовження, %
Інтактні	104,2±1,8	20,2±0,3	117,2±2,3	12,2±0,4
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	63,4±2,8 *	18,9±0,3*	77,4±2,7 *	8,6±0,2*
+ суспензія нанодисперсного кремнезему	77,4±1,4 *,**	20,4±0,5 **	97,9±2,7 *,**	9,4±0,4 *

При оцінці біомеханічних властивостей стегнової кістки за умов призначення нанодисперсного кремнезему при надмірному надходженні фториду та нітрату натрію при випробовуванні на згин за 4-х точковою схемою за допомогою деформаційної установки МРК-1 (таблиця 5.11) було виявлено вірогідне підвищення модулю пружності Юнга (на 90,4%) та межі міцності (на 27,7%) порівняно з результатами 4-ї групи. Проте показники межі пружності та відносного видовження крайніх волокон до руйнування суттєво не змінювалися.

Таблиця 5.11

Вплив нанодисперсного кремнезему на біомеханічні властивості стегнової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію при випробовуванні на згин за 4-х точковою схемою за допомогою деформаційної установки МРК-1 ($M \pm m$, $n=15$)

Групи	Показники			
	Модуль Юнга E, МПа	Межа пружності $\sigma_{пр.}$, МПа	Межа міцності $\sigma_{міц.}$, МПа	Відносне видовження до руйнування ε_{max} , %
Інтактні	2832,9±146,6	55,4±3,0	65,8±3,8	3,2±0,8
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	2155,7±56,5 *	52,1±4,2	57,7±5.3	4,1±0,5
+ суспензія нанодисперсного кремнезему	4105,2±151,5 */**	55,9±5,6	73,7±4.2 **	2,9±0,5

У таблиці 5.12 наведено результати дослідження впливу суспензії нанодисперсного кремнезему на кількісні показники структурної композиції хребців за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

Введення ентеросорбенту за цих умов вірогідно підвищувало щільність хребців (на 12,6 %) порівняно з результатами 4-ї групи. Показники мінеральної насиченості та зольності не змінювалися.

Таблиця 5.12

Вплив нанодисперсного кремнезему на кількісні показники структурної композиції хребців за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію ($M \pm m$, $n=15$)

Групи	Показники		
	Щільність, г/см ³	Мінеральна насиченість, г/см ³	Зольність,%
Інтактні	1,28±0,02	0,69±0,04	53,8±2,6
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	1,11±0,04 *	0,57±0,02 *	51,9±2,9
+ суспензія нанодисперсного кремнезему	1,25±0,03 **	0,62±0,03	49,9±2,9

Таким чином, застосування суспензії нанодисперсного кремнезему суттєво не позначається на кількісних показниках структурної композиції стегової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію, але покращує її біомеханічні властивості при лінійному розриві (розривне навантаження, відносне подовження) та при випробуванні на згин (розривне навантаження, модуль Юнга, межу міцності). Введення цього ентеросорбенту підвищує щільність хребців без істотного впливу на їхню мінеральну насиченість.

Результати розділу відображено у статтях [3, 9, 104].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Раніше було показано, що метаболізм у кістковій тканині у значній мірі залежить від стану конкурентних шляхів обміну L-аргініну – NO-синтазного та аргіназного. З їхнім функціонуванням пов'язаний стан регіонарної гемодинаміки [117, 137], регуляція активності остеобластів і остеокластів [215, 311], опосередкування дії про- та протизапальних цитокінів [243, 265], статевих гормонів [145], колагеногенез [107] тощо.

На баланс наведених шляхів метаболізму L-аргініну суттєвий вплив мають сполуки, що або надходять в організм при навантаженні нітратами та фторидами, або утворюються в ньому *in situ* з екзогенних попередників. Так, відомою є здатність фторид-іонів неконкурентно пригнічувати аргіназну активність [23, 257, 290], унаслідок чого активується NO-синтазний шлях [117, 153]. І, навпаки, останній пригнічується за механізмом негативного зворотного зв'язку (цикл монооксиду нітрогену), коли активується нітрат- / нітритредуктазний механізм утворення NO при надмірному надходженні екзогенних нітратів [68, 70, 71, 227].

При перевищенні дози неорганічних нітросполук цей механізм авторегуляції рівня NO може зберігатися або порушуватися в залежності від дози токсиканту, метаболічних особливостей того чи іншого органу або тканини [51, 105]. Проте, за нашими даними, за умов окремого введення нітрату натрію у крові та гомогенаті стегнових кісток щурів сумарна активність NOS зменшується, що відповідає закономірностям функціонування циклу NO. Аргіназна активність при цьому конкурентно збільшується.

При окремому призначенні фториду натрію також прогнозовано спостерігається зменшення загальної аргіназної активності та підвищення сумарної активності конкурентного ферменту – NOS.

У той же час, поєднане введення нітрату та фториду натрію супроводжується відмінностями у показниках NO-синтазного та аргіназного шляхів обміну L-аргініну в крові та кістках. У крові поєднана активація нітрат- / нітритредуктазної системи та дія фториду знижує загальну активність NOS, як це і повинно відбуватися за механізмом функціонування циклу NO. Проте активність аргінази суттєво не змінюється. Вочевидь, пригнічувальна дія фторид-іонів компенсується авторегуляторним механізмом активації цього ферменту при гальмуванні NOS.

У гомогенаті стегових кісток також виявляється збільшенням активності загальної NOS (за рахунок iNOS). Окрім того знижується аргіназна активність та активність eNOS, що вказує на порушення механізму авторегуляції рівня NO в стегових кістках щурів. Це супроводжується збільшенням у кістках концентрації пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів, що свідчить про розвиток нітрозативного стресу.

Примітно, що неорганічні нітросполуки та фториди при надлишковому надходженні здатні збільшувати генерацію супероксидних аніон-радикалів, які при взаємодії з NO утворюють пероксинітрит [16, 19]. Головними джерелами генерування супероксиду за цих умов вважаються мітохондрії, мікросоми та NADPH-оксидаза лейкоцитів [4, 17].

Раніше було показано, що пероксинітрит має суттєве значення у розладах ремоделювання кісток за умов надлишкового надходження нітрату натрію. Застосування скевенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну позитивно впливає на процес формування кістки та

пригнічує її резорбцію, обмежує колагеноліз і деполімеризацію протеогліканів, підвищує щільність губчастих і трубчастих кісток [86], обмежує порушення їхньої гістологічної структури, підвищує середню щільність розташування клітинних елементів та кількість остеобластів [83].

Для оцінки процесів кісткового ремоделювання, особливо характеру резорбції та формування кісток, ми оцінювали активність у сироватці крові лужної фосфатази, як маркеру формування кістки, а також кислої фосфатази та її тартрат-резистентної ізоформи, як маркерів резорбції.

Застосування нітрату натрію, за нашими даними, підвищує активність тартрат-резистентної кислої фосфатази, що вказує на збільшення резорбції кісткової тканини. Введення фториду натрію не супроводжується вірогідними змінами маркерних ферментів.

Поєднане надлишкове введення фториду та нітрату натрію збільшує активність ферментів-маркерів резорбції кісткової тканини порівняно з окремим призначенням цих токсикантів. Показники лужної фосфатази (маркеру формування кістки) та обміну кальцію істотно не змінюються. Таким чином, характер кісткового обміну при одночасному призначенні фториду та нітрату натрію може розцінюватися як високий. За цих умов підвищена резорбція не компенсується процесом формування кістки [10].

Основним компонентом позаклітинного матриксу кісткової тканини є колаген. На його долю припадає до 95% її органічної складової. Розпад колагену оцінювали за концентрацією вільного оксипроліну. Ця амінокислота, як відомо, утворюється внаслідок гідроксилювання проліну після включення його до поліпептидного ланцюга білка. Вона є специфічною для колагену та з'являється у вільному вигляді внаслідок катаболізму [10, 38].

Проте важливу роль у процесах утворення кісток, їхньої мінералізації та ремоделювання відіграють провідну інше білки, зокрема, протеоглікани, глікопротеїни, морфогенетичні білки кістки, фосфопроїтеїни, протеоліпиди та ін. Вони складають приблизно 5% органічного матриксу [14, 21, 28, 89, 185].

Нами встановлено, що при поєднаному введенні фториду та нітрату натрію у стегнових кістках і хребцях суттєво підвищується концентрація як вільного оксипроліну, так і мономерів неколагенових білків – гексуранових кислот і NANA. Ці результати свідчать про суттєву активацію колагенолізу, деполімеризацію протеогліканів і сіалоглікопротеїнів у кістках, чого не спостерігається при окремому призначенні токсикантів.

Закономірним наслідком цього є зміни остеометричних характеристик стегнової кістки та хребців за умов поєданого надмірного надходження у організм фториду та нітрату натрію, що виявляється у зменшенні їхньої маси при збільшенні індексу Simon (інтегрує ростові параметри кісток, міцнісні властивості мікроструктури та мінерального балансу). Це свідчить про розвиток остеопенії та створює структурні передумови для зниження міцності кісткової тканини [57, 58, 67].

Примітно, що окреме призначення нітрату натрію суттєво не позначається на величинах остеометричних параметрів, а введення фториду натрію, навпаки, підвищує масу нативної стегнової кістки.

Раніше повідомлялося про здатність фторидів підвищувати об'єм, масу та щільність кісток, але їхні біомеханічні властивості при цьому можуть знижуватися [157, 173].

Колагенолітичній дії може сприяти розвиток окисно-нітрозативного стресу, коли активні форми кисигену та нітрогену

збільшують експресію мРНК інтерстиціальної колагенази без істотних змін синтезу тканинного інгібітора металопротеїназ [65].

Наслідками деструкції органічного матриксу кісткової тканини можуть бути певні зміни показників структурної композиції кісток та їхніх біомеханічних характеристик. Найбільш істотні порушення виявляються при поєднаному введенні фториду та нітрату натрію, коли достовірно зменшується щільність стегової кістки та хребців. Проте, слід зазначити, саме за цих умов знижується також мінеральна насиченість цих кісток. Цей показник вважається провідним у забезпеченні міцності кістки як конструкції [79].

Окреме призначення нітрату натрію суттєво не позначається, за нашими даними, на величинах цих параметрів, а введення фториду натрію у певній мірі навіть підвищує щільність стегової кістки та хребців без істотних мінеральної насиченості.

Про властивості фторидів як анаболічних чинників вже повідомлялося в літературі [102, 157, 214]. Проте при цьому збільшення об'єму кісткової тканини та товщини трабекул часто відбувається без супутнього посилення їхньої зв'язності [102]. Це може супроводжуватися порушеннями біомеханічних характеристик кісток [157, 278].

Раніше було показано, що одного надлишкового введення нітрату натрію недостатньо для забезпечення високого рівня кісткового обміну, що супроводжується зниженням щільності губчастих і трубчастих кісток. Але показано, що нітратне навантаження потенціює остеолітичний потенціал інших патогенних чинників, що сприяють остеопорозу та остеопенії, наприклад, глюкокортикоїдів [81, 84]. Примітно, що цей процес залежить від функціонального стану iNOS та утворення АФН, особливо, при порушенні механізму авторегуляції кількості NO при його утворенні з екзогенного попередника [85, 86].

Для дослідження біомеханічних властивостей стегнової кістки за умов експерименту ми використовували випробовування на лінійний розрив (за 2-х точковою схемою) та випробовування на згин (за 3-х точковою схемою) з використанням машини розривної РМУ-0,05-1. Це дозволяє оцінити такі показники, як розривне навантаження (міцність) та відносне подовження кісток (пружність). Додатково при поєднаному введенні фториду та нітрату натрію ми проводили випробовування на згин (за 4-х точковою схемою) за допомогою деформаційної установки МРК-1 з розрахунком модулю Юнга (модулю пружності першого роду або модулю пружності під час розтягу), межі міцності, відносної залишкової деформації до руйнування та відносного видовження до руйнування.

За нашими даними, призначення нітрату натрію суттєво не впливає на величини розривного навантаження та відносного подовження кісток. Введення фториду натрію підвищує розривне навантаження за 2-х точковою схемою (лінійний розрив).

У той же час, при поєднаному введенні фториду та нітрату натрію суттєво зменшується розривне навантаження та відносне подовження стегнових кісток при лінійному розриві та при випробовуванні на згин, зменшується величина модулю Юнга (при випробовуванні на згин за 4-х точковою схемою).

Ці результати узгоджуються з одержаними нами даними щодо зменшення міцності за остеометричним показником (підвищення SI), маркерами деполімеризації колагену, протеогліканів та сіалоглікопротеїнів.

Глікопротеїни та протеоглікани характеризуються мікрогетерогенністю – структурною нерегулярністю будови, що є характерним для сполук, які виконують регуляторні та сигнальні функції. Така нерегулярність будови насамперед властива

сульфатованим глікозаміногліканам (хондроїтинсульфат, гепарансульфат, кератансульфат), що визначають вуглеводну складову протеогліканів [283]. Тобто, ці біополімери є не тільки структурними компонентами сполучної тканини, а й виявляють істотну біологічну активність: здатні гальмувати або прискорювати проліферацію клітин, впливаючи на реплікацію ДНК і мітотичну активність клітин [89], містять сайти зв'язування для численних білкових лігандів, включаючи низку розчинних медіаторів імунної системи, завдяки чому вони можуть активувати або пригнічувати їхню активність [134]. Примітно, що компоненти позаклітинного матриксу, у тому числі протеоглікани та глікозаміноглікани, регулюють остеолітичний процес. Показано, що глікозаміноглікани можуть впливати на остеокластогенез, але це дані дуже суперечливі: деякі дослідження показують гальмівну дію глікозаміногліканів на диференціацію остеокластів, тоді як інші описують стимулювальний ефект [136].

Виявлена нами деполімеризація глікопротеїнів і протеогліканів є потенційно небезпечним фактором ризику переломів кісток, насамперед, через їх залучення у формування колагенових фібрил [212] та внаслідок здатності неколагенових білків брати участь у регуляції диференціювання остеобластів зі стромальних клітин кісткового мозку [117]. Так, маркерами остеогенезу вважаються сіалоглікопротеїни, а їхня деструкція вказує на порушення в утворенні та диференціюванні остеобластів [143]. Тобто, деполімеризація біополімерів кісткової тканини може вважатися однією з провідних ланок патогенезу виявлених нами біомеханічних розладів стегнових кісток за умов експерименту.

Проте такі зміни можуть обумовлювати розлади мінералізації кісткової тканини, яка здійснюється на органічному матриксі, що ініціює утворення кристалів апатитів [13, 55]. Тому при поєднаному введенні

фториду та нітрату натрію, коли виявляється істотна деструкції колагенових і неколагенових білків кісткової тканини, ми можемо спостерігати зменшення мінеральної насиченості стегнових кісток і хребців. Цьому можуть також сприяти ендокринні механізми, зокрема, недостатність статевих гормонів, що викликається АФН [186, 242].

Нами виявлено, що метаболізм і біомеханічні характеристики кісток у значній мірі залежить від активності транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB за умов поєднаного введення тваринам фториду та нітрату натрію. Ці чинники вважаються провідними регуляторами процесу ремоделювання кісткової тканини [118, 203].

Примітно, що надлишкове утворення NO та інших АФН може активувати експресію компонентів AP-1 і NF-κB у клітинах сполучної тканини [51, 205, 237]. Обидва чинника контролюють експресію гена iNOS. Так, промотор останнього містить центр для зв'язування NF-κB [297]. Індукторами NOS є також деякі цитокіни (TNF-α, IL-1β), біосинтез яких також пов'язано з NF-κB [291]. Нині виявлено участь однієї з підгруп MAPK (p38), що активує AP-1, у регуляції iNOS [264]. Тобто саме з активацією названих транскрипційних чинників може бути пов'язане виявлене нами за умов надлишкового навантаження фторидом і нітратом натрію порушення механізму авторегуляції рівня NO (внаслідок гіперекспресії iNOS).

Нами встановлено, що пригнічення AP-1 та NF-κB при введенні SR 11302, ПДТК та кверцетину за умов поєднаного введення фториду та нітрату натрію супроводжується зменшенням у гомогенаті стегнових кісток щурів загальної активності NOS та активності її індукцибельної ізоформи. Це є свідченням відновлення механізму авторегуляції рівня NO. При цьому збільшується загальна аргіназна активність (очевидно, завдяки послабленню конкуренції з NOS за субстрат) та обмежується утворення пероксинітриту.

Проте слід звернути увагу, що вплив кверцетину на утворення АФН може бути пов'язаний не тільки з його здатністю гальмувати убіквітинзалежний протеоліз комплексу NF-κB з інгібіторним білком IκB [204], але і через його безпосередню антирадикальну дію [97], або дію на активність ферментів (фосфоліпази, LOX, COX) [12].

Раніше було показано, що пригнічення iNOS (аміногуанідином) та зменшення концентрації пероксинітриду, наприклад, при застосуванні його скевенджерів (L-селенометіоніну та сечової кислоти) здатне покращувати процес утворення кісток, пригнічувати їхню резорбцію, обмежувати колагеноліз та деполімеризацію протеогліканів у великогомілкових кістках, хребцях та альвеолярних відростках щелеп при відтворенні експериментальної патології (остеопорозу та інтоксикацій) [20, 85, 86].

Тобто, інгібітори активації AP-1 та NF-κB можуть ефективно впливати на NO-залежні ланки патогенезу остеопатології (гіперекспресія iNOS, надмірне утворення пероксинітриду). Тому інтерес викликає оцінка структурно-метаболических та біомеханічних наслідків такої дії на кісткову тканину за умов поєданого надходження у організм фториду та нітрату натрію.

Нами показано, що інгібітори транскрипційних чинників AP-1 та NF-κB (SR 11302, ПДТК та кверцетин) за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію зменшують активність ферментів-маркерів резорбції кістки (кислої фосфатази та її кісткової ізоформи), але не впливають на активність ферменту-маркеру формування кістки (лужної фосфатази).

Тобто, саме процес резорбції за умов дії обох токсичних агентів виявляється у більшій мірі залежним від впливу AP-1 та NF-κB.

Дійсно, вплив індукторів NF-κB, до яких належать і АФН [205, 237], здатний стимулювати резорбтивну активність остеокластів, як це

відбувається при дії RANKL [179, 309]. Роль NF-κB як чинника, необхідного для регуляції остеобластів, доведена, але реалізується за умов дії певних додаткових біорегуляторів [245].

Примітно, що чинники NF-κB і AP-1 функціонують спільно для забезпечення остеокластогенезу в процесі ремоделювання кісткової тканини при реалізації механізму RANKL–RANK взаємодії та включення сигнального каскаду із залученням адаптерних молекул TRAF у клітинах-попередниках (ранніх генераціях моноцитів / макрофагів) [181, 216]. Цікаво, що обидва фактори транскрипції регулюються на декількох рівнях шляхом димеризації та фосфорилування і дуже специфічно впливають на остеокластогенез.

Проте AP-1, як відомо, має неоднозначну дію на процес резорбції кісткової тканини [118, 299]. Відсутність білків сімейства AP-1 (наприклад, Fra-2) у дефіцитних за ними новонароджених мишей супроводжується дефектами остеокластів, а гіперекспресія Fra-2 викликає посилену диференціацію остеобластів [118]. З іншого боку, експресія Fra-1 збільшує диференціацію остеокластів [235, 249]. Тобто, на характер впливу AP-1 на ремоделювання кісткової тканини може впливати залучення тих чи інших його компонентів, що утворюють гомо- та гетеродимери (різні білки цього сімейства відрізняються за потенціалом трансактивації) [11, 315]. Окрім того активація компонентів AP-1 можлива за участю багаторівневих сигнальних модулів, наприклад, каскадів, пов'язаних з MAPK, JNK, і ERK [218, 276]. Так, дія донаторів NO може опосередковуватися через одну з підгруп MAPK, відому як p38 [142].

Раніше була доведена здатність інгібітора активації AP-1 момордину I гальмувати RANKL-індукований остеокластогенез, пригнічуючи експресію c-Fos без істотної дії на MAPK-сигналізацію та фосфорилування JNK, ERK і p38 [181]. Інший інгібітор AP-1

N-метилпіролідон також здатний пригнічувати функцію остеокластів, що забезпечується через гальмування RANKL-індукованого фосфорилування ERK p42/44, необхідного для експресії c-Fos і активації AP-1 [165].

Резорбція кісток, як відомо, реалізується не тільки через диференціацію остеокластів, але і через деградацію матриксу [250]. Катепсин К і MMP-9 селективно продукуються остеокластами, а MMP-1, MMP-2, MMP-13 (колагеназа 3) і MMP-14 переважно експресуються в остеобластах. Для ефективної резорбції кістки необхідною вважається індукція MMP-2, -3 і -13 [211, 247].

Обидва транскрипційні чинники AP-1 та NF-κB забезпечують експресію генів гістолітичних ферментів. Тому виявлені нами ефекти інгібіторів AP-1 та NF-κB (SR 11302, ПДТК та кверцетину) як засобів обмеження деполімеризації колагену, протеогліканів та сіалоглікопротеїнів сполучної (кісткової) тканини стегнових кісток і хребців за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію є цілком логічними. Такий висновок базується на тому факті, що введення за умов експерименту інгібіторів названих транскрипційних чинників вірогідно зменшує концентрацію мономерів названих біополімерів кісткової тканини – вільного оксипроліну, гексуронової кислоти і NANA – у стегнових кістках та хребцях порівняно з результатами 4-ї групи.

Взагалі, AP-1 має неоднозначну дію на метаболізм біополімерів сполучної тканини. З одного боку, він опосередковує колагеногенез, індукований цитокінами (наприклад, TNF-β, TGF-β) [267]. У той же час, компоненти AP-1 можуть зменшувати експресію гена ланцюга α2 колагену 1-го типу COL1A2 [132]. З іншого боку, AP-1 викликає експресію MMP 1, 7, 9, 13 (колагенази, стромелізину та желатинази В), що синтезуються моноцитами / макрофагами, фібробластами, остеобластами, у тому числі через продукцію цитокінів (IL-2) [252, 270,

296]. Показано, що інгібітор AP-1 N-метилпіролідон зменшує експресію MMP-9 (желатинази B) і катепсину K, обидва з яких беруть участь у резорбції кістки [165].

Відомо, що експресія генів низки MMP є наслідком індукції NF-κB при дії прозапальних цитокінів (IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α) [252]. Введення щурам ПДТК знижує рівень MMP-1, MMP-2 та MMP-9 у крові та різних органах [307]. Позитивний вплив інгібіторів активації NF-κB, таких як 4-метил-N-(3-фенілпропіл) бензол-1,2-діамін, ПДТК, кверцетин, на деполімеризацію колагенових і неколагенових білків сполучної тканини підтверджується при відтворенні різних експериментальних моделей (інтоксикацій, метаболічного синдрому, системної запальної відповіді) [20, 36, 59, 94].

Обмеження деструкції органічного матриксу кісток повинно поліпшити їхні структурні показники. За нашими даними, всі інгібітори AP-1 та NF-κB, які вивчалися (SR 11302, ПДТК, кверцетин), усувають остеопенію за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію. Про це свідчить нормалізація маси стегнових кісток і хребців. При цьому SR 11302 і ПДТК збільшують міцність хребців, про що свідчить зменшення остеометричного індексу Simon.

Застосування SR 11302 та ПДТК за умов експерименту вірогідно підвищує щільність і мінеральну насиченість стегнової кістки та хребців порівняно з результатами 4-ї групи. Введення водорозчинної форми кверцетину за цих умов також збільшує щільність стегнової кістки та хребців. Останні також виявляють підвищення мінеральної насиченості.

Призначення SR 11302 та ПДТК за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію покращує біомеханічні характеристики стегнових кісток – міцність і пружність, на що вказує підвищення величин розривного навантаження та відносного подовження (при лінійному розриві та на згин).

Введення водорозчинної форми кверцетину за цих умов супроводжується збільшенням міцності стегнових кісток (підвищуються величини розривного навантаження при лінійному розриві та на згин) без істотних змін їхньої пружності (відносного подовження кісток).

Раніше було виявлено покращення тензометричних характеристик шкіри (міцності та еластичності) при введенні інгібіторів активації NF-κB (ПДТК і кверцетину) за умов надмірного надходження нітрату натрію в організм щурів. Ці показники виявляють зворотну кореляційну залежність зі змінами маркерів деструкції сполучної тканини (колагенолізу та деполімеризації протеогліканів) [92].

Повідомлялося про позитивну дію кверцетину на біомеханічні характеристики кісткової тканини при нанесенні наскрізного дірчастого дефекту у великогомілковій кістці щурів, що супроводжувалося корекцією показників питомої стріли вигину, руйнуючого моменту, межі міцності, модуля пружності і мінімальної роботи руйнування кістки [79]. Збільшення індексу міцності кісток щурів (плечової, великогомілкової, стегнової, хребців) відмічається при застосуванні кверцетину також при дії гіпоксії та гіпертермії [15].

Серед механізмів остеопротективної дії кверцетину дослідники вказують на його здатність активувати сигнальні шляхи, пов'язані з позаклітинно сигнал-регулювальною протеїнкіназою (ERK) і p38 в мезенхімальних стовбурових клітинах, наслідком чого є їхня проліферація, остеогенна диференціація та секреція ангіогенного фактора [323].

Зниження показників нітрозативного стресу при призначенні інгібіторів активації AP-1 та NF-κB, обмеження при цьому маркерних ферментів резорбції кісток, ознак деструкції їх органічного матриксу, покращення щільності та мінеральної насиченості губчастих і

трубчастих кісток, їхніх біомеханічних властивостей дозволяє припустити ефективність застосування цих агентів при остеопатології, спричиненої дією екологічно небезпечних чинників та порушенням авторегуляції АФН. Це доводить доцільність розширення арсеналу остеопротективних засобів за рахунок інгібіторів AP-1 та NF- κ B, у т.ч. таких природних сполук як поліфеноли (наприклад, кверцетин).

Іншим терапевтичним прийомом при поєднаній інтоксикації нітратами і фторидами може бути застосування ентеросорбентів. Це дозволяє зменшити всмоктування фторидів і нітратів і таким чином змінити характер дії цих сполук з остеотоксичної (при великих концентраціях) на остеопротективну (при малих концентраціях).

Теоретичною передумовою такого підходу є численні спостереження щодо здатності фторидів (при дії мікромолярних концентрацій) [102, 157, 214] і донаторів NO [121, 209, 229] стимулювати проліферацію остеобластів та зменшувати резорбцію кісткової тканини *in vitro* та *in vivo*.

Для вибору оптимального ентеросорбенту для корекції метаболічних і біомеханічних розладів кісток за умов експерименту ми дослідили найбільш перспективні, за даними аналізу літературних джерел [7], засоби, здатні сорбувати неорганічні нітросполуки та фториди. Такими вважаються препарати на основі вуглецю (СКН), лігніну гідролізного та нанодисперсного кремнезему.

Далі ми дослідили дію цих засобів на показники нітрозативного стресу в крові (маркери токсичної дії нітратів) та загальну аргіназну активність крові (маркер токсичної дії фторид-іонів).

За нашими даними, суспензія нанодисперсного кремнезему більш ефективно адсорбує нітрати порівняно з сорбентом на основі активованого вугілля («Карболайн»). Адсорбція фторидів суспензією нанодисперсного кремнезему є більш вираженою, ніж це відбувається

при дії лігніну гідролізного. У зв'язку з цим як найбільш перспективний ентеросорбент, здатний коригувати метаболічні та біомеханічні порушення кісткової тканини за умов поєднаного надлишкового надходження фториду та нітрату натрію, нами було обрано суспензію нанодисперсного кремнезему, яка досліджувалася далі.

Застосування цього ентеросорбенту за умов експерименту призводить у гомогенаті кісток до зменшення загальної активності NOS, активності її індукцйбельної ізоформи, збільшення загальної аргіназної активності та обмеження утворення пероксинітриту. Тобто, суспензія нанодисперсного кремнезему сприяє відновленню функціонування фізіологічного механізму авторегуляції рівня, як в крові, так і в стегнових кістках щурів за умов поєднаного введення фториду та нітрату натрію.

Раніше було показано, що саме перевищення рівня NO, що утворюється із ендогенних нітрат- і нітрит-іонів при реалізації нітрат- / нітритредуктазного або неферментативного механізмів їх відновлення, а також пригнічення аргіназного шляху метаболізму L-аргініну, призводить до порушення функціонування циклу NO за принципом негативного зворотного зв'язку [16, 51, 105]. Порушення цього механізму при надмірному надходженні екзогенних джерел NO та пригнічення фторидами аргінази «розгальмовує» NOS (за рахунок збільшення активності iNOS), що стає причиною утворення токсичних АФН, зокрема, пероксинітриту. Саме від балансу цих NO та пероксинітриту, на думку дослідників, залежить остеобластичний контроль резорбції кісток [244]. Застосування нанодисперсного кремнезему дозволяє зменшити концентрації нітратів, їхніх похідних та фторидів до рівнів, недостатніх до розладів наведених циклічних процесів.

І хоча переконливих доказів щодо впливу суспензії нанодисперсного кремнезему на маркерні ферменти формування або резорбції кістки за умов експерименту ми не виявили, але нами було показано його гальмівний вплив на деполімеризацію колагену, протеогліканів та сіалоглікопротеїнів у стегнових кістках і хребцях. Цей ефект ентеросорбенту є не менш цінним, ніж вплив на клітини кісткової тканини, так як процес її резорбції, як відомо, реалізується не тільки через диференціацію остеокластів, але і через деградацію позаклітинного матриксу [250]. Обмеження цього процесу дозволяє покращити структурні та біомеханічні характеристики кісток.

Дійсно, при застосуванні суспензії нанодисперсного кремнезему за умов поєднаного введення фториду та нітрату натрію збільшується маса стегнових кісток і хребців та міцність за даними остеометричного індексу Simon.

Проте призначення суспензії нанодисперсного кремнезему суттєво не позначається на кількісних показниках структурної композиції стегнової кістки за умов експерименту, але покращує її біомеханічні властивості при лінійному розриві (розривне навантаження, відносне подовження) та при випробовуванні на згин (розривне навантаження, модуль Юнга, межу міцності). Введення цього ентеросорбенту підвищує щільність хребців без істотного впливу на їхню мінеральну насиченість.

Схематично механізми метаболічних і біомеханічних порушень у кістках щурів за умов поєднаного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію за результатами нашого дослідження та даними літератури наведено на рис. 6.1.

Таким чином, підбиваючи підсумки дослідження ролі механізмів метаболічних і біомеханічних порушень у кістках щурів за умов поєднаного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію, можна констатувати суттєві дизрегуляторні зміни у нітроксидергічній і

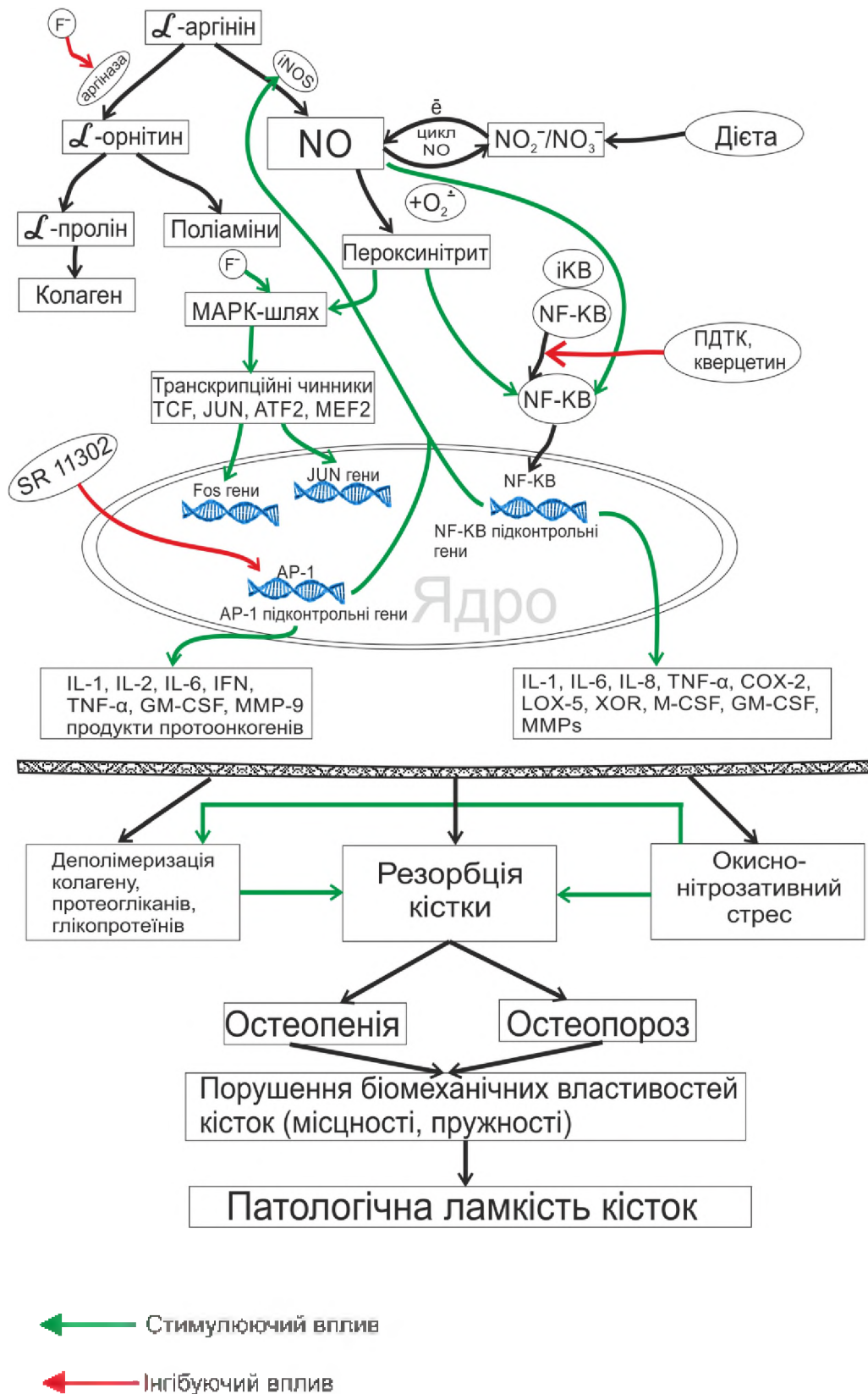


Рис. 6.1. Концептуальна схема механізмів метаболічних і біомеханічних порушень у кістках щурів за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію

аргіназній системах, що призводять до порушення авторегуляції рівня монооксиду нітрогену та утворенням остеотоксичних концентрацій активних форм нітрогену. Це супроводжується порушенням циклу ремоделювання кісткової тканини за рахунок превалювання резорбції кістки, що підтверджується збільшенням активності у сироватці крові ферментів-маркерів резорбції кістки (кислої фосфатази та її тартрат-резистентної ізоформи) та надмірною деполімеризацією колагенових і неколагенових білків стегнових кісток і хребців. Наслідком таким процесів є порушення їхніх остеометричних характеристик і структурної композиції (остеопенія, зменшення щільності та мінеральної насиченості), що перевищують такі при окремій дії токсичних агентів. За цих умов істотно порушуються біомехангічні властивості стегнових кісток (міцність і пружність).

У ході дослідження показано зв'язок метаболічних і біомеханічних розладів кісток за умов поєднаного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію з активністю транскрипційних факторів AP-1 та NF- κ B, що коригуються їхніми інгібіторами (SR 11302, ПДТК, кверцетин). Показана доцільність застосування суспензії нанодисперсного кремнезему за умов експерименту для попередження остеотоксичної дії надмірних концентрацій неорганічних нітросполук і фторидів.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведене теоретичне узагальнення і експериментальне розв'язання наукового завдання, що полягає у з'ясуванні механізмів метаболічних і біомеханічних порушень у кістках щурів за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію та дослідженні ефективності їхньої корекції з використанням інгібіторів транскрипційних факторів AP-1 та NF-κB, а також ентеросорбенту.

1. Поєдане введення фториду та нітрату натрію, на відміну від окремого застосування цих сполук, порушує механізм авторегуляції рівня монооксиду нітрогену в стегнових кістках щурів, збільшуючи активність загальної NO-синтази (на 51,3%, $P < 0,05$) та її індукцибельної ізоформи (на 80,0%, $P < 0,01$) на тлі зниження загальної аргіназної активності (на 53,6%, $P < 0,001$) з подальшим підвищенням у тканинах концентрації пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів (на 24,4%, $P < 0,001$), що свідчить про розвиток нітрозативного стресу.

2. Сукупна дія фториду та нітрату натрію супроводжується високим кістковим обміном з підвищеною резорбцією, яка не компенсується реакцією формування кістки, збільшенням вмісту продуктів деполімеризації колагену, протеогліканів і сіалоглікопротеїнів (вільного оксипроліну, гексуронових кислот та N-ацетилнейрамінової кислоти) у стегнових кістках (на 13,7%, $P < 0,01$, 51%, $P < 0,01$, та 69,5%, $P < 0,001$, відповідно) та хребцях (на 18%, $P < 0,01$, 47%, $P < 0,02$, та 70%, $P < 0,01$, відповідно), що перевищує такий при поодинокому введенні солей фторної та нітратної кислот.

3. За умов поєданого надмірного надходження у організм фториду та нітрату натрію, на відміну від окремого застосування цих

сполук, змінюються остеометричні та біомеханічні характеристики кісток: зменшується маса, щільність та мінеральна насиченість стегнових кісток (на 11,7%, $P < 0,001$, 19,6%, $P < 0,01$, та 23,5%, $P < 0,02$, відповідно) і хребців (на 13%, $P < 0,01$, 13,3%, $P < 0,01$, та 17,4%, $P < 0,05$, відповідно), знижується міцність і пружність стегнових кісток (при лінійному розриві та при випробовуванні на згин).

4. Інгібітори транскрипційних чинників AP-1 та NF- κ B (SR 11302, амонію піролідіндитіокарбамат та водорозчинна форма кверцетину) відновлюють за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію механізм авторегуляції рівня NO в стегнових кістках щурів, зменшуючи загальну активність NO-синтази (на 64%, $P < 0,001$, 74%, $P < 0,001$, та 80%, $P < 0,001$, відповідно) та активність її індукбельної ізоформи (на 75%, $P < 0,001$, 86%, $P < 0,001$, та 89%, $P < 0,001$, відповідно) при реципрокному збільшенні загальної аргіназної активності (на 88%, $P < 0,001$, 95%, $P < 0,001$, та вдвічі, $P < 0,001$, відповідно), та обмежуючи утворення пероксинітриду. Це супроводжується зменшенням активності ферментів-маркерів резорбції кістки (кислої фосфатази та її кісткової ізоформи) та обмеженням деполімеризації колагену, протеогліканів та сіалоглікопротеїнів сполучної (кісткової) тканини стегнових кісток і хребців.

5. Інгібітори транскрипційних чинників AP-1 та NF- κ B за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію нормалізують масу стегнових кісток і хребців, при цьому SR 11302 і амонію піролідіндитіокарбамат збільшують щільність, мінеральну насиченість, міцність і пружність стегнових кісток, а також щільність, мінеральну насиченість і міцність хребців (зменшується остеометричний індекс Simon), а водорозчинна форма кверцетину підвищує щільність і міцність стегнових кісток (збільшується розривне навантаження, межа міцності)

без істотного впливу на показники мінеральної насиченості та пружності.

6. При застосуванні суспензії нанодисперсного кремнезему за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію відновлюється функціонування фізіологічного механізму авторегуляції рівня NO в крові та стегнових кістках щурів. У гомогенаті кісток це призводить до зменшення загальної активності NO-синтаз (на 81,7%, $P < 0,001$), активності її індукбельної ізоформи (на 90,7%, $P < 0,001$), збільшення загальної аргіназної активності (на 89,2%, $P < 0,001$) та обмеження утворення пероксинітриту (на 9,9%, $P < 0,01$), що супроводжується обмеженням деполімеризації колагену, протеогліканів та сіалоглікопротеїнів сполучної (кісткової) тканини стегнових кісток і хребців.

7. Застосування суспензії нанодисперсного кремнезему суттєво не позначається за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію на кількісних показниках структурної композиції стегнових кісток, але покращує їхні остеометричні (маса збільшується на 11,2%, $P < 0,001$) та біомеханічні властивості при лінійному розриві (розривне навантаження підвищується на 22,1%, $P < 0,01$; відносне подовження – на 7,9%, $P < 0,05$) та при випробовуванні на згин (розривне навантаження збільшується на 26,5%, $P < 0,001$, модуль Юнга – 90,4%, $P < 0,001$, межа міцності – на 27,7%, $P < 0,05$).

8. Призначення суспензії нанодисперсного кремнезему за умов надходження фториду та нітрату натрію підвищує щільність хребців (на 12,6%, $P < 0,05$) без істотного впливу на їхню мінеральну насиченість, а за результатами остеометричного дослідження – збільшує масу та міцність (зменшується індекс Simon) 3-го поперекового хребця.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Акимов О.Е. Влияние NF-kB фактора на развитие оксидационного стресса в крови крыс при фторидной интоксикации / О.Е. Акимов, И.А. Ковалёва, А.В. Мищенко // Актуальні питання розвитку медичних наук у ХХІ ст. : міжнар. наук.-практ. конф. (Львів, 25-26 травня 2019 р.) : зб. матеріалів. – Львів, 2019. – С. 94–98.

2. Акимов О.Е. Влияние суспензии нанодисперсного кремнезёма на функционирование цикла оксида азота в слизистой оболочке желудка крыс при сочетанной нитратной и фторидной интоксикации / О.Е. Акимов, А.В. Мищенко, В.А. Костенко // Медицинский журнал БДМУ (Беларусь). – 2017. – №1. – С.40-44.

3. Акимов О.Е. Влияние энтеросорбентов на метаболизм аргинина и процессы пероксидного окисления липидов в крови крыс в условиях хронической сочетанной интоксикации нитратом и фторидом натрия / О.Е. Акимов, И.А. Ковалёва, В.А.Костенко // Вестник Алматинского государственного института усовершенствования врачей (Казахстан). – 2016. – №3. – С.37-41.

4. Акимов О.Е. Генерация свободных радикалов и процессы пероксидного окисления липидов в слизистой оболочке желудка крыс в условиях сочетанной нитратной и фторидной интоксикации / О.Е. Акимов, А.В. Мищенко, В.А. Костенко // Вестник Алматинского государственного института усовершенствования врачей (Казахстан). – 2016. – № 3. – С. 42-46.

5. Акимов О. Е. Нитрат-индуцированные процессы в крови и сердце крыс / О.Е. Акимов, И.А. Ковалёва // Багаторівнева профілактика та діагностика в онкології : зб. тез наук.-практ. конф. з міжнар. участю. – Харків, 2018. – С. 8.

6. Акимов О.Е. Роль активации ядерного транскрипционного фактора NF- κ B в развитии гиперпродукции оксида азота в условиях хронической фторидной интоксикации / О.Е. Акимов, И.А. Ковалёва, А.В. Мищенко // Світова медицина: сучасні тенденції та фактори розвитку : збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції (м. Львів, 25–26 січня 2019 р.). – Львів : ГО «Львівська медична спільнота», 2019. – С. 109–112.

7. Акимов О. Е. Современные подходы к поиску препаратов для дезинтоксикационной терапии при хронической интоксикации нитратами и фторидами / О.Е. Акимов // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2015. – Т. 15, № 2. – С. 238-243

8. Акімов О.Є. Вплив різних карбонових сорбентів на функціонування циклу оксиду азоту в слизовій оболонці шлунка щурів за умов поєднаної нітратно-фторидної інтоксикації / О.Є. Акімов, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2017 – Т.17. – №2. – С.5-8.

9. Акімов О.Є. Функціонування аргіназного та NO-синтазного шляху метаболізму L-аргініну в крові щурів за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію та застосування суспензії нанодисперсного кремнезему / О.Є. Акімов, І.О. Ковальова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2016 – Т.16, №1. – С. 169-173.

10. Алехнович Л.И. Патогенетические механизмы и лабораторная диагностика метаболических нарушений при остеопорозе / Л.И. Алехнович, Э.В. Руденко, Ю.И. Степанова // Медицина. – 2012. – №2. – С. 19-29.

11. Беланова А.А. Активаторный белок 1: структура, функционирование и роль в окислительном статусе человека / А.А.

Беланова, Ю.А. Лебедева, О.Н. Кузьминова [и др.] // *Sci Pract J Health Life Sci.* – 2014. – №3. – С. 11-20.

12. Биофлавоноиды как органопротекторы (кверцетин, корвитин, квертин) / [Н.П. Максютин, А.А. Мойбенко, Н.А. Мохорт и др.]. – К. : Наукова думка, 2012. – 274 с.

13. Білець М.В. Зміни мінеральної фази кісткової тканини в умовах сполученої дії емоційного стресу і недостатності гонад / М.В. Білець // *Клін. та експерим. патол.* – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 332-333.

14. Білець М.В. Метаболізм протеогліканів кісткової тканини різних відділів скелету за умов емоційного стресу, недостатності гонад та їх поєданого впливу / М.В. Білець, Ф.С. Леонтєва, Л.М. Тарасенко // *Мед. хімія.* – 2007. – Т. 9, № 2. – С. 46-49.

15. Білик О.В. Зміни кісток щурів за умов гіпоксії і гіпертермії та корекція їх кверцетином : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 14.03.04 “Патологічна фізіологія” / О.В. Білик. – Луганськ, 2010. – 21 с.

16. Богданов А.В. Механизмы дисрегуляции нитроксидазной системы в тканях пародонта крыс в условиях сочетанного избыточного поступления нитратов и фторида натрия / А.В. Богданов, Ю.М. Гришко, В.А. Костенко // *Wiad Lek.* – 2016. – Т. LXIX, №3 (cz. II). – S. 457-461.

17. Богданов О.В. Вільнорадикальні процеси в тканинах пародонта щурів за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію / О.В. Богданов, В.О. Костенко // *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії.* – 2016. – Т.16, №2. – С. 210-213.

18. Богданов О.В. Вплив інгібітора ядерної транслокації транскрипційного фактора κВ на окисний метаболізм у тканинах пародонта щурів за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію / О.В. Богданов, В.О. Костенко // *Актуальні*

проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2017. – Т.17, №1. – С. 217-219.

19. Богданов О.В. Вплив скевенджерів пероксинітриту на окисний метаболізм у тканинах пародонта щурів за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію / О.В. Богданов, В.О. Костенко // Світ медицини та біології. – 2016. – №3. – С. 95-98.

20. Богданов О.В. Роль компонентів системи оксиду азоту у патогенезі ушкодження пародонта щурів за умов сполученого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.03.04 “Патологічна фізіологія” / О.В. Богданов. – Харків, 2018. – 24 с.

21. Бруско А.Т. Структурные основы, условия возникновения и механизмы адаптационных и компенсаторных реакций в костях / А.Т. Бруско, И.В. Рой // Вісник ортопедії, травматології та протезування. – 2002. – № 3. – С. 25-28.

22. Верголяс М.Р. Генотоксическое влияние фтора питьевой воды / Верголяс М.Р., Головков А.Н., Наниева А.В. [и др.] // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2016. – Т.18. – С. 33-35.

23. Геворкян М.Л. Строение активного центра печеночной аргиназы млекопитающих. II. Субстраты и ингибиторы / М.Л. Геворкян, М.А. Давтян // Биолог. журн. Армении. – 2008. – №4. – С. 16-26.

24. Герштейн Е.С. Лиганд-рецепторная система RANK/RANKL/OPG и ее роль при первичных новообразованиях костей (анализ литературы и собственные результаты) / Е.С. Герштейн, Ю.С. Тимофеев, А.А. Зуев, Н.Е. Кушлинский // Усп. молекул. онкол. – 2015. – Т.2, №3. – С. 51-59.

25. Гланц С. Медико-биологическая статистика : пер. з англ. / Стентон Гланц. – М. : Практика, 1999. – 459 с.

26. Головач И. Ю. Новая цель таргетной терапии остеопороза — ингибитор RANKL деносумаб / И.Ю. Головач // Укр. ревм. журн. – 2013. – № 1. – С. 12-20.

27. Горностаева Е.А. Влияние фторсодержащих соединений на живые организмы / Е.А. Горностаева, С.Л. Фукс // Теоретическая и прикладная экология. – 2017. – №1. – С. 14-24.

28. Гулевский А.К. Гликозаминогликаны хрящевой ткани крыс при механической травме: нормализующее влияние низкомолекулярной фракции кордовой крови и крови молочных телят / А.К. Гулевский, В.И. Грищенко, Е.Г. Иванов // Український біохімічний журнал. – 2009. – Т.81, №3. – С. 117-121.

29. Дедух Н.В. Костная ткань в норме и при остеопорозе: препараты кальция и витамина D / Н.В. Дедух, Е.А. Побел // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2013. – № 3. – С. 92-98.

30. Должкова К. П. Вплив пригнічення та індукції NO-синтаз на біохімічний склад кісткової тканини нижньої щелепи при відтворенні її перелому на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію / К.П. Должкова, В.О. Костенко // Пробл. екол. та мед. – 2010. – Т. 14, № 1-2. – С. 35-38.

31. Должкова К.П. Вплив хронічної інтоксикації нітратом натрію на процеси репаративної регенерації нижньощелепної кістки у щурів / К.П. Должкова // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2010. – Т. 5, №3. – С. 51-55.

32. Должкова К.П. Вплив хронічної інтоксикації нітратом натрію на репаративну регенерацію нижньої щелепи / К.П. Должкова // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Укр. мед. стомат. академії. – 2009. – Т. 9, Вип. 2. – С. 44-45.

33. Дыдыкина И.С. Опыт применения деносумаба в терапии остеопороза у больных ревматоидным артритом, получающих

глюкокортикоиды / Дыдыкина И.С., Коваленко П.С., Смирнов А.В. [и др.] // Современная ревматология. – 2018. – №2. – С. 50-57.

34. Елинская А.Н. Роль транскрипционного фактора STAT-3 в деструкции белков соединительной ткани пародонта крыс в условиях липополисахарид-индуцированного системного воспалительного ответа / А.Н Елинская, В.А. Костенко // Современные проблемы гигиены, радиационной и экологической медицины : сб. науч. ст. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, УО «Гродн. гос. мед. ун-т». – Гродно : ГрГМУ, 2018. – Вып. 8. – С. 24-33.

35. Елинская А.Н. Системное и местное введение липополисахарида *Salmonella typhi* взаимно потенцируют продукцию супероксидного анион радикала в тканях пародонта крыс / А.Н Елинская, В.А. Костенко // Роль и место инновационных технологий в современной медицине : сб. статей. Т. II. - Душанбе : ТГМУ им. Абуали ибни Сино, 2018. – С. 119-121.

36. Єлінська А.М. Вплив водорозчинної форми кверцетину на дезінтеграцію органічного матриксу пародонта щурів за умов системного введення ліпополісахариду *Salmonella typhi* / А.М. Єлінська, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2019. – Т. 19, №1. – С. 56-60.

37. Єлінська А.М. Вплив інгібітора фактора транскрипції AP-1 на деполімеризацію білків сполучної тканини пародонта щурів за умов системної запальної відповіді / А.М. Єлінська, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2018. – Т. 18, №2. – С. 335–339.

38. Єлінська А.М. Механізми дезорганізації сполучної тканини пародонта щурів за умов системного запалення / А.М. Єлінська, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2018. – Т. 18, №1. – С. 175–177.

39. Жовинский Э.Я. Полтавская фтороносная провинция / Жовинский Э.Я., Крюченко Н.О. // Вода і водоочист. технол. – 2003. – № 2. – С. 46–50.

40. Жукова А.Г. Динамика компенсаторных механизмов на ранних стадиях интоксикации фтором / Жукова А.Г., Уланова Е.В., Щербакова Д.А. [и др.] // Технологии живых систем. – 2011. – Т. 8, № 1. – С. 10-17.

41. Жукова А.Г. Современные представления о молекулярных механизмах физиологического и токсического действия соединений фтора на организм / Жукова А.Г., Михайлова Н.Н., Казицкая А.С., Алехина Д.А. // Медицина в Кузбассе. – 2017. – Т.16, № 3. – С. 4-11.

42. Жукова А.Г. Специфичность клеточного ответа на действие различных производственных токсикантов / Жукова А.Г., Уланова Е.В., Фоменко Д.В. [и др.] // Медицина труда и промышленная экология. – 2011. – №7. – С. 23-26.

43. Иванюк Е.Э. Субпопуляции макрофагов и мезенхимные стволовые клетки в регуляции ремоделирования костной ткани / Е.Э. Иванюк, С.В. Надеждин, Л.А. Покровская [и др.] // Цитология. – 2018. – Т.60, №4. – С. 252-261.

44. Інгібітори активації транскрипційних чинників NF-κB та AP-1 як засоби профілактики та патогенетичної терапії окисно-нітрозативного стресу / В.О. Костенко, А.М. Єлінська, І.О. Ковальова, С.М. Назаренко, Н.В. Соловйова, Ю.Д. Френкель, О.О. Швайковська, І.В. Явтушенко // Бюлл. XVII чтений им. В.В. Подвысоцкого (г. Одесса, 24–25 мая 2018 г.). – Одесса, 2018. – С. 110-111.

45. Кайдашев И.П. Роль NFκB в функционировании отдельных тканей, развитии и синтропии заболеваний основных систем организма / И.П. Кайдашев // Журн. НАМН України. – 2012. – Т. 18, № 2. – С. 186-198.

46. Калетина Н.И. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов : [учебное пособие для вузов] / Н.И. Калетина. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 1016 с.

47. Ковалёва И.А. Роль пероксинитрита в процессах деполимеризации коллагена и протеогликанов в костях и коже крыс при сочетанном введении в организм нитрата и фторида натрия / И.А. Ковалёва, А.В. Богданов, Д.А. Хмиль // Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье : XIX международная медико-биологическая конференция молодых исследователей (Санкт-Петербург, 23 апреля 2016 г.) : тезисы. – СПб. : Изд-во СПбГУ, 2016. – С. 273-274.

48. Ковальова І.О. Вплив інгібітора транскрипційного чинника AP-1 на структурно-метаболічні та біомеханічні зміни кісткової тканини за умов поєданого надлишкового надходження фториду та нітрату натрію / І.О. Ковальова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2019. – Т.19, №2. – С. 123-128.

49. Ковальова І.О. Вплив інгібіторів транскрипційного чинника каппа В на метаболічні та структурні порушення кісткової тканини за умов поєданого надлишкового надходження фториду та нітрату натрію / І.О. Ковальова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2019. – Т.19, №1. – С. 65-70.

50. Ковальова І.О. Метаболічні, остеометричні і біомеханічні показники кістковій тканини щурів при поєданому надлишковому надходженні в організм нітрату і фториду натрію / І.О. Ковальова, В.І. Макаренко // Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція : тези доповідей II Науково-практичної

інтернет-конференції з міжнародною участю (21 листопада 2019 р.). – Харків : Вид-во НФаУ, 2019. – С. 184.

51. Костенко В.О. Механізми ауторегуляції утворення оксиду азоту в організмі ссавців та їх порушення при розвитку патологічних процесів / В.О. Костенко, Н.В. Соловйова, О.В. Коваленко [та ін.] // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2011. – Т.11, №3. – С. 150-154.

52. Костенко В.О. Механізми порушення окисних процесів у тканинах при надлишковому утворенні оксиду азоту з екзогенних попередників / В.О. Костенко, А.Г. Костенко, С.В. Денисенко [та ін.] // Клін. та експ. патол. – 2004. – Т.3, № 2 (Ч.1). – С.202-204.

53. Костенко В.А. Не только концентрация, но и происхождение оксида азота определяет его патогенетическую или саногенетическую роль / В.А. Костенко, И.В. Батухина, А.А. Левков [и др.] // Патология. – 2008. – Т.5, №2. – С. 58.

54. Костенко В.О. Роль слинних залоз у механізмах ауторегуляції рівня оксиду азоту в організмі ссавців та їх порушень / В.О. Костенко, А.М. Єлінська, Л.І. Ляшенко [та ін.] // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2013. – Т. 13, № 2. – С. 10–14.

55. Краснопольский В.И. Роль эндогенных гормонов в регуляции костно-минерального обмена / В.И. Краснопольский, В.У. Торчинов, О.Ф. Серова, Н.В. Зароченцева // Росс. вестн. акушера-гинеколога. – 2005. – № 4. – С. 16-20.

56. Левашов М.И. Физическая нагрузка и ремоделирование кости / М.И. Левашов // Спортив. мед. – 2011. – № 1-2. – С. 47-54.

57. Лузин В.И. Особенности роста костей скелета белых крыс, подвергшихся воздействию экстремальной хронической гипертермии в сочетании с физической нагрузкой и возможным корректором инозином

/ В.И. Лузин, С.М. Смоленчук // Укр. морфол. альм. – 2008. – Т.6, №3. – С. 52-56.

58. Лузин В.И. Рост и формообразование костей скелета белых крыс при нанесении дырчатого дефекта большеберцовых костей на различных этапах постнатального онтогенеза / В.И. Лузин, В.Н. Прочан // Укр. морфол. альм. – 2008. – Т. 6, № 4. – С. 69-74.

59. Ляшенко Л.І. Роль транскрипційного ядерного фактора κВ у механізмах порушень вільнорадикальних процесів і дезорганізації сполучної тканини пародонта за умов експериментального метаболічного синдрому / Л.І. Ляшенко, С.В. Денисенко, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2014. – Т. 14, №1. – С. 97–100.

60. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / [Л.В. Беркало, О.В. Бобович, Н.О. Боброва та ін.] ; за ред. І.П. Кайдашева. – Полтава, 2003. – 320 с.

61. Молекулярні механізми впливу фторидів на організм ссавців / В.О. Костенко, О.Є. Акімов, І.О. Ковальова, А.В. Міщенко, Ю.Д. Френкель // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2018. – Т. 18, №1. – С. 303-308.

62. Мосейчук А. А. Оцінка якості питної води в джерелах децентралізованого водопостачання Полтавської області / Мосейчук А.А., Бойко І. А. // Вісн. Полтавської держ. агр. акад. – 2011. – № 4. – С. 12-17.

63. Непорада К.С. Регуляторні поліаміни та регуляція проліферації та диференціації клітин органів порожнини рота / К.С. Непорада, Т.В. Берегова, А.А. Сухомлин [та ін.] // Мед. форум. – 2016. – №9. – С. 52-55.

64. Ніцак О.В. Експериментальне обґрунтування доцільності використання суспензії нанодисперсного кремнезему як сорбційного

засобу : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 14.03.05 «Фармакологія» / О.В. Ніцак. – К., 2009. – 23 с

65. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / [Е.Б.Меньщикова, В.З.Ланкин, Н.К.Зенков и др.]. – М. : Слово, 2006. – 556 с.

66. Пигарова Е.А. Применение терипаратида для лечения тяжелого остеопороза с множественными переломами / Пигарова Е.А., Рожинская Л.Я. // Остеопороз и остеопатии. – 2014. – №1. – С. 33-37.

67. Пикалюк В.С. Методичні аспекти дослідження скелету людини і тварин / В.С. Пикалюк. – Сімферополь, 2007. – 272 с.

68. Проблема оксида азота в биологии и медицине и принцип цикличности: Ретроспективный анализ идей, принципов и концепций / [В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, Н.С. Косицын и др.]. – М. : Едиториал УРСС, 2003. – 96 с.

69. Реутов В.П. Нитратно-нитритный фон существования современного человека и продолжительность жизни / В.П. Реутов // Евразийское научное объединение. – 2016. – №3. – С.68-76.

70. Реутов В.П. Проблема оксида азота в биологических системах: от NO-синтазных и нитритредуктазных систем в организме млекопитающих к циклу оксида азота, принципу цикличности и механизмам, лежащих в основе многочисленных заболеваний / В.П. Реутов // Евразийское научное объединение. – 2016. – №1. – С. 45-55.

71. Реутов В.П. Цикл оксида азота как механизм стабилизации содержания NO и продуктов его превращения в организме млекопитающих / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, А.И. Гоженко [и др.] // Актуал. пробл. трансп. мед. – 2008. – № 1 (11). – С. 22-28.

72. Роль інгібіторів та індукторів редокс-чутливих транскрипційних чинників у фармакологічній регуляції окисно-нітративного стресу / А.М. Єлінська, Ю.Д. Френкель, О.І. Белікова, М.С.

Коваль, І.О. Ковальова, В.О. Костенко // V нац. з'їзд фармакологів України (Запоріжжя, 18–20 жовтня 2017 р.) : тези доп. – Запоріжжя, 2017. – С. 42.

73. Роль редоксчутливих чинників транскрипції в механізмах деструкції сполучної тканини / А.М. Єлінська, І.О. Ковальова, С.М. Назаренко, Ю.Д. Френкель, О.О. Швайковська, І.В. Явтушенко, В.О. Костенко // Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм : XI наук.-практ. конф. з міжнарод. участю (Тернопіль, 4–5 жовтня 2018 р.) : мат. – Тернопіль, 2018. – С. 43- 44.

74. Роль редокс-чутливих транскрипційних чинників у механізмах окисно-нітрозативного стресу / А.М. Єлінська, Ю.Д. Френкель, М.С. Коваль, І.О. Ковальова, О.О. Швайковська, І.В. Явтушенко, В.О. Костенко // Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм : X наук.-практ. конф. з міжнарод. участю (Тернопіль, 5–6 жовтня 2017 р.) : мат. – Тернопіль, 2017. – С. 16.

75. Роль редоксчутливих чинників транскрипції в порушенні авторегуляції оксиду азоту в організмі ссавців / В.О. Костенко, Ю.М. Гришко, С.В. Денисенко, А.М. Єлінська, І.О. Ковальова, Н.В. Соловйова, О.О. Швайковська // Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики : VII пленум Укр. наук. тов. патофізіологів та наук.-практ. конф., присвячені 110-річчю з дня народження чл.-кор. АМН СРСР, проф. М.Н. Зайка : мат. доп. (Полтава, 11-12 жовтня 2018 р.). – Полтава, 2018. – С. 35-36.

76. Рошупкіна С.Л. Особливості росту, будови та формоутворення кісток скелета під впливом нітратів : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.03.01“Нормальна анатомія” / С.Л. Рошупкіна. – Харків, 2000. – 17 с.

77. Сагаловски С. Остеопороз и его клеточно-молекулярные механизмы развития: поиск молекул-мишеней для новых средств

лечения заболевания / С. Сагаловски, М. Шёнерт // Мед. перспективы. – 2012. – Т. 17, №1. – С.1-13.

78. Сагаловски С. RANKL – RANK – OPG система и ремоделирование кости: новые подходы к лечению остеопороза / С. Сагаловски, М. Шёнерт // Клин. та експ. патол. – 2011. – Т. 10, №2 . – С. 146-153.

79. Сак Н.Н. Прочность плечевой кости белых крыс различного возраста при нанесении дырчатого дефекта большеберцовых костей // Укр. морфол. альм. / Н.Н. Сак. – 2012. – Т. 10, №2. – С. 196-198.

80. Сибірна Н.О. Молекулярні механізми депонування оксиду азоту в еритроцитах / Н.О. Сибірна, М.Я. Люта, Н.І. Климишин // Біологічні студії. – 2010. – Т.4, №1. – С. 143-160.

81. Сорокин Б.В. Характер ремоделирования костей при воспроизведении экспериментального остеопороза при хронической интоксикации нитрата натрия / Б.В. Сорокин, В. А. Костенко // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2013. – № 4. – С. 74-76.

82. Сорокін Б.В. Вплив пектину та пектиновмісних продуктів на функціонально-метаболічні зміни кісткової тканини при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію / Б.В. Сорокін, В.О. Костенко // Світ медицини та біології. – 2013.– № 4. – С. 86-89.

83. Сорокін Б.В. Вплив L-селенометіоніну на патоморфологічні зміни кісток при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію / Б.В. Сорокін, І.І. Старченко, В. О. Костенко // Науковий вісник МНУ ім. В.О. Сухомлинського : сб. наукових праць / за ред. І.В. Наконечного, В.С. Черна. – Вип. 2 (101). – Миколаїв : МНУ ім. В.О. Сухомлинського, 2013. – (Сер. Біологічні науки). – С. 218-224.

84. Сорокін Б.В. Зміни компонентів органічного матриксу кісткової тканини щурів при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію / Б. В. Сорокін, В. О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2013. – Т.13, №2. – С. 220-224.

85. Сорокін Б.В. Роль NO-синтаз у механізмах структурно-функціональних порушень кісток при відтворенні глюкокортикоїдного остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію / Б. В. Сорокін, В. О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2013. – Т.13, №4. – С. 178-181.

86. Сорокін Б. В. Роль утворення пероксинітриту на структурно-метаболічні зміни кісткової тканини при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію / Б. В. Сорокін, В. О. Костенко // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2012. – №4, дод. Б. – С. 78-82.

87. Стасюк О.А. Роль ізоформ NO-синтази у механізмах порушень вільнорадикальних процесів у слинних залозах щурів за умов спільного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію / О.А. Стасюк, В. О. Костенко // Світ медицини та біології. – 2012. – № 4. – С. 101-104.

88. Ступаков Г.П. Костная система и невесомость / Г.П. Ступаков, А.И. Воложин. – М. : Наука, 1989. – 184 с.

89. Сукманський О.І. Глікозаміноглікани (ГАГ) і кісткова тканина / О.І. Сукманський, В.Н. Горохівський // Вісн. стоматол. – 2009. – № 3. – С. 113-118.

90. Тетянец С.С. Метод определения свободного оксипролина в сыворотке крови / С.С. Тетянец // Лабор. дело. – 1985. – №1. – С. 61-62.

91. Торонченко О.М. Екологічне дослідження концентрації фтору у питній воді Полтавської області та аналіз впливу на здоров'я

населення / О.М. Торонченко // Світ мед. та біол. – 2013. – №4. – С. 52-57.

92. Хміль Д.А. Эффективность сочетанного применения L-аргинина и ингибитора ядерного фактора κВ для коррекции дезорганизации соединительной ткани кожи крыс при избыточном поступлении в организм нитрата натрия / Д.А. Хміль, А.А. Левков, В.А. Костенко // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2018. – Т.16, № 1. – С. 36-40.

93. Хміль Д.О. Вплив L-аргініну та корвітину на окисно-нітрозативний стрес у шкірі щурів за умов підвищеного вмісту нітрату натрію / Д.О. Хміль, В.О. Костенко // Фізіол. журн. – 2017. – Т. 63, № 6. – С. 53-59.

94. Хміль Д.О. Роль NO-синтази і аргінази у механізмах дезорганізації сполучної тканини шкіри щурів за умов надмірного надходження в організм нітрату натрію / Д.О. Хміль, В.О. Костенко // Світ медицини та біології. – 2017 – №2. – С.169-171.

95. Хміль Д.О. Роль NO-синтази і аргінази у механізмах окисно-нітративного стресу в шкірі щурів за умов надмірного надходження в організм нітрату натрію / Д.О. Хміль, А.В. Міщенко, В.О. Костенко // Український журнал медицини, біології та спорту. – 2017. – №2. – С. 54-59.

96. Хміль Д.О. NO- та аргіназа-опосередковані механізми окисно-нітрозативного стресу та деполімеризації біополімерів сполучної тканини шкіри щурів за умов надмірного надходження в організм нітрату натрію : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.04 «Біохімія». – Тернопіль, 2018. – 22 с.

97. Червяковский Е.М. Роль флавоноидов в биологических реакциях с переносом электронов / Червяковский Е.М., Курченко В.П., Костюк В.А. // Тр. Белорусского гос. ун-та. Сер. Физиологические,

биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2009. – Т.4, Ч. 1. – С. 9-26.

98. Шалина М.А. Опыт применения деносумаба в лечении постменопаузального остеопороза / Шалина М.А., Ярмолинская М.И. // Остеопороз и остеопатии. – 2016. – №2. – С.84-85.

99. Шалина Т.И. Общие вопросы токсического действия фтора / Т.И. Шалина, Л.С. Васильева// Сиб. мед. журн. – 2009. Т. 88, № 5. – С. 5-9.

100. Шараев П.Н. Метод определения гликозаминогликанов в биологических жидкостях / П.Н. Шараев, В.Н. Пишков, Н.И. Соловьева [и др.] // Лаб. дело. – 1987. – №5. – С.330-332.

101. Шюк О. Функциональное исследование почек : пер. с чеш. / О. Шюк. – [2-е изд.] – Прага : Авиценум, 1981. – 344 с.

102. Aaron J.E. The effect of sodium fluoride on trabecular architecture / Aaron J.E., de Vernejoul M.C., Kanis J.A. // Bone. – 1991. – V. 12. – P. 307-310.

103. Abu-Amer Y. NF- κ B signaling and bone resorption / Y. Abu-Amer // Osteoporos Int. – 2013. – V.24, №9. – Art. 10.1007/s00198-013-2313-x.

104. Akimov O. Ye. Correction of destructive changes in connective tissues of different organs during chronic nitrate and fluoride intoxication by nanosized silica oxide / O.Ye. Akimov, I.O. Kovalova, V.O. Kostenko // Journal of Education, Health and Sport. – 2019. – V.9, №5. – P. 547-555.

105. Akimov O. Ye. Functioning of nitric oxide cycle in gastric mucosa of rats under excessive combined intake of sodium nitrate and fluoride / O.Ye. Akimov, V.O. Kostenko // Ukr Biochem J. – 2016. – V. 88, №6. – P. 70-75.

106. Akimov O. Ye. Superoxide and peroxynitrite production in gastric mucosa of rats under combined nitrate-fluoride intoxication / O.Ye. Akimov,

V.O. Kostenko // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2018. – Т. 16, №6. – С. 730-734.

107. Albaugh V.L. Proline Precursors and Collagen Synthesis: Biochemical Challenges of Nutrient Supplementation and Wound Healing / Albaugh V.L., Mukherjee K., Barbul A. // J Nutr. – 2017. – V.147, №11. – P. 2011-2017.

108. Anastasilakis A.D. Therapy of endocrine disease: Denosumab vs bisphosphonates for the treatment of postmenopausal osteoporosis / Anastasilakis A.D., Polyzos S.A., Makras P. // Eur J Endocrinol. – 2018. – V.179, №1. – P. R31-R45.

109. Bagmut I. The antioxidant system enzymes' activity in rats' brain, toxicated with sodium fluoride in subtoxic doses / I. Bagmut, I. Kolisnyk, A. Titkova [et al.] // Arch Balkan Med Union. – 2018. – V. 53, №4. – P. 506-511.

110. Barbier O. Molecular mechanisms of fluoride toxicity / O. Barbier, L. Arreola-Mendoza, L.M. Del Razo // Chem Biol Interact. – 2010. – V. 188. – P. 319-333.

111. Bartesaghi S. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration / Bartesaghi S., Radi R. // Redox Biol. – 2018. – V.14. – P. 618-625.

112. Basic and Applied Bone Biology / D.B. Burr, M.R. Allen eds. – [2nd ed.]. – Academic Press, 2019. – 478 p.

113. Batoon L. Osteomacs and Bone Regeneration / Batoon L., Millard S.M., Raggatt L.J., Pettit A.R. // Curr Osteoporos Rep. – 2017. – V.15, №4. – P. 385-395.

114. Berkowitz D.E. Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels / D. E. Berkowitz, R. White, D. Li [et al.] // Circulation. – 2003. – V.108, №16. – P.2000–2006.

115. Bhatta A. Deregulation of arginase induces bone complications in high-fat/high-sucrose diet diabetic mouse model / Bhatta A., Sangani R., Kolhe R. [et al.] // *Mol Cell Endocrinol.* – 2016. – V.422. – P. 211-220.

116. Bhawal U.K. Micromolar sodium fluoride mediates anti-osteoclastogenesis in *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss / U.K. Bhawal U.K., H.J. Lee, K. Arikawa [et al.] // *Int J Oral Sci.* – 2015. – V. 7. – №4. – P. 242-249.

117. Bi Y. Extracellular matrix proteoglycans control the fate of bone marrow stromal cells / Bi Y., Stuelten C.H., Kilts T. [et al.] // *J Biol Chem.* - 2005. – V.280, №34. – P. 30481-30489.

118. Bozec A. Fra-2/AP-1 controls bone formation by regulating osteoblast differentiation and collagen production / A. Bozec, L. Bakiri, M. Jimenez [et al.] // *J Cell Biol.* – 2010. – V. 190, №6. – P. 1093–1106.

119. Bucur R.C. Nitrates and bone turnover (NABT) – a trial to select the best nitrate preparation: study protocol for a randomized controlled trial / R.C. Bucur, L.S. Reid, C.J. Hamilton [et al.] // *Trials.* – 2013. – V.14, №1. – P. 284.

120. Butler A.R. Formation of nitric oxide from nitrous acid in ischemic tissue and skin / A.R. Butler, J.H. Ridd // *Nitric Oxide.* – 2004. – V.10, №1. – P. 20-24.

121. Buttery L.D. Nitric oxide stimulates osteoblast replication and development / L.D. Buttery, I.J. Aguirre, M.V. Hukkanen [et al.] // *J Bone Mineral Res.* – 1999. – V.14. – P.1154.

122. Caldwell R.B. Arginase: an old enzyme with new tricks / R.B. Caldwell, H.A. Toque, S.P. Narayanan, R.W. Caldwell // *Trends Pharmacol Sci.* – 2015. – V.36, №6. – P. 395–405.

123. *Cells and Tissues in Culture: Methods, Biology and Physiology* / E. N. Willmer ed. – Academic Press, 2015. – 788 p.

124. Chachra D. The effect of fluoride treatment on bone mineral in rabbits / Chachra D., Turner C.H., Dunipace A.J., Grynpas MD. // *Calcif Tissue Int.* – 1999. – V.64. – P.345-351.

125. Chang J. Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor-kappaB / J. Chang, Z. Wang, E. Tang [et al.] // *Nat Med.* – 2009. – V.15, №6. – P. 682-689.

126. Chang M.K. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo / Chang M.K., Raggatt L.J., Alexander K.A. [et al.] // *J Immunol.* – 2008. – V.181, №2. – P. 1232-1244.

127. Chazaud B. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration / B. Chazaud // *Immunobiology.* – 2014. – V.219, №3. – P. 172-178.

128. Chen Z. Osteogenic differentiation of bone marrow MSCs by β -tricalcium phosphate stimulating macrophages via BMP2 signalling pathway / Chen Z., Wu C., Gu W. [et al.] // *Biomaterials.* – 2014. – V.35, №5. – P. 1507-1518.

129. Cho K. Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene and bone density/ultrasound and geometry in humans / K. Cho, S. Demissie, J. Dupuis [et al.] // *Bone.* – 2008. – V.42, №1. – P. 53-60.

130. Choi M.S. S-nitrosylation of fatty acid synthase regulates its activity through dimerization / Choi M.S., Jung J.Y., Kim H.J. [et al.] // *J Lipid Res.* – 2016. – V.57, №4. – P. 607-15.

131. Chouhan S. Fluoride-induced changes in haem biosynthesis pathway, neurological variables and tissue histopathology of rats / Chouhan S., Lomash V., Flora S.J.S. // *J Appl Toxicol.* – 2010. – V.30, №1. – P. 63-73.

132. Chung K.Y. An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human alpha2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming

growth factor-beta / K.Y. Chung, A. Agarwal, J. Uitto, A. Mauviel // *J Biol Chem.* – 1996. – V. 271, №6. – P. 3272-3278.

133. Cicek E., Aydin G., Akdogan M. Effects of chronic ingestion of sodium fluoride on myocardium in a second generation of rats / Cicek E., Aydin G., Akdogan M. // *Hum Exp Toxicol.* – 2005. – V.24, №2. – P. 79-87.

134. Collins L.E. Heparan sulfate as a regulator of inflammation and immunity / Collins L.E., Troeberg L. // *J Leukoc Biol.* – 2019. – V.105, №1. – P. 81-92.

135. Cooper L.F. Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO₂ grit-blasted c.p. titanium endosseous implants / Cooper L.F., Zhou Y., Takebe J. [et al.] // *Biomaterials.* – 2006. – V.27. – P. 926-936.

136. Corradetti B. Heparan Sulfate: A Potential Candidate for the Development of Biomimetic Immunomodulatory Membranes / Corradetti B., Taraballi F., Giretti I. [et al.] // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2017. – V.5. – Art. 54.

137. Corraliza I. Increased expression of arginase II in patients with different forms of arthritis. Implications of the regulation of nitric oxide / I. Corraliza, S. Moncada // *J Rheumat.* – 2002. – V. 29, №11. – P. 2261-2265.

138. Cosman F. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis / F. Cosman, S.J. de Beur, M.S. LeBoff [et al.] // *Osteoporos Int.* – 2014. – V. 25, №10. – P. 2359-2381.

139. Cramer J.A. A systematic review of persistence and compliance with bisphosphonates for osteoporosis / Cramer J.A., Gold D.T., Silverman S.L., Lewiecki E.M. // *Osteoporosis Int.* – 2007. – V.18. – P. 1023-1031.

140. Cuzzocrea S. Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice / S. Cuzzocrea, E. Mazzon, L. Dugo [et al.] // *Endocrinology.* – 2003. – V.144, №3. – P. 1098-1107.

141. Damoulis P.D. Nitric oxide acts in conjunction with pro-inflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts / P.D. Damoulis, P.V. Hauschka // *J Bone Miner Res.* – 1997. – V.12. – P.412-423.

142. Dao V.T. Nitric oxide up-regulates endothelial expression of angiotensin II type 2 receptors / Dao V.T., Medini S., Bisha M. [et al.] // *Biochem Pharmacol.* – 2016. – V.112. – P. 24-36.

143. Dapunt U. The osteoblast as an inflammatory cell: production of cytokines in response to bacteria and components of bacterial biofilms / Dapunt U., Giese T., Stegmaier S. [et al.] // *BMC Musculoskelet Disord.* – 2016. – V.17. – Art. 243.

144. Darnay B.G. TRAFs in RANK signaling / B.G. Darnay, A. Besse, A. Poblenz [et al.] // *Adv Exp Med Biol.* – 2007. – V.597, №1. – P. 152-159.

145. Das U.N. Nitric oxide as the mediator of the antiosteoporotic actions of estrogen, statins, and essential fatty acids / U.N. Das // *Exp Biol Med (Maywood).* – 2002. – V. 227, №2. – P. 88-93.

146. Decreau R.A. Three toxic gases meet in the mitochondria [Electronic resource] / R.A. Decreau, J.P. Collman // *Front Physiol.* – 2015. – V.6. – Art.210.

147. DeMartino A.W. Nitrite and nitrate chemical biology and signalling. DeMartino A.W., Kim-Shapiro D.B., Patel R.P., Gladwin M.T. // *Br J Pharmacol.* – 2019. – V.176, №2. – P. 228-245.

148. Deng H. Sodium fluoride induces apoptosis in mouse splenocytes by activating ROS-dependent NF- κ B signaling / Deng H., Kuang P., Cui H. [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – V.8, №70. – P. 114428-114441.

149. DePaula C.A. Changing the structurally effective mineral content of bone with in vitro fluoride treatment / DePaula C.A., Abjornson C., Pan Y. [et al.] // *J Biomech.* – 2002. – V.35. – P. 355-361.

150. Dominguez J.M. Increased nitric oxide-mediated vasodilation of bone resistance arteries is associated with increased trabecular bone volume

after endurance training in rats / J.M. Dominguez, R.D. Prisby, J.M. Muller-Delp [et al.] // *Bone*. – 2010. – V.46, №3. – P. 813-819.

151. Dovgiy R.S. The effect of thymic mesenchymal stromal cells on arginase activity and nitric oxide produced by mouse macrophages / R.S. Dovgiy, I.S. Nikolsky, L.M. Skivka // *Ukr Biochem J*. – 2017. – V. 89, №3. – P. 25-30.

152. Dungal P. Impact of mitochondrial nitrite reductase on hemodynamics and myocardial contractility / Dungal P., Penzenstadler C., Ashmwe M. [et al.] // *Sci Rep*. – 2017. – V.7, №1. – Art. 12092.

153. Durante W. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function / W. Durante, F. K. Johnson, R.A. Johnson // *Clin Exp Pharmac Physiol*. – 2007. – V.34, №9. – P. 906–911.

154. EMEA recommends changes in the product information for Protelos/Osseor due to the risk of severe hypersensitivity reactions : [press release] : Doc. Ref. EMEA/417458/2007 / European Medicines Agency. – London, 2007. – Access mode : https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/emea-recommends-changes-product-information-protelos/osseor-due-risk-severe-hypersensitivity-reactions_en.pdf

155. European Medicines Agency recommends limiting longterm use of calcitonin medicines : [press release] : Doc. Ref. EMA/CHMP/483874/2012 / European Medicines Agency, 2012. – Access mode : https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/european-medicines-agency-recommends-limiting-long-term-use-calcitonin-medicines_en.pdf

156. European Medicines Agency starts review of Protelos/ Osseor: Evidence relating to cardiovascular and cutaneous toxicity to be considered again : [press release] : Doc. Ref. EMA/CHMP/827880/2011 / European Medicines Agency, 2011. – Access mode : <https://www.ema.europa.eu/en/>

documents/press-release/european-medicines-agency-starts-review-protelos/osseor_en.pdf

157. Everett E.T. Fluoride's effects on the formation of teeth and bones, and the influence of genetics / E.T. Everett // *J Dent Res.* – 2011. – V.90, №5. – P. 552-560.

158. Fina B.L. fluoride increases superoxide production and impairs the respiratory chain in ROS 17/2.8 osteoblastic cells / B.L. Fina, M. Lombarte, J.P. Rigalli [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – V. 9. – № 6. – Art.e100768.

159. Firat S.C. Evaluation of eNOS gene polymorphisms in relation to BMD in postmenopausal women / S.C. Firat, Z. Cetin, N. Samanci [et al.] // *Maturitas.* – 2009. – V.63, №4. – P. 352-356.

160. Fox S.W. Nitric oxide synthase expression in bone cells / S.W. Fox, J.W. Chow // *Bone.* – 1998. – V.23. – P.1-6.

161. Freeman J.J. Raman spectroscopic detection of changes in bioapatite in mouse femora as a function of age and in vitro fluoride treatment / Freeman J.J., Wopenka B., Silva M.J., Pasteris J.D. // *Calcif Tissue Int.* – 2001. – V.68. – P. 156-162.

162. Furuta S. Basal S-Nitrosylation Is the Guardian of Tissue Homeostasis / Furuta S. // *Trends Cancer.* – 2017. – V.3, №11. – P. 744-748.

163. Gàò X. Reduction-oxidation pathways involved in cancer development: a systematic review of literature reviews / Gàò X., Schöttker B. // *Oncotarget.* – 2017. – V.8, №31. – P. 51888-51906.

164. Garcia V. Endothelial NOS: perspective and recent developments / Garcia V., Sessa W.C. // *Br J Pharmacol.* – 2019. – V.176, №2. – P. 189-196.

165. Ghayor C. Inhibition of Osteoclast Differentiation and Bone Resorption by N-Methylpyrrolidone / C. Ghayor, R.M. Corroero, K. Lange [et al.] // *J Biol Chem.* – 2011. – V.286, №27. – P. 24458-24466.

166. Golchin N. Nitrate Medications, Fractures, and Change in Bone Mineral Density in Postmenopausal Women: Results from the Women's

Health Initiative / Golchin N., Hohensee C., LaCroix A., Gray S.L. // *J Bone Min Res.* -2016. – V.31, №9. – P. 1760-1766.

167. Gordon S Alternative activation of macrophages: mechanism and functions / Gordon S., Martinez F.O. // *Immunity.* – 2010. –V.32, №5. – P. 593-604.

168. Gratchev A. Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages / Gratchev A., Kzhyshkowska J., Utikal J., Goerdts S. // *Scand J Immunol.* – 2005. – V.61, №1. – P. 10-17.

169. Grynopas M.D. The effect of fluoride treatment on bone mineral crystals in the rat / Grynopas M.D., Rey C. // *Bone.* – 1992. – V.13. – P. 423-429.

170. Gu Q. Macrophages and bone inflammation / Q. Gu, H. Yang, Q. Shi // *J Orthop Translat.* – 2017. – V.10. – P. 86-93.

171. Guihard P. Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling / Guihard P1, Danger Y, Brounais B [et al.] // *Stem Cells.* – 2012. – V.30, №4. – P. 762-772.

172. Gutteridge D.H. A randomized trial of sodium fluoride (60 mg) +/- estrogen in postmenopausal osteoporotic vertebral fractures: increased vertebral fractures and peripheral bone loss with sodium fluoride; concurrent estrogen prevents peripheral loss, but not vertebral fractures / Gutteridge D.H., Stewart G.O., Prince R.L. [et al.] // *Osteoporos Int.* – 2002. – V.13, №2. – P. 158-170.

173. Haguenaer D. Fluoride for the treatment of postmenopausal osteoporotic fractures: a meta-analysis / Haguenaer D, Welch V, Shea B [et al.] // *Osteoporos Int.* – 2000. – V.11, №9. – P. 727-738.

174. Helfrich M.H. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures / M.H. Helfrich, D.E. Evans, P.S. Grabowski [et al.] // *J Bone Miner Res.* – 1997. – V.12. – P.1108-1115.

175. Hezel M.P. The oral microbiome and nitric oxide homeostasis / Hezel M.P., Weitzberg E. // *Oral Dis.* – 2015. – V.21, №1. – P. 7-16.

176. van't Hof R.J. Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity / R.J. van't Hof, S.H. Ralston // *J Bone Miner Res.* – 1997. – V.12. – P. 1797-1804.

177. Hof R.J. Nitric oxide and bone / R.J. van't Hof, S.H. Ralston // *Immunology.* – 2001. – V.103, №3. – P. 255-261.

178. Hof R.J. Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for IL-1- induced osteoclastic bone resorption / R.J. van't Hof, K.J. Armour, L.M. Smith [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2000. – V.97. – P.7993-7998.

179. Hofbauer L. Die rolle des RANK/RANKL/OPG Signalwegs in Knochenstoffwechsel / L. Hofbauer, T. Racher // *Fortbildung Osteologie.* – 2010. – Bd.3, №5. – S. 118-121.

180. Hsu E. Advances in Treatment of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis / E. Hsu, M. Nanes // *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* – 2017. – V.24, №6. – P. 411-417.

181. Hwang Y.H. Momordin I, an inhibitor of AP-1, suppressed osteoclastogenesis through inhibition of NF-kappaB and AP-1 and also reduced osteoclast activity and survival / Hwang Y.H., Lee J.W., Hahm E.R. [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2005. – V.337, №3. – P. 815-823.

182. Ignarro L.J. Nitric oxide is not just blowing in the wind / Ignarro L.J. // *Br J Pharmacol.* – 2019. – V.176, №2. – P. 131-134.

183. Ikebuchi Y. Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling / Ikebuchi Y., Aoki S., Honma M. [et al.] // *Nature*. – 2018. – V.561, №7722. – P. 195-200.

184. Inoue M. In vivo effect of fluoride-substituted apatite on rat bone / Inoue M., Nagatsuka H., Tsujigiwa H. [et al.] // *Dent Mater J*. – 2005. – V.24. – P. 398-402.

185. Iozzo R.V. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans / Iozzo R.V., Schaefer L. // *Matrix Biol*. – 2015. – V. 42. – P. 11–55.

186. Ishimaru R.S. Inhibitory effects of nitric oxide on estrogen production and cAMP levels in rat granulosa cell cultures / R.S. Ishimaru, K. Leung, L. Hong, P.S. LaPolt // *J Endocrinol*. – 2001. – V.168, №2. – P. 249-255.

187. Iwatsuki M. Fluoride-induced c-Fos expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells / M. Iwatsuki, M. Matsuoka // *Toxicol Mech Meth*. – 2016. – V.26, №2. – P.132-138.

188. Izquierdo-Vega J.A. Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss / Izquierdo-Vega J.A., Sánchez-Gutiérrez M., Del Razo L.M. // *Toxicol Appl Pharm*. – 2008. – V. 230, №3. – P. 352-357.

189. Jansson E.A. A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis / E.A. Jansson, L. Huang, R. Malkey // *Nat Chem Biol*. – 2008. – V.4, №7. – P. 411-417.

190. Jabbar S. Osteoprotegerin, RANKL and bone turnover in postmenopausal osteoporosis / S. Jabbar, J. Drury, J.N. Fordham [et al.] // *J Clin Pathol*. – 2011. – V. 64, №4. – P. 354-357.

191. Jamal S.A. Effect of nitroglycerin ointment on bone density and strength in postmenopausal women: a randomized trial / S.A. Jamal, C.J.

Hamilton, R. Eastell, S.R. Cummings // JAMA. – 2011. – V.305, №8. – P. 800-807.

192. Jamal S.A. Isosorbide mononitrate increases bone formation and decreases bone resorption in postmenopausal women: a randomized trial / S.A. Jamal, S.R. Cummings, G.A. Hawker // J Bone Miner Res. – 2004. – V.19, № 9. – P. 1512-1517.

193. Jamal S.A. Nitrate use and changes in bone mineral density: the Canadian Multicentre Osteoporosis Study / S.A. Jamal, D. Goltzman, D.A. Hanley [et al.] // Osteoporos Int. – 2009. – V.20, №5. – P. 737-744.

194. Jamal S.A. Nitric oxide donors for the treatment of osteoporosis / S.A. Jamal, C.J. Hamilton // Curr Osteoporos Rep. – 2012. – V.10, №1. – P. 86-92.

195. Jamal S.A. The effects of organic nitrates on osteoporosis: a randomized controlled trial (ISRCTN94484747) / S.A. Jamal, C.J. Hamilton, D. Black, S.R. Cummings // Trials. – 2006. – V.7. – P. 10.

196. Jamal S.A. The effects of organic nitrates on osteoporosis: a systematic review / Jamal S.A., Reid L.S., Hamilton C.J. // Osteoporos Int. – 2013. – V.24, №3. – P. 763-770.

197. Jiang N. Different Effects of Fluoride Exposure on the Three Major Bone Cell Types / Jiang N., Guo F., Sun B. [et al.] // Biol Trace Elem Res. – 2020. – V.193, №1. – P. 226-233.

198. Joshua J. Nitric oxide as a mediator of estrogen effects in osteocytes / Joshua J., Kalyanaraman H., Marathe N., Pilz R.B. // Vitam Horm. – 2014. – V.96. – P. 247-263.

199. Joshua J. Soluble guanylate cyclase as a novel treatment target for osteoporosis / Joshua J., Schwaerzer G.K., Kalyanaraman H. [et al.] // Endocrinology. – 2014. – V.155, №12. – P. 4720-4730.

200. Kalyanaraman H. A novel, direct NO donor regulates osteoblast and osteoclast functions and increases bone mass in ovariectomized mice / H.

Kalyanaraman, G. Ramdani, J. Joshua // *J Bone Miner Res.* – 2017. – V.32, №1. – P. 46–59.

201. Kalyanaraman H. Nitric oxide and cyclic GMP functions in bone / Kalyanaraman H., Schall N., Pilz R.B. // *Nitric Oxide.* – 2018. – V.76. – P. 62-70.

202. Kang C.H. Quercetin inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV2 microglial cells by suppressing the NF- κ B pathway and activating the Nrf2-dependent HO-1 pathway / Kang C.H., Choi Y.H., Moon S.K. [et al.] // *Int Immunopharmacol.* -2013. –V.17, №3. – P. 808-813.

203. Kenkre J.S. The bone remodelling cycle / Kenkre J.S., Bassett J. // *Ann Clin Biochem.* – 2018. – V.55, №3. – P. 308-327.

204. Kleinbongard P. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals / Kleinbongard P., Dejam A., Lauer T. [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2003. – V.35, №7. – P. 790-796.

205. Knethen A. NF- κ B and AP-1 Activation by Nitric Oxide Attenuated Apoptotic Cell Death in RAW 264.7 Macrophages / A. von Knethen, D. Callsen, B. Brüne // *Mol Biol Cell.* – 1999. – V.10, №2. – P. 361-372.

206. Koch C.D. Enterosalivary nitrate metabolism and the microbiome: Intersection of microbial metabolism, nitric oxide and diet in cardiac and pulmonary vascular health / Koch C.D., Gladwin M.T., Freeman B.A. [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2017. – V.105. – P. 48-67.

207. Koh T.J. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage / Koh T.J., DiPietro L.A. // *Expert Rev Mol Med.* – 2011. – V. 13. – Art. e23.

208. Koriyama Y. S-Nitrosylation Regulates Cell Survival and Death in the Central Nervous System / Koriyama Y., Furukawa A. // *Neurochem Res.* - 2018. – V.43, №1. – P. 50-58

209. Koyama A. Nitric oxide accelerates the ascorbic acid-induced osteoblastic differentiation of mouse stromal ST2 cells by stimulating the production of prostaglandin E₂ / A. Koyama, E. Otsuka, A. Inoue [et al.] // *Eur J Pharmacol.* – 2000. – V.391. – P.225-231.

210. Kzhyshkowska J. Stabilin-1 localizes to endosomes and the trans-Golgi network in human macrophages and interacts with GGA adaptors / Kzhyshkowska J., Gratchev A., Martens J.H. [et al.] // *J Leukoc Biol.* – 2004. – V.76, №6. – P. 1151-1161.

211. Kusano K. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption / Kusano K, Miyaura C, Inada M. [et al.] // *Endocrinology.* – 1998. – V.139. – P. 1338-1345.

212. Lamoureux F. Proteoglycans: key partners in bone cell biology / Lamoureux F., Baud'huin M., Duplomb L. [et al.] // *Bioessays.* – 2007. – V.29, №8. – P. 758-771.

213. Larsen E.R. Vitamin D and calcium supplementation prevents osteoporotic fractures in elderly community dwelling residents: a pragmatic population-based 3-year intervention study / Larsen E.R., Mosekilde L., Foldspang A. // *J Bone Miner Res.* – 2004. – V.19, №3. – P. 370-378.

214. Lau K.H. Molecular mechanism of action of fluoride on bone cells / Lau K.H., Baylink D.J. // *J Bone Miner Res.* – 1998. – V.13. – P. 1660-1667.

215. Lee M.J. Exogenous polyamines promote osteogenic differentiation by reciprocally regulating osteogenic and adipogenic gene expression / Lee M.J., Chen Y., Huang Y.P. [et al.] // *J Cell Biochem.* – 2013. – V.114, №12. – P. 2718-2728.

216. Lee Z.H. Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts / Z.H. Lee, H.H. Kim // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2003. – V.305, №2. – P. 211-214.

217. Li J. Regulation of vascular function by nitric oxide-related S-nitrosylation / Li J., Feng J., Wang X. // *Sheng Li Xue Bao.* – 2017. – V.69, №5. – P. 557-570.

218. Li Q. MAPK usage in periodontal disease progression / Li Q., Valerio M.S., Kirkwood K.L. // *J Signal Transduct.* – 2012. – V. 2012. – Art. 308943.

219. Li Y. Endogenous TNF α lowers maximum peak bone mass and inhibits osteoblastic Smad activation through NF- κ B / Li Y., Li A., Strait K. [et al.] // *J Bone Miner Res.* – 2007. – V.22. – P. 646-655.

220. Liu S.Z. Relationships between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and osteoporosis in postmenopausal women / S.Z. Liu, H. Yan, W.K. Hou [et al.] // *J Zhejiang Univ Sci B.* – 2009. – V. 10, №8. – P. 609-618.

221. Liu X, Lin R, Zhao B et al. Correlation between oxidative stress and the NF- κ B signaling pathway in the pulmonary tissues of obese asthmatic mice / Liu X., Lin R., Zhao B. [et al.] // *Mol Med Rep.* – 2016. – V.13, №2. – P. 1127-1134.

222. Lowik C.W.G.M. Inducible production of nitric oxide in osteoblast like cells and in fetal bone explants is associated with supression of osteoclastic bone resorption / C.W.G.M. Lowik, P.H. Nibbering, M.van der Ruit [et al.] // *J Clin Invest.* – 1994. – V.93. – P.1465-1472.

223. Lu J. Comparative proteomics analysis of cardiac muscle samples from pufferfish *Takifugu rubripes* exposed to excessive fluoride. – P. initial molecular response to fluorosis / Lu J., Xu Q., Liu H. // *Toxicol Mech Meth.* 2009. – V.19. – P. 468-475.

224. Lundberg J.O. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide / J.O. Lundberg, M. Govoni // *Free Radic Biol Med.* – 2004. – V.37, №3. – P. 395-400.

225. Lundberg J.O. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics / J.O. Lundberg, M.T. Gladwin, S. Shiva [et al.] // *Nature chem biol.* – 2009. – V. 5, № 12. – P. 865-869.

226. Lundberg J.O. Nitric Oxide Formation From Inorganic Nitrate / J.O. Lundberg, E. Weitzberg // *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology* / L.J. Ignarro, B. Freeman eds. – [3rd ed.]. – Academic Press, 2017. – P. 157-172.

227. Lundberg J.O. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics / J.O. Lundberg, E. Weitzberg, M.T. Gladwin // *Nature reviews.* – 2008. – V. 7. – P. 156-167.

228. MacPherson H. Expression and functional role of nitric oxide synthase isoforms in human osteoblast-like cells / H. MacPherson, B.S. Noble, S.H. Ralston // *Bone.* – 1999. – V.24. – P.179-185.

229. Mancini L. The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are cGMP dependent / L. Mancini, N. Moradi-Bidhendi, L. Becherini [et al.] // *Biochem Biophys Res Comm.* – 2000. – V.274. – P.477-481.

230. Marathe N. Pro-survival Effects of 17beta-Estradiol on Osteocytes Are Mediated by Nitric Oxide/cGMP via Differential Actions of cGMP-dependent Protein Kinases I and II / Marathe N., Rangaswami H., Zhuang S. [et al.] // *J Biol Chem.* – 2012. – V.287, №2. – P. 978-988.

231. Marie P.J. Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation / P.J. Marie // *Curr Opin Rheumatol.* – 2006. – V.18, Suppl. 1. – P. S11–S15.

232. Martin T.J. Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility / T.J. Martin, E. Seeman // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* – 2008. – V.22, №5. – P. 701-722.

233. Martínez-Ruiz A. S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction / Martínez-Ruiz A., Lamas S. // *Cardiovasc Res.* – 2004. – V.62, №1. – P. 43-52.

234. Matata B.M. Peroxynitrite is an essential component of cytokines production mechanism in human monocytes through modulation of nuclear factor-kappa B DNA binding activity / Matata B.M., Galiñanes M. // *J Biol Chem.* – 2002. – V.277, №3. – P. 2330-2335.

235. Matsuo K. Fos11 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation / Matsuo K., Owens J.M., Tonko M. [et al.] // *Nat Genet.* – 2000. – V.24, №2. – P. 184-187.

236. McNeill E. Regulation of iNOS function and cellular redox state by macrophage Gch1 reveals specific requirements for tetrahydrobiopterin in NRF2 activation / E. McNeill, M.J. Crabtree, N. Sahgal [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2015. – V.79. – P. 206-216.

237. Mendes A.F. Role of nitric oxide in the activation of NF-kappaB, AP-1 and NOS II expression in articular chondrocytes / Mendes A.F., Carvalho A.P., Caramona M.M., Lopes M.C. // *Inflamm Res.* – 2002. – V.51, №7. – P. 369-375.

238. Meunier P.J. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis / Meunier P.J., Roux C., Seeman E. [et al.] // *N Engl J Med.* – 2004. – V. 350. – P. 459-468.

239. Mogi M. Involvement of nitric oxide and biopterin in proinflammatory cytokine-induced apoptotic cell death in mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1 / M. Mogi, K. Kinpara, A. Kondo [et al.] // *Biochem Pharmacol.* – 1999. – V.58. – P.649-654.

240. Monjo M. In vivo expression of osteogenic markers and bone mineral density at the surface of fluoride-modified titanium implants / Monjo M., Lamolle S.F., Lyngstadaas S.P. [et al.] // *Biomaterials.* – 2008. – V.29. – P. 3771-3780.

241. Mousny M. Fluoride effects on bone formation and mineralization are influenced by genetics / Mousny M., Omelon S., Wise L. [et al.] // *Bone*. – 2008. – V.43. – P. 1067-1074.

242. Nath P. Physiological relevance of nitric oxide in ovarian functions / Nath P., Maitra S. // *Gen Comp Endocrinol*. – 2018. – V. S0016-6480, №18. – Art. 30239-9.

243. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology* / L.J. Ignarro, B. Freeman eds. – [3rd ed.]. – Academic Press, 2017. – 434 p.

244. *Nitric Oxide in Bone and Joint Disease* / M.V.J. Hukkanen, J.M. Polak and S.P.F. Hughes eds. – [2nd ed.]. – Cambridge : Cambridge University Press, 2011. – 208 p.

245. Novack D.V. Role of NF- κ B in the skeleton / D.V. Novack // *Cell Res*. – 2011. – V.21, №1. – P. 169-182.

246. O'Brien C.A. Osteocyte control of osteoclastogenesis / C.A. O'Brien, T. Nakashima, H. Takayanagi // *Bone*. – 2013. – V.54, №2. – P. 258-263.

247. Ohshiba T. Role of RANKL-induced osteoclast formation and MMP-dependent matrix degradation in bone destruction by breast cancer metastasis / T. Ohshiba, C. Miyaura, M. Inada, A. Ito // *Br J Cancer*. – 2003. – V.88, №8. – P. 1318-1326.

248. Okuda A. The effects of sodium fluoride on the resorptive activity of isolated osteoclasts / Okuda A., Kanehisa J., Heersche J.N. // *J Bone Miner Res*. – 1990. – V.5, Suppl 1. – P. 115-120.

249. Owens J.M. Fra-1 potentiates osteoclastic differentiation in osteoclast-macrophage precursor cell lines / Owens J.M., Matsuo K., Nicholson G.C. [et al.] // *J Cell Physiol*. – 1999. – V. 179. – P. 170-178.

250. Paiva K.B.S. Matrix Metalloproteinases in Bone Resorption, Remodeling, and Repair / Paiva K.B.S., Granjeiro J.M. // *Prog Mol Biol Transl Sci*. – 2017. – V.148. – P. 203-303.

251. Pak C.Y. Anabolic effects of fluoride on bone / Pak C.Y., Zerwekh J.E., Antich P. // Trends Endocrinol Metab. – 1995. – V.6. – P. 229-234.

252. Palanki M.S. Inhibitors of AP-1 and NF-kappa B mediated transcriptional activation: therapeutic potential in autoimmune diseases and structural diversity / M.S. Palanki // Curr Med Chem. – 2002. – V.9, №2. – P. 219-227.

253. Pegg A.E. Functions of Polyamines in Mammals / A.E. Pegg // J Biol Chem. – 2016. – V.291, №29. – P. 14904–14912.

254. Pei J. Effect of fluoride on osteoclast formation at various levels of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) / J. Pei, Y. Gao, B. Li [et al.] // Fluoride. – 2012. – V.45, №2. – P. 86–93.

255. Pei J. Excessive fluoride stimulated osteoclast formation through up-regulation of receptor activator for nuclear factor- κ B Ligand (RANKL) in C57BL/6 mice / J. Pei, Y. Yao, B. Li [et al.] // Int J Clin Exp Med. – 2017. – V.10, №11. – P. 15260-15268.

256. Percival M.D. Inhibition of cathepsin K by nitric oxide donors: evidence for the formation of mixed disulfides and a sulfenic acid / M.D. Percival, M. Ouellet, C. Campagnolo [et al.] // Biochemistry. – 1999. – V.38. – P.13574-13583.

257. Pethe S. Interaction of anions with rat liver arginase: specific inhibitory effects of fluoride / S. Pethe, J.-L. Boucher, D. Mansuy // J Inorg Biochem. – 2002. – V. 88. – P. 397-402.

258. Pouwels S. Use of organic nitrates and the risk of hip fracture: a population-based case-control study / Pouwels S., Lalmohamed A., van Staa T. [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. – 2010. – V.95, №4. – P. 1924-1931.

259. Qin J.D. Effect of ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) on NF- κ B activation and CYP2E1 content of rats with immunological liver

injury / J.D. Qin, Z.H. Cao, X.F. Li [et al.] // *Pharm Biol.* – 2014. – V.52, №11. – P. 1460-1466.

260. Raggatt L.J. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling / L.J. Raggatt, N.C. Partridge // *J Biol Chem.* – 2010. – V. 283, №33. – P. 25103-25108.

261. Ralston S.H. Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption / S.H. Ralston, L.P. Ho, M.H. Helfrich [et al.] // *J Bone Miner Res.* – 1995. – V.10. – P.1040-1049.

262. Rangaswami H. Cyclic GMP and protein kinase G control a Src-containing mechanosome in osteoblasts / Rangaswami H., Schwappacher R., Marathe N. [et al.] // *Sci Signal.* – 2010. – V.3, №153. – Art. ra91

263. Rangaswami H. Type II cGMP-dependent protein kinase mediates osteoblast mechanotransduction / Rangaswami H., Marathe N., Zhuang S. [et al.] // *J Biol Chem.* – 2009. – V.284. – P. 14796-14808.

264. Ratajczak-Wrona W. Role of AP -1 family proteins in regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human neutrophils / Ratajczak-Wrona W., Jablonska E., Garley M. [et al.] // *J Immunotoxicol.* – 2013. – V.10, №1. – P. 32-39.

265. Rath M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages / M. Rath, I. Müller, P. Kropf [et al.] // *Front Immunol.* – 2014. – V. 5. – Art. 532.

266. Reid I.R. Efficacy, effectiveness and side effects of medications used to prevent fractures / Reid I.R. // *J Intern Med.* – 2015. – V.277, №6. – P. 690-706.

267. Roman-Blas J.A. Modulation of TGF-beta signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes / J.A. Roman-Blas, D.G. Stokes, S.A. Jimenez // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2007. – V.15, №12. – P. 1367-1377.

268. Sarahrudi K. Elevated level of macrophage colony-stimulating factor in human fracture healing / K. Sarahrudi, M. Mousavi, A. Thomas [et al.] // *J Orthoped Res.* – 2010. – V. 28, №5. – P. 671-676.

269. Seeman E. Bone modeling and remodeling / E. Seeman // *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* – 2009. – V. 19, №3. – P. 219-233.

270. Shadrina A.S. Classification, regulation of activity, and genetic polymorphism of matrix metalloproteinases in health and disease / A.S. Shadrina, Ya.Z. Plieva, D.N. Kushlinskiy // *Alm Clin Med.* – 2017. – V.45, №4. – P. 266-279.

271. Shiva S. Mitochondria as metabolizers and targets of nitrite / S. Shiva // *Nitric Oxide.* – 2010. – V.22, №2. – Art. 64.

272. Shiva S. Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function / S. Shiva // *Red Biol.* – 2013. – V.1, №1. – P. 40-44.

273. Silva M.J. In vitro sodium fluoride exposure decreases torsional and bending strength and increases ductility of mouse femora / Silva M.J., Ulrich S.R. // *J Biomech.* – 2000. – V.33. – P. 231-234.

274. Simon M.R. The effects of simulated increases in body weight for 60 days on robusticity and mineral content of limb bones of hypophysectomized rats / M.R. Simon, K.R. Holmes, A.M. Olsen // *Anat Rec.* – 1984. – V. 210, №2. – P.333-341.

275. Şireli M. The effect of acute fluoride poisoning on nitric oxide and methemoglobin formation in the guinea pig / M. Şireli, A. Bülbül // *Turk J Vet Anim Sci.* – 2004. – №28. – P. 591-595.

276. Sirianni R. The AP -1 family member FOS blocks transcriptional activity of the nuclear receptor steroidogenic factor 1 / Sirianni R., Nogueira E., Bassett M.H. [et al.] // *J Cell Sci.* – 2010. – V. 123 (Pt. 22). – P. 3956-3965.

277. Søgaaard C.H. Effects of fluoride on rat vertebral body biomechanical competence and bone mass / Søgaaard C.H., Mosekilde L., Schwartz W. [et al.] // *Bone*. – 1995. – V.16. – P. 163-169.

278. Søgaaard C.H. Marked decrease in trabecular bone quality after five years of sodium fluoride therapy—assessed by biomechanical testing of iliac crest bone biopsies in osteoporotic patients / Søgaaard C.H., Mosekilde L., Richards A. [et al.] // *Bone*. – 1994. – V.15. – P. 393-399.

279. Sözen T. An overview and management of osteoporosis / T. Sözen, L. Özışık, N. Çalık Başaran // *Eur J Rheumatol*. – 2017. – V.4, №1. – P. 46–56.

280. Sparacino-Watkins C.E. Nitrite reductase and nitric-oxide synthase activity of the mitochondrial molybdopterin enzymes mARC1 and mARC2 / C.E. Sparacino-Watkins, J. Tejero, B. Sun [et al.] // *J Biol Chem*. – 2014. – V. 289, №15. – P. 10345–10358.

281. Steinmüller L. Regulation and composition of activator protein 1 (AP-1) transcription factors controlling collagenase and c-Jun promoter activities / L. Steinmüller, G. Cibelli, J.R. Moll [et al.] // *Biochem J*. – 2001. – V.360, Pt 3. – P. 599–607.

282. Stuehr D.J. Nitric oxide synthase enzymology in the 20 years after the Nobel Prize / Stuehr D.J., Haque M.M. // *Br J Pharmacol*. – 2019. – V.176, №2. – P. 177-188.

283. Sugahara K. Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans / Sugahara K., Kitagawa H. // *Curr Opin Struct Biol*. – 2000. – V.10, №5. – P. 518-527.

284. Sun Y. Inflammatory signals from photoreceptor modulate pathological retinal angiogenesis via c-Fos / Y. Sun, Z. Lin, C.H. Liu [et al.] // *J Exp Med*. – 2017. – V.214, №6. – P. 1753-1767.

285. Sun Z. Fluoride-induced apoptosis and gene expression profiling in mice sperm in vivo / Sun Z., Niu R., Wang B. // Arch Toxicol. – 2011. – V.85. – P. 1441-1452

286. Szabó S. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics / C. Szabó, H. Ischiropoulos, R. Radi // Nature Reviews. – 2007. – V. 6. – P. 662-680.

287. Tasso R. In vivo implanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells trigger a cascade of cellular events leading to the formation of an ectopic bone regenerative niche / Tasso R., Ulivi V., Reverberi D. [et al.] // Stem Cells Dev. – 2013. – V.22, №24. – P. 3178-3191.

288. Taylor B.C. Association of endothelial nitric oxide synthase genotypes with bone mineral density, bone loss, hip structure, and risk of fracture in older women: the SOF study / B.C. Taylor, P.J. Schreiner, J.M. Zmuda [et al.] // Bone. – 2006. – V.39, №1. – P. 174-180.

289. The pathochemical mechanisms of action of sodium fluoride on the body / I. Bagmut, I. Kolisnyk, A. Titkova. – LAP Lambert Academic Publ., 2017. – 43 p.

290. Tormanen C.D. Substrate inhibition of rat liver and kidney arginase with fluoride / C.D. Tormanen // J Inorg Biochem. – 2003. – V.93, №3-4. – P. 243-246.

291. Tornatore L. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation / L. Tornatore, A.K. Thotakura, J. Bennett [et al.] // Trends Cell Biol. – 2012. – V. 22, № 11. – P. 557-566.

292. Trouvin A-P. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss / A.-P. Trouvin, V. Goeb // Vlin Intervent Aging. – 2010. – V. 5, №4. – P. 345-354.

293. Turner C.H. Fluoride reduces bone strength in older rats / Turner C.H., Hasegawa K., Zhang W. [et al.] // J Dent Res. – 1995. – V.74. – P. 1475-1481.

294. Umland E.M. An update on osteoporosis epidemiology and bone physiology / E.M. Umland // *Univer Tennessee Adv Stud Pharmacy*. – 2008. – V. 5, №7. – P.210-214.

295. Ungprasert P. Expert Opinion Safety profile of denosumab / P. Ungprasert, N. Leeaphorn, W. Kittanamongkolchai, W. Cheungpasitporn // *J Sympt Signs* – 2013. – V.2, №6. -P. 505-506.

296. Vincenti M.P. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors / M.P. Vincenti, C.E. Brinckerhof // *Arthritis Res*. – 2002. – V.4, №3. – P. 157–164.

297. Vos T.A. Expression of inducible nitric oxide synthase in endotoxemic rat hepatocytes is dependent on the cellular glutathione status / T.A. Vos, H. Van Goor, L. Tuyt [et al.] // *Hepatology*. – 1999. – V. 29, №2. – P. 421-426.

298. Waddington R.J. Altered expression of matrix metalloproteinases within mineralizing bone cells in vitro in the presence of fluoride / Waddington R.J., Langley M.S. // *Connect Tissue Res*. – 2003. – V.44. – P. 88-95.

299. Wagner E.F. Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development / E.F. Wagner // *Ann Rheum Dis*. – 2002. – V.61, Suppl 2. – P. ii40-ii42.

300. Wagner E.F. Genetic control of skeletal development / E.F. Wagner, G. Karsenty // *Curr Opin Genet Dev*. – 2001. – V.11. – P. 527-532.

301. Wang H. Enamel matrix protein interactions / Wang H., Tannukit S., Zhu D. [et al.] // *J Bone Miner Res*. – 2005. – V.20. – P. 1032-1040.

302. Wang W. Thoracic ossification of ligamentum flavum caused by skeletal fluorosis / Wang W., Kong L., Zhao H. [et al.] // *Eur Spine J*. – 2007. –V.16. – P. 1119-1128.

303. Warnken M. Species differences in expression pattern of arginase isoenzymes and differential effects of arginase inhibition on collagen

synthesis in human and rat pulmonary fibroblasts / Warnken M., Haag S., Matthiesen S. [et al.] // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* – 2010. – V.381, №4. – P. 297-304.

304. Wimalawansa S.J. Nitric oxide and bone / S.J. Wimalawansa // *Ann N Y Acad Sci.* – 2010. – V. 1192. – P. 391-403.

305. Wimalawansa S.J. Nitric oxide: novel therapy for osteoporosis / S.J. Wimalawansa // *Expert Opin Pharmacother.* – 2008. – V.9, №17. – P. 3025-3044.

306. Wu G. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease / G. Wu, F.W. Bazer, T.A. Davis [et al.] // *Amino Acids.* – 2009. – V. 37, №1. – P. 153-168.

307. Wu K.I.S. NF kappa B and Matrix Metalloproteinase induced Receptor Cleavage in the Spontaneously Hypertensive Rat / K.I.S. Wu, G.W. Schmid-Schönbein // *Hypertension.* – 2011. – V.57, №2. – P. 261-268.

308. Wu X. TNF-a mediated inflammatory macrophage polarization contributes to the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis in mice / Wu X., Xu W., Feng X. [et al.] // *Int J Immunopathol Pharmacol.* – 2015. – V.28, №3. – P. 351-361.

309. Xiong J. Osteocyte RANKL: new insights into the control of bone remodeling / J. Xiong, C.A. O'Brien // *J Bone Miner Res.* – 2012. – V.27, №3. – P. 499-505.

310. Xu H. Proteomic analysis of osteoblasts exposed to fluoride in vitro / Xu H., Jing L., Li G.S. // *Biol Trace Elem J.* – 2008. – V.123, №1-3. – P. 91-97.

311. Yamamoto T. The natural polyamines spermidine and spermine prevent bone loss through preferential disruption of osteoclastic activation in ovariectomized mice / T. Yamamoto, E. Hinoi, H. Fujita [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2012. – V. 166, №3. – P. 1084–1096.

312. Yan D. Genetic background influences fluoride's effects on osteoclastogenesis / Yan D., Gurumurthy A., Wright M. [et al.] // *Bone*. – 2007. – V.41. – P. 1036-1044.

313. Yan X. Effects of sodium fluoride treatment in vitro on cell proliferation, apoptosis and caspase-3 and caspase-9 mRNA expression by neonatal rat osteoblasts / Yan X., Feng C., Chen Q. // *Arch Toxicol*. – 2009. – V.83, №5. – P. 451-458.

314. Yang S. Sodium fluoride induces apoptosis and alters bcl-2 family protein expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells / Yang S., Wang Z., Farquharson C. // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2011. – V. 410, №4. – P. 910-915.

315. Ye N. Small molecule inhibitors targeting activator protein 1 (AP-1) miniperspective / N. Ye, Y. Ding, C. Wild [et al.] // *J Med Chem*. – 2014. – V.57, №16. – P. 6930-6948.

316. Yelins'ka A.M. Epigallocatechin-3-gallate prevents disruption of connective tissue in periodontium and salivary glands of rats during systemic inflammation / A.M. Yelins'ka, O.O. Shvaykovs'ka, V.O. Kostenko // *Wiad Lek*. – 2018. – T. LXXI, №4. – S. 869-873.

317. Yelins'ka A.M. Role of AP-1 transcriptional factor in development of oxidative and nitrosative stress in periodontal tissues during systemic inflammatory response / A.M. Yelins'ka, O.Ye. Akimov, V.O. Kostenko // *Ukr Biochim J*. – 2019. – V. 91, №1. – P. 80-85.

318. Yu B. Inhaled nitric oxide / Yu B., Ichinose F., Bloch D.B., Zapol W.M. // *Br J Pharmacol*. – 2019. – V.176, №2. – P. 246-255.

319. Zhan X.A. Evaluation of caspase-dependent apoptosis during fluoride-induced liver lesion in pigs / Zhan X.A., Wang M., Xu Z.R. // *Arch Toxicol*. – 2006. – V.80, №2. – P. 74-80.

320. Zhang H.W. AP-1 inhibits expression of MMP-2/9 and its effects on rat smooth muscle cells / Zhang H.W., Wang X., Zong Z.H. [et al.] // *J Surg Res*. 2009. – V.157, №1. – P. e31-e37.

321. Zhang Y.L. Genes associated with sodium fluoride-induced human osteoblast apoptosis / Y.L. Zhang Y.L., Q. Luo, Q. Deng [et al.] // *Int J Clin Exp Med*. – 2015. – V.8, № 8. –P.13171-13178.

322. Zhao Q. NFATc1: functions in osteoblasts / Q. Zhao, X. Wang, Y. Liu [et al] // *Int J Biochem Cell Biol*. – 2010. – V.42, №5. – P. 576-579.

323. Zhou Y. The Effect of Quercetin on the Osteogenic Differentiation and Angiogenic Factor Expression of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells / Zhou Y., Wu Y., Jiang X. [et al] // *PLoS One*. – 2015. – V.10, №6. – Art. e0129605.

324. Zivkovic J. Osteogenic effect of inflammatory macrophages loaded onto mineral bone substitute in subcutaneous implants / Zivkovic J., Najman S., Vukelic M., Najdanovic J. // *Arch Biol Sci*. – 2015. – V.67. – P. 173-186.

325. Zuina M. Nitrates and osteoporosis. Which relationship? / Zuina M., Rigatellie G., Scaranello F. [et al.] // *Eur J Intern Med*. – 2017. – V.43. – P. e22–e23.

ДОДАТКИ

Додаток А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Функціонування аргіназного та NO-синтазного шляху метаболізму L-аргініну в крові щурів за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію та застосування суспензії нанодисперсного кремнезему / О.Є. Акімов, І.О. Ковальова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2016. – Т.16, №1. – С. 169-173.

2. Влияние энтеросорбентов на метаболизм аргинина и процессы пероксидного окисления липидов в крови крыс в условиях хронической сочетанной интоксикации нитратом и фторидом натрия / О.Е. Акимов, И.А. Ковалёва, В.А.Костенко // Вестник Алматинского государственного института усовершенствования врачей (Казахстан). – 2016. – №3. – С.37-41.

3. Ковальова І.О. Вплив інгібіторів транскрипційного чинника каппа В на метаболічні та структурні порушення кісткової тканини за умов поєданого надлишкового надходження фториду та нітрату натрію / І.О. Ковальова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2019. – Т.19, №1. – С. 65-70.

4. Ковальова І.О. Вплив інгібітора транскрипційного чинника AP-1 на структурно-метаболічні та біомеханічні зміни кісткової тканини за умов поєданого надлишкового надходження фториду та нітрату натрію / І.О. Ковальова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2019. – Т.19, №2. – С. 123-128.

5. Correction of destructive changes in connective tissues of different organs during chronic nitrate and fluoride intoxication by nanosized silica oxide / O.Ye. Akimov, I.O. Kovalova, V.O. Kostenko // Journal of Education, Health and Sport. – 2019. – V.9, №5. – P. 547-555.

6. Ковалёва И.А. Роль пероксинитрита в процессах деполимеризации коллагена и протеогликанов в костях и коже крыс при сочетанном введении в организм нитрата и фторида натрия / И.А. Ковалёва, А.В. Богданов, Д.А. Хмиль // Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье : XIX международная медико-биологическая конференция молодых исследователей (Санкт-Петербург, 23 апреля 2016 г.) : тезисы. – СПб. : Изд-во СПбГУ, 2016. – С. 273-274.

7. Роль редокс-чутливих транскрипційних чинників у механізмах окисно-нітративного стресу / А.М. Єлінська, Ю.Д. Френкель, М.С. Коваль, І.О. Ковальова, О.О. Швайковська, І.В. Явтушенко, В.О. Костенко // Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм : X наук.-практ. конф. з міжнарод. участю (Тернопіль, 5–6 жовтня 2017 р.) : мат. – Тернопіль, 2017. – С. 16.

8. Роль інгібіторів та індукторів редокс-чутливих транскрипційних чинників у фармакологічній регуляції окисно-нітративного стресу / А.М. Єлінська, Ю.Д. Френкель, О.І. Белікова, М.С. Коваль, І.О. Ковальова, В.О. Костенко // V нац. з'їзд фармакологів України (Запоріжжя, 18–20 жовтня 2017 р.) : тези доп. – Запоріжжя, 2017. – С. 42.

9. Акимов О. Е. Нитрат-индуцированные процессы в крови и сердце крыс / О. Е. Акимов, И. А. Ковалёва // Багаторівнева профілактика та діагностика в онкології : зб. тез наук.-практ. конф. з міжнар. участю. – Харків, 2018. – С. 8.

10. Інгібітори активації транскрипційних чинників NF-κB та AP-1 як засоби профілактики та патогенетичної терапії окисно-нітративного

стресу / В.О. Костенко, А.М. Єлінська, І.О. Ковальова, С.М. Назаренко, Н.В. Соловійова, Ю.Д. Френкель, О.О. Швайковська, І.В. Явтушенко // Бюлл. XVII чтений им. В.В. Подвысоцкого (г. Одесса, 24–25 мая 2018 г.). – Одесса, 2018. – С. 110-111.

11. Роль редоксчутливих чинників транскрипції в механізмах деструкції сполучної тканини / А.М. Єлінська, І.О. Ковальова, С.М. Назаренко, Ю.Д. Френкель, О.О. Швайковська, І.В. Явтушенко, В.О. Костенко // Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм : XI наук.-практ. конф. з міжнарод. участю (Тернопіль, 4–5 жовтня 2018 р.) : мат. – Тернопіль, 2018. – С. 43- 44.

12. Роль редоксчутливих чинників транскрипції в порушенні авторегуляції оксиду азоту в організмі ссавців / В.О. Костенко, Ю.М. Гришко, С.В. Денисенко, А.М. Єлінська, І.О. Ковальова, Н.В. Соловійова, О.О. Швайковська // Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики : VII пленум Укр. наук. тов. патофізіологів та наук.-практ. конф., присвячені 110-річчю з дня народження чл.-кор. АМН СРСР, проф. М.Н. Зайка : мат. доп. (Полтава, 11-12 жовтня 2018 р.). – Полтава, 2018. – С. 35-36.

13. Роль активации ядерного транскрипционного фактора NF-κB в развитии гиперпродукции оксида азота в условиях хронической фторидной интоксикации / О.Е. Акимов, И.А. Ковалёва, А.В. Мищенко // Світова медицина: сучасні тенденції та фактори розвитку : збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції (м. Львів, 25–26 січня 2019 р.). – Львів : ГО «Львівська медична спільнота», 2019. – С. 109-112.

14. Влияние NF-κB фактора на развитие оксидационного стресса в крови крыс при фторидной интоксикации / О.Е. Акимов, И.А. Ковалёва, А.В. Мищенко // Актуальні питання розвитку медичних наук у XXI ст. :

міжнар. наук.-практ. конф. (Львів, 25-26 травня 2019 р.) : зб. матеріалів. – Львів, 2019. – С. 94–98.

15. Ковальова І.О. Метаболічні, остеометричні і біомеханічні показники кістковій тканини щурів при поєднаному надлишковому надходженні в організм нітрату і фториду натрію / І.О. Ковальова, В.І. Макаренко // Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція : тези доповідей II Науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю (21 листопада 2019 р.). – Харків : Вид-во НФаУ, 2019. – С. 184.

16. Молекулярні механізми впливу фторидів на організм ссавців / В.О. Костенко, О.Є. Акімов, І.О. Ковальова, А.В. Міщенко, Ю.Д. Френкель // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2018. – Т. 18, №1. – С. 303-308.

Додаток Б**ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. XIX міжнародна медико-біологічна конференція молодих дослідників «Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 23 квітня 2016 р., публікація матеріалів).
2. VII національний конгрес патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції» (Харків, 5-7 жовтня 2016 р., стендова доповідь).
3. X науково-практична конференція «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів» (Тернопіль, 5–6 жовтня 2017 р., публікація матеріалів).
4. V національний з'їзд фармакологів України (Запоріжжя, 18–20 жовтня 2017 р., публікація матеріалів).
5. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Багаторівнева профілактика та діагностика в онкології», присвячена 95-річчю з дня заснування Харківської медичної академії післядипломної освіти (Харків, 1-2 лютого 2018 р., публікація матеріалів).
6. XVII читання ім. В.В. Підвисоцького (Одеса, 24–25 травня 2018 р., публікація матеріалів).
7. XI науково-практична конференція «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів» (Тернопіль, 4–5 жовтня 2018 р., публікація матеріалів).
8. VII пленум Українського наукового товариства патофізіологів та науково-практична конференція «Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики», присвячені 110-річчю з дня народження члена-

кореспондента АМН СРСР, професора М.Н. Зайка (Полтава, 10-12 жовтня 2018 р., стендова доповідь).

9. Міжнародна науково-практична конференція «Світова медицина: сучасні тенденції та фактори розвитку» (Львів, 25–26 січня 2019 р., публікація матеріалів).

10. Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання розвитку медичних наук у ХХІ ст.» (Львів, 25-26 травня 2019 р., публікація матеріалів).

11. II Науково-практична інтернет-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (Харків, 21 листопада 2019 р., публікація матеріалів).

Додаток В

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Запорізького
державного медичного університету,
професорТуманський В.О.
2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: Механізми розвитку окисно-нітрозативного стресу за умов поєднаного надлишкового надходження екзогенних забруднювачів (фториду та нітрату натрію) та їх корекція суспензією нанодисперсного кремнезему

2. Установа-розробник: Українська медична стоматологічна академія, кафедра патофізіології, аспіранти Акімов О.Є., Ковальова І.О.

3. Джерело інформації:

Статті :

Акімов О.Е. Влияние энтеросорбентов на метаболизм аргинина и процессы пероксидного окисления липидов в крови крыс в условиях хронической сочетанной интоксикации нитратом и фторидом натрия / О.Е. Акімов, И.А. Ковалёва, В.А.Костенко // Вестник Алматинского государственного института усовершенствования врачей (Казахстан). – 2016. – №3. – С.37-41.

Акімов О.Є. Вплив різних карбонових сорбентів на функціонування циклу оксиду азоту в слизовій оболонці шлунка щурів за умов поєднаної нітратно-фторидної інтоксикації / О.Є. Акімов, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. - 2017. – Т.17, №2. – С. 5-8.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Запорізький державний медичний університет, кафедра патологічної фізіології

5. Термін впровадження: 2017-2018 навчальний рік.

6. Форма впровадження: матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри - лекційному курсі та практичних заняттях з патофізіології (за темами "Патофізіологія клітини. Загальні механізми клітинного пошкодження і смерті. Некробіоз і апоптоз", "Патофізіологія системи травлення. Недостатність травлення").

7. Зауваження і пропозиції: Не вносилися.

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри патологічної фізіології,
Запорізького державного медичного університету,
д.мед.н., професор

О.В. Ганчева

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Харківського національного
медичного університету

д. мед. н., професор В. Д. Марковський

« _____ » _____ 2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Механізми дезінтеграції кісткової тканини за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію.

2. Установа, автор: очний аспірант Ковальова Ірина Олександрівна, 36011, м. Полтава, вул. Шевченка, 23, кафедра патофізіології Української медичної стоматологічної академії, кафедра патофізіології.

3. Джерело інформації:

Correction of destructive changes in connective tissues of different organs during chronic nitrate and fluoride intoxication by nanosized silica oxide / O.Ye. Akimov, I.O. Kovalova, V.O. Kostenko // Journal of Education, Health and Sport. – 2019. – V.9, №5. – P. 547-555.

Сукупна дія фториду та нітрату натрію супроводжується високим кістковим обміном з підвищеною резорбцією, яка не компенсується реакцією формування кістки, збільшенням вмісту продуктів деполімеризації колагену, протеогліканів і сіалоглікопротеїнів (вільного оксипроліну, гексуранових кислот та N-ацетилнейрамінової кислоти) у стегнових кістках та хребцях, що перевищує такий при поодинокому введенні солей фторної та нітратної кислот.

4. Де і коли впроваджено: Харківський національний медичний університет, кафедра патологічної фізіології ім. Д.О. Альперна.


5. Форма впровадження: навчальний процес, у курсі лекцій та практичних занять за темою «Патогенна дія факторів зовнішнього середовища».

6. Ефективність впровадження: викладається додаткова інформація, що сприяє кращому засвоєнню матеріалу.

7. Термін впровадження: травень-вересень 2019 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри патологічної фізіології ім. Д.О. Альперна
Харківського національного медичного університету,
д.мед.н., професор



О.В. Ніколаєва



професор А.Л. Загайко
2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Вплив інгібіторів транскрипційного чинника NF-κB на метаболічні та біомеханічні порушення кісткової тканини за умов поєднаного надлишкового надходження фториду та нітрату натрію

2. Установа, автор: 36011, м. Полтава, вул. Шевченка, 23, кафедра патофізіології Українська медична стоматологічна академія, кафедра патофізіології, очний аспірант Ковальова Ірина Олександрівна.

3. Джерело інформації:

Статті:

1. Ковальова І.О. Вплив інгібіторів транскрипційного чинника каппа В на метаболічні та структурні порушення кісткової тканини за умов поєднаного надлишкового надходження фториду та нітрату натрію / І.О. Ковальова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2019. – Т.19, №1. – С. 65-70.

Інгібітори транскрипційних чинника NF-κB (амонію піролідіндитіокарбамат та водорозчинна форма кверцетину) відновлюють за умов поєднаного введення фториду та нітрату натрію механізм авторегуляції рівня NO в стegovих кістках щурів, зменшуючи загальну активність NO-синтази та активність її індукційної ізоформи при реципрокному збільшенні загальної аргіназної активності, та обмежуючи утворення пероксинітриду. Це супроводжується зменшенням активності ферментів-маркерів резорбції кістки (кислоти фосфатази та її кісткової ізоформи) та обмеженням деполімеризації колагену, протеогліканів та сіалоглікопротеїнів сполучної (кісткової) тканини стegovих кісток і хребців. Амонію піролідіндитіокарбамат збільшує щільність, мінеральну насиченість, міцність і пружність стegovих кісток, а також щільність, мінеральну насиченість і міцність хребців (зменшується остеометричний індекс Simon), а водорозчинна форма кверцетину підвищує щільність і міцність стegovих кісток (збільшується розривне навантаження, межа міцності) без істотного впливу на показники мінеральної насиченості та пружності.

4. Де і коли впроваджено: Національний фармацевтичний університет, кафедра патологічної фізіології.

5. Форма впровадження: навчальний процес, у курсі лекцій та практичних занять за темами "Патофізіологія клітини", "Патогенна дія факторів зовнішнього середовища".

6. Ефективність впровадження: викладається додаткова інформація, що сприяє кращому засвоєнню матеріалу.

7. Строки впровадження: березень-травень 2019 р.

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри патологічної фізіології
Національного фармацевтичного університету,
д.мед.н., професор

Н.М. Кононенко

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор з науково-педагогічної
роботи Української медичної
стоматологічної академії
професор



Дворник В.М.
2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: Роль редоксчутливих факторів транскрипції на метаболічні та біомеханічні порушення кісткової тканини за умов поєданого надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

2. Установа-розробник: Українська медична стоматологічна академія, очний аспірант кафедри патофізіології Ковальова Ірина Олександрівна.

3. Джерела інформації:

Статті:

Ковальова І.О. Вплив інгібіторів транскрипційного чинника каппа В на метаболічні та структурні порушення кісткової тканини за умов поєданого надлишкового надходження фториду та нітрату натрію / І.О. Ковальова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2019. – Т.19, №1. – С. 65-70.

Ковальова І.О. Вплив інгібітора транскрипційного чинника AP-1 на структурно-метаболічні та біомеханічні зміни кісткової тканини за умов поєданого надлишкового надходження фториду та нітрату натрію / І.О. Ковальова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2019. – Т.19, №2. – С. 123-128.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Українська медична стоматологічна академія, кафедра патофізіології. Обговорено на засіданні кафедри (протокол № 12 від 4 лютого 2020 р.).

5. Термін впровадження: вересень – грудень 2019 р.

6. Форма впровадження: матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри – лекційному курсі та практичних заняттях за темою “Патофізіологія клітини”, у наукових дослідженнях.

7. Зауваження і пропозиції: Не вносилися.

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри патофізіології
Української медичної
стоматологічної академії,
д.мед.н.,професор

Костенко В.О.