

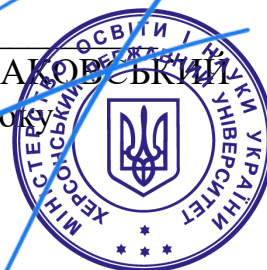
УДК 612.85.2 : 611.41 : 612.4
№ держреєстрації: 0117U001764

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
вул. Шевченка, 14, м. Івано-Франківськ, 76000. Тел. +380963102636;
e-mail: office@ksu.ks.ua; <http://www.kspu.edu>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Ректор Херсонського
державного університету

Олександр СПИВАКОВСЬКИЙ
13 серпня 2024 року



ЗВІТ ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

**ВПЛИВ ДЕЯКИХ ВАЗОАКТИВНИХ РЕЧОВИН НА ЦЕНТРАЛЬНІ ТА
ПЕРИФЕРИЧНІ ЛІМФОЇДНІ ОРГАНИ БІЛИХ МИШЕЙ**
(остаточний)

Перший проректор
д.пед.н., професор

Сергій ОМЕЛЬЧУК

Наукова керівниця НДР
к.б.н., доцент

Олена ГАСЮК

Івано-Франківськ – Херсон

2024


СПИСОК АВТОРІВ

Керівниця НДР, к.б.н.,
завідувачка кафедри біології
людини та імунології,
доцентка



О.М. Гасюк
(Вступ, Розділ 1, 3,
висновки)

Відповідальна виконавиця
фахівець кафедри біології
людини та імунології



Ю.С. Ануфрієва
(Розділ 2, список
літературних джерел)

АНОТАЦІЯ

Об'єкт дослідження – вазоактивні ефекти еритропоєтину та нікотинової кислоти в умовах *in vivo* та *in vitro*.

Предмет дослідження – морфофункціональні особливості селезінки та периферичної крові; поведінкові особливості лабораторних мишей в умовах дії вазоактивних речовин.

Методи дослідження. Для оцінки впливу вазоактивних речовин було застосовано морфометричні, біохімічні методи та методи дослідження поведінкової активності. Отримані дані аналізувалися за допомогою методу непараметричної статистики, з використанням критерію Мана-Уїтні.

Вивчали вплив вазоактивних речовин (рекомбінантний еритропоєтин- α , нікотинова кислота) на центральні та периферичні лімфоїдні органи білих лабораторних мишей на моделях *in vivo* та *in vitro* та опосередкований вплив на загальний фізіологічний стан та поведінкові прояви лабораторних тварин.

В даному дослідженні вперше показано вплив тривалого уведення нікотинової кислоти на білковий обмін у головному мозку та показано, що такий вплив відображається на поведінці мишей. Така дія, можливо, зумовлена змінами тонуусу судин, спричинених прямою дією нікотинової кислоти. Результати дослідження вказують на перспективність подальшого вивчення ефектів впливу нікотинової кислоти та еритропоєтину на лімфоїдні органи та нервову систему.

Ключові слова: еритропоєтин, нікотинова кислота, селезінка, периферична кров, поведінкові реакції, периферична кров, лейко грама, морфологічні показники.

Умови одержання звіту: за договором, УкрІНТЕІ, вул. Антоновича, 180, м. Київ, 03680.

ANNOTATION

The subject of research - vasomotor effects of erythropoietin and nicotinic acid under *in vivo* and *in vitro* conditions.

The object of research - morphofunctional features of the spleen and peripheral blood; behavioral characteristics of laboratory mice under the influence of vasomotor substances.

Research methods. Morphometric, biochemical methods, and methods for studying behavioral activity were applied to assess the impact of vasomotor substances. The obtained data were analyzed using non-parametric statistical methods, using the Mann-Whitney criterion.

The study investigated the influence of vasomotor substances (recombinant erythropoietin- α , nicotinic acid) on central and peripheral lymphoid organs of white laboratory mice in *in vivo* and *in vitro* models, as well as their indirect effects on the general physiological condition and behavioral manifestations of laboratory animals.

This study, for the first time, demonstrated the effect of long-term administration of nicotinic acid on protein metabolism in the brain and showed that such an effect is reflected in the behavior of mice. This action may be due to changes in vascular tone caused by the direct action of nicotinic acid.

The results of the study indicate the prospect of further study of the effects of nicotinic acid and erythropoietin on lymphoid organs and the nervous system.

Keywords: erythropoietin, nicotinic acid, spleen, peripheral blood, behavioral reactions, leukogram, morphological indicators.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. Огляд літературних джерел.....	9
1.1. Роль еритропоетину в організмі	9
1.1.1. Загальна характеристика.....	9
1.1.2. Прямі та плейотропні ефекти еритропоетину.....	10
1.2. Роль нікотинової кислоти у організмі.....	15
1.1.1. Загальна характеристика нікотинової кислоти.....	15
1.1.2. Прямий та плейотропний вплив нікотинової кислоти.....	16
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи дослідження.....	21
2.1. Організація експериментального дослідження	21
2.2. Методи дослідження.....	21
РОЗДІЛ 3. Аналіз та обговорення отриманих результатів	24
3.1. Фізичний стан в умовах дії вазоактивних речовин	24
3.2. Цитохімічний статус імунокомпетентних клітин периферичної крові білих мишей в умовах дії вазоактивних речовин.....	28
3.2.1. Цитохімічні властивості клітин периферичної крові в умовах дії еритропоетину.....	28
3.2.2. Цитохімічні показники клітин крові в умовах дії нікотинової кислоти.	31
3.3. Лейкоцитарна формула периферичної крові в умовах дії вазоактивних речовин	32
3.4. Клітинний склад кісткового мозку в умовах дії вазоактивних речовин.....	35
3.5. Функціональні показники міокарду в умовах дії вазоактивних речовин	40
3.6. Вплив вазоактивних речовин на поведінкову активність	43
ВИСНОВКИ.....	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	52

ВСТУП

Управління тонусом судин, прив'язане до стану ендотеліальних клітин, які здатні виробляти вазоактивні речовини, що сприяють локальній вазодилатуючій дії, такі як оксид азоту, простагліцин, гіперполяризує ендотелій-залежний фактор та інші. З іншого боку, ендотелій виробляє також вазоконстриктори: ендотелін, супероксид-аніон тощо.

В останні роки з'являються повідомлення про порушення балансу ендотелій-залежних вазоконстрикторів і вазодилаторів. Внаслідок змін судинного ендотелію розвивається дисбаланс у продукції або метаболізмі вазоактивних медіаторів, який може призводити до вазоспазму і зміни артеріального тиску.

Максимальна вазодилатація і максимальна вазоконстрикція мають негативний вплив на кровопостачання будь-якого органу.

Є відомості про вивільнення протагландинів із селезінки та інших органів під впливом катехоламінів, кінінів, ангіотензину та вазопресину. При збудженні альфа-адренорецепторів відбувається скорочення судин селезінки.

Необхідно отримати нові дані про особливості пристосувальних реакцій лімфоїдних органів, що ініційовані вазоактивними речовинами, зокрема, функціонального стану тимусу, селезінки, оцінки стану систем клітинного та гуморального імунітету, рівня катехоламінів в структурних елементах лімфоїдних органів, оцінка стану ендотелію судин лімфоїдних органів. Також не вистачає даних про детальний аналіз вищезазначених показників та порівняння їх з аналогічними показниками мишей інтактної групи.

Важливо поглибити знання про вплив вазоактивних речовин на стан лімфоїдних органів та допоможуть у визначенні особливостей функціонування нейро-імунно-гуморальної системи регуляції і уточнити роль та значення її окремих ланок (імунної та ендокринної).

Аналіз цих даних матиме значення для розуміння фізіологічних механізмів пристосувальних дій організму ссавців, для виявлення характеру

змін у функціональній активності органів і систем, утворення нових внутрішньосистемних та міжсистемних зв'язків.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Робота є завершальним звітом за науково-дослідною темою “Вплив деяких вазоактивних речовин на центральні та периферичні лімфоїдні органи білих мишей” (номер держреєстрації 0117U001764).

Мета дослідження. Виявлення деяких ефектів (механізмів) впливу вазоактивних речовин на лімфоїдні органи, систему крові та поведінку білих лабораторних мишей на моделях *in vivo* та *in vitro*.

Для досягнення мети були поставлені та вирішені наступні завдання дослідження:

- дослідити показники фізичного стану досліджуваних тварин в умовах впливу вазоактивних речовин;
- визначити цитохімічний статус імунокомпетентних клітин периферичної крові білих мишей в умовах дії вазоактивних речовин;
- розрахувати лейкоцитарну формулу периферичної крові в умовах дії вазоактивних речовин;
- вивчити окремі показники клітинного складу кісткового мозку в умовах дії вазоактивних речовин;
- визначити деякі функціональні показники міокарду в умовах дії вазоактивних речовин;
- дослідити вплив вазоактивних речовин на поведінкову активність досліджуваних тварин.

Об'єкт дослідження – вазоактивні ефекти еритропоєтину та нікотинової кислоти в умовах *in vivo* та *in vitro*.

Предмет дослідження – морфофункціональні особливості селезінки та периферичної крові; поведінкові особливості лабораторних мишей в умовах дії вазоактивних речовин.

Методи дослідження. Для оцінки впливу вазоактивних речовин було застосовано морфометричні, біохімічні методи та методи дослідження

поведінкової активності. Отримані дані аналізувалися за допомогою методу непараметричної статистики, з використанням критерію Мана-Уїтні.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі було досліджено комплексний вплив вазоактивних речовин на клітини та органи досліджуваних тварин. Вперше показано, що ефекти еритропоетину та нікотинової кислоти мають дозозалежний ефект і вони найбільш ефективні при середніх дозах. Показано, що еритропоетин та нікотинова кислота змінюють ферментативну активність імунокомпетентних клітин крові. Вперше показано, що еритропоетин та нікотинова кислота, при тривалому застосування та у дозах, що перевищують терапевтичні, мають вплив на поведінкову активність тварин, покращуючи здатність до вироблення умовних рефлексів.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати потрібно враховувати при терапії із застосуванням означених препаратів. Оскільки вазоактивні речовини змінюють кровонаповнення у окремих органах, можлива розробка уточнень до схеми застосування еритропоетину та нікотинової кислоти із іншими препаратами та корекція доз. Також отримані результати доцільно використовувати у навчальному процесі, інтегрувавши у структуру таких навчальних компонент як «Імунологія» та «Фізіологія людини і тварин».

Апробація результатів дослідження. Основні положення науково-дослідної роботи викладено у 1 науково-методичному посібнику, 4 статтях категорії Б, 4 статтях в інших виданнях та у 9 тезах. У ході проведених досліджень виконано і захищено 6 кваліфікаційних робіт. Результати досліджень обговорювалися під час виступів на наукових конференціях різного рівня.

Робота складається із вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел, ілюстрована 24 рисунками та 7 таблицями.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1.1. Роль еритропоетину в організмі

1.1.1. Загальна характеристика. Те, що регуляція еритропоезу здійснюється гуморально, виявлено більше 70 років тому дослідженнями Bonsdorff і Jalavisto (1948) та інших авторів. Але вивчення ефектів еритропоетину (ЕРО) майже не відбувалося із-за того, що його циркулюючі рівні були пікомолярними. Лише у 1977 році його було виділено із людської сечі та охарактеризовано амінокислотну послідовність [21]. Дослідження, проведені протягом останніх двадцяти років, показали, що ЕРО та рекомбінантний еритропоетин (ЕРОР) експресуються на різних типах клітин, включаючи клітини серцево-судинної та нервової систем, що свідчить про те, що ефекти ЕРО виходять за межі регуляції еритропоезу [36].

Тож, ЕРО є членом сімейства цитокінів класу I і в основному синтезується та виділяється нирками. ЕРО опосередковує еритропоез шляхом зв'язування зі своїм специфічним рецептором, ЕРО-рецептором (ЕРОР), експресованим на поверхні незрілих еритробластів [31; 39]. Ефекти ЕРО в кістковому мозку опосередковуються приєднанням до специфічного трансмембранного рецептора (ЕРО-R), який експресується переважно гемопоетичними клітинами-попередниками [20]. Подальша димеризація ЕРО-R призводить до активації багатьох внутрішньоклітинних шляхів (PI3K/Akt, мітогенактивована протеїнкіназа [МАРК], STAT-5), що пов'язані із виживанням клітин [32].

Уявлення про те, що гіпоксія значно посилює продукцію ЕРО і що вона стимулює еритропоез залежно від ступеня важкості, призвела до загальноприйнятої парадигми петлі негативного зворотного зв'язку, подібної до тих, що лежать в основі регуляції рівня глюкози в крові інсуліном і периферичних ендокринних гормонів гіпофізарними тропінами (рис. 1.1).

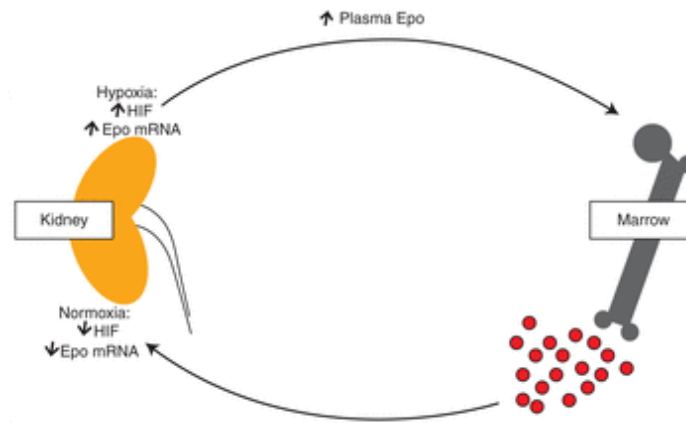


Рис. 1.1. Регуляція продукції еритроцитів за допомогою ЕРО (за *H.Franklin Bunn, 2013*) [6]

Зменшення доставки кисню до спеціалізованих клітин у нирках призводить до збільшення експресії та секреції ЕРО, який циркулює в плазмі та стимулює клітини-попередники кісткового мозку, тим самим збільшуючи виробництво еритроцитів. Якщо збільшення маси еритроцитів зменшує сигнал гіпоксії, експресія ЕРО знижується

На рис. 1.1 показано, що гіпоксія індукує збільшення вироблення гормону ЕРО в нирках, який потім циркулює в плазмі та зв'язується з рецепторами, які рясно експресуються на еритроїдних клітинах-попередниках, тим самим сприяючи життєздатності, проліферації та кінцевій диференціації еритроїдних попередників, і викликаючи збільшення маси еритроцитів. Таким чином посилюється здатність крові переносити кисень, збільшуючи напругу кисню в тканинах, таким чином завершуючи цикл зворотного зв'язку та пригнічуючи подальшу експресію ЕРО [6].

1.1.2. Прямі та плейотропні ефекти еритропоєтину. Найбільш вивченим є вплив еритропоєтину на еритропоез [8].

За останні роки доступність рекомбінантного еритропоєтину людини (r-*HuEPO*, епоєтин альфа) зробили його основним засобом лікування анемії у різних груп пацієнтів. Було показано, що епоєтин альфа прискорює

еритропоез і зменшує алогенне переливання крові під час великих планових, несерцевих, несудинних хірургічних втручань і у деяких пацієнтів з анемією з хронічною нирковою недостатністю, немієлоїдними злоякісними пухлинами та інфекцією вірусу імунодефіциту людини [4].

ЕРО також має плюрипотентний потенціал, наприклад, для покращення когнітивних функцій, нейрогенезу, а також має антифіброзну, антиапоптозну, антиоксидантну та протизапальну дію [24].

Важливим аспектом дії еритропоетину є його вплив на серцево-судинну систему. У серцево-судинній системі ЕРО впливає як на міокард, так і на судинні тканини. ЕРО та ЕРОR експресуються в кардіоміоцитах, ендотеліальних клітинах судин і гладеньком'язових клітинах. Важливо відзначити, що для досягнення індукованого ЕРО захисту тканин потрібні високі дози порівняно з дозами ЕРО, необхідними для кровотворення (Anagnostou et al., 1994; Ammarguella et al., 1996; Brines and Cerami, 2005). На основі існуючих досліджень із високими дозами виник своєрідний дисонанс: з одного боку, було з'ясовано захисні ефекти ЕРО та основні механізми в серцево-судинній та неврологічній системах, що спонукало до початку клінічних випробувань у пацієнтів з інфарктом міокарда, аневризмальним субарахноїдальним крововиливом та гострим інсультом. Навпаки, були виявлені несприятливі явища, пов'язані з терапією ЕРО, через його плейотропний ефект головним чином у серцево-судинній системі, включаючи гіпертензію, тромбоз і посилений пухлинний ангиогенез. Експериментальні дослідження показали, що ЕРО впливає на два важливих процеси під час ішемічного ураження серця, в першу чергу він викликає різке зменшення розміру зони інфаркту та пригнічення апоптозу, а по-друге, сприяє утворенню нових судин [12].

З'явилося досить багато повідомлень про вплив еритропоетину на нервову тканину. Так, показано, що еритропоетин і глікозид GM1 мають терапевтичний вплив на регенерацію аксонів у мишей, які мали експериментальне пошкодження спинного мозку. Спостерігалось значне

збільшення мієлінізованих аксонів і довжини мієлінізованих аксонів у групі тварин, які отримували еритропоєтин [46].

Уведення ЕРО послаблює активацію мікроглії, що викликає нейрозапальний статус, і відновлює синаптичну втрату у мишей із хворобою Альцгеймера [7]. ЕРО демонструє нейропротекторну властивість *in vivo* шляхом зменшення нейрозапалення [28] і посилення нейрогенезу [1]. У мишачих моделях Альцгеймера терапія ЕРО призвела до відновлення асоціативної навчальної пам'яті [25]. Було доведено, що ЕРО відіграє значну роль у стимулюванні нейрогенезу під час розвитку мозку і у дорослому мозку [42]. Відмічено, що введення ЕРО запобігало втраті серотонінергічних волокон і підтримувало щільність при пошкодженні спинного мозку мишей [48]. Інше дослідження показало, що серотонінергічна активація ЕРО може сприяти опосередкованій ЕРО проліферації клітин і нейрогенезу в гіпокампі миші [9]. Серотонін (5-гідрокситриптамін, 5-НТ) бере участь у вищих функціях мозку, включаючи пізнання та емоційну поведінку, а також у багатьох важливих неврологічних процесах, таких як сон, апетит, температура тіла, біль і рухова активність, і кілька досліджень повідомляли про значну втрату рецепторів 5-НТ 4 (5-НТ4R) у гіпокампальних і кортикальних нейронах. Показано, що активація 5-НТ4R покращує когнітивні функції у гризунів і приматів [34]. Гостре та хронічне пригнічення постсинаптичних рецепторів 5-НТ1а призводить до зменшення кількості новоутворених клітин у зубчастій звивині. Також досліджено активацію серотонінергічної системи та нейрогенну відповідь, викликану терапією ЕРО. [41].

Показано, що ЕРО пов'язаний із захистом тканин, які страждають від ішемії та реперфузійного ушкодження, а також з покращеною регенерацією в різних системах органів, зокрема шкіри. Є чіткі докази того, що ЕРО ефективно впливає на всі фази загоєння ран залежно від дози. Це включає запалення, формування тканин і кровоносних судин, а також ремоделювання рани. Молекулярний механізм переважно базується на підвищеній експресії

ендотеліальної та індукційної синтази оксиду азоту (NO) з послідовним швидким надходженням NO, а також на підвищеному вмісті фактора росту ендотелію судин (VEGF) у рані [44].

На початку двотисячних почалися дослідження щодо трансдукції сигналу EPO *in vivo* та його корисності у профілактиці хронічної, суто апоптотичної смерті нейрональних клітин, яка сприяє втраті зору при глаукомі та прогресуванні нейродегенеративних захворювань [3; 35; 43]. Показано, що застосування EPO запобігало загибелі імуночищених щурячих RGCs *in vitro*, позбавлених нейротрофічного фактора, врятувало аксотомовані RGCs *in vivo* та запобігало активації каспази-3. Нейрозахист EPO був дозозалежним *in vitro* та *in vivo*, тоді як токсичні ефекти EPO ніколи не спостерігалися [50]. У тканинах сітківки людини рецептори EPO (EPOR) експресуються в клітинах фоторецепторів, пігментному епітелії сітківки та шарі гангліозних клітин сітківки. Дослідження показали його потенційний терапевтичний ефект при багатьох нейродегенеративних захворюваннях, включаючи глаукому [26]. Також показано нейропротекторну функцію EPO в екстрагематопоетичних тканинах, особливо сітківці. Там він взаємодіє зі своїм гетеродимерним рецептором (EPOR/ β cR), і має змогу проявляти свої антиапоптозні, протизапальні та антиоксидантні ефекти для запобігання смерті гангліозних клітин сітківки за допомогою різних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів [24].

Тож, використання еритропоетину є перспективним для лікування глаукоматозної нейропатії зорового нерва, неврити зорового нерва, неартеріальної передньої ішемічної нейропатії зорового нерва та травматичної нейропатії зорового нерва.

EPO також впливає на гемостаз. Він тимчасово збільшує кількість циркулюючих тромбоцитів і покращує функцію тромбоцитів, і ці ефекти пов'язані з поверненням часу кровотечі до нормального [45].

Еритропоетин стимулює еритропоез через свій специфічний рецептор (EPO-R), але проводяться дослідження ролі системи EPO/EPO-R у серці та

кровоносних судинах. Повідомлялося, що ЕРО стимулює ангиогенез. МРНК ЕРО- α виявляється в ендотелії судин людини. Однак у більшості досліджень *in vitro* застосовувалися дуже високі концентрації ЕРО, а добре сплановані дослідження не продемонстрували прямого впливу ЕСА на ендотеліальні клітини. Вочевидь, ЕРО сприяє мобілізації мієлоїдних клітин-попередників у кровотік, ще потребує більш детального вивчення, оскільки цей ефект може виявитися корисним для посилення неоваскуляризації ішемічних тканин [19]. Тим не менш, нещодавно було показано, що ЕРО модулює шляхи передачі клітинного сигналу для виконання багатьох функцій, крім еритропоезу. ЕРО є цитопротекторним шляхом запобігання запрограмованій смерті клітин як у судинній, так і в нейрональній системах шляхом модуляції двох різних компонентів запрограмованої клітинної смерті, які включають деградацію геномної ДНК та екстерналізацію залишків фосфатидилсерину клітинної мембрани. Цитозахист за допомогою ЕРО ініціюється активацією EPOR і подальших шляхів передачі сигналу, які походять від білка Jak2. Подальші низхідні клітинні шляхи включають активацію датчиків сигналу та активаторів транскрипції (STAT), Bcl-x(L), фосфоінозитид-3-кінази/Акт, мітоген-активованих протеїнкіназ, цистеїнових протеаз, протеїн-тирозинфосфатаз і ядерних фактор капа-В [10].

Деякими дослідженнями показано, що дія рекомбінантного еритропоетину може дещо відрізнятися від дії едогенного ЕРО, втім ці відмінності не є критичними при терапевтичному використанні цієї сполук. Так, рекомбінантний еритропоетин приймає участь у розвитку нейротрофічних та нейропротективних процесах (наприклад, при ішемічному мозковому інсульті, гіпоксії). Такий вплив показано на моделях експериментального аутоімунного енцефаломієліту (модель нейродегенеративного захворювання) [38], на моделі церебральної ішемії [47] тощо. Також рекомбінантний ЕРО здатен забезпечувати пластичність синапсів у головному мозку дорослих людей (є нейротрансмітером) і тим

сприяти регенерації нервової тканини після експериментального пошкодження [51].

1.2. Роль нікотинової кислоти у організмі

1.1.1. Загальна характеристика нікотинової кислоти.

Ніацин є попередником піридинових нуклеотидів NAD (нікотинамідаденіндинуклеотид) і NADP (нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат). Ніацин (вітамін B3) — загальний термін для нікотинової кислоти, нікотинаміду та похідних, які виявляють біологічну активність нікотинаміду. Крім того, незамінна амінокислота триптофан є субстратом для синтезу NAD *de novo*. Таким чином, потреби та споживання ніацину виражаються як еквіваленти ніацину. Протягом останнього десятиліття інтерес до ніацину в основному зосереджувався на фармакологічних дозах нікотинової кислоти як гіполіпідемічного агента та інших попередників NAD як потенційних підсилювачів клітинних концентрацій NAD⁺. Жодне з цих досліджень, однак, не робить корисного внеску в розуміння дієтичних потреб у здорових популяціях. Потреба в ніацині оцінюється на основі співвідношення між споживанням і біохімічними показниками статусу ніацину, насамперед екскрецією метаболітів нікотинаміду з сечею [13].

Дієтичні попередники NAD (переважно нікотинова кислота, нікотинамід, нікотинамід рибозид або триптофан) сприяють синтезу NAD різними шляхами (*de novo*, Preiss-Handler та шляхи відновлення). NAD(H) і NADP(H) використовуються в клітинах у сотнях окислювально-відновних реакцій в енергетичному метаболізмі та різних системах синтезу/деградації. NAD⁺ також використовується як субстрат у ферментних системах, які контролюють, наприклад, відновлення ДНК, регуляцію транскрипції, циркадні ритми, мітохондріальний гомеостаз і сигналізацію кальцію. Крім того, NAD⁺ служить лігандом пуринергічних рецепторів P2Y, які беруть

участь у регуляції діяльності вісцеральних гладких м'язів та імунних клітин. Клітинний пул NAD^+ чітко збалансований регуляцією синтезу NAD^+ та його розщеплення ферментами, що споживають NAD^+ [13]. Субклітинна локалізація реакцій або необхідні ферменти не представлені на рисунку 1.2.

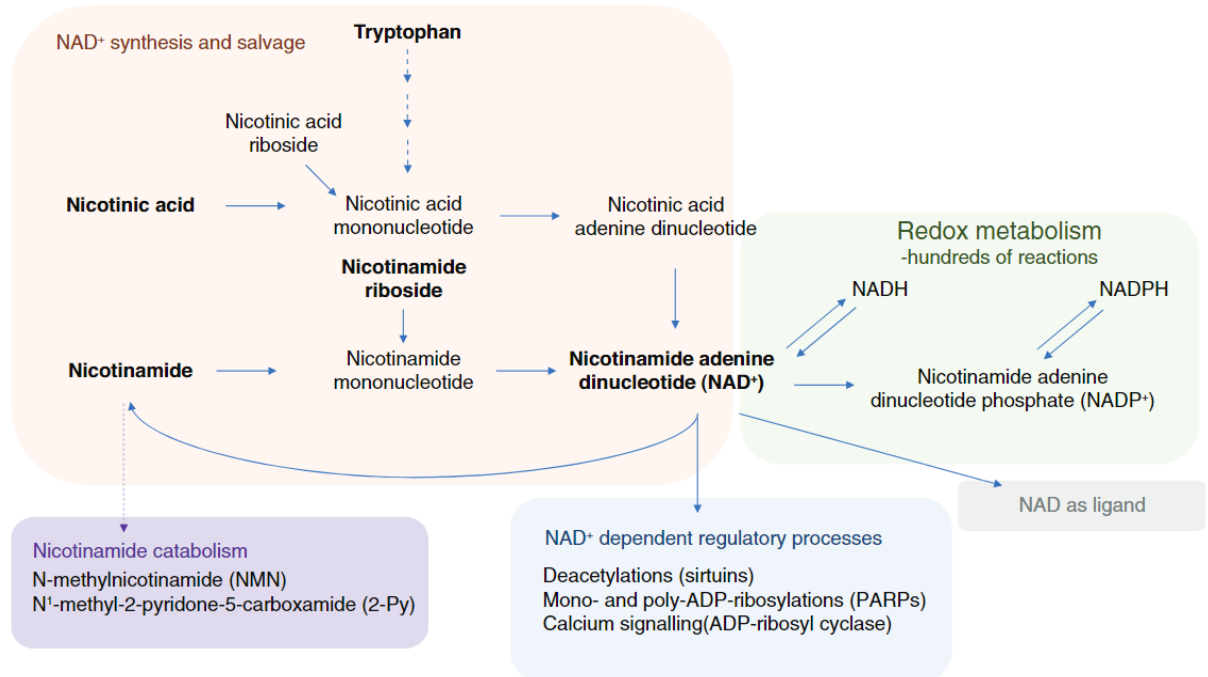


Рис. 1.2. Субклітинна локалізація реакцій (за Blomhoff R. et al, 2023) [5]

Дві сполуки відомі як вітамін Niacin: нікотинова кислота (NiA) і нікотинамід (Nam). Фізіологічні функції та метаболічні долі NiA та Nam ідентичні, але відрізняються при введенні фармакологічних доз [40].

1.1.2. Прямий та плейотропний вплив нікотинової кислоти.

Вивчення ефектів нікотинової кислоти має велику історію. Хоча і були періоди зниження цікавості до цієї речовини, зараз дослідження прямих та плейотропних ефектів нікотинової кислоти та її похідних почалися знову. Вже у п'ятдесяті роки ХХ століття було відомо, що дієти, що містять підвищений рівень нікотинової кислоти як такої або у формі натрієвої або нікотинамідну, зменшували ступінь регенерації печінки у частково гепатектомованих щурів. На відміну від дієт, прийом нікотинової кислоти

або амідної кислоти у великій добовій дозі або підшкірне введення нікотинової кислоти не впливало на ступінь регенерації печінки [15]. Ніацин або нікотинова кислота є розчинним вітаміном з гіполіпідемічними властивостями. Ніацин знижує тригліцериди, LDL-с (5-25%) і підвищує HDL-с. Дослідження Coronary Drug Project показало, що використання ніацину було пов'язане зі зниженням коронарних подій і загальної смертності, а також було продемонстровано, що ніацин у поєднанні з іншими гіполіпідемічними препаратами, може послабити прогресування коронарного атеросклерозу. Ніацин зменшує мобілізацію вільних жирних кислот з адипоцитів, діючи на специфічні рецептори, зменшуючи утворення в печінці багатих на тригліцериди ліпопротеїдів [37].

В організмі людини введення нікотинової кислоти (ніацину) призводить до двох типів ефектів. У межах фізіологічного діапазону (приблизно = 20 мг/день) ніацин відіграє подібну до вітамінів роль фактора профілактики пелагри [52]. Фармакологічна доза (приблизно 0,5-4,5 г/добу) суттєво впливає на концентрацію ліпідів і ліпопротеїнів плазми: знижує концентрацію ЛПДНЩ і ЛПНЩ, змінює профіль субфракцій ЛПНЩ у бік більших частинок, а також частинок меншої щільності; це також глибоко підвищує концентрацію HDL-С внаслідок підвищеної концентрації субфракції HDL2. Ніацин як єдиний гіполіпідемічний препарат знижує концентрацію ліпопротеїну(а). Гіполіпідемічний механізм ніацину відрізняється від інших гіполіпідемічних препаратів [52].

Ніацин сприятливо впливає на аполіпопротеїни В-вмісні ліпопротеїни (наприклад, ліпопротеїни дуже низької щільності [ЛПДНЩ], ліпопротеїни низької щільності [LDL], ліпопротеїни [а]) і підвищує аполіпопротеїни А-I, що містять ліпопротеїни (ліпопротеїни високої щільності [HDL]). Нещодавно нові відкриття розширили наше розуміння механізму дії ніацину та поставили під сумнів старі концепції. Є нові дані щодо того, як ніацин впливає на тригліцериди і метаболізм ліпопротеїнів, що містять апо В, у печінці, як він впливає на метаболізм апо А-I та ЛПВЩ, як він впливає на

судинні протизапальні явища, специфічний рецептор ніацину в адипоцитах та імунних клітинах, те, як ніацин викликає припливи, і характеристика транспортної системи ніацину в клітинах печінки та кишківника. Нові відкриття вказують на те, що ніацин прямо і неконкурентно пригнічує діацилгліцерол-ацилтрансферазу-2 гепатоцитів, ключовий фермент для синтезу тригліцеридів [29]. Інгібування синтезу ТГ ніацином призводить до прискореної внутрішньоклітинної деградації апо В у печінці та зниження секреції частинок ЛПДНЩ та ЛПНЩ. Попередні кінетичні дослідження на людях і нещодавні дослідження клітинної культури *in vitro* вказують на те, що ніацин уповільнює переважно печінковий катаболізм апо А-I (проти апо А-II), але не ефірів холестерину, опосередкованих рецептором-акцептором ВІ. Зниження катаболізму ЛПВЩ-апо А-I під дією ніацину пояснює збільшення періоду напіврозпаду ЛПВЩ і концентрації субфракцій ЛПВЩ ліпопротеїну А-I, які підсилюють зворотний транспорт холестерину. Початкові дані свідчать про те, що ніацин, інгібуючи поверхневу експресію гепатоцитів бета-ланцюга аденозинтрифосфатсинтази (нещодавно зареєстрований рецептор голочастинок HDL-апо А-I), пригнічує видалення HDL-апо А-I [22]. Останні дослідження показують, що ніацин підвищує окислювально-відновний стан ендотеліальних клітин судин, що призводить до інгібування окислювального стресу та генів запалення судин, ключових цитокінів, залучених до атеросклерозу [11].

Тож, нікотинова кислота є безпечним ліпідним агентом широкого спектру дії, показаним для профілактики серцево-судинних захворювань, але її широке використання обмежене припливом ніацину, опосередкованим простагландином D2 (PGD2). Секреція PGD2, викликана нікотиною кислотою, опосередковується шкірою і є припущення, що макрофаги є джерелом індукованої нікотиною кислотою секреції PGD2. та можуть призвести до кращих стратегій для усунення цього обмежуючого побічного ефекту [30]. Також було показано, що лікування ніацином полегшувало загоєння ран і покращувало серцеву функцію після ішемії через

опосередковане DP1 зміщення M2 і своєчасне усунення запалення в інфарктних серцях. Крім того, виявлено, що споживання ніацину також стимулює M2-поляризацію периферичних моноцитів у людей. У сукупності ні/ацин сприяє функціональному відновленню серця після ішемічного інфаркту міокарда через опосередковану DP1 поляризацію M2 і своєчасне вирішення запалення в серцях. Ці результати показали, що інгібування DP1 може послабити серцево-судинні переваги ніацину [23]

Відновився інтерес до нікотинової кислоти через необхідність покращення профілактики атеросклерозу у пацієнтів, які вже приймають статини. Крім того, виявлення рецептора нікотинової кислоти, що експресується в адипоцитах та імунних клітинах, допомогло з'ясувати механізми, що лежать в основі антиатеросклеротичних, а також небажаних ефектів цього препарату. Нікотинова кислота проявляє свою антиатеросклеротичну дію принаймні частково незалежно від її антидисліпідемічної дії через механізми, що включають її рецептор на імунні клітини, а також через прямий і непрямий вплив на ендотелій судин [27].

Схематично ефекти нікотинової кислоти можна представити у вигляді схеми (рис. 1.3).

Не до кінця розкритим є потенціал впливу нікотинаміду та похідних на нервову систему та, зокрема, на когнітивні функції. Окремі дослідження, спрямовані на визначення ефективності лікування нікотиновою кислотою когнітивних порушень, пов'язаних із дієтами з високим вмістом жирів у щурів, і для модуляції експресії та активності транскетолази, показали, що нікотинова кислота може модулювати активність транскетолази гіпоталамуса, щоб зменшити вираженість когнітивного дефіциту та зменшення когнітивної дисфункції в клінічних умовах, пов'язаних з дієтами з високим вмістом жиру [54].

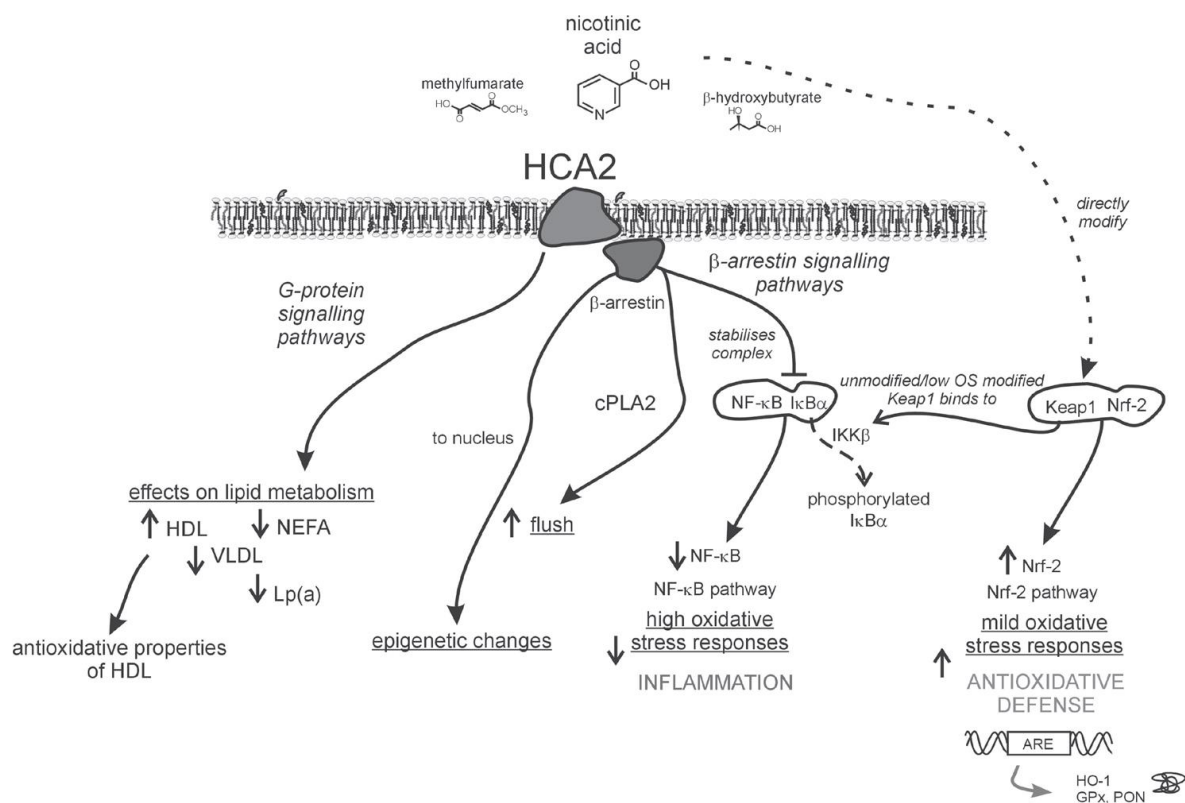


Рис. 1.3. Основні ефекти нікотинової кислоти (за Zeman M. та інші) [53]

Ефекти ніацину опосередковуються його зв'язуванням з рецептором HCA2 (раніше GPR109A; природний ліганд: β-гідроксибутират), який експресується на на поверхні багатьох типів клітин або через невідомі механізми, через які ніацин впливає на гепатоцити і ендотеліальних клітин

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Організація експериментального дослідження

Експериментальне дослідження проходило в кілька етапів, на кожному із яких застосовувалися лабораторні тварини. У досліджах використовували білих мишей лінії Vistar, вагою 15 – 25 г. Тваринки утримувалися у стандартизованих умовах віварію (при температурі 20 °С, вода *ad libitum*, на стандартний раціон). При роботі із тваринами враховувалися положення Директиви Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986) та інші відповідні документи.

Базово усі тварини були розподілені на три групи:

1. контрольна група: миші, які за схемою відповідного експерименту отримували фізіологічний розчин того ж об'єму, що і експериментальна речовина;

2. Перша експериментальна група: миші, які отримували еритропоетин. ЕПО вводили у різних дозуваннях: 0,065 МО/г; 3,25 МО/г; 6,5 МО/г.

3. Друга експериментальна група: миші, які отримували нікотинову кислоту (0,065 МО/г; 3,25 МО/г; 6,5 МО/г).

Отримані мікрофотографії обробляли за допомогою комп'ютерної програми Image J.

Графічний і статистичний аналіз результатів проводили у середовищі Statistica 6.0., отримані величини виражали у вигляді середнього значення і стандартного відхилення. Достовірність відмінностей визначали за критерієм Манна–Уїтні. Зміни вважалися значимими при $P \leq 0,05$.

2.2. Методи дослідження

Одним із важливих досліджень є визначення органолептичних

показників і морфометрія досліджуваних тварин, їх тканин і органів [33]. Ми проводили такі виміри перед, в середині та наприкінці кожного дослідження.

Визначення цитохімічних показників проводили за стандартними методами [66; 71].

Оцінку клітинного складу кісткового мозку мишей проводили після фарбування гематоксилін-еозином за стандартною методикою [69]. Потім підраховували мієлограму мишей контрольної та експериментальних груп [17; 18; 60].

Методика дослідження функціональних показників міокарду в умовах дії вазоактивних речовин. Методика Langendorff [2; 49] дозволяє спостерігати за ізольованим серцем, перфузуючи коронарні артерії поживним середовищем. У лабораторії було виготовлено модифікований апарат для перфузії ізольованого серця. Перфузійний розчин Кребса-Хензеляйта, підігрітий до 37°C, використовувався для постійної перфузії коронарних судин під тиском 60-100 см водного стовпчика. Розчин насичували киснем та CO₂ з постійним контролем рН, додаючи 1 мл гепарину для запобігання згортанню крові.

Серце, видалене після цервікальної дислокації, занурювали в холодний перфузійний розчин з гепарином для видалення крові зі шлуночків. Маніпуляції з серцем тривали не більше 3 хвилин, щоб зберегти його властивості. Під час досліджень дотримувалися Європейської конвенції про захист хребетних тварин.

Після зупинки скорочень до аорти кріпили канюлю, яка кріпилась до штативу, і серце починало автономно скорочуватись. Протягом 10 хвилин відбувалася стабілізація роботи серця, вимивання залишкової крові, після чого серце досягало повної нормалізації скорочень. Через 30 хвилин нормальної роботи штучно створювали ішемію, перекриваючи потік перфузійного розчину на 20 хвилин, щоб перевірити зміни в роботі серця.

Методика дослідження поведінкових проявів досліджуваних тварин [14]. Досліди проводилися в ізольованій кімнаті зі стабільним освітленням та температурою (близько 20°C) з 10:00 до 15:00. Для вивчення процесу навчання використовували Т-подібний лабіринт, що складався зі стартового відсіку, центрального рукава, бокових рукавів та напівколових коридорів.

Миші проходили умовно-рефлекторний тест, в якому бігли з центрального рукава до бокового з підкріпленням (молоко). В іншому боковому рукаві кормушку закривали перемичкою. Перед експериментом мишей привчали до лабіринту протягом 15 хвилин на день.

Під час експерименту тварину поміщали в стартовий відсік, відкривали доступ до рукавів, і реєстрували час пошуку підкріплення (2 хвилини). "Позитивне рішення" фіксували при знаходженні підкріплення, "негативне" – при підході до рукава без підкріплення. Якщо миша не приймала рішення за 2 хвилини, її повертали в стартовий відсік.

Навчання тривало три дні, по 10 спроб щодня. Критерієм навченості було 80% успішних пробіжок або сім правильних поспіль. Показники успішності включали кількість навчених мишей і швидкість виконання пробіжок. Після кожного досліду лабіринт протирали вологою ганчіркою.

РОЗДІЛ 3.

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

3.1. Фізичний стан в умовах дії вазоактивних речовин

За умов введення вазоактивних речовин, для визначення загального фізичного стану досліджуваних тварин, проводили органолептичний огляд та визначення ваги тварин. Відмічено окремі зміни в фізичному стані лабораторних мишей, а саме: стан хутра тьмянний, без блиску; на відкритих ділянках шкіри зустрічаються виразки; збільшилася потреба у воді, значно зросла рухова активність тварин.

Результати контрольних зважувань дослідних тварин, які отримували ЕРО у різних дозах представлено у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Динаміка змін ваги досліджуваних мишей, г

Концентрація	Дата ін'єкцій								
	25.03	27.03	29.03	31.03	03.04	05.04	07.04	10.04	12.04
0,065 МО/г	26,03	25,8	25,22	29,45	29,1	25,10	25,3	25,28	26,07
	31,6	30,4	31,97	34,09	32,1	33,53	34,2	32,78	33,71
3,25 МО/г	20,6	20,7	21,14	28,4	20,3	21,59	22,2	22,58	22,15
	28,1	28,4	28,39	29,2	27,6	29,78	29,7	29,24	29,8
6,5 МО/г	45,2	43,7	43,0	42,9	42,3	42,48	42,3	41,34	42,1
	35,63	35,02	35,61	35,03	35,1	35,43	26,4	34,25	34,7
	25,3	25,35	26,1	25,92	26,1	26,31	26,3	26,31	26,5
контроль	26,08	26,2	26,2	26,52	25,6	26,2	26,2	24,55	21,6
	28,01	28,8	29,4	29,31	28,5	28,7	28,9	29,21	28,8
	23,9	24,34	23,7	22,92	24,6	24,4	25,1	25,63	25,56

Рекомбінантний ЕРО має вплив на показники ваги (набір та стрімкий спад) в експериментальних групах, які отримували великі та низькі дози ЕРО. Миші які отримували ЕРО середньої концентрації, мали зниження ваги порівняно із контрольною групою.

Натомість, миші, які знаходились в умовах впливу нікотинової кислоти достовірно не відрізнялися за масою тіла від інтактних мишей.

При щоденному візуальному огляді не виявлено проявів токсичного впливу на стан волосяного покрыву, шкіри та видимих слизових оболонок. Хоча на останніх двох ін'єкціях спостерігався ціаноз нижньої частини тіла у 80% мишей, що отримували нікотинову кислоту. Ступінь ціанозу позитивно корелювала із концентрацією нікотинової кислоти, яку отримували тварини експериментальної групи.

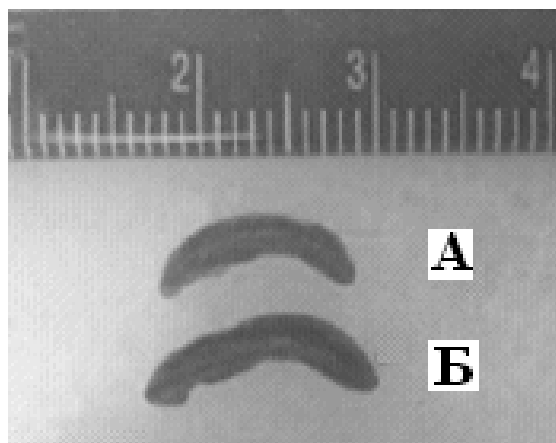
По закінченні експерименту проводилась автопсія. У тварин, які отримували еритропоедин, не виявлено видимих патологічних змін стану внутрішніх органів, фасцій, м'язів. Також, подібна ситуація була і у випадку із мишами, що отримували нікотинову кислоту: видимі зміни стосувалися тільки селезінки. Показано, що у досліджуваних тварин збільшено кровонаповнення та вага селезінок із-за впливу нікотинової кислоти на тонус судин, а відповідно, із збільшенням тонуусу, збільшилися і лінійні розміри органу та інші морфологічні показники.

Для уточнення морфології селезінок та для з'ясування впливу уведення вазоактивних речовин на стан селезінки, було проведено гомогенізацію органу та виготовлено суспензію клітин. При мікроскопуванні селезінової клітинної суспензії, виявлено, що збільшилася, у порівнянні із препаратами тварин контрольної групи, кількість паренхіматозних клітин у препараті селезінки тварин, які отримували нікотинову кислоту.

На відміну від людини, селезінка гризунів відіграє головну роль у гемопоезі протягом всього постнатального онтогенезу. В межах виконання означеного дослідження, нами проведено натуральний експеримент у вигляді спостереження наслідків впливу нікотинової кислоти на стан селезінки. У дорослих тварин орган достовірно збільшується, а кровонаповнення стає інтенсивніше. Дослідження морфологічної структури також виявило певні розбіжності: мікроструктура селезінки в тварин, які отримували нікотинову кислоту, відрізнялася від контрольної: ми виявили зменшення кількості мегакаріоцитів та еритроцитів, що може пояснити помірний ціаноз кінцівок окремих тварин наприкінці експерименту (більш детально це питання буде

розглянуто у наступних розділах). Також виявлено зростання присутності лімфоцитів на 1 мм² площі фолікулу лімфоїдної пульпи, відповідне зростання його радіусу та площі, а також звагоділатацію центральних артерій селезінкового фолікулу. Треба зауважити, що селезінки тварин, які отримували ін'єкції еритропоетину, також були збільшені у розмірах, але достовірної різниці зафіксовано не було, а клітинний склад мав велику кількість еритроцитів, що пояснюється специфічною дією еритропоетину.

Результати органолептичного обстеження селезінок мишей, що знаходились під ендogenousним впливом нікотинової кислоти, наведено на рисунку 3.1.



3.1. Зовнішні розміри селезінки досліджуваних тварин

Примітки: А – селезінка миші контрольної групи; Б – селезінка миші, що отримувала ін'єкції нікотинової кислоти

На препаратах ми побачили виражене дифузне повнокров'я червоної пульпи. Лімфатичні фолікули в різному ступені збільшені в розмірах за рахунок гіперплазії, окремі з них зливаються один з одним. У більшості фолікулів виражене просвітлення реактивних центрів. Стінки центральних артерій фолікулів потовщені за рахунок слабо вираженого гіалінозу. Капсула селезінки не потовщена.

Тож, як вже відмічалось, протягом дослідження збільшилися лінійні розміри селезінок та їх вага (табл.3.1). Відомо, що маса органа зазвичай змінюється у двох випадках: можлива у двох випадках: за рахунок

збільшення кількості зрілих клітин органу; за рахунок притоку периферичної крові для забезпечення живлення клітин (хоча на практиці ми маємо комбінацію цих факторів).

Таблиця 3.1

Показники ваги та розміри селезінок досліджуваних мишей

Група	Вага тварини, г	Вага селезінки, мг		
Експериментальна	24,2±1,1	186,1±2,8 *		
Контрольна	23,9±1,09	119,1±1,5		
Група	Розміри селезінки, мм			
	Довжина	Ширина	Товщина	
Експериментальна	18±0,5*	4±0,1	3±0,06	
Контрольна	14±0,3	3±0,1	3±0,03	

Примітка: * - достовірність відмінностей між показниками контрольної та експериментальної груп, при $p < 0,05$

Також, ми розрахували ваговий показник, який характеризує відношення ваги органу до ваги тіла (рис. 3.2).

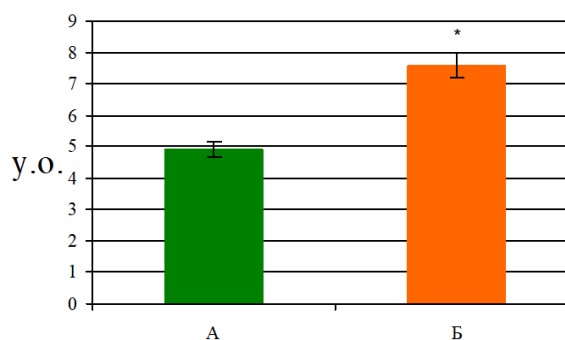


Рис. 3.2. Ваговий індекс селезінки досліджуваних мишей в умовах дії нікотинової кислоти

Примітка: * - достовірність відмінностей між показниками А (контрольна група) та Б (експериментальна група) при $p < 0,05$

З наведеної візуалізації виходить, що зміни саме органу, а не власне ваги тварини, зумовлюють зміни вагового індексу.

Тож, ми встановили, що нікотинова кислота збільшує кровонаповнення

та вагу селезінок досліджуваних тварин, впливаючи на тонус судин,.

Периферична кров та органи кровотворення першими відкликаються на вплив фізіологічних та патологічних факторів різної природи. Особливо це стосується так званих «імунокомпетентних клітин», адже багато з них проходять спеціалізацію та і взагалі утворюються саме у селезінці. Із вищевикладеного можна зробити припущення, що цитохімічна активність буде опосередковано вказувати на функціональний стан імунокомпетентних клітин та, власне, селезінки. Ті ж самі припущення в повній мірі відносяться і до випадку впливу еритропоетину, як вазоактивної та гемопоезстимулюючої речовини.

3.2. Цитохімічний статус імунокомпетентних клітин периферичної крові білих мишей в умовах дії вазоактивних речовин

3.2.1. Цитохімічні властивості клітин периферичної крові в умовах дії еритропоетину. Лейкоцити та еритроцити у периферичній крові є важливим інформаційним джерелом про ранні метаболічні зміни в організмі. Дослідження показали, що адаптація організму до ендогенних та екзогенних змін у середовищі, відображається, зокрема, у зміні ферментативної активності кров'яних клітин. Причому, подібні зміни можуть мати як суто пристосувальний характер, так і мати ознаки компенсаторних змін та патологічних змін. Ці показники також співвідносяться із ферментним статусом клітин окремих життєво важливих органів, зокрема, органів гемопоезу та лімфоїдних.

Гранулоцити, зокрема, мають ключову роль у руйнуванні антигенів та формуванні першого рівня захисту. Вони виконують цю функцію завдяки синтезу та виділенню цитокінів, що викликають запальну реакцію на чужорідну інформацію, а також за рахунок різних метаболічних процесів всередині клітин.

Було визначено активність лужної фосфатази у гранулоцитах мишей, що

отримували вазоактивні речовини. Фзіологічна функція лужної фосфатази полягає у тому, що вона бере участь у регулюванні рівня фосфатів у крові шляхом гідролізу фосфатних груп з різних органічних сполук, бере участь у метаболізмі мінералів, таких як кальцій, фосфати та інші. Лужна фосфатаза може виступати як активатор для інших ферментів, що регулюють різноманітні біохімічні процеси в клітинах організму. Рівень лужної фосфатази в крові може бути використаний у медичній практиці як діагностичний показник для оцінки функції печінки, кісткового метаболізму та інших патологічних станів.

На рисунку 3.2. показано червоні кров'яні тільця мишей з гранулами, що містять лужну фосфатазу.

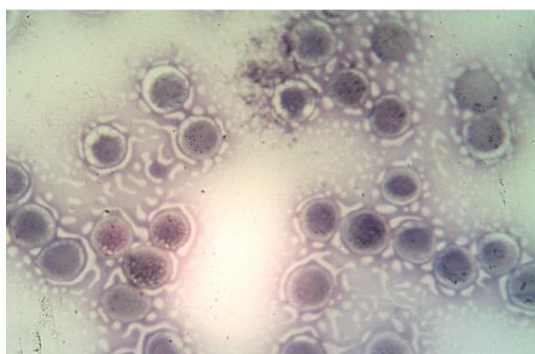


Рис. 3.2. Червоні кров'яні тільця із гранулами лужної фосфатази у мишей експериментальної групи

У досліджуваних мишей було визначено середній цитохімічний коефіцієнт вмісту лужної фосфатази (див. рис. 2.4).

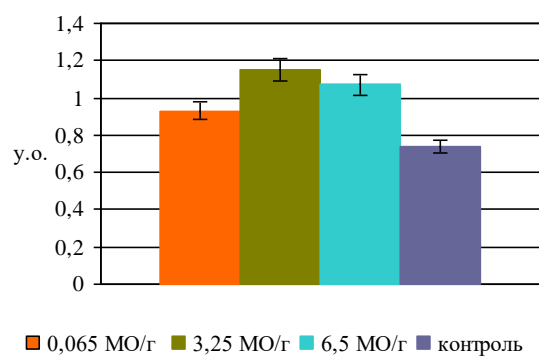


Рис. 3.3. Концентрація лужної фосфатази в червоних кров'яних тільцях досліджуваних мишей, у.о

З'ясовано, що вміст лужної фосфатази менше у мишей які отримували еритропоетин з концентрацією 6,5 МО/г та 0,065 МО/г ніж у тварин, що отримували концентрацію 3,25 МО/г . Рівень лужної фосфатази у мишей що отримували ін'єкції ЕРО вище ніж у контролю.

Також ми виявили вміст кислої фосфатази у мишей досліджуваних груп. На рисунку 3.4 показано скупчення гранул кислої фосфатази в червоних кров'яних тільцях мишей. Також у ми визначили середній цитохімічний коефіцієнт знаходження кількості лужної фосфатази у клітинах (рис. 3.5).

З'ясовано, що у мишей які отримували рекомбінантний ЕРО з концентрацією 0,065 МО/г та 6,5 МО/г вміст кислої фосфатази більше ніж у мишей, що отримували концентрацію 3,25 МО/г . Рівень кислої фосфатази у мишей що отримували ін'єкції еритропоетину вище ніж у контролю.

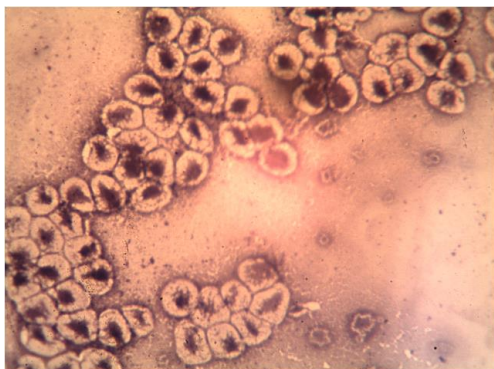


Рис. 3.4. Червоні кров'яні тільця із гранулами кислої фосфатази у тварин експериментальної групи

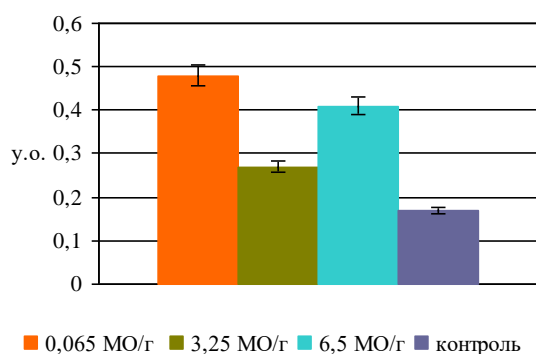


Рис. 3.5. Дозозалежний ефект впливу еритропоетину на вміст кислої фосфатази в клітинах досліджуваних мишей, у.о

Тож, еритропоетин має здатність змінювати активність фосфатах у еритроцитах периферичної крові піддослідних тварин.

3.2.2. Цитохімічні показники клітин крові в умовах дії нікотинової кислоти. Також нами було зроблено кількісне та якісне порівняння показників вмісту кислої та лужної фосфатази в умовах уведення другої із досліджуваних вазоактивних речовин, а саме нікотинової кислоти. Ми виявили зменшення кількості лужної фосфатази у мишей експериментальної групи (рис. 3.6).

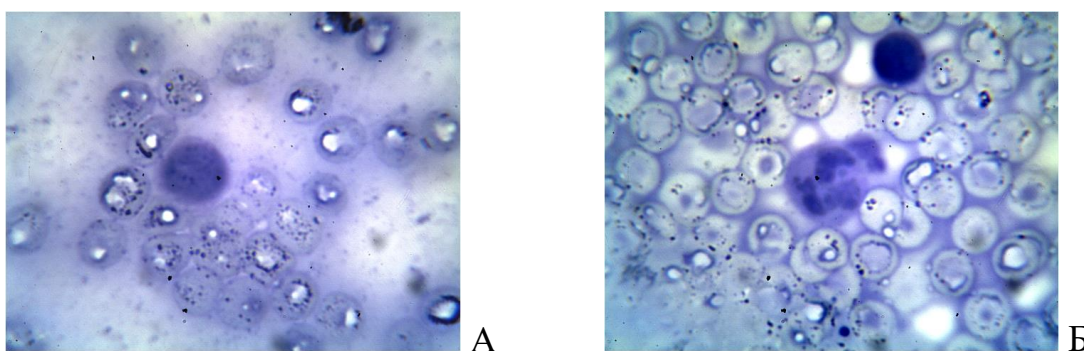


Рис. 3.6. Гранули лужної фосфатази у клітинах крові
Примітки: А – експериментальна група; Б – контрольна група

Тож нікотинова кислота пригнічує ферментативну активність щодо еритроцитів мишей експериментальної групи, додатково це можна виявити у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Середній цитохімічний коефіцієнт вмісту лужної фосфатази у досліджуваних тварин, ум. од., $M \pm m$

Групи	Термін	
	Початок експерименту	Кінець експерименту
Експериментальна група	$0,57 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,02^\diamond$
Контрольна група	$0,54 \pm 0,02^*$	$0,5 \pm 0,01^{*\diamond}$

Примітки: * - статистично достовірна різниця між групами досліджуваних; \diamond - статистично достовірна різниця між показниками всередині однієї групи, різниця достовірна при $p \leq 0,05$

Відомо, що на тлі зменшення вмісту та пригнічення активності лужної

фосфатази зазвичай спостерігається підвищення концентрацій мієлопероксидази у периферичних гемоцитах та покращення фагоцитарної функції, оскільки існує негативний зворотній зв'язок між цими показниками (виникнення активних форм кисню зменшується при підвищенні рівня лужної фосфатази). Тож, було визначено мієлопероксидазну активність клітин периферичної крові. Виявлено статистично достовірне збільшення рівня мієлопероксидази в лейкоцитах мишей, що отримували ін'єкції вазоактивних очовин (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Показники СЦК мієлопероксидази у мишей експериментальної та контрольної групи (ум. од.), $M \pm m$

Групи	Термін	
	Початок експерименту	Кінець експерименту
Експериментальна група	$2,15 \pm 0,05$	$4,66 \pm 0,14$
Контрольна група	$2,32 \pm 0,05 *$	$2,22 \pm 0,05 * \blacklozenge$

Примітки: * - статистично достовірна різниця між групами досліджуваних; - статистично достовірна різниця між показниками всередині однієї групи, різниця достовірна при $p \leq 0,05$

Отримані дані показують, що у мишей після експерименту збільшується кількість мієлопероксидази у лейкоцитах. Цей ефект може бути наслідком процесів, які відбуваються з лейкоцитами під час їх диференціації у синусах селезінки. Під час диференціації у кровотворенні відбувається біосинтез цього ферменту, який завершується до моменту виходу зрілих клітин у кровоносне русло. Збільшення рівня мієлопероксидази може бути результатом накопичення цього ферменту у клітинах, які не вивільняють його у кров, що допомагає запобігти окисному ушкодженню тканин власного організму.

3.3. Лейкоцитарна формула в умовах дії вазоактивних речивин

Було проведено аналіз лейкоцитарної формули тварин, які отримували різні концентрації еритропоетину. Порівнявши результати дослідження

лейкограми мишей до та після експерименту, було виявлено певні відмінності у останніх (див. рис. 3.7). Зростання концентрації еритропоєтину призводить до збільшення вмісту еозинофілів у периферичній крові. Ці зміни спостерігаються на всіх рівнях концентрації еритропоєтину. Також було виявлено достовірне зменшення відсотка нейтрофілів (особливо зрілих форм) та моноцитів у досліджуваних групах з концентраціями еритропоєтину 3,25 МО/г та 6,5 МО/г. Зауважено також незначне збільшення відсотка лімфоцитів та базофілів у групах, що отримували концентрації еритропоєтину 3,25 МО/г та 6,5 МО/г.

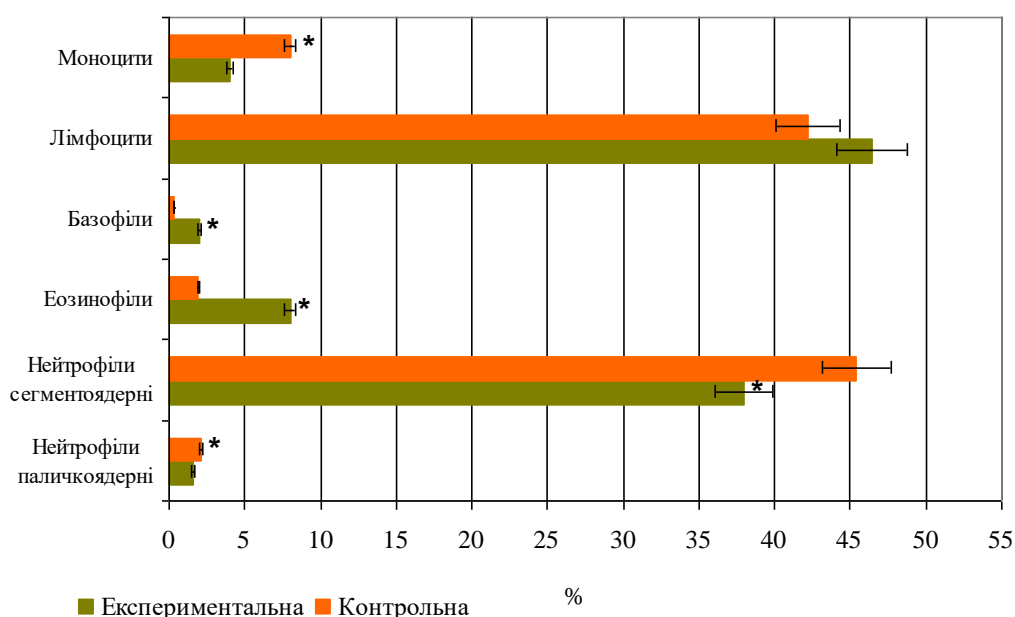


Рис. 3.7. Показники лейкограми досліджуваних мишей в умовах дії еритропоєтину (усереднено по трьом концентраціям), $M \pm m$

Примітки: ♦ - статистично достовірна різниця між показниками ($p \leq 0,05$)

Визначали лейкограму і в умовах дії нікотинової кислоти (рис. 3.8). У випадку експериментальної групи, після введення нікотинової кислоти, відбулося підвищення рівня паличкоядерних нейтрофілів, яке було підтверджено як достовірне. Рівень моноцитів у цій групі був значно нижче, ніж у контрольної групи. Деяке збільшення вмісту нейтрофілів в експериментальній групі було також виявлено в порівнянні з контрольною. Цікавим фактом є достовірне збільшення рівня сегментоядерних нейтрофілів

у мишей експериментальної групи порівняно з контрольною. Крім того, спостерігалось незначне підвищення відсотка еозинофілів. Також помічено виразні зміни у кількості базофілів у експериментальній групі, що підтверджуються достовірними даними порівняно з контрольною групою.

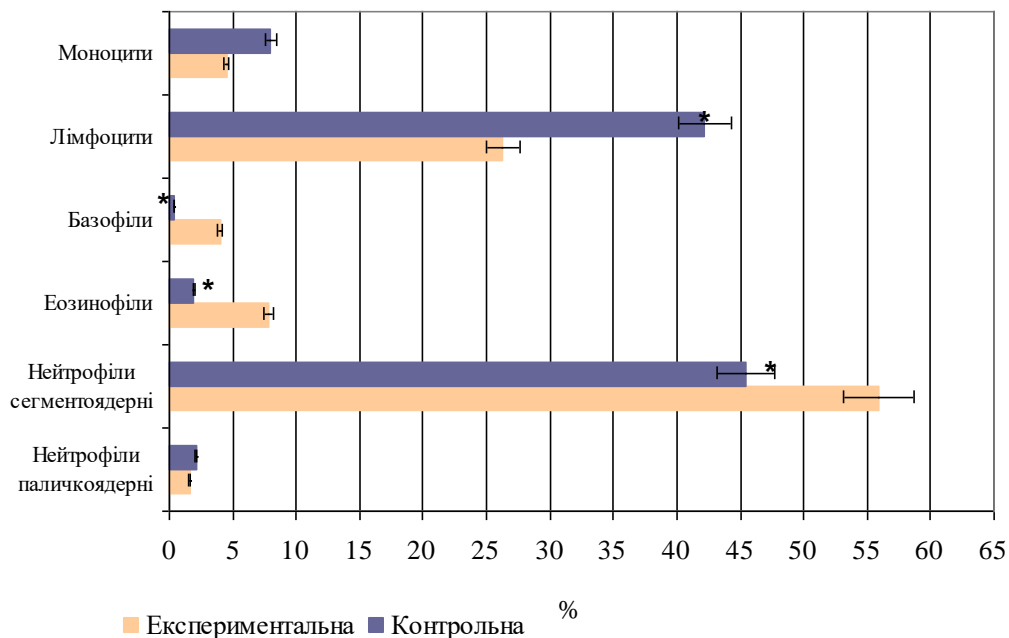


Рис. 3.8. Показники лейкограми досліджуваних мишей в умовах дії нікотинової кислоти

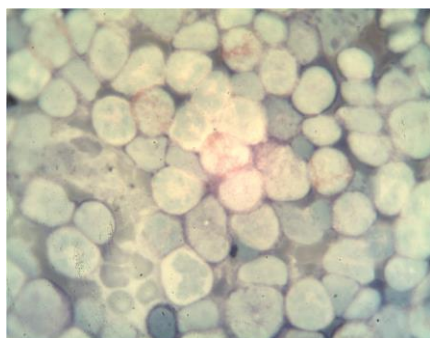
Примітки: ♦ - статистично достовірна різниця між показниками ($p \leq 0,05$)

Отже, в результаті експерименту було встановлено, що у мишей спостерігається значне зменшення відносного вмісту паличкоядерних нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів на тлі підвищеного рівня сегментоядерних нейтрофілів, еозинофілів та базофілів. Збільшення кількості гранулоцитів може бути пояснене зростанням часу їхнього перебування у кровотоці. Зниження вмісту лімфоцитів пов'язане з їхнім переходом у тканини через вплив збільшених доз нікотинової кислоти. Це зменшення свідчить про вплив на зниження компенсаційних та захисних реакцій організму. Збільшення рівня еозинофілів та базофілів може бути показником латентної алергізації. Також зниження рівня лімфоцитів, які відповідають за

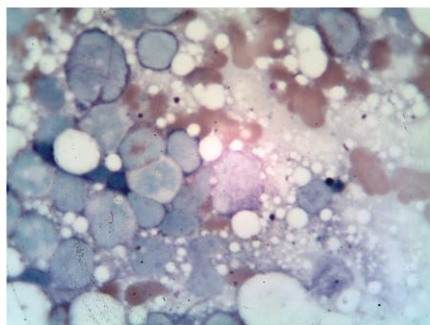
імунітет, може свідчити про зниження імунокомпетентних функцій організму.

3.4. Клітинний склад кісткового мозку в умовах дії вазоактивних речовин

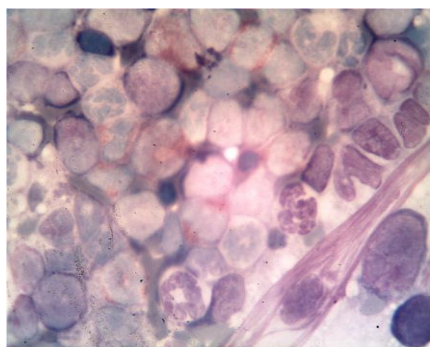
Для оцінки впливу еритропоєтину на клітинний склад кісткового мозку ми провели аналіз препаратів червоного кісткового мозку досліджуваних мишей (рис. 3.9).



Препарат кісткового мозку мишей, що отримували еритропоєтини в концентрації 0,065 МО/г



Препарат кісткового мозку мишей, що отримували еритропоєтини в концентрації 3,25 МО/г



Препарат кісткового мозку мишей, що отримували еритропоєтини в концентрації 6,5 МО/г

Рис. 3.9. Клітинний склад кісткового мозку в умовах дії вазоактивних речовин

Ми аналізували кількість різних видів клітин у кістковому мозку за допомогою мікроскопії. Ці клітини включали мієлобласти, які є попередниками клітин еритроїдного ряду кровотворення. Ми розглядали наступні фракції:

I фракція включала малодиференційовані попередники, які є першими клітинами, які можна розпізнати як клітини еритрону;

II фракція містила пронормоцити та базофільні нормоцити, у яких розпочинається процес гемоглобінізації цитоплазми;

III фракція складалася з поліхроматофільних нормоцитів;

IV фракція включала оксифільні нормоцити та кістково-мозкові ретикулоцити.

Ми зауважили, що кількість бластних клітин у кістковому мозку мишей, які отримували ін'єкції еритропоетину, була більшою, ніж у мишей контрольної групи. Також було виявлено, що кількість еритробластів та еритроцитів у кістковому мозку мишей у експериментальній групі перевищувала кількість у контрольній групі (Рис.3.10).

Відрізнялася кількість бластів також при порівнянні показників між експериментальними групами, що отримували різні дози еритропоетину.

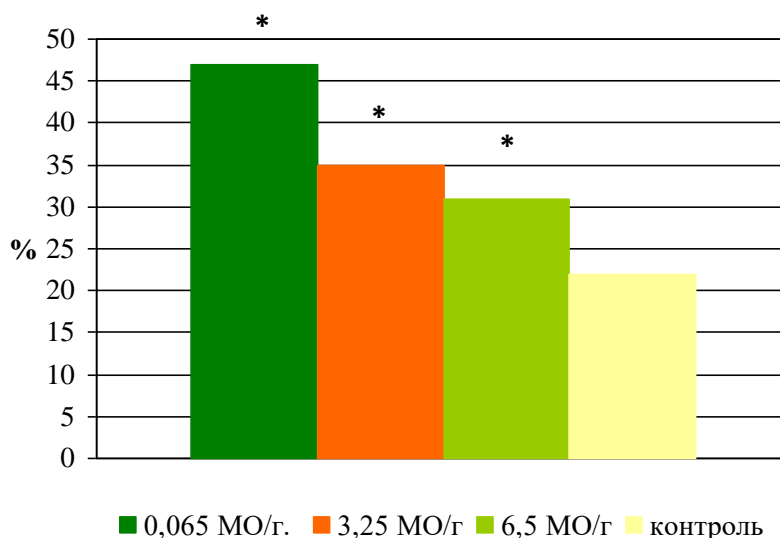


Рис. 3.10. Відсотковий вміст у червоному кістковому мозку досліджуваних мишей нормобластних клітин та проеритроцитів при дії еритропоетину у рійній концентрації

Фіксували кількість попередників еритроцитів у кістковому мозку досліджуваних тварин. Найбільшою вона була у мишей, яким вводили ЕРО у концентрацією 0,065 МО/г. Наступною групою, за кількістю еритробластів

була група мишей, які отримували еритропоетин концентрацією 3,25 МО/г. Ну і на третьому місці була група тварин, що отримували 6,5 МО/г ЕРО. Також, було зафіксовано численні зрілі еритроцити у кістковому мозку мишей, що знаходились під впливом 3,25 МО/г ЕРО.

Показано, що є пряма залежність між швидкістю созрівання еритроїдних клітин та концентрацією еритропоетину.

За результатами дослідження, нами зроблено припущення, що різні концентрації еритропоетину по різному стимулюють еритропоз. Так, найменша і найбільша концентрації викликають утворення більшої еритробластів та пришвидшений вихід готових еритроцитів у периферичну кров. Натомість, середні концентрації ЕРО мають не такий потужний вплив на утворення еритроцитів. Цим можна пояснити значну кількість зрілих еритроцитів у кістковому мозку досліджуваних тварин. Спостерігали «побічний» ефект введення еритропоетину: на тлі стимуляції еритропозу - збільшення мієлобластних клітин. Зафіксовано, особливо у мишей, що отримували найвищу концентрації еритропоетину, значну кількість жирових клітин.

На рисунку 3.11. можна бачити процес мітозу у клітинах під впливом еритропоетину.

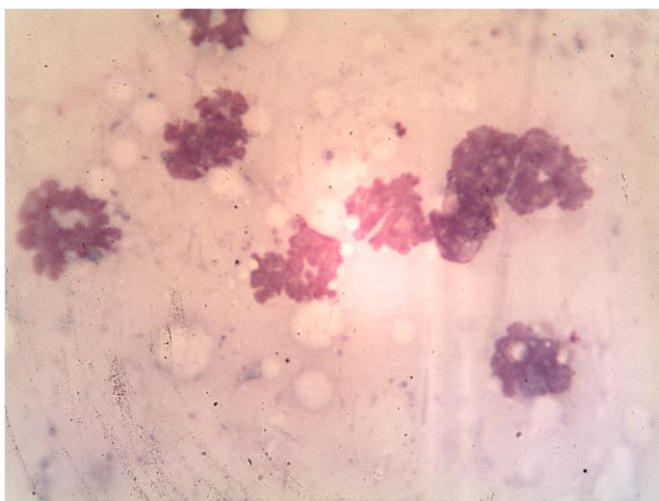


Рис. 3.11. Мітоз у клітинах кісткового мозку (концентрація еритропоетину 6,5 МО/г)

Отже, еритропоетини мають дозозалежний ефект впливу на гемопоез.

Також досліджували вплив вазоактивних речовин на селезінку мишей. Очікувано, що контрольна група тварин мала нормальні показники морфогістологічної будови селезінки (рис. 3.12).

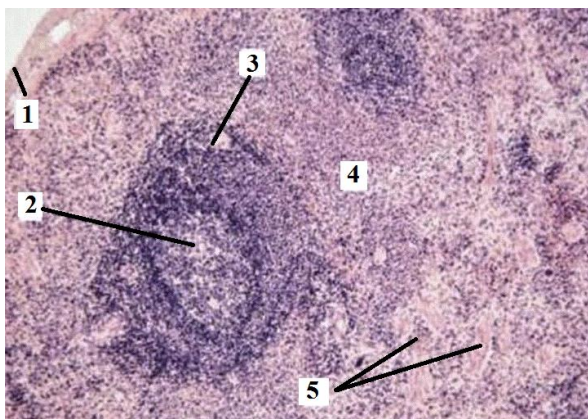


Рис. 3.12. Морфогістологічна будова селезінки інтактних мишей (гематоксилін-еозин)

Примітки: 1 - капсула; 2 - лімфоїдний вузлик (біла пульпа); 3 - центральна артерія; 4 – червона пульпа; 5 - трабекула

Ми спостерігали у селезінки тонку сполучнотканинну капсулу, радіальні трабекули і строму червоної і білої пульпи із ретикулярної тканини. Склад ретикулярної тканини включав власне ретикулярні клітини, волокна, а також фібробласти. Склад білої пульпи включав лімфоїдні періартеріальні муфти, а також лімфатичні фолікули. Зріз фолікула (середня площа), який зроблено через реактивний центр, у середньому $0,06 \text{ мм}^2$.

В гермінативних центрах фолікулів селезінки виявлено повільно зростаючу популяцію імунних клітин. За нашими спостереженнями, близько 30 з них діляться, а 60 гинуть і утилізуються шляхом апоптозу. Активність проліферації лімфоцитів у фолікулах складає 0,54.

Маргінальні зони селезінки мають вигляд кілець шириною 70-90 мкм навколо фолікулів. Ці зони щільно заповнені ретикулярними клітинами, великими лімфоцитами та макрофагами. Червона пульпа складається з тяжів пульпи та венозних синусів, заповнених клітинами крові. В субкапсулярній зоні та вздовж трабекул розташовані численні невеликі вогнища мієлоїдного

кровотворення.

Проведено обстеження гістологічне селезінок мишей в умовах дії нікотинової кислоти (рис. 3.13).

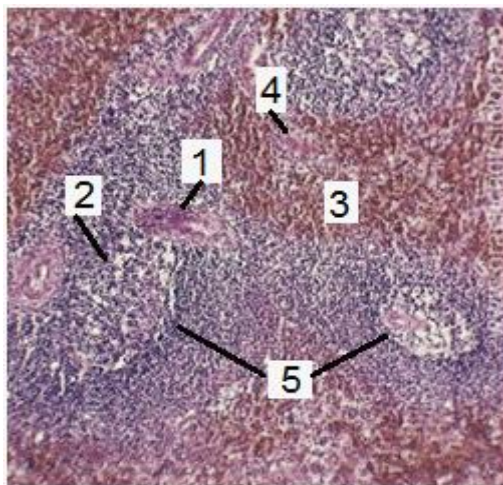


Рис. 3.13. Мікрофотографія селезінки миші, що отримувала ін'єкції нікотинової кислоти (гематоксилін-еозин)

Примітки: 1 - центральна артерія; 2 - лімфоїдний вузлик (біла пульпа); 3 – червона пульпа; 4 – трабекула; 5 – реактивний центр

На гістологічних препаратах у червоній пульпі досліджуваних селезінок спостерігалось помітне дифузне повнокров'я, хоча селезінкова капсула не була потовщеною. Лімфатичні фолікули гіперпластичні (збільшені в розмірах), окремі з них можуть зливатися один з одним. У більшості фолікулів спостерігається просвітлення реактивних центрів. Судинні стінки центральних фолікулярних артерій мають слабо виражений гіаліноз, за рахунок чого потовщені.

Тож, тривале введення нікотинової кислоти збільшує кровонаповнення селезінки, що надалі веде до гіперплазією та збільшення кількості клітин.

3.5. Функціональні показники міокарду в умовах дії вазоактивних речовин

Метод перфузії ізольованого серця із одночасним зніманням та записом

кардіограми часто використовується для дослідження функціонального стану міокарду. Він простий і досить інформативний. Оцінку електрокардіограми ми здійснювали за допомогою вимірювання пропускної здатності серця та розшифрування основних елементів електрокардіографічної кривої: сили зубця R та часу (відстані) між цими зубцями.

В межах даної дослідницької теми ми проводили перфузію серця миші, вилученого із мишиного організму. Перфузію проводили перфузійним розчином, що містив рекомбінантний еритропоетин (для мишей експериментальної групи) та чистим перфузійним розчином (контрольна група), результати представлені у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

Показники електрокардіограми ізольованих сердець

Дані	Експеримент		Контроль	
	Сила піка, МВ	Час між піками, с	Сила піка, МВ	Час між піками, с
Середнє значення	0,950952	6,302745	0,51023 *	6,1495 *

Інтерпритація даних експериментальної групи показала, що при концентрації еритропоетину у 0,65 МО найбільша сила піку складала $0,95 \pm 0,39$ Мв за комплексом QRS (в середньому у II відведенні), та показник часу між комплексами складав $6,3 \pm 4,7$ с (в середньому у II відведенні).

Таким чином, еритропоетин, як вазоактивна речовина, збільшує силу синусового збудження та уповільнює синусовий ритм.

Виявлено, що пропускна здатність неоднорідна при перфузії різних сердець (показники хвилинного об'єму (ХОС) наведено на рис 3.14). У контрольній групі (пропускали нормальний перфузійний розчин без додавання еритропоетину), середнє значення ХОС - 5 мл/хв., після ішемії це значення зменшилося (4,5 мл/хв.), на 38 хвилині і далі відбулася стабілізація до 5 мл/хв.

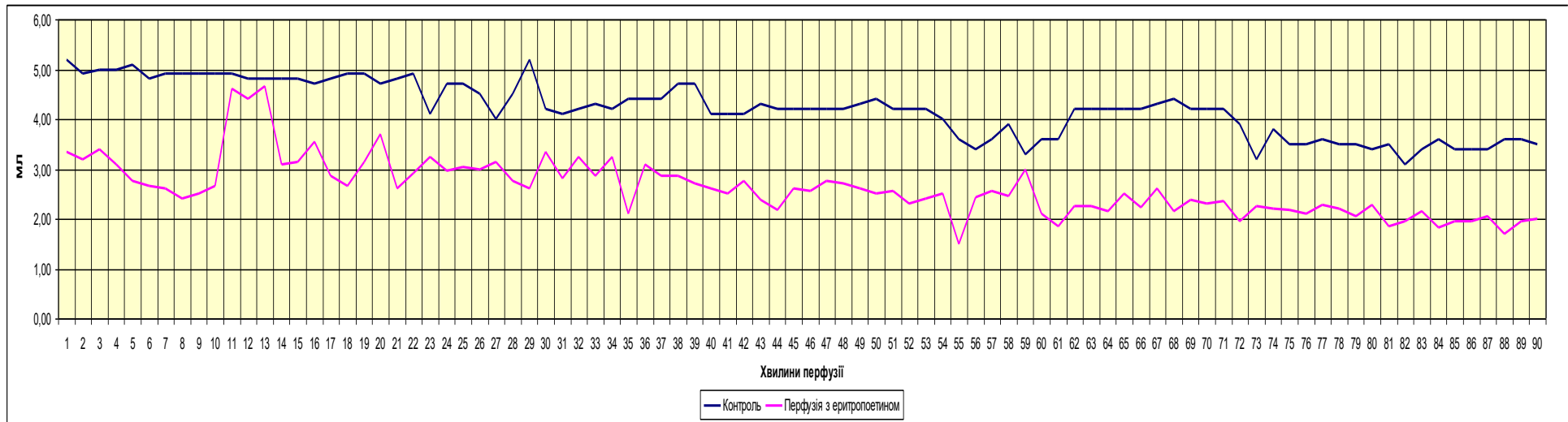


Рис. 3.14. Показники хвилинного об'єму ізольованих сердець білих лабораторних мишей($P \leq 0,5$)

Надалі ізольоване серце перфузували розчином Кребса-Хензелайта протягом 30 хвилин. З 12 по 25 хвилину додавали еритропоетин (ЕПО) до розчину. Вимірювали хвилинний об'єм, амплітуду зубця R та інтервал PQ та визначали концентрацію глюкози в перфузійному розчині кожні 10 хвилин.

При оцінці результатів було з'ясовано, що перші 11 хвилин хвилинний об'єм знизився до 3,5 мл/хв (порівняно з контролем). На 12-25 хвилині хвилинний об'єм стабілізувався. На 26-30 хвилині хвилинний об'єм підвищився до 5,5-6 мл/хв. Амплітуда зубця R збільшилась, а інтервал PQ збільшився до 0,2 с. І концентрація глюкози також збільшилась в перфузійному розчині під час проведення даного етапу експерименту.

Таким чином, додавання ЕПО до перфузійного розчину покращило роботу ізольованого серця в кінці дослідження. Спочатку ЕПО пригнічувало роботу серця, але потім ефект стабілізувався. ЕПО збільшило амплітуду зубця R, але сповільнило провідність. Збільшення концентрації глюкози в перфузійному розчині може бути ознакою погіршення обміну речовин в серці.

Тож, ЕПО може мати як позитивні, так і негативні ефекти на роботу серця і потрібні додаткові дослідження, щоб зрозуміти механізми дії ЕПО на серце. Отримані дані наведено на рисунку 3.15.

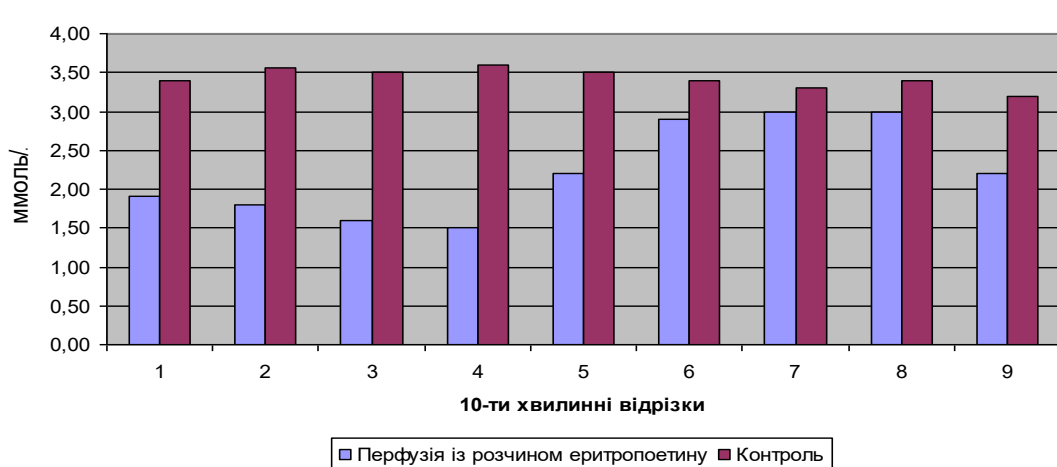


Рис. 3.15. Динаміка споживання глюкози міокардом в умовах дії еритропоетину

Споживання глюкози міокардом у контрольній групі було гіршим ніж у групі, де перфузія проводилася із додаванням у перфузійний розчин еритропоетину. Зауважимо, що протягом всього експерименту концентрація глюкози трималася приблизно на однаковому рівні ($3,5 \pm 0,3$ ммоль/л), а на 70 та 90 хвилинах спостерігався невеликий пік споживання. Натомість, концентрація глюкози у перфузійному розчині сердець експерисентальної групи була нижче ніж у контролі. Це говорить про інтенсифікацію роботи серця, адже саме при підсиленні роботи збільшується споживання глюкози. Ці дані корелюють із показниками електричної активності та хвилинного об'єму

Отже, еритропоетин інтенсифікує обмін речовин у міокарді, про можна пересвідчитися аналізуючи динаміку споживання глюкози (чим більшим є ХОС та електрична активність, тим більше споживається глюкози). Також, на останньому етапі дослідження зафіксовано погіршення насосної функції серця відносно початкових величин. З'ясовано, що додавання еритропоетину до розчину для перфузії підсилює вольтаж зубця R, але уповільнює серцевий ритм. Також еритропоетин робить більш інтенсивним обмін речовин у серцевому м'язі, що відображається у підсиленому споживанні глюкози.

3.6. Вплив вазоактивних речовин на поведінкову активність

Вплив вазоактивних речовин є досить глобальним для організму. Зміни кровопостачання повинні мати вплив не тільки на вісцеральні функції, а і на центральну нервову систему та на поведінкові прояви. Для вивчення особливостей такого впливу, а точніше – вивчення особливостей процесу утворення умовних рефлексів, був використаний метод «Т-подібний лабіринт». Ми застосовували по три експериментальні серії для мишей експериментальної та контрольної груп (рис. 3.16).

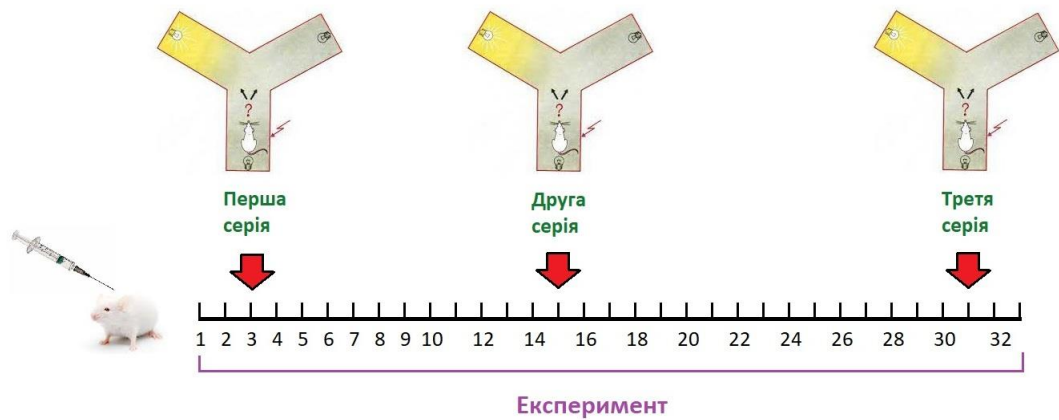


Рис. 3.16. Схема проведення експериментів із дослідження поведінкової активності лабораторних мишей на тлі уведення vasoактивних речовин (еритропоетин)

Було проведено три серії експерименту, після кожної з них ми проводили тест у Т-подібному лабіринті та визначали відсоток успішних реакцій та частку мишей, які успішно засвоїли навичку не більше ніж за десять спроб.

Кожна серія складалася із трьох стадій. На першій (дослідній) стадії тварину поміщають на вхід лабіринту та дозволяють рухатися лабіринтом без підкріплення чи покарання та досліджувати його. Асоціативна (друга) стадія починається з того, що у правий рукав поміщався їжа миша повинна знайти її (підкріплення зпохоченням). На початку третьої стадії тварину розташовували на вході до лабіринту і вона мала можливість вільно рухатися. Тобто миша повинна самостійно побудувати просторовий план зовнішнього середовища, поєднавши два незалежні фактори: «1) поворот направо / наліво веде в правий / лівий рукав, 2) в правому / лівому рукаві можна отримати заохочення / не отримати заохочення».

Дослідження здатності засвоювати так звану «харчову навичку», при застосуванні у якості підкріплення молока, наведено у таблиці 3.5.

Початковий рівень часу реакції у дослідній тварин достовірно не відрізнявся у тварин досліджуваних груп.

Показники вироблення умовної харчової інструментальної навички у Т-подібному лабіринті у мишей при стимуляції еритропоезу

Показники		Експериментальна	Контрольна
Середній час реакції, с	2 день	18,2±1,2	19,3±1,6
	3 день	18,9±0,7	21,2±0,9
	4 день	17,2±0,7*	20,6±0,91
Частина успішних реакцій, % (6 день)		71,2*	60,4
Успішна переділка навички, %		20	10

Примітка: Достовірність різниці між показниками експериментальної та контрольної груп, при $p \leq 0,05$

Протягом експерименту у мишей, які отримували еритропоетин, достовірно зменшився середній час реакції, тобто проміжок часу, необхідний для того, щоб зробити вибір та досягти правильного результату (третій день) (рис. 3.17).

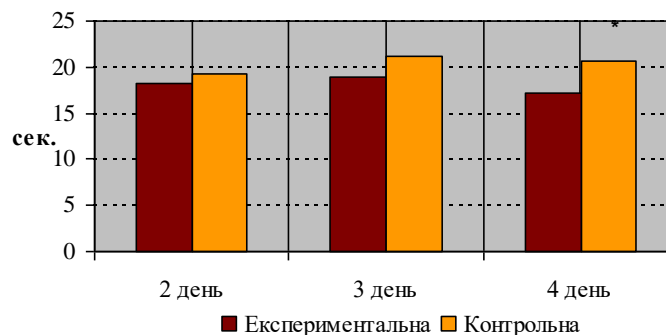


Рис. 3.17. Середній час реакції при проходженні Т-подібного лабіринту (2 – 4 день), с

На наступний день було проведено закріплення утвореного у тварин умовного рефлексу. Успішними реакціями ми вважали ті, де миші правильно обирали рукав, де знаходиться харчове підкріплення. Відсоток таких реакцій у контрольній групі дорівнював 60,4%, у експериментальній групі – 71,2 %. Змінюючи рукав, у якому знаходилося харчове підкріплення, ми дослідили «перенавчання» з першої та/або другої спроби це змогли зробити 1 тварина із контрольної та 2 ьварини із

експериментальної груп.

Тож, тварини, які отримували ін'єкції еритропоетину, краще формували умовні рефлекси.

Аналогічне дослідження було проведено після двох тижнів уведення еритропоетину. Показники тварин, які знаходилися під впливом еритропоетину, змінилися у напрямку зменшення часу, необхідного для утворення умовного рефлексу, натомість показники мишей, контрольної групи не зазнали суттєвих змін (табл. 3.6, рис. 3.18).

Таблиця 3.6

Показники вироблення умовної харчової інструментальної навички у Т-подібному лабіринті у мишей (14 – 16 день)

Показники		Експериментальна	Контрольна
Середній час реакції, с	14 день	18,3±1,2	20,3±1,6
	15 день	7,5±0,7*	18,1±1,3
	16 день	6,3±0,7*	17,5±0,8
Частина успішних реакцій, % (18 день)		90,6*	65,4
Успішна переділка навички, %		40	10

Примітка: Достовірність різниці між показниками експериментальної та контрольної груп, при $p \leq 0,05$

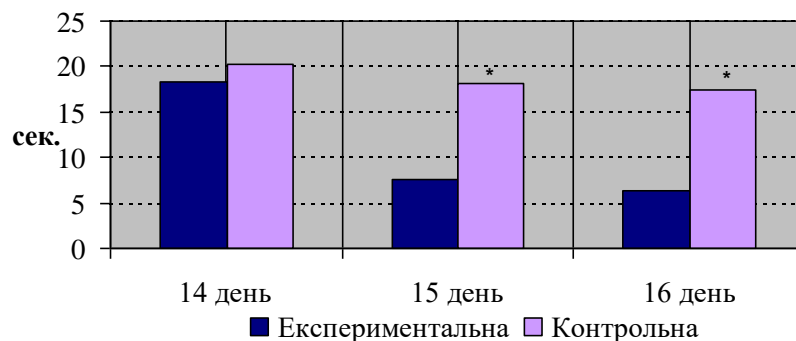


Рис. 3.18. Середній час реакції при проходженні Т-подібного лабіринту (14 – 16 день), с

Тож, стимуляція еритропоезу та вазоактивна дія сприяє тому, що дослідні тварини швидко проходили лабіринт і знаходили підкріплення.

Також посторно вивчалася здатність тварин до перенавчання. 1 миша із контрольної та 4 миші із експериментальної груп отримали новий рефлекс.

Третя серія (кінець експерименту) показала, що середній час вироблення умовного рефлексу у контрольній групі незначно змінився. В експериментальній групі він виявився достовірно меншим, ніж у контрольної. Зміни показників зумовлені тим, що в оюої досліджуваних групах відбувається процес навчання, але підсилене кровопостачання та активізація еритропоезу покращує здатність до вироблення кмовних рефлексів (табл. 3.7 та рис 3.19).

Таблиця 3.7

Показники вироблення умовної харчової інструментальної навички у Т-подібному лабіринті (30 – 32 день)

Показники		Експериментальна	Контрольна
Середній час реакції, с	30 день	18,3±1,2	20,3±1,6
	31 день	12,7±0,7	17,1±1,3
	32 день	9,8±0,7*	16,5±0,8
Частина успішних реакцій, % (35 день)		88,3*	62
Успішна переділка навички, %		40	10

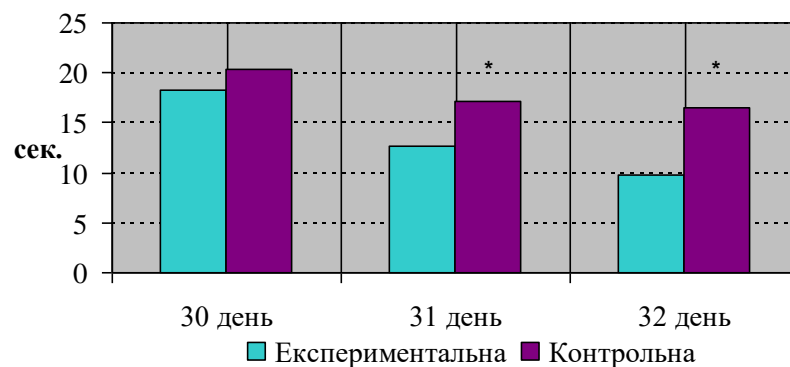


Рис. 3.19. Середній час реакції при проходженні Т-подібного лабіринту (30 – 32 день), с

Результати експерименту з «перенавчання» були подібними до таких у другій серії.

Ми розглянули зміни часу реакції у тварин, які знаходилися під впливом вазоактивних речовин (рис. 3.20).

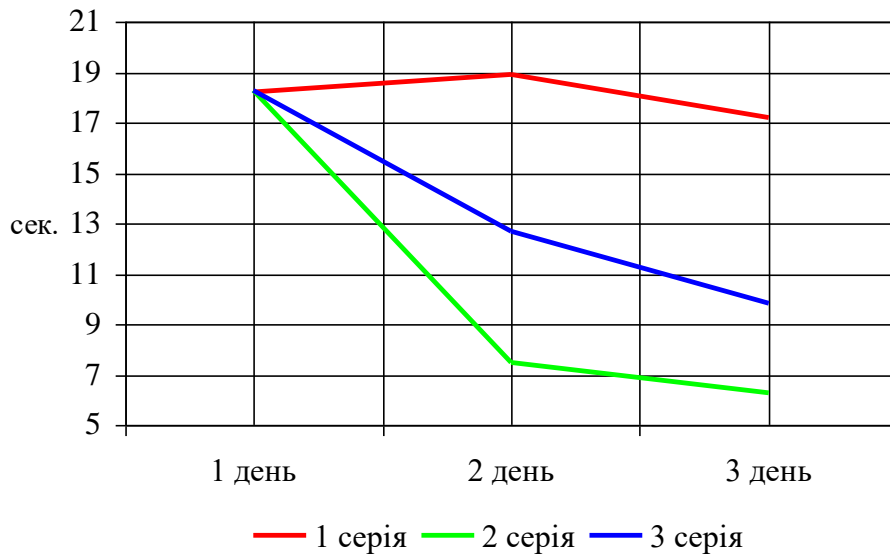


Рис. 3.20. Зміни часу реакції протягом періоду введення еритропоєтину, сек

Як можна бачити, кращі показники спостерігалися у другій серії, у третій показники почали знижуватися, але не до вихідних значень. Частка успішних випадків перенавчання була високою як у другій, так і в третій серіях (рис. 3.21).

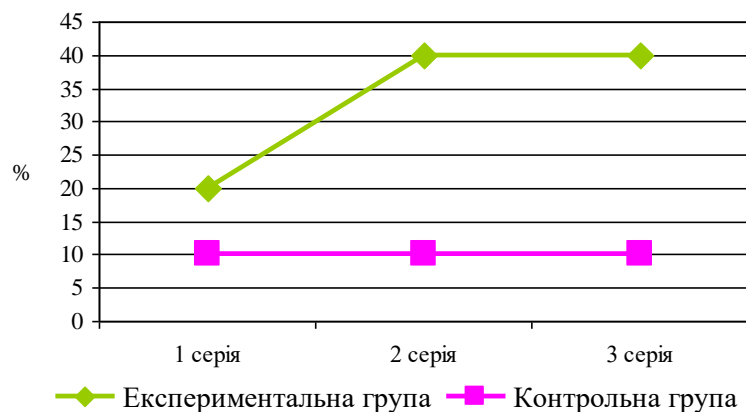


Рис. 3.21. Частина успішних реакцій при перенавчанні, %

Примітка: Достовірність різниці між показниками експериментальної та контрольної груп, при $p \leq 0,05$

Еритропоетин, у своїй системній дії, сприяє насиченню тканин мозку киснем. Це відбувається двома шляхами: вазоділятацією та стимуляцією еритропоезу (ЕПО збільшує кількість молодих еритроцитів та вміст в них гемоглобіну). Тож, покращення когнітивних здібностей, що було отримано в результаті експерименту можна пояснити системною жією еритропоетину.

ВИСНОВКИ

1. З'ясовано, що вазоактивні речовини різноспрямовано впливають на зміни ваги у експериментальних групах. Динаміка змін ваги спільна у груп, що отримували еритропоетини з малою та середньою концентраціями, та протилежна – у групі, яка отримувала еритропоетин у середній концентрації. Уведення нікотинової кислоти достовірно не впливало на вагу тварин. Показано, що нікотинова кислота, впливаючи на тонус судин, збільшує кровонаповнення та вагу селезінок досліджуваних тварин.
2. З'ясовано, що вміст лужної фосфатази менше у клітинах тварин, які отримували середні дози еритропоетину на відміну від тих, що отримували високі та низькі. Аналогічні результати отримані по кислій фосфатазі. З'ясовано, що нікотинова кислота пригнічує ферментативну активність еритроцитів, про що свідчать показники вмісту лужної та кислої фосфатаз. В умовах дії вазоактивних речовин збільшується рівень активності мієлопероксидази, що може бути результатом накопичення ферменту у клітинах, які не вивільняють його у кров.
3. Встановлено, що в умовах дії вазоактивних речовин спостерігається значне зменшення відносного вмісту паличкоядерних нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів на тлі підвищеного рівня сегментоядерних нейтрофілів, еозинофілів та базофілів.
4. Вплив еритропоетину на кістковий мозок має дозозалежний ефект. Найменша і найбільша концентрації викликають утворення більшої кількості еритробластів та пришвидшений вихід готових еритроцитів у периферичну кров. Тривале введення нікотинової кислоти збільшує кровонаповнення селезінки, що надалі веде до гіперплазією та збільшення кількості клітин.
5. З'ясовано, що вазоактивні речовини інтенсифікують обмін речовин у міокарді, збільшуючи споживання глюкози. Також змінюються окремі

компоненти електрокардіограми.

- б. Отже, активізація утворення еритроцитів, шляхом уведення еритропоєтину є фактором, який полегшує формування умовних рефлексів та покращує здатність до навчання у експериментальних мишей. Встановлено, що в умовах уведення різних доз ЕРО (тобто в усіх трьох серіях експерименту із стимуляції еритропоєзу) процес навчання та засвоєння необхідних навичок у мишей був достовірно більш ефективним. Аналіз динаміки часу ефективних пробіжок в лабіринті за 3 дні навчання для мишей, які приймали участь у кожній серії експерименту теж показала у мишей експериментальної групи більшу швидкість формування умовних рефлексів. Аналіз результатів тесту на перенавчання (тобто, гальмування вже утвореного умовного рефлексу, який виражався в переході на отримання харчового підкріплення у протилежному рукаві лабіринту) показав, що швидше «перенавчилися» пройшли миші експериментальної групи.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Arabpoor, Z.; Hamidi, G.; Rashidi, B.; Shabrang, M.; Alaei, H.; Sharifi, M.R.; Salami, M.; Dolatabadi, H.R.; Reisi, P. Erythropoietin improves neuronal proliferation in dentate gyrus of hippocampal formation in an animal model of Alzheimer's disease. *Adv. Biomed. Res.* 2012, 1, 50.
2. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2011 Jun;50(6):940-50. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.02.018. Epub 2011 Mar 6. PMID: 21385587.
3. Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, et al. Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia.* 2000;30:271–278
4. Bieber E. Erythropoietin, the biology of erythropoiesis and epoetin alfa. An overview. *J Reprod Med.* 2001 May;46(5 Suppl):521-30.
5. Blomhoff R, Andersen R, Arnesen EK, Christensen JJ, Eneroth H, Erkkola M, et al. *Nordic Nutrition Recommendations 2023.* Copenhagen: Nordic Council of Ministers; 2023
6. Bunn HF. Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Mar 1;3(3):a011619. doi: 10.1101/cshperspect.a011619
7. Chang, R.; Al Maghribi, A.; Vanderpoel, V.; Vasilevko, V.; Cribbs, D.H.; Boado, R.; Pardridge, W.M.; Sumbria, R.K. Brain Penetrating Bifunctional Erythropoietin-Transferrin Receptor Antibody Fusion Protein for Alzheimer's Disease. *Mol. Pharm.* 2018, 15, 4963–4973.
8. Chen TL, Chiang YW, Lin GL, Chang HH, Lien TS, Sheh MH, Sun DS. Different effects of granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin on erythropoiesis. *Stem Cell Res Ther.* 2018 May 2;9(1):119. doi: 10.1186/s13287-018-0877-2.
9. Choi, M.; Son, H. Effects of serotonin on erythropoietin expression in mouse hippocampus. *Exp. Neurobiol.* 2013, 22, 45–50.

10. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin: cytoprotection in vascular and neuronal cells. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2003 Jun;3(2):141-54. doi: 10.2174/1568006033481483.
11. Drexel H. Nicotinic acid in the treatment of hyperlipidaemia. *Fundam Clin Pharmacol*. 2007 Nov;21 Suppl 2:5-6. doi: 10.1111/j.1472-8206.2007.00530.x. PMID: 18001312.
12. Erik Lipšic, Regien G. Schoemaker, Peter van der Meer, Adriaan A. Voors, Dirk J. van Veldhuisen, Wiek H. van Gilst, Protective Effects of Erythropoietin in Cardiac Ischemia: From Bench to Bedside, *Journal of the American College of Cardiology*, Volume 48, Issue 11, 2006, Pages 2161-2167, ISSN 0735-1097, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.08.031>].
13. Freese R, Lysne V. Niacin - a scoping review for Nordic Nutrition Recommendations 2023. *Food Nutr Res*. 2023 Dec 12;67. doi: 10.29219/fnr.v67.10299.
14. Gerlai R. A new continuous alternation task in T-maze detects hippocampal dysfunction in mice A strain comparison and lesion study#pf3. <https://www.researchgate.net/publication/13530878>.
15. Gershbein LL. Effect of nicotinic acid and derivatives on rat liver regeneration. *Am J Physiol*. 1956 Jan;184(1):47-51. doi: 10.1152/ajplegacy.1955.184.1.47
16. Hasiuk O. Erythropoietin Affects on Behavioral Activity / O.Hasiuk // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології : матеріали VIII Міжнар. наук. конф. (Київ, 17-20 жовтня 2017 р.) / Київський національний університет імені Тараса Шевченка. К., 2017. – С. 13.
17. Hoff J. Methods of Blood Collection in the Mouse / Janet Hoff // *Lab Animal*. November 2000. Volume 29, № 10. P.47-53.
18. Huang S. An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow / S.Huang, L. Xu, Y. Sun, T. Wu, K. Wang, G. Li // *Journal of Orthopaedic Translation* (2015) 3, 26. e 33.

19. Jelkmann W, Elliott S. Erythropoietin and the vascular wall: the controversy continues. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013 Dec;23 Suppl 1:S37-43. doi: 10.1016/j.numecd.2012.04.002.
20. Jelkmann W, Wagner K. Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. *Ann Hematol* 2004;83:673–86.
21. Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev.* 1992;72:449–489.].
22. Kamanna VS, Kashyap ML. Mechanism of action of niacin. *Am J Cardiol.* 2008 Apr 17;101(8A):20B-26B. doi: 10.1016/j.amjcard.2008.02.029. PMID: 18375237.
23. Kong D, Li J, Shen Y, Liu G, Zuo S, Tao B, Ji Y, Lu A, Lazarus M, Breyer RM, Yu Y. Niacin Promotes Cardiac Healing after Myocardial Infarction through Activation of the Myeloid Prostaglandin D2 Receptor Subtype 1. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017 Mar;360(3):435-444. doi: 10.1124/jpet.116.238261.
24. Lai YF, Lin TY, Ho PK, Chen YH, Huang YC, Lu DW. Erythropoietin in Optic Neuropathies: Current Future Strategies for Optic Nerve Protection and Repair. *Int J Mol Sci.* 2022 Jun 27;23(13):7143. doi: 10.3390/ijms23137143
25. Lee, S.T.; Chu, K.; Park, J.E.; Jung, K.H.; Jeon, D.; Lim, J.Y.; Lee, S.K.; Kim, M.; Roh, J.K. Erythropoietin improves memory function with reducing endothelial dysfunction and amyloid-beta burden in Alzheimer's disease models. *J. Neurochem.* 2012, 120, 115–124.
26. Lin TY, Lai YF, Chen YH, Lu DW. The Latest Evidence of Erythropoietin in the Treatment of Glaucoma. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 16;23(24):16038. doi: 10.3390/ijms232416038
27. Lukasova M, Hanson J, Tunaru S, Offermanns S. Nicotinic acid (niacin): new lipid-independent mechanisms of action and therapeutic potentials. *Trends Pharmacol Sci.* 2011 Dec;32(12):700-7. doi: 10.1016/j.tips.2011.08.002.

28. Maurice, T.; Mustafa, M.H.; Desrumaux, C.; Keller, E.; Naert, G.; de la, C.G.-B.M.; Rodriguez Cruz, Y.; Garcia Rodriguez, J.C. Intranasal formulation of erythropoietin (EPO) showed potent protective activity against amyloid toxicity in the Abeta(2)(5)(-)(3)(5) non-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Psychopharmacol.* 2013, 27, 1044–1057
29. McKenney J. New perspectives on the use of niacin in the treatment of lipid disorders. *Arch Intern Med.* 2004 Apr 12;164(7):697-705. doi: 10.1001/archinte.164.7.697. PMID: 15078639.
30. Meyers CD, Liu P, Kamanna VS, Kashyap ML. Nicotinic acid induces secretion of prostaglandin D2 in human macrophages: an in vitro model of the niacin flush. *Atherosclerosis.* 2007 Jun;192(2):253-8. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.07.01
31. Noguchi K, Yamashiro S, Matsuzaki T, Sakanashi M, Nakasone J, Miyagi K. Effect of 1-week treatment with erythropoietin on the vascular endothelial function in anaesthetized rabbits. *Br J Pharmacol.* 2001;133:395–405. ;
32. Ratajczak J, Majka M, Kijowski J, et al. Biological significance of MAPK, AKT and JAK-STAT protein activation by various erythroFigure 1. Biological functions of erythropoietin (EPO). Classical hematopoietic effect and 2 mechanisms by which EPO renders cardioprotection in experiments. *JACC Vol. 48, No. 11, 2006* Lipšic et al. 2165 December 5, 2006:2161–7 Erythropoietin in Cardiac Ischemia poietic factors in normal human early erythroid cells. *Br J Haematol* 2001;115:195–204.].
33. Roberts, N.. (2015). *Manual Morphometry. Brain Mapping: An Encyclopedic Reference.* 1. 333-343. 10.1016/B978-0-12-397025-1.00303-1
34. Roux, C.M.; Leger, M.; Freret, T. Memory Disorders Related to Hippocampal Function: The Interest of 5-HT4Rs Targeting. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 12082.

35. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:4635–4640
36. Santhanam AV, d'Uscio LV, Katusic ZS. Cardiovascular effects of erythropoietin an update. *Adv Pharmacol*. 2010;60:257-85. doi: 10.1016/B978-0-12-385061-4.00009-X. PMID: 21081221; PMCID: PMC3907121].
37. Santos RD. Farmacologia da niacina ou ácido nicotínico [Pharmacology of niacin or nicotinic acid]. *Arq Bras Cardiol*. 2005 Oct;85 Suppl 5:17-9. Portuguese. Epub 2006 Jan 2. PMID: 16400392.
38. Savino C., Pedotti R., Baggi F. et al. Delayed administration of erythropoietin and its non-erythropoietic derivatives ameliorates chronic murine autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2006;172:27-37.
39. Schoener B, Borger J. Erythropoietin Stimulating Agents. [Updated 2023 Mar 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536997/>
40. Shibata K, Fukuwatari T, Suzuki C. Pharmacological doses of nicotinic acid and nicotinamide are independently metabolized in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2014;60(2):86-93. doi: 10.3177/jnsv.60.86.
41. Shim K-H, Ha S, Choung JS, Choi JI, Kim DY, Kim JM, Kim M. Therapeutic Effect of Erythropoietin on Alzheimer's Disease by Activating the Serotonin Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(15):8144. <https://doi.org/10.3390/ijms23158144>.
42. Shingo, T.; Sorokan, S.T.; Shimazaki, T.; Weiss, S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J. Neurosci*. 2001, 21, 9733–9743.
43. Siren AL, Fratelli M, Brines M, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:4044–4049

44. Sorg H, Harder Y, Krueger C, Reimers K, Vogt PM. The nonhematopoietic effects of erythropoietin in skin regeneration and repair: from basic research to clinical use. *Med Res Rev.* 2013 May;33(3):637-64. doi: 10.1002/med.21259.
45. Tang WW, Stead RA, Goodkin DA. Effects of Epoetin alfa on hemostasis in chronic renal failure. *Am J Nephrol.* 1998;18(4):263-73. doi: 10.1159/000013349].
46. Torelli AG, Cristante AF, de Barros-Filho TEP, Dos Santos GB, Morena BC, Correia FF, Paschon V. Effects of ganglioside GM1 and erythropoietin on spinal cord injury in mice: Functional and immunohistochemical assessments. *Clinics (Sao Paulo).* 2022 Feb 19;77:100006. doi: 10.1016/j.clinsp.2022.100006.
47. Villa P., Bigini P., Mennini T. et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med* 2003;198:971-975.
48. Vitellaro-Zuccarello, L.; Mazzetti, S.; Madaschi, L.; Bosisio, P.; Gorio, A.; De Biasi, S. Erythropoietin-mediated preservation of the white matter in rat spinal cord injury. *Neuroscience* 2007, 144, 865–877.
49. Watanabe M, Okada T. Langendorff Perfusion Method as an Ex Vivo Model to Evaluate Heart Function in Rats. *Methods Mol Biol.* 2018;1816:107-116. doi: 10.1007/978-1-4939-8597-5_8. PMID: 29987814.
50. Weishaupt JH, Rohde G, Pölking E, Siren AL, Ehrenreich H, Bähr M. Effect of erythropoietin axotomy-induced apoptosis in rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 May;45(5):1514-22. doi: 10.1167/iovs.03-1039
51. Yamaji R., Okada T., Moriya M. et al. Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA. *Eur. J. Biochem.* 1996; 239:494-500.

52. Zák A, Zeman M, Vecka M, Tvrzická E. Kyselina nikotinová: lek neprávem opomíjený [Nicotinic acid: an unjustly neglected remedy]. *Cas Lek Cesk.* 2006;145(11):825-31. Czech. PMID: 17168412.
53. Zeman M, Vecka M, Perlík F, Staňková B, Hromádka R, Tvrzická E, Širc J, Hrib J, Žák A. Pleiotropic effects of niacin: Current possibilities for its clinical use. *Acta Pharm.* 2016 Dec 1;66(4):449-469. doi: 10.1515/acph-2016-0043.
54. Zheng Y, Chen ZY, Ma WJ, Wang QZ, Liang H, Ma AG. B Vitamins Supplementation Can Improve Cognitive Functions and May Relate to the Enhancement of Transketolase Activity in A Rat Model of Cognitive Impairment Associated with High-fat Diets. *Curr Med Sci.* 2021 Oct;41(5):847-856. doi: 10.1007/s11596-021-2456-5.
55. Вахтіна Т.М. Вплив великих доз еритропоєтину на стан нервової системи та поведінку білих мишей / Т.М.Вахтіна, О.М. Гасюк // Магістерські студії. Альманах. Вип. 17 (2). – Херсон. ХДУ, 2017. – С. 47-49.
56. Гасюк О.М, Динаміка засвоєння глюкози ізольованою селезінкою в умовах впливу нікотинової кислоти / О.М,Гасюк, Ю.С.Самойленко // Сучасні проблеми біології, екології та хімії: матеріали V Міжнар. наук. конф. (Запоріжжя, 26-28 квітня 2017 р.) / Запорізький національний університет. Запоріжжя, 2017. – С. 139-140.
57. Гасюк О.М. Вплив інтерлейкіну-2 на адаптаційні реакції крові лабораторних мишей в умовах фізичного навантаження / В.А. Швець, С.П. Бєсчасний, // Український журнал медицини, біології та спорту. – 2020. - №5. – С. 349-356.
58. Гасюк О.М. Динаміка споживання глюкози міокардом під впливом еритропоєтину (на моделі «Ізольоване серце») / О.М.Гасюк, О.К.Чумарин // Ліцейська освіта : Навч.-метод. зб. / Херсон. міськ. рада, Херсон. академ. ліцей ім. О. В. Мішукова. Вип. XXXVI. – Херсон: Видавничий дім «Гельветика», 2017. – С. 13-14.

- 59.Гасюк О.М. Електрична активність міокарду в умовах алергічної реакції / С.П. Бесчасний, О.М. Гасюк, Ю.А. Бевзюк // Сьогоднішня біологічна наука : матеріали II Міжнародної наукової конференції (09-11 листопада 2018 р., м. Суми) – Суми : ФОП Цьома С. П., 2018. – 176-178 с.
- 60.Гасюк О.М. Клітинні основи кровотворення : навч.-метод. посіб. / О. М. Гасюк – Херсон : ФОП Вишемирський В. С., 2019. – 92 с.
- 61.Гасюк О.М. Поведінкова активність в умовах дії еритропоетину / О.М.Гасюк // Індивідуальні психофізіологічні особливості людини та професійна діяльність: матеріали VI Всеукр. наук. конф. (Черкаси, 20-22 вересня 2017 р.) / Черкаський національний університет імені Б. Хмельницького. Черкаси, 2017. – С. 23.
- 62.Гасюк О.М. Участь TNF-рецептор-асоційованого фактору (TRAF3) в імунних реакціях (огляд) / Ю.С. Ануфрієва, С.П. Бесчасний, О.М. Гасюк // Український журнал медицини, біології та спорту. – 2020. - №6. – С. 329-335.
- 63.Гасюк О.М. Участь рекомбінантного еритропоетину у адаптації до фізичних навантажень / О.М.Гасюк // Фізіологічний журнал / НАНУ, Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця. – Київ, 2019. – Т. 65, №3. – С. 93-94. ISSN 0201-8489
- 64.Гасюк, О. М. Біологічна дія еритропоетину у різних концентраціях на культуру клітин / О.М.Гасюк, О.С.Максименко, А.В.Шкуропат // Український журнал медицини, біології та спорту. – 2017. - №4. С. 185-188.
- 65.Левченко Г.О. Плейотропна дія гемопоез-стимулюючого фактору / О.М.Гасюк, Г.О. Левченко // Магістерські студії. Альманах. Вип. 17 (2). – Херсон. ХДУ, 2017. – С. 80-82.
- 66.Манько В.В. Основи техніки лабораторних робіт у фізіологічних дослідженнях [навчальний посібник] / Гальків М.О., Клевець М.Ю – Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2005. – 133 с.

67. Маслянка А. Морфометричні показники селезінки в умовах дії вазоактивних речовин // О.Гасюк, А.Маслянка // Матеріали Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Тенденції та перспективи розвитку науки і освіти в умовах глобалізації»: Зб. наук. праць. - Переяслав, 2019. - Вип. 53. - С. 15-17.
68. Мельник О. В., Гасюк О. М. Вміст малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів у еритроцитах крові в умовах уведення нікотинової кислоти. Proceedings of the 5th International scientific and practical conference. SPC —Sci-conf.com.ua. Kharkiv, Ukraine. 2021. Pp. 138-143.
69. Морфологія клітин крові лабораторних тварин і людини: Атлас / В. М. Запорожан, В. К. Напханюк, Н. О. Горянова та ін. - Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2002. - 118 с.
70. Половинко Т. Когнітивні процеси білих мишей в умовах дії еритропоез-стимулюючого фактора / О.М. Гасюк, Т.Половинко // Ліцейська освіта: Навч.-метод. зб. / Херсон. міськ. рада, Херсон. академ. Л 65 лицей ім. О.В. Мішукова. Вип. XXXVII. – Херсон: Видавничий дім «Гельветика», 2018. – С. 14-15.
71. Практикум з біологічної хімії [Текст]: Навчальний посібник / М. В. Шевряков, Б. В. Яковенко, О. Ф. Явоненко. – Суми: ВТД "Університетська книга", 2003. – 204 с.
72. Тищенко О.І. Формування умовних рефлексів у мишей при стимуляції еритропоезу / О.М.Гасюк, О.І.Тищенко // Магістерські студії. Альманах. Вип. 17 (2). – Херсон. ХДУ, 2017. – С. 115-116.
73. Тукан А.І. Деякі фізіологічні ефекти рекомбінантних еритропоетинів α та β / О.М. Гасюк, А.І. Тукан // Магістерські студії. Альманах. Вип. 18 (2). – Херсон. ХДУ, 2018 – С. 620-622.
74. Чепель І. Властивості селезінки та периферичної крові в умовах дії нікотинової кислоти / О.Гасюк, І.Чепель // Ліцейська освіта: Навч.-метод. зб. / Херсон. академ. лицей ім. О.В. Мішукова. Вип. XXXVIII. – Херсон: Видавничий дім «Гельветика», 2019. – С. 6 – 7.