

**Одеський національний університет імені І.І. Мечникова**  
**Міністерство освіти і науки України**

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**СІДЛЕЦЬКИЙ ОЛЕКСІЙ СЕРГІЙОВИЧ**

УДК 612.75:616-007.234:591.465.3(043.5)

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**СТАН КІСТОК САМОК ЩУРІВ ПРИ ПОРУШЕННІ ФУНКЦІЇ  
ЯЄЧНИКІВ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЯ**

091 Біологія

09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

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

\_\_\_\_\_ О. С. Сідлецький

(підпис)

Науковий керівник: Макаренко Ольга Анатоліївна, д.б.н., с.н.с., зав. каф. фізіології, здоров'я і безпеки людини та природничої освіти ОНУ імені І. І. Мечникова

Одеса–2025

## АНОТАЦІЯ

Сідлецький О. С. Стан кісток самок щурів при порушенні функції яєчників та його корекція.

Кваліфікаційна наукова робота на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 091 Біологія - Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, Одеса, 2025.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню стану кісткової тканини та травного тракту у самок лабораторних щурів при оваріоектомії та інтоксикації піретроїдним інсектицидом  $\alpha$ -циперметрином, а також профілактики порушень у кістковій тканині, які викликані дисфункцією яєчників.

Для реалізації мети та виконання завдань дисертаційної роботи проведено дві серії експериментів на самках лабораторних щурів та дослідження *in silico*. Утримання лабораторних тварин відбувалось згідно правил роботи з експериментальними тваринами, встановлених Директивою Європейського парламенту та Ради (2010/63/EU) та наказом Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України від 01.03.2012 р. № 249. Щури знаходились на постійному харчовому та питному режимі у віварію ОНУ імені І. І. Мечникова.

Завданням першого етапу роботи було дослідження остеопроєкторної та протизапальної ефективності профілактичного комплексу на основі кверцетину, мінералів та вітамінів у оваріоектомованих щурів, які отримували неповноцінний за вмістом кальцію та білка раціон.

Дефіцит естрогенів, білка та кальцію впродовж чотирьох місяців призвів до зменшення щільності стегнової кістки та кістки поперекових хребців на 8,96 % та 13,89 % відповідно. Вміст мінерального компоненту знизився на 22,84 % у кістці стегна та на 29,63 % у кістці хребців. Отримані дані виступають ознакою розвитку остеодистрофічних явищ у кістковій тканині на тлі змодельованої патології.

В альвеолярній частині нижньої щелепи оваріоектомованих щурів з дефіцитом білка та кальцію відбувалось двократне збільшення активності кислої та лужної фосфатаз, що вказує на активацію остеокластогенезу, а також на компенсаторний захист кісткової тканини від посиленої резорбції. Підвищення активності кісткової еластази на 37,8 % свідчить про надмірну деструкцію колагену I типу у кістковій тканині. Вміст маркера окислювального стресу – малонового діальдегіду – не зазнав достовірних змін, але активність антиоксидантного ферменту каталази достовірно зросла на 10,78 %.

Оваріоектомія в комбінації з дефіцитом білка та кальцію у їжі щурів призвели до збільшення екскреції кальцію з сечею, зменшення його виведення з калом та гальмування загальної абсорбції кальцію в організмі на 16,9 %. В слизових оболонках ШКТ при змодельованій патології спостерігали зростання активності кислої фосфатази на 16,49 – 29,57 %, еластази – на 28,72 – 93,73 %, уреазі – на 41,00 – 227,01 %, вмісту малонового діальдегіду – на 25,78 – 35,65 %. Отримані дані демонструють наявність виражених запальних змін з розвитком перекисного окислювання ліпідів та збільшенням мікробної контамінації у слизових оболонках травного тракту.

Вживання комплексу кверцетину, вітамінів та мінералів сприяло збільшенню щільності на 6,94 % та вмісту мінерального компоненту на 22,47 % у стегновій кістці. У кістковій тканині хребців щільність зросла на 5,48 %, через збільшення вмісту мінерального компоненту на 26,94 %. Атрофія альвеолярної частини нижньої щелепи стала меншою на 22,9 %. Отримані дані слугують доказом вираженої остеопроєкторної дії розробленого комплексу, що підтверджується біохімічним аналізом кісткової тканини пародонта. В альвеолярній частині нижньої щелепи активність кісткових фосфатаз та еластази досягла нормальних значень, активність каталази та вміст малонового діальдегіду мали тенденцію до зменшення.

Профілактичний комплекс не вплинув на виведення кальцію в оварієктомованих щурів. Водночас, завдяки додатковому вмісту цього елемента в складі комплексу, його засвоєння зросло на 72,6%. Введення запропонованого комплексу викликало гальмування проявів запалення та деструкції білків у травному тракті: активність кислої фосфатази зменшилась на 8,39 – 21,79 %, еластази – на 16,38 – 37,85 %, на тлі нормалізації вмісту малонового діальдегіду (зменшення на 20,49 – 23,03 %). Протизапальна та цитопротекторна активність складових комплексу сприяла кращому засвоєнню кальцію, що додатково вплинуло на зменшення проявів деструкції кісткової тканини оварієктомованих самок.

Хоча всі складові даної добавки мають стабілізуючі властивості щодо кісткової тканини, найбільше значення в процесах пригнічення остеорезорбції та ініціації остеогенезу, на нашу думку, мали кверцетин та цитрат кальцію.

Наступний етап дослідження остеопроєкторної дії комплексу кверцетину, вітамінів С та D<sub>3</sub>, макро- та мікроелементів планували проводити в умовах тривалого впливу  $\alpha$ -циперметрину. У зв'язку з цим, доцільним було спрогнозувати можливі взаємодії  $\alpha$ -циперметрину, його метаболітів та кверцетину з  $\alpha$ -рецептором естрогенів (ER $\alpha$ ) в умовах *in silico*. З цією метою нами було використано програми AutoDock 4.2.6 (далі AutoDock4), AutoDockVina-1.2.5 (далі AutoDockVina) та Schrödinger Maestro Glide. Для прогнозування фармакокінетичних особливостей та токсичності дослідних сполук використовували платформи pkCSM та SwissADME. Були обрані 4 ліганд-зв'язуючих домени ER $\alpha$ : два в комплексі з ендogenous агоністом естрадіолом (1GWR, 1ERE), один – в комплексі з агоністом ралоксифеном (1ERR), один в комплексі з антагоністом 4-гідрокситамоксифеном (3ERT)

Інсектицид  $\alpha$ -циперметрин показав прогнозовані значення докінгу з 1GWR, 1ERE та 1ERR (комплекси з агоністами) за оцінкою AutoDock4 в межах від – 10,4 до – 9,7 ккал/моль, в той час як з 3ERT (комплекс з

антагоністом) енергія докінгу склала  $-9,6$  ккал/моль. Метаболіт  $\alpha$ -циперметрину 3-феноксibenзойна кислота (3-РВА) мав значення енергії зв'язування з ліганд-зв'язуючими доменами ER $\alpha$  в комплексі з агоністами від  $-6,2$  до  $-5,9$  ккал/моль, при докінгу з 3ERT даний показник склав  $-5,8$  ккал/моль. Інший метаболіт  $\alpha$ -циперметрину 3-(2,2-дихлоетеніл)-2,2-диметилциклопропанкарбонова кислота (DCCA) продемонстрував енергію докінгу з 1GWR, 1ERE та 1ERR в межах від  $-4,8$  до  $-5,3$  ккал/моль, а з 3ERT  $-5,2$  ккал/моль. Таким чином, за оцінкою AutoDock4 можна припустити більший агонізм  $\alpha$ -циперметрину та 3-РВА, ніж антагонізм, хоча показники афінності для всіх обраних структур ER $\alpha$  загалом були близькими за значеннями, що ускладнює остаточний висновок.

AutoDockVina прогнозує, що енергії докінгу  $\alpha$ -циперметрину з ліганд-зв'язуючими доменами ER $\alpha$  в комплексі з агоністами складають від  $-9,0$  до  $-8,0$  ккал/моль, для 3-РВА дані показники коливались між  $-8,0$  та  $-7,5$  ккал/моль, в той час як для DCCA – між  $-6,0$  та  $-5,5$  ккал/моль. Енергії зв'язування даних сполук з 3ERT склали від  $-7,9$  (для  $\alpha$ -циперметрину) до  $-6,1$  ккал/моль (для DCCA). Отже за оцінкою AutoDockVina можна також допустити як агонізм, так і антагонізм перелічених сполук до ER $\alpha$ , через близькість значень докінгу з ER $\alpha$  в комплексах з агоністами та антагоністами.

Використання програми Schrödinger Maestro Glide дозволяє встановити антагонізм  $\alpha$ -циперметрину щодо ER $\alpha$ , оскільки його енергія зв'язування при докінгу з 3ERT є значно нижчою в порівнянні з іншими варіантами ліганд-зв'язуючих доменів ER $\alpha$  (Gscore склав  $-9,29$  ккал/моль). Найнижчі показники афінності для 3-РВА спостерігали з 1GWR та 1ERE, найвищі – з 1ERR (ЛЗД ER $\alpha$  в комплексі з ралоксифеном), що свідчить про агоністичну дію даного метаболіту  $\alpha$ -циперметрину. DCCA продемонстрував найнижчі показники Gscore з 1ERE та 3ERT, що також робить неможливим однозначно стверджувати про активацію чи інактивацію ER $\alpha$  цим метаболітом.

За результатами всіх програм (AutoDockVina, AutoDock 4, Schrödinger Maestro Glide) кверцетин демонструє нижчі показники енергії зв'язування порівняно з метаболітами  $\alpha$ -циперметрину, що свідчить про здатність флавоноїду витіснити інсектицид при їх конкурентному зв'язуванні з ER $\alpha$ . Висока афінність кверцетину до 1GWR, 1ERE, 1ERR (комплексів ER $\alpha$  з агоністами) вказує на його виражений агонізм щодо ER $\alpha$ . За оцінкою Schrödinger Maestro Glide, значення Gscore для кверцетину були нижчими, ніж для  $\alpha$ -циперметрину при зв'язку з 1GWR, 1ERE, 1ERR, що додатково підтверджує його конкурентну перевагу у взаємодії з ER $\alpha$ .

Аналіз механізмів взаємодії дослідних сполук з обраними структурами ER $\alpha$  у сайтах зв'язування встановив, що кверцетин утворює водневі зв'язки з тими ж залишками амінокислот, що і естрадіол. Піретроїд  $\alpha$ -циперметрин та його метаболіти формують інший тип зв'язку з амінокислотними залишками 1GWR, 1ERE, 1ERR, ніж естрадіол, але мають певну подібність до докінгу з 3ERT, як у референтного антагоністу 4-гідрокситамоксифену.

Таким чином оцінка афінності  $\alpha$ -циперметрину, 3-PBA, DCCA значною мірою залежала від програмного забезпечення та ускладнювалася близькістю показників між обраними структурами ER $\alpha$ . Тим не менш, результати докінг-аналізу та характер взаємодії  $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів з залишками амінокислот ЛЗД ER $\alpha$  свідчать про їхню афінність до ER $\alpha$  із переважно антагоністичною дією. Кверцетин також демонструє високу афінність до ER $\alpha$ , подібну до естрадіолу, що вказує на виражену агоністичну активність флавоноїду та його здатність витіснити інсектицид з ER $\alpha$ .

Згідно з даними платформ pkCSM і SwissADME, кверцетин характеризується сприятливими фармакокінетичними параметрами та лікоподібністю та має низьку токсичність. Це дає змогу розглядати його як перспективний профілактичний засіб при ряді патологій. Піретроїд  $\alpha$ -циперметрин за оцінкою цих платформ є високотоксичним.

Для підтвердження естрогеноподібної та, як наслідок, остеопроєкторної, дії кверцетину у складі профілактичного комплексу

вітамінів, макро- та мікроелементів на заключному етапі проведено дослідження на самках щурів, які отримували  $\alpha$ -циперметрин в дозі 10 мг/кг впродовж 120 днів.

Тривалий вплив  $\alpha$ -циперметрину призвів до подовження естрального циклу у самок за рахунок збільшення стадії дієструсу на 72,58 %. Рівень естрадіолу у сироватці крові при інтоксикації збільшувався удвічі, але це не супроводжувалося збільшенням органного індексу матки. Натомість органний індекс яєчників зменшився на 28,13 %. Отримані дані свідчать про порушення контролю рівня естрадіолу механізмами негативного зворотнього зв'язку через імовірне блокування рецепторів естрогенів, апоптичні явища у яєчниках та відсутність естрогенової стимуляції тканин матки.

При вживанні  $\alpha$ -циперметрину з одночасним прийомом розробленого профілактичного комплексу відбувалась нормалізація тривалості естрального циклу, рівня естрадіолу та органного індексу яєчників. Результати доказують виражену естрогеноподібність комплексу та його високі гонадопротекторні властивості в умовах інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином.

В кістковій тканині самок щурів з інтоксикацією  $\alpha$ -циперметрином встановлено достовірне зменшення щільності стегнових кісток та поперекових хребців на 3,34 % та 3,21 %, відповідно. Зниження вмісту мінерального компоненту в даних кістках складало: 10,23 % у стегновій кістці та 10,24 % у хребцях. Ступінь атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи тварин збільшився на 10,82 %. В альвеолярній частини спостерігали активацію лужної фосфатази на 32,25 %, кислої фосфатази – на 29,82 %, еластази – утричі. Активність антиоксидантного ферменту каталази у кістковій тканині зросла на 39,62 % при збільшенні вмісту малонового діальдегіду на 38,90 %. Зазначені зміни у кістковій тканині подібні до тих, що відбувались при оваріоектомії та дефіциті нутрієнтів та виступають ознакою посилення резорбційних та окислювальних процесів за умови тривалого впливу  $\alpha$ -циперметрину, що може бути пов'язано з його ендокринно-руйнівною дією.

Вживання комплексу вітамінів та мінералів на тлі інтоксикації піретроїдом викликало збільшення щільності кістки стегна на 3,66 % та хребців – на 3,75 %, зростання вагової частки мінерального компоненту на 9,93 % у стегновій кістці та на 14,21% у поперекових хребцях, зменшення атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи на 16,86 %. Профілактичне застосування вітамінно-мінерального комплексу у щурів за умов інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином, сприяло нормалізації біохімічних показників в альвеолярній частині нижньої щелепи, зокрема зниженню активності кислої фосфатази на 20,50 %, лужної фосфатази – на 40,31 %, еластази – на 30,75 % , каталази – на 26,35 %, а також зменшенню вмісту МДА на 29,77 %.

Тривалий вплив  $\alpha$ -циперметрину, так само, як оваріоектомія з дефіцитом білка та кальцію, спричинив у слизових оболонках ШКТ самок щурів збільшення активності кислої фосфатази на 14,07 – 20,00 %, еластази – на 39,43 – 41,04 %, вмісту МДА – на 33,82 % у ротовій порожнині та шлунку. Застосування комплексу на тлі інтоксикації ефективно попереджувало активацію маркерів запалення і пероксидації ліпідів у слизових оболонках ШКТ.

Проведені дослідження *in silico* та на самках щурів встановили небезпеку інсектициду  $\alpha$ -циперметрину через блокування рецепторів естрогенів, порушення контролю рівня естрадіолу механізмами негативного зворотнього зв'язку, апоптичні явища у яєчниках та, як наслідок, активацію резорбції у кістковій тканині і запалення у травному тракті тварин. За результатами *in silico* флавоноїд кверцетин на тлі низької токсичності володіє естрогеноподібною дією, потенціалом витіснити  $\alpha$ -циперметрин та його метаболіти з рецепторів естрогену, наявністю задовільних фармакокінетичних параметрів та лікоподібності. Встановлені властивості кверцетину надають змогу розглядати його, як перспективний засіб при дефіциті естрогенів або блокуванні їх рецепторів.

Комплекс кверцетину, вітамінів та мінералів в умовах оваріоектомії або інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином за рахунок синергетичного впливу його



компонентів проявив остеопротекторну, протизапальну та антиоксидантну дію, що виражалось в збалансованості процесів ремоделювання кісткової тканини за нормалізацією морфометричних та біохімічних параметрів. На нашу думку, значний внесок у стабілізацію стану кісткової тканини надала спроможність комплексу попереджувати наслідки дефіциту естрогенів та гонадотоксичні ефекти  $\alpha$ -циперметрину завдяки естрогеноподібній активності кверцетину. Протизапальні та антиоксидантні ефекти комплексу в травному тракті тварин з патологією покращували засвоєння кальцію, що додатково сприяло мінералізації позаклітинного матриксу кісткової тканини.

**Ключові слова:** щури, кісткова тканина, травний тракт, остеодистрофія, остеопороз, запалення, молекулярний докінг-аналіз, поліфеноли,  $\alpha$ -циперметрин, яєчники, естрадіол, естральний цикл, апоптоз, антиоксидантна активність, інтоксикація.

## ABSTRACT

Sidletskyi O. S. Condition of bone tissue in female rats with ovarian dysfunction and its correction

Qualification research work (manuscript).

Dissertation for the degree of Candidate of Biological Sciences (Doctor of Philosophy) in the specialty 091 Biology – I. I. Mechnikov Odesa National University, Odesa, 2025.

The dissertation is devoted to the study of bone tissue and gastrointestinal tract conditions in female laboratory rats under ovariectomy and intoxication with the pyrethroid insecticide  $\alpha$ -cypermethrin, as well as the prevention of bone tissue disorders caused by ovarian dysfunction.

Two series of experiments on female rats and in silico studies were conducted to achieve the research objectives. The maintenance of laboratory animals complied with the European Parliament and Council Directive (2010/63/EU) and the order of the Ministry of Education and Science, Youth and Sports of Ukraine dated 01.03.2012 No. 249. The animals were kept under a constant diet and water regimen in the vivarium of I. I. Mechnikov ONU.

The first stage of the study investigated the osteoprotective and anti-inflammatory efficacy of a preventive complex based on quercetin, minerals, and vitamins in ovariectomized rats receiving a diet deficient in calcium and protein.

Estrogen, protein, and calcium deficiency over four months led to an 8.96% and 13.89% decrease in femoral and lumbar vertebral bone density, respectively. The mineral content decreased by 22.84% in the femur and 29.63% in the vertebrae. These findings indicate osteodystrophic changes in the bone tissue under the modeled pathology.

In the alveolar part of the mandible of ovariectomized rats with protein and calcium deficiency, a twofold increase in acid and alkaline phosphatase activity was observed, indicating osteoclastogenesis activation and a compensatory

mechanism against excessive bone resorption. A 37.8% increase in bone elastase activity indicated excessive type I collagen destruction. Although malondialdehyde (MDA) levels showed no significant changes, catalase activity increased by 10.78%.

Ovariectomy combined with protein and calcium deficiency resulted in increased urinary calcium excretion, decreased fecal calcium excretion, and a 16.9% reduction in total calcium absorption. The mucous membranes of the gastrointestinal tract (GIT) exhibited increased acid phosphatase activity (16.49–29.57%), elastase (28.72–93.73%), urease (41.00–227.01%), and MDA content (25.78–35.65%), indicating inflammation, lipid peroxidation, and microbial contamination.

The quercetin, vitamin, and mineral complex increased femoral bone density by 6.94% and mineral content by 22.47%. In vertebral bone tissue, density increased by 5.48%, with a 26.94% increase in mineral content. Alveolar part of the mandible atrophy decreased by 22.9%, confirming the complex's osteoprotective effect through biochemical analysis of periodontal bone tissue. Acid and alkaline phosphatase and elastase activities normalized, while catalase activity and MDA content showed a decreasing trend.

The preventive complex did not affect calcium excretion but improved its absorption by 72.6% due to its calcium content. The complex reduced inflammatory and destructive changes in the GIT, lowering acid phosphatase activity by 8.39–21.79%, elastase by 16.38–37.85%, and MDA by 20.49–23.03%. These anti-inflammatory and cytoprotective effects contributed to better calcium absorption, reducing bone tissue destruction in ovariectomized females.

The most significant contributors to osteoresorption inhibition and osteogenesis initiation were quercetin and calcium citrate.

The second research phase planned to investigate the osteoprotective effect of the quercetin, vitamin C, D3, and mineral complex under prolonged  $\alpha$ -cypermethrin exposure. In silico modeling was used to predict interactions between  $\alpha$ -cypermethrin, its metabolites, and quercetin with estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ),

employing AutoDock 4.2.6, AutoDockVina-1.2.5, and Schrödinger Maestro Glide software. Pharmacokinetics and toxicity predictions were performed using pkCSM and SwissADME platforms. Four ER $\alpha$  ligand-binding domains were selected: with estradiol (1GWR, 1ERE), raloxifene (1ERR), and 4-hydroxytamoxifen (3ERT).

Docking scores from AutoDock 4 ranged from  $-10.4$  to  $-9.7$  kcal/mol for  $\alpha$ -cypermethrin with agonist complexes (1GWR, 1ERE, 1ERR) and  $-9.6$  kcal/mol with the antagonist complex (3ERT). The  $\alpha$ -cypermethrin metabolite 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) showed binding energies of  $-6.2$  to  $-5.9$  kcal/mol with agonist complexes and  $-5.8$  kcal/mol with 3ERT. Another metabolite, DCCA, demonstrated binding energies of  $-4.8$  to  $-5.3$  kcal/mol with agonist complexes and  $-5.2$  kcal/mol with 3ERT.

AutoDockVina predicted docking energies of  $-9.0$  to  $-8.0$  kcal/mol for  $\alpha$ -cypermethrin,  $-8.0$  to  $-7.5$  kcal/mol for 3-PBA, and  $-6.0$  to  $-5.5$  kcal/mol for DCCA. Schrödinger Maestro Glide identified  $\alpha$ -cypermethrin as an ER $\alpha$  antagonist, with a Gscore of  $-9.29$  kcal/mol for 3ERT. Quercetin demonstrated lower binding energies than  $\alpha$ -cypermethrin metabolites, indicating its potential to displace  $\alpha$ -cypermethrin from ER $\alpha$ .

In silico results showed quercetin's estrogenic action, high ER $\alpha$  affinity, and favorable pharmacokinetics with low toxicity, positioning it as a promising preventive agent against estrogen deficiency and receptor blockade.

In vivo experiments on  $\alpha$ -cypermethrin-intoxicated rats revealed estrous cycle prolongation (72.58% increase in diestrus), doubled estradiol levels without uterine index changes, and a 28.13% reduction in ovarian index, indicating estrogen receptor blockade and ovarian apoptosis. The preventive complex normalized these parameters, demonstrating estrogen-like and gonadoprotective properties.

Bone density reductions of 3.34% (femur) and 3.21% (vertebrae) and mineral content decreases of 10.23% (femur) and 10.24% (vertebrae) were observed under  $\alpha$ -cypermethrin intoxication. Atrophy of the alveolar part of the mandible increased by 10.82%, with elevated alkaline phosphatase (32.25%), acid

phosphatase (29.82%), and elastase (3-fold). Catalase activity rose by 39.62%, and MDA by 38.90%. These changes indicate enhanced resorption and oxidative stress similar to ovariectomy and nutrient deficiency.

The preventive complex increased femoral bone density by 3.66% and vertebral density by 3.75%, with mineral content rising by 9.93% (femur) and 14.21% (vertebrae). trophic decreased by 16.86%. The complex normalized alveolar part of the mandible biochemical markers, reducing acid phosphatase by 20.50%, alkaline phosphatase by 40.31%, elastase by 30.75%, catalase by 26.35%, and MDA by 29.77%.

GIT inflammation under  $\alpha$ -cypermethrin intoxication mirrored ovariectomy results, with increased acid phosphatase (14.07–20.00%), elastase (39.43–41.04%), and MDA (33.82%). The complex effectively prevented these inflammatory and oxidative changes.

In silico and in vivo studies confirmed  $\alpha$ -cypermethrin's estrogen receptor-blocking and endocrine-disrupting effects, leading to bone resorption and GIT inflammation. Quercetin exhibited estrogen-like, osteoprotective, and gonadoprotective activities, low toxicity, and favorable pharmacokinetics.

The quercetin, vitamin, and mineral complex synergistically provided osteoprotective, anti-inflammatory, and antioxidant effects, stabilizing bone remodeling parameters. Quercetin's estrogen-like activity was pivotal in countering estrogen deficiency and gonadotoxic effects, while its anti-inflammatory and antioxidant properties improved calcium absorption and bone mineralization.

**Keywords:** rats, bone tissue, digestive tract, osteodystrophy, osteoporosis, inflammation, molecular docking analysis, polyphenols,  $\alpha$ -cypermethrin, ovaries, estradiol, estrous cycle, apoptosis, antioxidant activity, intoxication.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### *Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації*

1. Сідлецький О. С., Майкова Г. В., Макаренко О. А. Експериментальне обґрунтування профілактики деструкції кісткової тканини пародонта щурів з оваріоектомією кальційвмісними препаратами. *Вісник ОНУ. Біологія*. 2022. Т. 27, вип. 2(51). С. 77 – 87. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2022.2\(51\).268534](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2022.2(51).268534)
2. Сідлецький О. С., Макаренко О. А. Корекція порушень засвоєння кальцію та резорбції кісткової тканини у щурів з гіпоестрогенією та аліментарним дефіцитом білка і кальцію. *Актуальні проблеми транспортної медицини*. 2023. №3(73). С. 146 – 154. <http://doi.org/10.5281/zenodo.8254462>
3. Сідлецький О. С., Макаренко О. А. Профілактика порушень у слизових оболонках травного тракту самок щурів за дефіциту естрогенів, білка та кальцію. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2023. Вип. 89. С. 66–74. <http://doi.org/10.30970/vlubs.2023.89.07>
4. Сідлецький О. С., Макаренко О. А. Антиоксидантна ефективність профілактичного комплексу з кверцетином у оваріоектомованих щурів. *Вісник ОНУ. Біологія*. 2023. Т. 28, вип. 2(53). С. 140 – 152. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.2\(53\).293003](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.2(53).293003)
5. Makarenko O. A., Sidletskiy O. S., Khodakov I. V. The state of the liver, reproductive and musculoskeletal systems in female rats with prolonged exposure to  $\alpha$ -cypermethrin. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2024. V. 15(2). P. 235 – 244. <https://doi.org/10.15421/022435>
6. Акішева А. С., Сідлецький О. С., Молодан Ю. О., Макаренко О. А. Прогнозування механізмів взаємодії кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його похідних з  $\alpha$ -рецептором естрогену (дослідження in silico). *Вісник ОНУ. Біологія*. 2024. Т. 29, вип. 1(54). С. 81 – 105. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2024.1\(54\).309040](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2024.1(54).309040)

***Наукові праці, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації***

1. Сідлецький О. С., Майкова Г. В., Макаренко О. А. Профілактика резорбції альвеолярного відростка у щурів з оваріоектомією біологічно-активними добавками. *XXI-і читання В. В. Підвисоцького: бюлетень матеріалів наук конф.*, м. Одеса, 23-24 червня. 2022 р. Одеса: УкрНДІ медицини транспорту, 2022. С. 98 – 100.
2. Стан кісткової системи щурів з оваріоектомією при вживанні біологічно-активної добавки на основі раковин чорноморських устриць / Сідлецький О.С., Майкова Г.В., Макаренко О.А., Ходаков І.В. *Еколого-біологічна освіта в концепції “Єдине здоров’я”:* *Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. уч.*, м. Тернопіль, 27 – 29 квітн. 2022 р. С. 68 – 70.
3. Сідлецький О. С., Макаренко О. А. Тривалість естрального циклу та рівень естрадіолу у крові самок щурів з інтоксикацією  $\alpha$ -циперметрином. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція: тези доп. VI наук-практ. інт-конф. з міжнар. уч.*, м. Харків, 16 лист. 2023 р. Харків: НфаУ, 2023. С. 438 – 440.
4. Сідлецький О.С., Макаренко О.А. Профілактика резорбції щелеп у самок щурів за умови оваріоектомії та неповноцінної за складом дієти. *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації: матеріали V наук-практ. конф. студ. та мол. вчен. з міжнар. уч.*, м. Харків, 18 травн. 2023 р. Харків: НфаУ, 2023. С. 280-282.
5. Сідлецький О. С., Макаренко О. А. Гепатопротекторна дія комплексу на основі кверцетину при тривалій інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином. *XXIII-і читання В. В. Підвисоцького: бюлетень матеріалів наук конф.*, м. Одеса, 16-17 травня. 2024 р. Одеса: УкрНДІ медицини транспорту, 2024. С. 125 – 128.

6. Сідлецький О. С., Макаренко О. А. Стан кісток щурів при тривалому впливі  $\alpha$ -циперметрину. *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації*: матеріали V наук-практ. конф. студ. та мол. вчен. з міжнар. уч., м. Харків, 16 травн. 2024 р. Харків: НфаУ, 2024. С. 187 – 188.
7. Сідлецький О. С., Макаренко О. А. Профілактика остеопоротичного процесу у оваріоектомованих щурів. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція*: тези доп. VII наук-практ. інт-конф. з міжнар. уч., м. Харків, 14 лист. 2024 р. Харків: НфаУ, 2024. С. 438 – 440.
8. Сідлецький О. С., Макаренко О. А. Нейротоксичність  $\alpha$ -циперметрину та її профілактика кверцетин-вмісним комплексом. *Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку*: тези допов. всеукр. наук.-практич. конф. з міжнарод. участю, 9–12 квітня 2024, Одеса: Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2024. С. 47 – 50.
9. Акішева А.С., Сідлецький О. С., Макаренко О. А. Докінг-аналіз взаємодії кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину з  $\alpha$ -рецептором естрогену. *Ідеї. Практики. Перспективи сучасної освіти*: тези у збірнику Науково-методичний альманах ОНУ ім. І. І. Мечникова, 2025. С. 113 – 116.



## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	20
ВСТУП.....	21
РОЗДІЛ 1. ФУНКЦІОНУВАННЯ КІСТКОВОЇ ТКАНИН В НОРМІ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ (огляд літератури) .....	30
1.1 Сучасні уявлення про фізіологію кісткової тканини .....	30
1.1.1 Види та клітини кісткової тканини. Процес ремоделювання....	31
1.1.2 Роль естрогенів в ремоделюванні кісткової тканини .....	32
1.2 Етіологічні фактори порушення процесів ремоделювання кісткової тканини.....	44
1.2.1 Піретроїдні інсектициди, як ендокринні деструктори та фактор розвитку порушень у кістковій тканині .....	46
1.3 Сучасні засоби корекції остеодистрофії .....	49
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	55
2.1 Умови проведення експерименту.....	55
2.2 Препарати, які використовували у дослідженні .....	58
2.3 Методика комп'ютерного моделювання.....	60
2.4 Морфометричні методи дослідження.....	63
2.4.1 Морфометричні дослідження кісток .....	63
2.4.2 Підрахунок органного індексу.....	65
2.5 Методи біохімічного дослідження кісткової тканини .....	65
2.6 Методика дослідження засвоєння та виведення кальцію.....	66
2.7 Методи біохімічного дослідження слизових оболонок травного тракту та сироватки крові .....	67
2.8 Метод визначення тривалості естрального циклу.....	68
2.9 Статистичні методи дослідження.....	69
РОЗДІЛ 3. ОСТЕОПРОТЕКТОРНА ЕФЕКТИВНІСТЬ КОМПЛЕКСУ КВЕРЦЕТИНУ, ВІТАМІНІВ ТА МІНЕРАЛІВ В ОВАРІОЕКТОМОВАНИХ САМОК ЩУРІВ .....	71

3.1 Морфометричні дослідження стегнових кісток, хребців та альвеолярної частини нижньої щелепи .....	71
3.2 Біохімічні дослідження кісткової тканини альвеолярної частини нижньої щелепи .....	76
3.3 Виведення та засвоєння та кальцію у оваріоектомованих самок щурів при дефіциті білка і кальцію та за умови профілактики.....	79
3.4 Біохімічні показники запалення та окислювального стресу в слизових оболонках шлунково-кишкового тракту у оваріоектомованих самок щурів при дефіциті білка і кальцію та за умови профілактики .....	80
РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ <i>IN SILICO</i> ОСОБЛИВОСТЕЙ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КВЕРЦЕТИНУ, $\alpha$ -ЦИПЕРМЕТРИНУ ТА ЙОГО МЕТАБОЛІТІВ З $\alpha$ -РЕЦЕПТОРОМ ЕСТРОГЕНУ, ЇХ ФАРМАКОКІНЕТИКИ ТА ТОКСИЧНОСТІ .....	87
4.1 Докінг-аналіз кверцетину, $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів з $\alpha$ -рецептором естрогенів.....	88
4.2 Оцінка <i>in silico</i> фармакокінетичних властивостей та токсичності кверцетину, $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів.....	96
РОЗДІЛ 5. СТАН КІСТОК, СЛИЗОВИХ ОБОЛОНОК ТРАВНОГО ТРАКТУ І ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ПОКАЗНИКІВ ЯЄЧНИКІВ У САМОК ЩУРІВ ПІСЛЯ ІНТОКСИКАЦІЇ $\alpha$ -ЦИПЕРМЕТРИНОМ ТА ЇЇ ПРОФІЛАКТИЦІ.....	103
5.1 Функціональні показники яєчників у самок щурів при інтоксикації $\alpha$ -циперметрином та її профілактиці .....	104
5.2 Морфометричні дослідження поперекових хребців, стегнових кісток та альвеолярної частини нижньої щелепи у самок щурів при інтоксикації $\alpha$ -циперметрином та її профілактиці.....	109
5.3 Біохімічні дослідження кісткової тканини альвеолярної частини нижньої щелепи у самок щурів при інтоксикації $\alpha$ -циперметрином та її профілактиці.....	114

5.4 Біохімічні показники запалення та окислювального стресу в слизових оболонках шлунково-кишкового тракту у самок щурів при інтоксикації $\alpha$ -циперметрином та її профілактиці.....	117
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	122
ВИСНОВКИ.....	149
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	152
ДОДАТКИ.....	185

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- АФК – активні форми кисню
- КТ – кісткова тканина
- КФ – кисла фосфатаза
- ЛФ – лужна фосфатаза
- ЛЗД – ліганд-зв’язуючий домен
- МДА – малоновий діальдегід
- МСК – мезенхімальні стовбурові клітини
- ПНЯ – передчасна недостатність яєчників
- ПТГ – паратгормон
- ШКТ – шлунково-кишковий тракт
- DCCA – 3-(2,2-дихлоретеніл)-2,2-диметилциклопропанкарбонова кислота
- 4-F-3-PBA – 4-фтор-3-феноксibenзойна кислота
- 3-PBA – 3-феноксibenзойна кислота
- ERK – extracellular signal-regulated kinases (кіназа, яка регулюється позаклітинним шляхом)
- FGF23 – fibroblast growth factor (фактор росту фібробластів)
- JNK - c-Jun N-terminal kinases (c-Jun N-термінальна кіназа)
- МАРК – мітоген-активована протеїнкіназа 1 (mitogen-activated protein kinases)
- М-CSF – макрофагальний колонієстимулюючий фактор (macrophage colony-stimulating factor)
- NFATc1 - nuclear factor of activated T-cells 1 (ядерний фактор активованих Т клітин 1)
- NF-κB - nuclear factor-каппа В (ядерний фактор каппа-В)
- OPG - osteoprotegerin (остеопротегерин)
- RANK - receptor activator for nuclear factor κB (рецептор-активатор ядерного фактору каппа-В)
- RANKL - ліганд RANK
- TNF-α - tumor necrosis factor (фактор некрозу пухлин-α)
- WNT - signaling pathways (сигнальний шлях Wnt)

## ВСТУП

На сьогоднішній день проблема остеопатій, та зокрема остеопорозу, є важливим медико-соціальним викликом в Україні та світі. За даними систематичного огляду 2022 року, глобальна поширеність остеопенії складає 40,4 % [135]. Близько 23,1 % жінок та 11,7 % чоловіків у світі хворіють на остеопороз [208, 239].

У 2019 році кількість хворих на остеопороз в країнах Європейського Союзу складала близько 25,5 млн жінок та 6,5 млн чоловіків. Випадки остеопоротичних переломів зафіксовані у 4,3 млн людей. Прогнозується, що у 2034 році кількість таких переломів зросте на чверть в порівнянні з 2019 роком [182]. В Україні за дослідженням Українського науково-медичного центру проблем остеопорозу в 2023 році, остеопороз виявлено у 20% жінок від 50 років і старше [26].

Остеопатії представляють небезпеку для осіб обох статей, але жінки більш схильні до розвитку цих патологій. Так, більше третини хворих на остеопороз – жінки у постменопаузі. Згасання ендокринної функції яєчників тягне за собою посилення остеокластогенезу, пригнічення функції остеобластів, посилення апоптозу остеоцитів [135, 231, 239]. Менопаузальні зміни можуть виникнути раніше за нормальний фізіологічний вік через передчасну недостатність яєчників (ПНЯ). Припинення менструації до 45 років зустрічається у 5% жінок, до 40 років – в 1%, у віці від 30 до 40 років – в однієї з тисячі, а до 30 років – в однієї з десяти тисяч [4]. Вважається, що кількість жінок з ПНЯ у світі невпинно зростає [240].

ПНЯ супроводжується значним ризиком виникнення остеопатій. Оцінка поширеності низької кісткової маси при ПНЯ коливається від 8 до 27% залежно від етіологічного фактора та віку пацієнта. Поширеність остеопорозу та ризик переломів у жінок із ПНЯ вдвічі вищі, ніж у загальній популяції, при цьому частота остеопорозу вдвічі перевищує показники у жінок після фізіологічної менопаузи [158]. Частота остеопоротичних змін у кістці стегна

жінок з ПНЯ складає в середньому 42,3 %, хребців – 57,5 % [254]. За даними Jones et al. [74] ризик остеопорозу та ризик переломів у жінок із ПНЯ на 37% і 45% відповідно вище порівняно з жінками, у яких менопауза настала в звичайному віці.

Одним із етіологічних факторів ПНЯ вважається вплив ендокринних деструкторів – екзогенних хімічних речовин, які втручаються в процеси ендокринної регуляції. До таких сполук відносяться бісфенол А, фталати, поліхлорвініли, діоксини, пестициди. Вони здатні порушувати роботу гормональної системи, через імітування дії гормонів, блокування рецепторів, перешкоджання синтезу, транспорту та розпаду ендогенних гормонів [3, 6, 114, 222, 199].

Одним із розповсюджених хімічних факторів з властивостями ендокринних деструкторів, слід визнати пестициди, з огляду на їхню поширеність у довкіллі та масштабність можливих негативних наслідків для широких верств населення [48]. Серед всіх класів пестицидів, інсектициди (засоби направлені на боротьбу з комахами-шкідниками) представляють найбільшу небезпеку для нецільових видів, включаючи людину [107]. У сучасному світі, в тому числі в Україні, найбільш поширеними є піретроїдні інсектициди, оскільки їх вважають менш токсичними ніж хлорорганічні, фосфоорганічні та карбаматні інсектициди [52, 203, 214].

Одним із найбільш поширених піретроїдів у світі є циперметрин, який здатний порушувати функцію яєчників через окислювальний стрес та спорідненість з рецепторами естрогенів. Піретроїди можуть викликати розвиток запалення та окислювального стресу в травному тракті та, таким чином, опосередковано впливати на засвоєння кальцію та погіршувати мінералізацію кісткової тканини [51, 63, 110, 139]. Однак сьогодні мало відомо про токсичність ізомерів циперметрину, зокрема  $\alpha$ -циперметрину, який дуже активно застосовується людиною [221, 229]. Також залишається недостатньо вивченим вплив піретроїдних інсектицидів на стан кісткової

тканини, обмовлений їх здатністю передчасно пригнічувати ендокринну активність яєчників [64, 222].

Для попередження розвитку остеопатій при фізіологічній і передчасній менопаузі застосовують препарати статевих гормонів, біфосфонати, антитіла до склеростину та паратгормону, селективні модулятори естрогенових рецепторів. Проте, висока ефективність терапії супроводжується низкою побічних ефектів: алергічні реакції, порушення з боку травного тракту, захворювання серцево-судинної системи, підвищений ризик злоякісних новоутворень [163, 172].

Потенціальною, безпечною альтернативою остеопротекторним препаратам можуть стати флавоноїди, зокрема кверцетин. Відомими є ефекти кверцетину, які здатні модулювати гормональний баланс і компенсувати наслідки дефіциту естрогенів, зокрема в кістковій тканині [163, 172]. За нашим припущенням, поєднання кверцетину з біологічно-активними добавками кальцію, макро- та мікроелементів, вітамінів С та D<sub>3</sub>, які приймають участь у регуляції ремоделювання кісткової тканини, може ефективно покращити стан кісток в умовах дисфункцій жіночих гонад.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дисертаційна робота виконана в рамках наукових тем кафедри фізіології, здоров'я і безпеки людини та природничої освіти ОНУ імені І. І. Мечникова «Дослідження лікувально-профілактичних властивостей раковин молюсків Чорного моря» (№ ДР 0119U000499), «Дослідження механізмів розвитку патологічних станів у людини та тварин під впливом ксенобіотиків» (№ ДР 0124U004566) та ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії НАМН України» «Експериментальне дослідження змін тканин ротової порожнини у щурів під впливом ксенобіотиків та гіпоксії» (№ ДР 0120U105477), «Експериментальне обґрунтування розробки профілактичних засобів для запобігання метаболічних порушень, які викликані ксенобіотиками воєнного походження» (№ ДР 0123U102321). Здобувач був співвиконавцем фрагментів тем.

**Мета.** Дослідження стану кісток самок щурів при порушенні функції яєчників різної етіології та обґрунтування схеми профілактики можливих порушень.

**Завдання дослідження.**

1. Дослідити остеопроєкторну ефективність комплексу кверцетину, вітамінів та мінералів за морфометричними параметрами кісток стегна, поперекових хребців та альвеолярної частини нижньої щелепи, а також за біохімічними маркерами остеокласто- та остеобластогенезу, окислювального стресу в альвеолярній частини нижньої щелепи оваріоектомованих самок щурів при аліментарному дефіциті білка та кальцію.
2. Встановити стан слизових оболонок травного тракту, а також ступінь засвоєння та виведення кальцію у оваріоектомованих самок на тлі дефіциту білка і кальцію та профілактичні ефекти комплексу вітамінів та мінералів.
3. За допомогою комп'ютерного моделювання з'ясувати особливості взаємодії  $\alpha$ -циперметрину, його метаболітів та кверцетину з  $\alpha$ -рецептором естрогенів, профіль токсичності  $\alpha$ -циперметрину та кверцетину, а також лікоподібність кверцетину.
4. Дослідити функціональний стан яєчників самок щурів після тривалої дії  $\alpha$ -циперметрину та профілактичну ефективність комплексу кверцетину, вітамінів та мінералів в умовах інтоксикації піретроїдом.
5. Виявити вплив запропонованого комплексу препаратів на параметри кісток стегна, хребців, альвеолярної частини нижньої щелепи та біохімічні маркери окислювального стресу, остеокласто- та остеобластогенезу в альвеолярній частини нижньої щелепи самок щурів за умови впливу  $\alpha$ -циперметрину.
6. Оцінити стан слизових оболонок травного тракту самок щурів після тривалого впливу  $\alpha$ -циперметрину за показниками запалення та перекисного окислення ліпідів та ефективність профілактичного комплексу.

*Об'єкт дослідження* – метаболічні порушення у кістковій тканині та слизових оболонках травного тракту при дисфункціях яєчників.



*Предмет дослідження* – морфометричні та біохімічні показники кісткової тканини, маркери запалення у травному тракті оваріоектомованих щурів та при інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином; тривалість естрального циклу, органні індекси яєчників та матки, рівень естрадіолу у крові, прогнозовані показники афінності та вільної енергії зв'язування  $\alpha$ -циперметрину, його метаболітів та кверцетину з  $\alpha$ -рецептором естрогенів, параметри лікоподібності та токсичності  $\alpha$ -циперметрину та кверцетину в умовах *in silico* (комп'ютерне моделювання).

Методи дослідження – патофізіологічні (моделювання оваріоектомії з дефіцитом білка та кальцію, інтоксикація  $\alpha$ -циперметрином); біохімічні (за маркерами запалення, ремоделювання кісткової тканини, окислювального стресу, рівня естрадіолу); фізіологічні (за ступенем абсорбції кальцію, тривалістю естрального циклу); морфологічні (за щільністю, вмістом мінерально-органічного компоненту кісток, атрофією альвеолярної частини нижньої щелепи, органного індексу матки та яєчників); докінг-аналіз (взаємодія  $\alpha$ -циперметрину, його метаболітів, кверцетину з  $\alpha$ -рецептором естрогенів, параметри лікоподібності та токсичності кверцетину та  $\alpha$ -циперметрину); статистичний аналіз результатів.

### **Наукова новизна отриманих результатів.**

На підставі результатів експериментальних досліджень поглиблені знання про патогенез остеодистрофії в умовах оваріоектомії, яка ускладнена аліментарним дефіцитом білка та кальцію. Встановлено, що остеорезорбція при оваріоектомії та дефіциті нутрієнтів супроводжується розвитком запалення, окислювального стресу, дисбіозу у травному тракті на тлі суттєвого гальмування абсорбції кальцію.

В умовах *in silico*, з використанням декількох програм для докінг-аналізу, показано можливий антагонізм  $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів до  $\alpha$ -рецептору естрогенів, що допускає їх деструктивний вплив на ендокринну систему. Оцінка докінгу кверцетину встановила його виражену агоністичну дію з  $\alpha$ -рецептором естрогенів поряд з лікоподібністю та

властивостями витіснити  $\alpha$ -циперметрин з рецепторів при конкурентному зв'язуванні.

Встановлено гонадотоксичні властивості  $\alpha$ -циперметрину за збільшенням тривалості естрального циклу за рахунок стадії дієструсу, збільшення рівня естрадіолу в крові, зменшення органного індексу яєчників у щурів. Це підтверджує антиестрогенний характер інсектициду через глибокі порушення вісі гіпоталамус-гіпофіз-гонади та механізмів негативного зворотнього зв'язку.

Вперше виявлено посилення резорбції кісткової тканини стегна, хребців та альвеолярної частини нижньої щелепи у самок щурів за умови тривалого впливу  $\alpha$ -циперметрину. Зроблено припущення щодо зв'язку остеодистрофічних змін з гонадотоксичними ефектами  $\alpha$ -циперметрину.

Визначили компенсаторну активацію остеогенезу та антиоксидантного захисту кісткової тканини альвеолярної частини нижньої щелепи самок щурів при інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином, що вказує на схожість розвитку остеодистрофії після оваріоектомії та головну ланку патогенезу – дефіцит естрогенів.

Показано, що оваріоектомія разом з дефіцитом білка та кальцію в їжі викликає у щурів більш інтенсивні патологічні процеси у кістковій тканині ніж інтоксикація  $\alpha$ -циперметрином.

Встановлена *in silico* агоністична дія кверцетину до  $\alpha$ -рецептору естрогенів поряд з лікоподібністю та властивостями витіснити  $\alpha$ -циперметрин з рецепторів, а також деструктивні явища у кістках і травному тракті оваріоектоміваних щурів та після інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином, дозволили обґрунтувати використання профілактичного комплексу для попередження порушень у статевій, кістковій травній системах в умовах патології яєчників різної етіології.

### **Практичне значення отриманих результатів.**

З'ясування ролі дефіциту естрогенів у патогенезі порушень кісткової тканини, що індуковані впливом  $\alpha$ -циперметрину, стало основою для

рекомендацій використання профілактичного комплексу на основі кверцетину, вітамінів С та D, мікро- та мікроелементів в умовах інтоксикації завдяки антиоксидантним, протизапальним, остеопротекторним властивостям.

Застосування запропонованого комплексу дозволило нормалізувати процеси остеогенезу, попередити активацію остеорезорбції та підтримати мінеральну щільність кісткової тканини в умовах дефіциту естрогенів. Профілактичний комплекс гальмував розвиток запалення та оксидативного стресу, які викликані  $\alpha$ -циперметрином у травному тракті щурів.

Результати експериментального дослідження дають підставу рекомендувати використання компонентів профілактичного комплексу в клінічній практиці для осіб із високим ризиком розвитку остеодистрофії, пов'язаної з дефіцитом естрогенів або впливом ендокринних деструкторів.

#### **Особистий внесок дисертанта.**

Дисертантом проведено аналіз літературних джерел за обраною темою. Разом із науковим керівником визначенні мета та завдання дослідження, обрані методи дослідження, сформовані висновки. При підготовці робіт [30], [34], [37] до публікації здобувач брав участь у моделюванні патології, зборі та підготовці матеріалу для дослідження, проведенні біохімічних та морфометричних досліджень, здійснив обробку первинних даних, аналіз наукових джерел. В статті [32] особистий внесок здобувача полягав в оцінці впливу змодельованої патології та профілактики на показники перекисного окислення ліпідів та активності антиоксидантного ферменту каталази, обробці та інтерпретації первинних даних, розрахунку антиоксидантно-прооксидантного індексу. В роботі [157] особистий внесок здобувача полягав в моделюванні інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином, дослідженні тривалості естрального циклу, розрахунку органного індексу яєчників, біохімічному та морфометричному дослідженні кісткової тканини, обробці первинних даних, аналізі наукових джерел. В дослідженні, опублікованому в статті

[25], здобувач приймав участь у виконанні докінг-аналізу, аналізі наукових джерел та інтерпретації отриманих даних.

За допомогу у виконанні морфометричних та біохімічних досліджень висловлюємо подяку співробітникам лабораторії біохімії ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицьової хірургії НАМН України» к.б.н. Хромагіній Л. М. та н.с. Ходакову І. В., за допомогу у проведенні комп'ютерного моделювання – аспірантці біологічного факультету ОНУ імені І. І. Мечникова – Акішевій А. С.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи були оприлюднені на: науковій конференції «XXI–і читання В. В. Підвисоцького» (Одеса, 2022) [31], науково-практичній конференції з міжнародною участю «Еколого-біологічна освіта в концепції «Єдине здоров'я» (Тернопіль, 2022) [42], VI науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (Харків, 2023) [39], V науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» (Харків, 2023) [40], науковій конференції «XXIII–і читання В. В. Підвисоцького» (Одеса, 2024) [33], VI науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» (Харків, 2024) [38], VII науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (Харків, 2024) [36], всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку» (Одеса, 2024) [35]. При підготовці тез [31] та [42] до публікації здобувач брав участь у моделюванні патології та профілактики її ускладнень, біохімічних та морфометричних дослідженнях, статистичній обробці даних, написанні тез. При підготовці матеріалів до конференції [39] здобувачем проведено

моделювання інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином, написання тексту тез, дослідження тривалості естрального циклу, аналіз даних. В роботах, які включені до збірок матеріалів конференції [40], [33], [38], [36] та [35] здобувач брав участь в моделюванні патології, аналізі матеріалу, інтерпретації отриманих даних та їх порівнянні з попередніми дослідженнями. При підготовці тез [1], аспірант брав участь у проведенні докінг-аналізу дослідних сполук.

**Публікації.** За результатами дисертації опубліковано: 6 статей у наукових фахових виданнях України, 9 тез у матеріалах конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація викладена на 199 сторінках комп'ютерного тексту і складається з анотацій, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів власних досліджень, аналізу та обговорення результатів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Дисертація ілюстрована 15 рисунками і 26 таблицями. Перелік використаних джерел містить 262 найменувань (49 кирилицею і 213 латиницею).

## РОЗДІЛ I. ФУНКЦІОНУВАННЯ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ В НОРМІ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ (огляд літератури)

### 1.1 Сучасні уявлення про фізіологію кісткової тканини

Кісткова тканина (КТ) представляє собою різновид сполучної тканини і складається з клітинних елементів та позаклітинного матриксу. Клітинними елементами КТ є остеобласти, остецити та остеокласти. Міжклітинна речовина, яка синтезується остеобластами, містить органічний компонент (волокна) та неорганічний мінеральний компонент. Головні функції КТ – захисна, опорна, метаболічна [47, 72].

Важливість позаклітинного матриксу полягає у структурній підтримці КТ та створенні основи для мінералізації. Отже, дана структура забезпечує такі функції кістки, як захисна та опорна [19].

Метаболічна функція КТ обумовлена тим, що вона є головним джерелом кальцію та фосфору в організмі, які депонуються в ній. Близько 99 % від загального кальцію знаходиться у кістках у вигляді кристалів гідроксиапатиту кальцію, а близько 1 % кальцію – у позаклітинних рідинах. Фосфор також знаходиться в організмі здебільшого у складі гідроксиапатиту кальцію, близько 10 % – в інших тканинах, 2-3 % – циркулюють в позаклітинній рідині [28, 45, 241].

Обмін кальцію та фосфору в організмі регулюється рядом гормонів: паратгормоном (ПТГ), кальцитоніном, активною формою вітаміну D<sub>3</sub> – кальцитріолом, фактором росту фібробластів 23 (FGF23) [18, 241].

ПТГ секретується клітинами паращитоподібних залоз. Основна його функція – збільшувати реабсорбцію кальцію та знижувати реабсорбцію фосфору в нирках; ініціювати резорбційні процеси у КТ. В наслідок цього збільшується концентрація кальцію у крові [102, 241].

Кальцитонін – гормон щитоподібної залози, який зменшує реабсорбцію кальцію та фосфору у нирках та всмоктування кальцію у кишечнику, гальмує виділення ПТГ та пригнічує остеорезорбцію [128].

FGF23 – глікопротеїн, який виробляється остеоцитами. Основна функція FGF23 – зменшення реабсорбції фосфору в нирках, шляхом інгібування експресії натрій-фосфатних котранспортерів NaPi2a та NaPi2c в проксимальних каналцях нирок. Синтез FGF23 стимулюється збільшенням концентрації фосфору та кальцію у крові, дефіцитом заліза, гіпоксією [94, 116].

Вітамін D<sub>3</sub> під впливом ферменту цитохрому P450 CYP2R1 перетворюється у печінці на кальцифедіол (25-гідроксихолекальциферол), який у зв'язаній з білком формі надходить у нирки, де зазнає впливу 1 $\alpha$ -гідроксилази та перетворюється на кальцитріол. Кальцитріол збільшує всмоктування кальцію в кишечнику та його реабсорбцію у нирках [136, 237].

Таким чином КТ є динамічною структурою, яка залучена у метаболічні процеси. Все це підкреслює важливість здорового фізіологічного функціонування даної тканини для підтримання сталості внутрішнього середовища організму.

### **1.1.1 Види та клітини кісткової тканини. Процес ремоделювання**

Розрізняють грубоволокнисту та пластинчасту КТ. Грубоволокниста КТ характерна для ембріонального періоду. В дорослому організмі вона зустрічається тільки у швах черепа, місцях прикріплення м'язів та сухожиль до кісток. Для неї характерні різнонаправлені колагенові волокна, низький вміст мінералів.

Основною структурною одиницею пластинчастої КТ виступає кісткова пластинка, яка побудована з колагенових волокон мінералізованих кристалами гідроксиapatиту. Пластинчаста кістка може бути губчастою (епіфізарна частина трубчастих кісток) або компактною (наприклад, діафіз трубчастих кісток). В губчастій (трабекулярній) кістці пластинки (трабекули) розташовані у різних напрямках. Простір між трабекулами заповнений червоним кістковим мозком. Компактна КТ має впорядковане розташування пластинок, яке визначається ходом кровоносних судин. Таким чином

формується остеон – морфофункціональна одиниця кісткової тканини – група концентричних пластинок з клітинами між ними, а також каналами Гаверса та Фолькмана, в яких проходять кровоносні судини [46].

Підтримка структури та функцій КТ, досягається за рахунок злагодженого функціонування клітин: остеобластів, остеоцитів та остеокластів [228].

Остеобласти – клітини кубічної форми, які складають приблизно 4 – 6% від клітинного вмісту кісткової тканини. Попередниками (прогеніторами) остеобластів є мезенхімальні стовбурові клітини (МСК). Диференціація остеопрогеніторів ініціюється білками кісткового морфогенезу (ВМР) та групою білків Wntless (Wnt) [72, 152, 167].

Комплекс Wnt/ $\beta$ -катенин впливає на вибір стовбуровими клітинами лінії диференціювання. Wnt зв'язується з рецепторним комплексом МСК, що складається з рецептору Frizzled та корецепторних білків 5 та 6, які пов'язані з рецептором ліпопротеїнів низької щільності. Це створює умови за яких  $\beta$ -катенин переміщується до ядра остеопрогеніторної клітини, ініціюючи остеобластогенез [59, 68, 244]. Сигнальні ВМР посилюють остеогенне диференціювання, оскільки мають спільні з Wnt молекулярні мішені [54, 155, 257].

Для диференціації остеобластів важливими є експресія білку гомеобоксу Dlx5 та остерікс (OSX), які специфічно експресується в МСК з остеогенним потенціалом. RUNX2 є ще одним з ключових для остеобластогенезу білків, який регулює експресію колагену I типу, лужної фосфатази, кісткового сіалопротеїну, остеокальцину [83, 140, 166, 256]. Зрілі остеобласти активно синтезують компоненти немінералізованого кісткового матриксу – остеоїду – волокна, протеоглікани та глікопротеїни [72, 180].

Волокна кісткової тканини побудовані здебільшого з колагену I типу та в меншому ступені з колагену V типу. Поєднання таких молекул призводить до утворення фібрил, які утворюють волокнисту сітку, яка інкрустується кристалами неорганічного матриксу [11, 72, 152].



Основними протеогліканами у кістковій тканині є хондроїтинсульфат, кератансульфат, декорин, біглікан, фібромодулін, остеоадгерин. Протеоглікани залучені у процеси утворення фібрил колагену та їх впорядкованості, в контролі локалізації цитокінів, які задіяні у процесах остеорезорбції [72, 137, 200, 209].

Глікопротеїни є макромолекулами, що складаються з білка, до якого приєднана коротка розгалужена молекула цукру. У кістковій тканині наявні такі глікопротеїни, як остеонектин, остеопонтин, остеокальцин. Остеонектин ініціює відкладання солей кальцію та забезпечує їх приєднання до волокон колагену. Остеопонтин та кістковий сіалопропротеїн забезпечують міграцію клітин, з'єднання клітин з волокнами колагену, беруть участь у процесах мінералізації. Остеокальцин – має високу спорідненість до  $\text{Ca}^{2+}$  за умови карбоксильовання трьох залишків глютамінової кислоти залежним від вітаміну К способом. Окрім мінералізації матриксу, остеокальцин може регулювати активність остеокластів, а в некарбоксильованій формі стимулювати виділення інсуліну підшлунковою залозою, адипонектину – адипоцитами, підтримувати когнітивні функції [11, 72, 129, 169, 178].

Мінералізація кісткового матриксу протікає у дві фази: везикулярну та фібрилярну. У першій фазі відбувається виділення остеобластами везикул, в мембрані яких знаходиться лужна фосфатаза, що відщеплює фосфатні групи від оточуючих фосфатвмісних молекул. Глікопротеїни, які синтезуються остеобластами, локально концентрують кальцій. При руйнації глікопротеїнів, іони кальцію потрапляють в середину везикули. Таким чином, формується середовище з високою концентрацією кальцію та фосфату, які в середині везикул утворюють кристали гідроксиапатиту кальцію –  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Фібрилярна фаза виникає через ріст кристалів гідроксиапатиту та їх вихід в оточуючий матрикс, через розрив мембрани лізосом [11, 137, 152, 178, 241].

Остеобласти живуть доволі короткий час – 3-5 місяців впродовж нормального циклу ремоделювання. Після цього остеобласти можуть залишитися вбудованими у матрикс та стати остеоцитами, клітинами

вистілки ендосту або періосту, або загинути через апоптоз. За фізіологічних умов, апоптоз остеобластів стимулює диференціацію нових остеопрогеніторів та посилює формування нової КТ [145].

Клітини вистілки формуються за умови знаходження остеобластів на поверхні кістки або навколо кістково-мозкової порожнини. Вважають, що ці клітини перешкоджають надмірній резорбції кістки [72].

Остеоцити – клітини зірчатої форми, які складають 90 – 95 % від усіх клітин кістки та мають найбільшу тривалість життя – до 25 років. Приблизно 5-20 % остеобластів стають остеоцитами. Впродовж тривалого часу вважалося, що остеоцити це відносно неактивні клітини, але наразі погляд на них змінився [99].

Диференціація остеоцитів починається з того, що остеобласт зменшує утворення матриксу та залишається оточеним ним, це створює умови за яких матрикс деградує і в ньому утворюються лакуни та каналці. На наступному етапі білок E11 контролює зріст цитоплазматичних відростків. Потім у цей процес залучаються тубулін, віментин, актин [71, 79, 244].

Остеоцити здатні стимулювати проліферацію остеобластів, вивільняючи оксид азоту та простагладини. В той же час вони здатні пригнічувати формування кістки через виділення білка склеростина, який зв'язується з білками 5 та 6, що пов'язані з рецептором ліпопротеїнів низької щільності. Відомо, що механічне навантаження зменшує експресію склеростина. Остеоцити також є джерелом ліганда рецептора-активатора ядерного нуклеотидного фактора каппа-В (RANKL), що визначає їх роль в процесах ремоделювання кістки, які будуть розглянуті нижче [71, 78, 160, 179, 215].

Остеоцити не залишаються ізольованими у лакунах. Вони з'єднані між собою та іншими клітинами за допомогою чисельних цитоплазматичних відростків, які проходять через каналці між лакунами, що заповнені міжклітинною рідиною. Дана система має назву лакуно-каналікулярної і

дозволяє швидко обмінюватися сигнальними молекулами з остеобластами, клітинами вистілки, кровоносним руслом [244].

Завдяки цій системі та рідині в ній остецити діють як механосенсори, що виконують регулюючу роль в адаптації кістки до механічних навантажень. Ключовим механізмом в цьому є явище механотрансдукції [72, 90, 137, 152] – процес трансформації фізичних змін при механічному навантаженні на кістки у біохімічні сигнали, які викликають резорбцію або остеогенез. Тому механічне навантаження необхідно для формування КТ [164, 244, 259].

Навантаження викликає стиснення або розтягнення в лакуно-каналікулярній системі, через це виникає зсув каналцевої рідини. Зміна потоку рідини виявляється остецитом за допомогою механосенсорів: білків інтегринів, кадгеринів, первинних війок, кальцієвих іонних каналів [164, 259]. В реакції кісткової тканини на електрохімічні та біохімічні стимули задіяні білки щільових контактів та геміканалів: білок конексин-43 та білок панексин-1 [89, 190, 191].

Зміна потоку рідини призводить до виникнення перехідного електричного потенціалу, який викликає відкриття кальцієвих каналів в мембранах остецитів та війках. Потік іонів кальцію стимулює вироблення в остециті таких факторів, як оксид азоту, простагландини, АТФ, які в свою чергу стимулюють диференціацію остеобластів з клітин-попередників. Потік кальцію також активує шлях мітоген-активованої протеїнкінази (МАРК), збільшуючи експресію остеобластичних маркерів в клітинах-попередниках [99, 164, 230, 244]. Таким чином наявність каналів та напівканалів дозволяє сформувати розгалужену мережу в КТ для швидкого обміну сигнальними молекулами та адаптації, що в деякій мірі уподібнює кісткову тканину нейронній мережі [81, 103, 133, 259].

Остеокласти – великі багатоядерні клітини, які утворюються з мононуклеарних клітин макрофагальної гемопоетичної лінії. Основна функція цих клітин – резорбція КТ за участю ферментів кислої фосфатази,

карбоангідрази II,  $H^+$ -АТФ-ази, еластази, катепсину К, металопротеїназ. Остеокласти грають велику роль у процесі ремоделювання кістки.

Ремоделювання – це складний процес резорбції (руйнування) та формування КТ, основна функція якого – її оновлення та підтримка мінерального гомеостазу при взаємопов’язаній дії остеобластів, остеокластів та остеоцитів. Ці клітини разом із клітинами вистілки, макрофагами, остеопрогеніторними клітинами формують базову багатоклітинну одиницю, яка вважається основною рушійною силою процесу ремоделювання. В середньому резорбція у базовій багатоклітинній одиниці у дорослої людини триває близько 3 тижнів, в той час як генерування нової тканини займає майже 4-6 місяці. 5 – 10 % скелету ремоделюється кожен рік, а вся кісткова тканина оновлюється впродовж 10 років [77, 183, 243]. В нормі ремоделювання кістки збалансоване: кількість зруйнованої тканини дорівнює кількості синтезованої, але при патології цей баланс може порушуватися, як у бік збільшення КТ, так і у бік її зменшення [243].

Ділянка кістки, що зазнає ремоделювання представляє собою тунель, який можна умовно поділити на три зони: 1) ріжучий конус (спостерігається велика кількість остеокластів, які активно резорбують кістку); 2) реверсійну зону (перехід від резорбції кістки до її утворення); 3) зону закриття (представлена мережею остеоцитів, які оточуються позаклітинним матриксом) [77, 243].

Активація процесу ремоделювання відбувається через апоптоз остеоцитів та остеобластів. Апоптоз в остеоцитах стимулює виділення білків групи хемотаксичного фактору, які рекрутують прогенітори остеокластів в зону мікроушкодження КТ [71]. Хемоатрактанти, що експресуються в остеобластах представлені фактором 1 стромальних клітин та фракталкіном [150].

Остеобласти та їх попередники також вироблять ряд факторів, які стимулюють або інгібують остеокластогенез. Диференціації та активації остеокластів сприяють інтерлейкини IL-3, IL-11, IL-6, IL-1; TNF- $\alpha$ .

Пригнічують остеокластогенез фактор росту пухлин бета, інтерлейкини IL-13, IL-10, IL-4 [24].

Перетворення клітин-попередників в остеокласти відбувається під впливом колонієстимулюючого фактору (M-CSF) та RANKL. M-CSF синтезується МСК, остеобластами, клітинами вистілки та сприяє проліферації та виживанню попередників остеокластів [76]. Взаємодія M-CSF з рецептором призводить до фосфорилування залишків тирозину в хвості рецептора. Фосфорильовані залишки тирозину, опосередковуючи активацію кінази, що регулюється зовнішньоклітинним шляхом (ERK), підтримують проліферацію клітин-попередників остеокластів та активують фактор транскрипції FOXO, завдяки чому ініціюється поділ клітини-попередника [77, 117, 151, 171, 210, 224, 242].

RANKL експресується остеобластами, остеоцитами, активованими T- та B-лімфоцитами, клітинами вистілки. Даний ліганд, який відноситься до суперродини TNF- $\alpha$ , існує у двох формах: мембранозв'язаній та розчинній. Розчинна форма RANKL утворюється коли під дією матриксної металопротеїнази 14 або білку ADAM10 від поверхні клітини відщеплюється мембранозв'язана форма [24, 80, 119]. RANKL взаємодіє з рецептором RANK, який експресується, як в клітинах-попередниках, так і в зрілих остеокластах. Остеобласти та остеоцити також синтезують білок остеопротегерин (OPG), який виступає своєрідним «рецептором-пасткою» для RANKL, конкурентно зв'язуючись з ним, тим самим запобігаючи надмірній резорбції.

Система RANKL/RANK/OPG є ключовою в резорбції кістки. При зв'язуванні RANKL та RANK, до рецептору приєднується TRAF6 (фактор пов'язаний з рецептором TNF). Необхідність TRAF6 обмовлена тим, що цитоплазматична ділянка RANK не має власної кіназної активності, тому виникає потреба у наявності молекул-адапторів для ініціації каскаду сигналів. Ядерний фактор каппа-B (NF- $\kappa$ B) знаходиться у цитоплазмі в секвестрованому вигляді завдяки інгібіторам каппа-B (I $\kappa$ B), тому для його

ініціації необхідно викликати їх деградацію. TRAF6 опосередковує деградацію даних інгібіторів через активацію кінази каппа-В. NF- $\kappa$ B в свою чергу, як напряду так і опосередковано, через протоонкоген c-Fos, призводить до посилення експресії ядерного фактору активованих Т-клітин (NFATc1), який стимулює диференціювання клітин-попередників у зрілі остеокласти [80, 84, 120, 187, 246].

Комплекс RANKL-RANK активує сигнальні шляхи MAPK: N-термінальну кіназу c-Jun, яка запускає ланцюг реакцій за участю c-Fos; p38 – який діє через активований протеїн 1; ERK кіназу. Зазначені сигнальні шляхи посилюють експресію NFATc1 у макрофагальних клітинах-попередниках остеокластів [77, 227, 236, 251]. NFATc1 задіяний у синтезі білку специфічного для дендритних клітин та трансмембранного білку, які забезпечують злиття моонуклеарних попередників у багатоядерний остеокласт. NFATc1 також задіяний в експресії специфічних для зрілих остеокластів маркерів: тартарат-резистентної кислої фосфатази, еластази, катепсину К, матриксної металопротеїнази-9 [77].

Остеокласт в процесі резорбції можна поділити на три зони: зона ущільнення, гофрована зона, базолатеральна зона. Зона ущільнення запобігає витіканню остеолітичних ферментів на ділянки кістки, які не повинні бути резорбовані. Ця зона формується завдяки полімеризації F-актину з утворенням актинового кільця з відростками – подосомами, які ізолюють область резорбції. Гофрована зона представляє собою складчасту мембрану з великою концентрацією везикул, які містять ферменти, що руйнують кістковий матрикс [137, 152].

Фермент карбонатгідраза II каталізує реакцію гідратації  $\text{CO}_2$  з утворення вугільної кислоти, яка дисоціює на протон водню та бікарбонат аніон. Протонні АТФ-азні насоси вивільняють протони водню у середовище резорбції, закислюючи його. При низькому рН створюються необхідні умови для функціонування кислої фосфатази, яка руйнує гідроксиapatит КТ. Органічний компонент руйнується під дією катепсину К та еластази [44, 132].

Утилізація продуктів резорбції відбувається через базолатеральну зону, яка відповідає за транцитоз речовин у позаклітинний простір [72,77, 183].

Під час переходу від резорбції КТ до її утворення, відбувається апоптоз остеокластів, підготовка резорбованої поверхні для остеогенезу, поділ та диференціація остеобластів та їх міграція [77, 223].

Вважають, що остеобластогенез стимулюється через молекулярні сигнали від остеокластів та латентні фактори, які були відкладені остеобластами в матриксі. В якості прикладу факторів, які звільняються з кісткового матриксу при резорбції кістки, можна навести інсуліноподібний фактор росту 1, фактор росту пухлин, BMPs, ендотеліальний фактору росту. Фактори, які синтезуються безпосередньо в остеокластах наступні: афамін, BMP6, кардіотрофін, хемокиновий ліганд-16, фактор росту гепатоцитів, фактор росту тромбоцитів, сфігнозин – 1 – фосфат [132].

На даному етапі під впливом наведених вище факторів, МСК диференціюються та стають преостеобластами. Далі взаємодія між остеокластами та преостеобластами відбувається через двусторонню сигналізацію ефринами, що призводить до їх остаточної диференціації у зрілі остеобласти [60, 77, 102, 132].

Регуляторами, що сприяють апоптозу остеокластів, виступають статеві гормони (естрогени, тестостерон), OPG, IL-12, IL-18, IL-33, інтерферон гамма, фактор росту пухлин бета (TGFβ). Дані сполуки збільшують експресію проапоптичних білків: TRAIL, Vax, FasL, Fas [161, 226].

Таким чином, взаємодія клітин кісткової тканини в нормальних фізіологічних умовах підтримує міцність кісток, їх здатність до регенерації та адаптації до умов навколишнього середовища, а також важлива для регуляції мінерального балансу в організмі.

### **1.1.2 Роль естрогенів в ремоделюванні кісткової тканини**

Жіночі статеві гормони грають ключову роль в регуляції багатьох фізіологічних процесів. Розуміння функцій, які вони виконують є необхідним

для усвідомлення важливості підтримки гормонального балансу в організмі жінки та масштабів негативних ефектів, внаслідок дії патологічних факторів, які викликають ендокринні порушення з боку статевої системи.

Серед жіночих статевих гормонів виділяють естрогени та прогестини (зокрема прогестерон). Найбільш важливими для підтримки репродуктивної системи та ряду інших фізіологічних процесів є естрогени: естрадіол, естрон та естріол.

Естрогени утворюються з холестерину і даний процес проходить в декілька етапів. Спочатку під дією ферменту, який розщеплює боковий ланцюг холестерину - 20,22-десмолази (CYP11A1), утворюється прегнелон. Останній зазнає впливу 17 $\alpha$ -гідроксилази (CYP17) та перетворюється в андростендіон. Андростендіон під дією ароматази (CYP19) може перетворюватися в естрон або виступити субстратом для 17 $\beta$ -гідроксистероїд дегідрогенази (17 $\beta$ -HSD), внаслідок чого утворюється тестостерон. Після цього ароматаза та 17 $\beta$ -HSD каталізують утворення естрадіолу з тестостерону та естрону, відповідно [247].

Естрадіол присутній в організмі від пубертатного періоду до настання менопаузи. Виділяється головним чином яєчниками та в меншому ступені у надниркових залозах і є найбільш активним жіночим статевим гормоном. Естрадіол циркулює у кровотоці здебільшого в комплексі з глобуліном, що зв'язує статеві гормони або з сироватковим альбуміном [16].

Естрадіол відповідає за формування статевих органів, розвиток кровоносних судин у матці, активацію поділу клітин строми та жирової тканини у молочних залозах, стимулюючи їх ріст; сприяє перебігу першої фази менструального циклу та процесу овуляції; підтримує фізіологічний стан кісткової тканини, шкіри, серцево-судинної системи, впливає на психо-емоційний стан жінки. Під час статевого дозрівання естрадіол сприяє розвитку довгих кісток та зрощенню епіфізарних пластин. Захищає КТ від остеорезорбтивних процесів [16, 27].



Таким чином, естрогени мають широкий спектр фізіологічних ефектів в організмі жінки. При настанні фізіологічної або передчасної менопаузи, дефіцит естрогенів, зокрема естрадіолу, викликає ряд патологічних станів з боку різних органів. Нестача естрогенів супроводжується підвищеним ризиком розвитку серцево-судинних патологій, неврологічними розладами, сухістю шкіри та слизових оболонок, порушенням ліпідного обміну, уrogenітальними розладами. Одним із характерних проявів гіпоестрогенії є остеопороз. Тому важливим є детальне висвітлення ролі естрогенів у регуляції метаболічних процесів у КТ.

Важливість ендокринної функції статевих залоз у підтримці функціонування опорно-рухової системи набула визнання у середині ХХ сторіччя. Так, Fuller Albright et al. [55] вперше припустили наявність закономірності між розвитком фізіологічної або передчасної менопаузи та збільшенням вірогідності розвитку остеопорозу. Дане припущення було підтверджено чисельними експериментами та клінічними спостереженнями [24]. Отже, наразі добре відомо, що естрогени необхідні для постнатального розвитку скелета та підтримки гомеостазу КТ впродовж дорослого життя людини.

Як було зазначено вище, КТ – це динамічна система з інтенсивним перебігом метаболічних процесів. Статеві гормони задіяні у мінеральному обміні КТ, за рахунок підтримки балансу між резорбцією та остеогенезом; виробленні факторів росту, посиленні реакції КТ на механічні навантаження, регуляції утворення та апоптозу остеокластів та остеобластів, подовженні тривалості життя остеоцитів [231]. Більшість ефектів естрогенів у кістці КТ опосередковуються через  $\alpha$ -рецептор естрогенів та  $\beta$ -рецептор естрогенів ( $ER\alpha$  та  $ER\beta$ ), які експресуються в остеобластах та клітинах-попередниках остеокластів та грають велику роль в адаптації кістки до навантаження [64]. При цьому, регулюючий вплив естрогенів на КТ здійснюється за допомогою декількох механізмів [149].

Внаслідок взаємодії естрадіолу з ER $\alpha$  остеобластів, активуються сигнальні шляхи, які зменшують активність остеокластів. Естрадіол через активацію ER $\alpha$  викликає транскрипцію Fas-ліганда (FasL) в остеокластах, який відщеплюється від поверхні клітини та взаємодіючи з рецептором Fas в преостеокластах викликає їх апоптоз через активацію каспази-8. Також, варто відмітити, що естрадіол сприяє пригніченню ряду цитокінів IL-1, IL-6, IL-7 і TNF в Т-клітинах та остеобластах, внаслідок чого пригнічується процеси остеокластогенезу. Естрадіол також індукує транскрипцію лужної фосфатази (ЛФ)– маркера диференціювання остеобластів [149, 163, 195].

Іншим механізмом пригнічення активності остеокластів, що опосередковується естрадіолом, є підтримка співвідношення RANKL/OPG. Естрадіол може індукувати на транскрипційному рівні експресію генів та синтез OPG в моделях *in vitro* та *in vivo* у людини та щурів, взаємодіючи з ER $\alpha$ . Утворений комплекс транслокується у ядро клітини, де активує транскрипцію OPG мРНК [120, 124, 149, 238].

В здоровому організмі вільні радикали та антиоксиданти знаходяться в рівновазі. Ослаблення антиоксидантних механізмів захисту може привести до збільшення активних форм кисню (АФК), цей стан характеризують як окислювальний стрес. Відомо, що активні радикали здатні впливати на втрату кісткової маси, оскільки викликають порушення ангиогенезу, ініціюють резорбцію КТ та диференціацію остеокластів [234].

Естрогени запобігають утворенню АФК у клітинах кістки, що також зумовлює їх остеопротекторну дію. При гіпоестрогенії, яка пов'язана з віком або гонадоектомією, спостерігається зменшення мінеральної щільності кісткової тканини та швидкості утворення КТ, апоптоз остеобластів та остеоцитів, дані явища супроводжуються надмірною генерацією АФК та пригніченням ферментативної ланки антиоксидантного захисту. АФК впливають на остеокласти та остеобласти через такі ж самі сигнальні шляхи та фактори (ERK, NF- $\kappa$ B, IL-6), що використовуються естрогенами для регуляції утворення та виживання цих клітин. АФК ослаблюють

остеобластогенез через активацію FOXO, факторів транскрипції, які сприяють формуванню компенсаторних реакцій при окислювальному стресі та дефіциті факторів росту. В лінії остеобластів найважливішою функцією FOXO є забезпечення балансу між підтримкою стовбурових клітин, здатних до самооновлення, реплікацією проміжних ланок та виживанням остаточно диференційованих клітин з метою адаптації до стрес-факторів, що накопичуються з віком. Проте, активація FOXO може посилити наслідки старіння для кісток та стати причиною інволюційного остеопорозу. АФК пригнічують апоптоз остеокластів та стимулюють остеокластогенез через посилення продукції RANKL в клітинах стромальної остеобластичної лінії, а також через шлях опосередкований ERK/NF- $\kappa$ B/IL-6. Естрадіол протидіє ефектам АФК через підвищення регуляції глутатіон-редуктази, пригнічення продукції остеокластогенних цитокінів – TNF $\alpha$  та IL-6, через зменшення активності NF- $\kappa$ B. Окрім цього, естрадіол запобігає апоптозу остеобластів та сприяє руйнуванню остеокластів через тимчасову або стійку активацію ERK, а також через регулювання експресії регулятора апоптозу Bcl2 в остеобластах [124, 149, 225].

За умови зменшення рівня естрогенів відбувається зростання швидкості ремоделювання КТ, що супроводжується збільшенням кількості як остеокластів так і остеобластів. Проте, резорбційна дія остеокластів за даних умов набагато вища за кісткоутворювальний потенціал остеобластів.

Таким чином, стан кісткової тканини регулюється естрогенами за допомогою: 1) впливу на експресію компонентів системи RANKL/RANK/OPG; 2) пригнічення факторів остеокластогенезу; 3) сприяння апоптозу остеокластів та подовженню тривалості життя остеобластів та остеоцитів, через вплив на експресію регуляторів апоптозу; 4) активізації антиоксидантної системи КТ.

## **1.2 Етіологічні фактори порушення процесів ремоделювання кісткової тканини**

Розвиток патологічних станів з боку різних органів та систем може призводити до порушення збалансованості процесів остеорезорбції та остеогенезу. Одним із найбільш поширених метаболічних захворювань КТ є остеопороз. Остеопорозу передують такі патологічні стани, як остеопенія, остеодистрофія та остеомалія, які характеризуються поступовим зниженням мінеральної щільності та порушенням структури кісткової тканини. Остеопенія проявляється зменшенням кісткової маси. Остеодистрофія та остеомалія супроводжуються порушенням мінералізації, що призводить до погіршення механічних властивостей КТ. На останньому етапі, коли деструктивні процеси переважають над відновними, розвивається остеопороз. Остеопороз – поліетіологічне захворювання КТ, яке супроводжується зменшенням маси кістки в одиниці об'єму, руйнуванням кістки, зниженням її мінеральної щільності, підвищеним ризиком переломів [49, 185].

Вважається, що на остеопороз у світі хворіє близько 200 млн людей [184], причому найбільше випадків у Європі та країнах Африки [239]. Остеопороз, як причина часткової або повної недієздатності та зменшення тривалості життя, займає четверте місце у світі, після патологій серцево-судинної системи, злоякісних новоутворень та цукрового діабету [49, 253].

Остеопороз поділяють на первинний та вторинний. Первинний остеопороз виникає через вікові зміни. Його підрозділяють на менопаузальний, сенільний та ідіопатичний. Вторинний остеопороз виникає як супутня патологія при інших хворобах або через тривале застосування деяких медичних препаратів [86, 130, 162].

Менопаузальний остеопороз, що розвивається внаслідок дефіциту естрогенів і посилення резорбційних процесів, слід відрізнити від сенільного, при якому спостерігається поступова втрата КТ з віком, що обумовлено виснаженням стромальних стовбурових клітин та зменшенням їх здатності

диференціюватися в остеокласти [218]. Пік кісткової маси приходить приблизно на 30 років, після цього чоловіки та жінки втрачають 0,3-0,5 % кісткової маси щорічно [105].

Найчастіше до розвитку вторинного остеопорозу призводить тривале застосування глюкокортикостероїдів, ендокринні розлади (гіперпаратиреоз, гіпертиреоз, цукровий діабет 1 та 2 типів), ревматологічні та аутоімунні захворювання (ревматоїдний артрит, системна червона вовчанка) Вторинний остеопороз також може виникнути через гіпогонадні стани, такі як синдром Тернера, синдром Клайнфельтера, передчасну недостатність яєчників (ПНЯ) [86, 130, 162].

Застосування глюкокортикоїдів є найбільш частою причиною виникнення вторинного остеопорозу [77]. Тривала терапія глюкокортикоїдами викликає пригнічення експресії маркерів остеобластогенезу: Wnt, RUNX2, лужної фосфатази, остеокальцину. Глюкокортикоїди зменшують всмоктування кальцію та збільшують його виведення з сечею. Припускають, що глюкокортикоїди сприяють диференціації мезенхімальних стовбурових клітин в адипоцити [167].

Гіперпаратиреоз супроводжується надмірною продукцією ПТГ, який викликає резорбцію КТ через посилення експресії RANKL остеобластами [142].

Гормон щитоподібної залози трийодтиронін необхідний для підтримки процесу ендохондральної осифікації, диференціації та проліферації остеобластів та остеокластів. При гіпотиреозі відмічається сповільнення ремоделювання, яке супроводжується пригніченням як остеогенезу, так і остеорезорбції. Наслідком цього є надмірна мінералізація кістки без збільшення її об'єму [69, 255].

При гіпертиреозі швидкість ремоделювання збільшується. Дисбаланс між остеогенезом та остеорезорбцією призводить до втрати близько 10 % КТ за один цикл ремоделювання [69, 255].

Зв'язок між ендокринною функцією підшлункової залози та КТ є доволі тісним. Відомо, що некарбоксільований остекальцин виступає одним з регуляторів секреції інсуліну [72, 154, 177]. В свою чергу інсулін стимулює синтез кісткового матриксу та стимулює утворення кісткових клітин [22]. Діабет 1 типу корелює зі зменшенням мінеральної щільності кістки [50, 75]. Це можна пояснити відсутністю анаболічної дії інсуліну на КТ [181]. В той же час, наявні дані, що при цукровому діабеті 2 типу мінеральна щільність може зростати, особливо в стегновій кістці та хребцях [50, 62]. Це може бути пояснено тим, що цукровий діабет 2 типу часто супроводжується ожирінням. Надмірна маса тіла може викликати адаптивну реакцію з боку КТ, що буде виражатися у збільшенні її щільності. В адипоцитах може відбуватися синтез естрогенів, що також буде сприяти збільшенню щільності [22].

При цьому цукровий діабет 2 супроводжується високим ризиком переломів. Це пов'язано з порушенням мікроархітектури кістки: зменшенням кількості та товщини трабекул, витонченням кортикальної кістки. З урахуванням перелічених особливостей, для патології кістки при діабеті доцільним є використання терміну «діабетична остеопатія», замість остеопорозу [50, 181].

Таким чином, регуляція ремоделювання КТ значною мірою залежить від нормального функціонування ендокринної системи.

### **1.2.1 Піретроїдні інсектициди, як ендокринні деструктори та фактор розвитку порушень у кістковій тканині**

Одним з етіологічних факторів остеопатій можуть виступити деструктори ендокринної системи: фталати, діоксини, бісфенол А, більшість пестицидів, перфторалкіли, поліциклічні ароматичі вуглеводні. Дані речовини втручаються у механізми гуморальної регуляції, зокрема порушують ендокринну активність статевих залоз. Вони можуть бути агоністами або антагоністами андрогенових та естрогенових рецепторів, викликати порушення синтезу, транспортування, метаболізму та виведення

статевих гормонів [107]. В жіночому організмі все перелічене створює ризик розвитку передчасної недостатності яєчників (ПНЯ).

ПНЯ характеризується настанням ранньої менопаузи до 40 років та супроводжується характерною для фізіологічної менопаузи симптоматикою. Проте, симптоми при ПНЯ є більш вираженими та тягнуть за собою тяжчі наслідки для здоров'я жінки, оскільки в її організмі відсутня поступова адаптація до зменшення рівня естрогенів [4].

Серед ендокринних деструкторів особлива увага приділяється пестицидам, як речовинам, які активно використовуються людиною. Пестициди поділяють на декілька типів в залежності від цільового об'єкту: фунгіциди знищують гриби, гербіциди – бур'яни, інсектициди – комах, ротенциди – гризунів. Для нецільових об'єктів, включаючи людину, найбільшу небезпеку представляють інсектициди. Серед пестицидів, які визнані ендокринними деструкторами, інсектициди складають більшість (близько 46%), далі йдуть фунгіциди та гербіциди – 31 % та 21 %, відповідно [107].

Існує декілька класів інсектицидів: органохлорини, органофосфати, карбамати та піретроїди. Піретроїди найбільш поширені в сучасному світі. Вони, за своєю структурою, є складними ефірами хризантемової кислоти, тобто представляють собою синтетичні аналоги піретринів, які містяться у листях, квітках, пагоні кавказької ромашки *Chrysanthemum cinerariaefolium* [134].

Піретроїди використовуються в сільському господарстві, медичних засобах від педикульозу, побутових засобах проти комах, репелентах. Вважається, що піретроїди є менш токсичними для людини та тварин, швидко метаболізуються та виводяться з організму, мають низькі показники біоаккумуляції та стійкості в навколишньому середовищі в порівнянні з інсектицидами інших класів.

У сучасному світі піретроїди складають близько 19 % від усіх пестицидів загалом і затребуваність у них с кожним роком стає все більшою.

Глобальна ринкова вартість піретроїдів склала у 2021 році 3,4 млрд доларів; прогнозується що ця цифра зросте до 4,5 млрд доларів до 2027 року та до 5,6 млрд доларів до 2032 року [52, 104, 170].

Піретроїдні інсектициди з'явилися у 1960-х роках ХХ сторіччя як більш безпечна альтернатива іншим засобам проти комах-шкідників. Прикладами піретроїдів першого покоління можуть слугувати речовини, які мають структуру складного ефіру циклопропанкарбонової кислоти: перметрин, біфентрин, тетраметрин, ресметрин. Вони є більш ефективними ніж природні піретрини, але швидко піддаються фотодеградації.

У середині 1970-х років з'явилися піретроїди другого покоління, які мають ціаногрупу: делтаметрин, цифлутрин, циперметрин, фенпропатрин. Вони є більш стійкими та токсичними для комах ніж їх аналоги першого покоління. Але разом з цим вони є більш небезпечними для нецільових видів.

Метаболічне знешкодження піретроїдів відбувається в печінці під дією карбоксилестераз та ферментів цитохрому Р450. Кінцевими продуктами метаболізму є 3-феноксibenзойна кислота (3-РВА), 4-фтор-3-феноксibenзойна кислота (4-F-3РВА), 3-(2,2-дихлорвинил)-2,2-диметилциклопропан-1-карбонова кислота (DCCA). Метаболіти кон'югуються з ацетильними та метильними групами, моносахаридами, амінокислотами та виводяться з сечею. Дані метаболіти можуть мати більш виражену токсичність, ніж вихідні сполуки [66, 203].

Незважаючи на те, що раніше піретроїди вважали низькотоксичними, з'являється все більше даних про те, що за умови тривалої дії, ці сполуки мають широкий спектр побічних ефектів: гепатотоксичність, нейротоксичність, порушення індивідуального розвитку, пошкодження генетичного апарату, канцерогенну дію, руйнівні ефекти на ендокринну систему та статеві залози. Метаболічні перетворення піретроїдів супроводжуються значною генерацією АФК та пригніченням ферментативної ланки антиоксидантного захисту, що значно розширює прояви інтоксикації з боку різних систем організму [96, 131]. Через



ліпофільну структуру піретроїди можуть накопичуватися у жировій тканини, виділятися разом з грудним молоком. Важливим параметром також є стереоізомерія, оскільки різні ізомери піретроїдів можуть відрізнятися за ступенем токсичності, стійкості в навколишньому середовищі та швидкістю знешкодження в організмі [66].

Грунтуючись на даних сучасної наукової літератури можна припустити, що піретроїди потенційно можуть суттєво погіршувати стан кісткової тканини. Вони можуть впливати на синтез стероїдних гормонів та втручатися у роботу вісі гіпоталамус-гіпофіз-гонади. Піретроїди порушують роботу натрієвих та кальцієвих каналів, ініціюють розвиток окислювального стресу та запалення у багатьох органах та тканинах, в тому числі жіночих та чоловічих статевих залозах. Все перелічене створює умови для розладу збалансованого моделювання та ремоделювання КТ [64, 248, 260].

Незважаючи на те, що піретроїди проявляють всі характерні ознаки ендокринних деструкторів та є потенційним етіологічним фактором розвитку ПНЯ, існує дуже мало досліджень, в яких вивчається зв'язок між ними та розвитком остеопорозу. Хоча наразі відомо, що рівень 3-РВА, 4-F-3-РВА, ДССА негативно корелює з мінеральною щільністю шийки стегна та хребців, механізми та наслідки взаємодії між піретроїдами та КТ потребують подальшого дослідження [64].

### **1.3 Сучасні засоби корекції остеодистрофії**

Терапія остеопорозу потребує цілого комплексу заходів, направлених на нормалізацію МЦКТ та зменшення ризику переломів. Для підтримки опорно-рухової системи в належному стані обов'язковими є заняття лікувальною фізкультурою, відмова від тютюнопаління та зловживання алкоголем, дієта збагачена білком, кальцієм, вітаміном D, а також, за необхідності, медикаментозна терапія. При лікуванні остеопорозу використовують антирезорбтивні перпарати, анаболічні засоби, препарати кальцію та вітаміну D [12, 26].

Препарати кальцію та вітаміну D є основою профілактики та лікування остеопорозу. Кальцій є головним негормональним засобом для корекції наслідків надмірної остеорезорбції. Нажаль, в раціоні сучасної людини часто зустрічається дефіцит цього елемента. Застосування препаратів кальцію відбувається також в рамках доповнення антирезорбтивної терапії [23, 163].

Препарати кальцію можна розподілити на три групи: 1) прості солі (карбонат, хлорид, фосфат, цитрат); 2) комплекс солей кальцію та вітаміну D; 3) комплекси кальцію з вітаміном D, які мають не тільки остеопротекторну, але й хондропротекторну дію. До складу препаратів з третьої групи часто входять такі мікроелементи як мідь, селен, цинк, які сприяють синтезу органічного компоненту кісткової та хрящової тканини [23].

Серед солей кальцію, найбільш доцільними для застосування є органічні солі кальцію, наприклад цитрат кальцію, оскільки вони мають більшу біодоступність та засвоюються незалежно від кислотності шлункового соку, що сприяє їх швидкому депонуванню в кістковій тканині. В роботі О. А. Макаренко та ін. [20] було показано, що прийом цитрату кальцію щурами з преднізолон-індукованим остеопорозом сприяв більшій активації маркерів остеогенезу та пригніченню активності кислої фосфатази ніж карбонат кальцію.

Вітамін D представлений у двох формах: D<sub>2</sub> – ергокальциферол, який поступає в організм з їжею та D<sub>3</sub> – холекальциферол, що синтезується у шкірі під дією ультрафіолетового випромінювання. D<sub>3</sub> є більш важливою формою, оскільки є попередником кальцитріолу, який зв'язується зі своїм рецептором в кишечнику, нирках, паращитоподібній залозі, кістках. Кальцитріол підвищує всмоктування кальцію у кишечнику та його каналцеву реабсорбцію, що сприяє його збереженню в КТ. Нестача кальцитріолу, яка виникає в тому числі через дисфункцію яєчників, призводить до погіршення доступності кальцію, компенсаторному збільшенню секреції ПТГ, фосфатурії, зниженню мінералізації КТ та остеомаліції [49, 136, 163].

Дозування кальцію та вітаміну D залежить від віку пацієнта, важкості протікання захворювання, ступеня збагачення щоденного раціону вітамінами, мікро- та макроелементами. Загалом, прийом 800 – 1200 мг кальцію та 400 – 800 МО холекальциферолу на добу є рекомендованим для пацієнтів з остеопорозом [5, 23, 172].

До засобів, які запобігають надмірній резорбції відносять: біфосфонати, антитіла до RANKL, замісну гормональну терапію, селективні модулятори естрогенових рецепторів [26].

Біфосфонати мають високу спорідненість з гідроксиапатитом КТ, завдяки чому мають змогу вбудовуватися у кістковий матрикс. Такі препарати як аледронат, золедронова кислота, ібандронова кислота, ризедронат в першу чергу використовуються при терапії остеопорозу. Біфосфонати ініціюють апоптоз остеокластів. Разом с тим, пригнічення роботи остеокластів призводить до накопичення мікроушкоджень, що в подальшому може призвести до розвитку атипових переломів. Іншими побічними ефектами біфосфонатів є розлади шлунково-кишкового тракту: нудота, діарея, виразки стравоходу, гастрит. Зрідка дані препарати призводять до остеонекрозу щелеп, епісклериту [9, 26, 70, 172].

Замісна гормональна терапія (ЗГТ) може проводитися у вигляді монотерапії естрогенами або комбінованої терапії естрогенами з прогестинами. Даний вид лікування сприяє апоптозу остеокластів, диференціації остеобластів та підтримці кісткової маси за рахунок регуляції механізмів, які були розглянуті вище, у розділі 1.2. У жінок, які отримують терапію статевими гормонами, ризик остеопоротичних переломів значно менший, що підтверджено плацебоконтрольованими дослідженнями [195, 249]. В Україні для ЗГТ при менопаузі використовують такі монопрепарати естрадіолу як «Прогінова» (пігулки), «Дивигель» (гель), «Естрожель» (гель), «Лензетто» (спрей), «Естрамон» (пластир). Естрадіол в комплексі з прогестинами наявний у складі препаратів «Фемостон» та «Клімонорм».

Серед побічних ефектів ЗГТ наявні реакції гіперчутливості, цереброваскулярні розлади, серцево-судинні захворювання, рак ендометрію та молочної залози. Тому, цей метод лікування рекомендується використовувати тільки у разі підвищеного ризику переломів та неефективності застосування біфосфонатів [26, 163].

Селективні модулятори естрогенових рецепторів (SERM) дозволяють уникнути деяких побічних ефектів терапії з використанням естрогенів, оскільки вони мають вибіркочу естрогену активність, яка проявляється тільки в окремих типах клітин або тканин. Для лікування остеопорозу здебільшого використовують такий SERM як ралоксифен. Побічні ефекти SERM включають цереброваскулярні порушення, м'язові спазми, високий ризик інсульту. Після припинення прийому SERM швидкість ремоделювання кістки збільшується, тому не бажано використовувати їх тривалий час [26, 163].

Деносумаб є моноклональним антитілом до RANKL. Деносумаб подібно OPG зв'язується з RANKL, запобігаючи остеокластогенезу. Проте, як і у випадку SERM, припинення терапії деносумабом може призвести до посилення остеокластогенезу [12, 172].

Анаболічними препаратами є молекулярні фрагменти ПТГ, аналоги білка, який зв'язаний з ПТГ, антитіла до склеростину. Анаболічна терапія дозволяє посилити формування КТ, на відміну від антирезорбтивних засобів, які тільки пригнічують активність остеокластів [163].

Відомо, що ПТГ сприяє резорбції КТ для збільшення кальцію в крові. Але такий ефект виникає тільки тоді, коли рецептори до ПТГ постійно знаходяться в активному стані, за рахунок тривалого впливу ПТГ. Переривчасте введення ПТГ буде мати анаболічний ефект на КТ, що супроводжується активним поділом та диференціацією МСК в остеобласти. Терипаратид є аналогом ПТГ, який складається з 34 N-кінцевих амінокислот цього гормону. Абалопаратид є аналогом білка, який зв'язаний з ПТГ. Обидва препарати ефективні для лікування остеопорозу у чоловіків та жінок,

але тривала терапія може викликати захворювання шлунково-кишкового тракту, м'язовий біль, нудоту, запаморочення [163].

Склеростин, який секретується остеоцитами пригнічує процеси остеобластогенезу. Препарат ромосозумаб є моноклональним антитілом до склеростину. Основна його перевага перед аналогами ПТГ це пригнічення остеокластогенезу, а не тільки збільшення активності остеобластів [163].

Враховуючи велику кількість можливих побічних ефектів через застосування препаратів для лікування остеопорозу, актуальним є пошук засобів, які б сприяли збереженню цілісності КТ та нормалізації процесів ремоделювання без завдання шкоди пацієнту. Можливим вирішенням даної проблеми є застосування флавоноїдів з вираженою естрогеноподібною дією, яка, в залежності від індивідуальних особливостей пацієнта, практично не супроводжується небажаними побічними наслідками. В організмі людини флавоноїди мають широкий спектр фізіологічних ефектів: капіляростабілізуючу, кардіопротекторну, протизапальну, антигрибкову, антибактеріальну, естрогеноподібну, антиоксидантну активність. Серед перелічених ефектів для підтримки належного процесу ремоделювання КТ, останні два мають дуже велике значення.

Так, наприклад, кверцетин подібно до ендогенного естрадіолу сприяє проліферації, мінералізації та диференціюванню в остеобластичну лінію МСК кісткового мозку. Це супроводжується збільшенням експресії факторів транскрипції: *osterix*, *RUNX2*, основного фактору зв'язування альфа 1; *ВМР2*; трансформуючого фактору росту бета-1; судинного ендотеліального фактору росту (*VEGF*); колагену 1 типу. Кверцетин стимулює вироблення характерних кісткових маркерів остеобластогенезу: лужної фосфатази, сіалопротеїну, остеопонтину, остеокальцину. В остеобластоподібних клітинах кверцетин сприяє експресії *OPG*, зменшує експресію *RANKL*, запобігає апоптозу остеобластів [258].

Флавоноїди здатні знижувати внутрішньоклітинну генерацію АФК та перекісне окислення ліпідів (ПОЛ), гальмувати розвиток запальних реакцій

за рахунок пригнічення активації NF- $\kappa$ B, що може також пояснити уповільнення остеокластогенезу та антиостеопоротичну дію [163].

Особливо ефективними флавоноїди можуть бути в комплексі з кальцієм, магнієм, селеном, цинком, що буде підвищувати їх біодоступність та сприяти швидкому відновленню КТ [176].

На кафедрі фізіології, здоров'я і безпеки людини та природничої освіти біологічного факультету ОНУ імені І.І. Мечникова було запропоновано спосіб профілактики (№ 111997), який показав свою ефективність щодо нормалізації біохімічних показників, вмісту органічного та мінерального компонентів КТ при алкогольній інтоксикації та гіпотиреозі [10, 29].

Таким чином, флавоноїди є перспективними остеопротекторами з комплексним впливом на організм. Тому, доцільним є детальне вивчення ефективності сполук цього класу при станах, які супроводжуються надмірною резорбцією КТ. Актуальним також є дослідження ефективності флавоноїдів, зокрема кверцетину, при дисфункції гонад та остеодистрофічних станах, які виникли через вплив таких ендокринних деструкторів як піретроїди. Враховуючи широке використання піретроїдних інсектицидів у сільському господарстві та медицині, а також відсутність переконливих даних про їх безпеку для здоров'я людини, механізми та наслідки взаємодії між піретроїдами та кістковою тканиною потребують подальшого дослідження.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Умови проведення експерименту

Експериментальні дослідження проводили на самках щурів лінії Wistar. Тварини знаходились в стандартних умовах віварію біологічного факультету Одеського національного університету імені І. І. Мечникова. Утримування тварин у віварію та експериментальні маніпуляції з ними здійснювали з дотриманням біоетичних норм викладених в Законі України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) з урахуванням правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 18 березня 1986 р., ETS № 123) та відповідно до вимог «Директиви 2010/63/ЄС Європейського парламенту та Ради від 22 вересня 2010 р. про захист тварин, що використовуються в наукових цілях» [7, 8, 93, 125].

Дослідження проводили у три етапи.

Метою *першого етапу дослідження* було експериментальне підтвердження остеопротекторної та протизапальної ефективності комплексу на основі кверцетину, вітамінів С та D<sub>3</sub>, макро- та мікроелементів при оваріоектомії, за умови раціону з низьким вмістом білка та кальцію. Використовували самок щурів віком три місяці із середньою масою тіла 116 г. Тварини були розподілені на три групи: 1 група (n=8) – інтактна контрольна група, 2 група (n=8) – дослідна група (щери, яким проводили двосторонню оваріоектомію та які весь період експерименту отримували раціон з низьким вмістом білка та кальцію), 3 група (n=8) – дослідна група (щери, яким надавали комплекс кверцетину, вітамінів та мінералів у дозі 500 мг/кг/ добу у вигляді суспензії через інтрагастральний зонд на тлі оваріоектомії, яка була ускладнена раціоном з низьким вмістом білка та кальцію).

Оваріоектомію здійснювали щурам з другої та третьої групи в асептичних умовах під тіопенталовим наркозом (20 мг/кг) шляхом розкриття черевної порожнини та видалення обох яєчників. Контрольній групі щурів проводили тільки розкриття черевної порожнини. Далі тварин з другої та третьої групи годували неповноцінним за вмістом кальцію та білка раціоном протягом 4 місяців. Неповноцінна дієта складалася з кукурудзяної крупи, буряка, гарбуза, яблука у кількості, що відповідала вмісту 10–15 мг кальцію та 3–4 г білка на 100 г тварин.

Засвоєння та виділення кальцію досліджували за допомогою метаболічних камер, в яких розміщували дослідних щурів перед евтаназією.

Щурів виводили з експерименту через чотири місяці під тіопенталовим наркозом (внутрішньоочеревинно в дозі 20 мг/кг шляхом тотального кровопускання з магістральних судин).

Після виведення тварин з експерименту виділяли стегнові кістки та поперекові хребці, в яких визначали морфометричні показники: щільність, вміст мінерально-органічного компоненту (МОК), мінерального компоненту (МК) та органічного компоненту (ОК). Також виділяли альвеолярний відросток нижньої щелепи в якому вимірювали ступінь атрофії.

В гомогенаті альвеолярної частини нижньої щелепи (75 мг/мл 0,1 М цитратного буферу рН 6,1) визначали активність кислої і лужної фосфатази, еластази, каталази та вміст малонового діальдегіду.

Виділяли слизові оболонки порожнини рота, шлунка, тонкої та товстої кишки, у гомогенатах яких визначали активність кислої фосфатази, еластази, уреази та вміст малонового діальдегіду.

Другий етап дослідження здійснювали у умовах *in silico*. Проводили оцінку докінгу піретроїдного інсектициду  $\alpha$ -циперметрину, його метаболітів: 3-феноксibenзойна кислота (3-РВА), 3-(2,2-дихлоретеніл)-диметилциклопропанкарбонова кислота (DCCA); флавоноїду кверцетину з  $\alpha$ -рецептором естрогенів (ER $\alpha$ ). Для докінг-аналізу використовували програмне забезпечення AutoDock 4.2.6, AutoDockVina-1.2.5, Schrödinger Maestro Glide.



Для аналізу фармакокінетичних властивостей та профілю токсичності були використані платформи pkCSM та SwissADME.

*Третій етап дослідження* проводили з метою визначення стану кісткової тканини, травного тракту та функції яєчників внаслідок тривалої дії  $\alpha$ -циперметрину, а також— для визначення ефективності запропонованого профілактичного комплексу щодо нормалізації стану перелічених систем.

Експеримент проводили на самках щурів віком три місяці з середньою масою 104,80 г. Щури були розподілені на три групи: 1 група (n=10) – інтактна контрольна група; 2 група (n=10) – щури, які щоденно отримували піретроїдний інсектицид  $\alpha$ -циперметрин у дозі 10 мг/кг інтрагастрально; 3 група (n=10) – щури, які інтрагастрально отримували профілактичний комплекс кверцетину, вітамінів С та D<sub>3</sub>, макро- та мікроелементів у дозі 500 мг/кг на тлі застосування  $\alpha$ -циперметрин у дозі 10 мг/кг.

На другому місяці експерименту визначали тривалість естрального циклу впродовж місяця щоденно, через дослідження піхвових мазків.

Через чотири місяці щурів виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом (20 мг/кг), попередньо зваживши, шляхом кровопускання з серця. Виділяли стегнову кістку, поперекові хребці та альвеолярний відросток нижньої щелепи. В кістках стегна та хребців визначали: щільність, вміст МОК, вміст МК та ОК. В альвеолярній частини нижньої щелепи вимірювали ступінь атрофії.

В гомогенаті альвеолярної частини нижньої щелепи (75 мг/мл 0,1 М цитратного буферу рН 6,1) визначали активність кислої та лужної фосфатази, еластази, каталази та вміст малонового діальдегіду.

Виділяли слизові оболонки порожнини рота, шлунка, тонкої та товстої кишки, у гомогенатах яких визначали активність кислої фосфатази, еластази та вміст малонового діальдегіду.

Виділяли матку та яєчники, які зважували та розраховували органний індекс, як відношення маси органа (мг) до маси тіла (г). У сироватці крові визначали рівень естрадіолу.

## 2.2 Препарати, які використовували у дослідженні

В експерименті використовувався  $\alpha$ -циперметрин торгівельної марки «Фас», виробник – ТОВ «Фабрика агрохімікатів», м. Черкаси, вироблений на замовлення ТОВ «Укравіт Агро», м. Київ; об'єм – 4 мл, концентрація діючої речовини 100 г/л.

Для отримання необхідної концентрації  $\alpha$ -циперметрин розводили дистильованою водою. Дозу 10 мг/кг обрали на основі раніше встановлених ефектів  $\alpha$ -циперметрину [148, 213, 260] та проводили її корекцію в залежності від ваги тіла щурів. Зважування дослідних тварин відбувалось щотижнево.

З метою профілактики порушення функції яєчників, патології кісткової тканини, запалення у травному тракті, як при оваріоектомії, так і за тривалого впливу  $\alpha$ -циперметрину одночасно застосовували вітамінно-мінеральний комплекс.

До складу профілактичного комплексу входили: кверцетин («Квертин», ПАТ «Науково-виробничий центр «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», Україна) – 250 мг; магній («Магній активний», ТОВ «Еліт-фарм», м. Дніпро, Україна) – 1500 мг; вітамін D («Олідетрим Кідс краплі оральні» МЕДАНА ФАРМА АО, Польща) – 300 МО; мідь («Мідь активна», ТОВ «Еліт-фарм», м. Дніпро, Україна) – 750 мг; аскорбінова кислота (аскорбінова кислота № 20, ТОВ «Аптека Гаєвського», м. Одеса, Україна) – 500 мг; цинк («Цинк активний» ТОВ «Еліт-фарм», м. Дніпро, Україна); селен («Селен активний», ТОВ «Еліт-фарм», м. Дніпро, Україна) – 500 мг; кальцій (цитрат кальцію з раковин устриць – лабораторний зразок власної технології) – 1500 мг; марганець («Марганець активний», ТОВ «Еліт-фарм», м. Дніпро, Україна) – 250 мг.

«Всі компоненти комплексу мають сертифікати якості та дозволені для застосування з лікарською і профілактичною метою» [29].

Кверцетин має виражені антиоксидантні, остеопроєкторні та протизапальні властивості.

Кальцій є головною складовою мінерального компоненту кісткової тканини у вигляді кристалічної сполуки – гідроксиапатиту [82, 153].

Вітамін D<sub>3</sub>, підвищує всмоктування кальцію у травному тракті та каналцях нирок. Дефіцит вітаміну D опосередковано впливає на транскрипційне активування рецептора RANK, що призводить до збільшення кількості остеокластів [23, 49].

Марганець активує гени остеогенних маркерів та покращує процеси утворення позаклітинного матриксу кісткової тканини, діє як активатор або кофактор в деяких ферментах, зокрема в антиоксидантному ферменті марганецьвмісній супероксиддисмутазі [73, 108].

Селен є антиоксидантним мікроелементом, оскільки більшість селенопротеїнів, включаючи глутатіонпероксидазу, тиоредоксинредуктазу, попереджають розвиток окислювального стресу [217]. Також відомо, що низький рівень селену в організмі пов'язан із зменшенням швидкості оновлення кісткової тканини та зменшенням щільності кісток [207].

Магній здатний модулювати активність антиоксидантних ферментів та захищати клітини від окислювального стресу [156, 159]. Він необхідний для розвитку та мінералізації кісток; стимулює активність остеобластів та ферментів групи фосфатаз, які беруть участь у кісткоутворенні [235].

Аскорбінова кислота (вітамін C) є потужним антиоксидантом та необхідним фактором кісткоутворення [252]. Концентрація вітаміну C в сироватці крові є зворотною пропорційною підвищенню ризику переломів кісток [173].

Цинк бере участь в повздовжньому рості кісток, ендокринній регуляції та передачі внутрішньоклітинних сигналів в остеогенезі, стимулює остеобласти до синтезу білка та перешкоджає їх апоптозу [92, 108, 262].

Мідь є кофактором лізілоксидази – фермента, який каталізує з'єднання волокон еластину та колагену в органічному компоненті кісткової тканини, а також кофактором ряду антиоксидантних ферментів: цитохром с-оксидази, супероксиддисмутазі, церулоплазміну [88, 108].

### 2.3 Методика комп'ютерного моделювання

«Процедуру молекулярного докінгу проведено з використанням кристалічних структур ліганд-зв'язуючого домену (ЛЗД) ER $\alpha$ : 3ERT (в комплексі з 4-гідрокситамоксифеном, який є активним метаболітом тамоксифену – препарату з антиестрогенною дією), 1GWR, 1ERE (в комплексі з естрадіолом, який є ендогенним агоністом) та 1ERR (в комплексі з ралоксифеном – препаратом, який має виражений агоністичний вплив на ER $\alpha$  та використовується при лікуванні менопаузального остеопорозу) з бази даних біологічних макромолекул PDB (<http://www.rcsb.org/>)» [155].

«Проведено докінг кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його похідних (DCCA, 3-PBA). Розташування референтного ліганду використовували для визначення автоматичного виявлення сайту зв'язування. Використовували три різних пакети програмного забезпечення для докінгу: Schrödinger Maestro –2023–2 Glide (trial license), AutoDock 4.2.6 (<https://autodock.scripps.edu/download-autodock4/>) та AutoDock Vina-1.2.5 (<http://vina.scripps.edu>)» [155].

Структури лігандів (кверцетин,  $\alpha$ -циперметрин, DCCA, 3-PBA, референтні ліганди) отриманих з бази даних PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

«*AutoDock 4.2.6 та AutoDockVina-1.2.5*. Ліганди «подано у форматі \*.pdb та оптимізовано за значенням внутрішньої енергії в програмі Avogadro (v 1.2.0) і полі молекулярних сил Merck – алгоритм (MMFF94), протонування при фізіологічному значенні рН 7,4. Молекулярний докінг за допомогою програми AutoDock 4.2.6 проводили з використанням реалізованої емпіричної функції вільної енергії та генетичного алгоритму Ламарка (LGA) для зв'язування лігандів білків» [155].

«*Schrödinger Maestro Glide*. Модуль LigPrep у наборі Schrödinger використовували для підготовки лігандів перед докінгом, де вони були оптимізовані за допомогою алгоритму силового поля OPLS2005, діапазон рН для генерації таутомерів та протонних станів складав 7,4. Білок був

змодельований за допомогою Protein Preparation of Schrödinger Suite; щоб підготувати структуру білка, були додані атоми водню та оптимізовані водневі зв'язки, рН 7,4. Якість геометричних контактів та їх енергію використовували для розрахунку взаємодії між білковими та лігандними комплексами. Така формула були використана для ранжування лігандів на основі їх G-показників:  $G\text{-показник} = (0,05 * vdW) + (0,15 * Coul) + Lipo + Hbond + Metal + Rewards + RotB + Site$  (1); де  $vdW$  – енергія Ван-дер-Ваальса,  $Coul$  представляє кулонівську енергію, термін  $Lipo$  пояснює ліпофільність,  $Rewards$  описує сприятливі гідрофобні взаємодії,  $Hbond$  – це показник, що відображає водневий зв'язок,  $Metal$  надає інформацію про зв'язування металу, інформує про негативний вплив, пов'язаний із заморожуванням обертових зв'язків, а  $Site$  визначає полярні взаємодії в активному центрі» [155].

«Першим етапом докінгу було отримання цільової структури естрогенового рецептору з Protein Data Bank (PDB), що містить 3D атомні координати» [155].

«Розташування сайту зв'язування визначалося за координатами референтного ліганду з використанням grid box MGL Tool (версія 1.5.7) та Schrödinger Suite» [155].

«Кожна програма докінгу використовує різні протоколи призначення заряду атомів ліганду. AutoDock використовує атомні заряди Гаштайгера-Марсілі, тоді як AutoDockVina не потребує призначення атомних зарядів» [155].

«Було проведено протонування білкових молекул, а файли PDB рецепторів і лігандів були перетворені у формат PDBQT. Для AutoDock 4.2.6 встановлені параметри генетичного алгоритму: 80 циклів, популяції – 300, інші залишились за замовчуванням. Розрахунки за допомогою Auto Dock Vina проводили з 9 режимами зв'язування (number of binding modes), вичерпністю пошуку – 8 (exhaustiveness of search) і максимальною різницею в енергії – 3 (maximum energy difference). Функція оцінки в AutoDockVina

використовується для оцінки передбачуваної спорідненості зв'язування між лігандом і його рецептором, оцінюючи силу зв'язувальної взаємодії між двома молекулами. На функцію підрахунку балів впливають як конформаційно-залежні фактори (внутрішньо- та міжмолекулярні внески, стерична, гідрофобна взаємодія та взаємодії водневих зв'язків), так і конформаційно-незалежні фактори (поворотні зв'язки, присутні в лігандах)» [155].

«Згідно з функцією оцінки AutoDock, AutoDockVina та Schrödinger Maestro Glide, найнижчі енергетичні конформери макромолекулярних комплексів були обрані як найбільш стабільні конформації. Далі провели перевірку якості результатів молекулярного докінгу шляхом визначення наявності стеричних перекриттів атомів лігандів з рецептором. Проаналізували молекулярні механізми зв'язування досліджуваних лігандів та ліганд-зв'язуючого домену (ЛЗД) ER $\alpha$ , визначили молекулярні групи лігандів, які беруть участь у взаємодії з амінокислотними залишками білка» [155].

«Оцінку якості результатів молекулярного докінгу, виявлення наявності стеричних перекриттів атомів лігандів з рецептором виконували за допомогою програмного забезпечення UCSF Chimera 1.17.3» [155].

«*In silico* прогнозування фармакокінетичних властивостей та профіль токсичності досліджуваних сполук. Для *in silico* дослідження фармакокінетичних властивостей та токсичності кверцетину та  $\alpha$ -циперметрину були використані платформи для швидкого аналізу кількох фармакокінетичних властивостей pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/>), онлайн сервер SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) із налаштуваннями за замовчуванням шляхом подання хімічних структур у форматі SMILE» [155].

## 2.4 Морфометричні методи дослідження

### 2.4.1 Морфометричні дослідження кісток

Оцінку дистрофічного процесу в пародонті оцінювали за ступенем оголення молярів, який відбувається через атрофію кісткової тканини альвеолярної частини нижньої щелепи. Перед вимірювання ступеня атрофії видаляли м'які тканини. «Величину ступеня атрофії визначали за формулою:

$$CA = \frac{L}{M} \times 100 \%$$

де:

CA – ступінь атрофії;

L - довжина від краю альвеоли до анатомічної шийки зуба;

M - довжина від краю альвеоли до вершини горбка зуба» [10].

«Спосіб визначення щільності кісток ґрунтується на принципі визначення об'єму кісток, для обчислення якого вимірюють величину архімедової сили, що діє на кістку під час повного занурення її у воду» [10].

Хід визначення: готували хімічну склянку з дистильованою водою і фіксували температуру води. Свіжопрепаровану кістку очищали скальпелем від сухожиль, промивали у воді й осушували ганчіркою до зникнення вологи. Після цього кістку зважували із точністю до 0,1 мг. Потім прикріплювали дріт довжиною 20 см з петлею на одному з кінців для підвішування його до важеля терезів. На стегновій кістці дріт кріпився навколо шийки, на великогомілковій – на звуженій частині під дистальним епіфізом. Кістку за допомогою дроту підвішували до важеля терезів, знизу підводили склянку з водою так, щоб кістка повністю занурилася у воду. Склянку встановлювали на підставку і реєстрували показання терезів. Потім пінцетом затискали дріт у місці виходу його з води, знімали дріт із важеля, відкріплювали кістку і вимірювали лінійну довжину ділянки дроту, яка занурювалася разом із

кісткою у воду, з точністю до 1 мм [17]. «Розрахунок щільності кістки обчислюють за такою формулою:

$$\rho = \frac{m}{\frac{m + m_1 - m_2}{\rho_2} - \frac{l \times m_1}{L \times \rho_1}}$$

де:

$m$  - маса кістки в повітрі (мг);

$m_1$  - маса дроту (мг);

$m_2$  - показання терезів при зануренні у воду кістки, підвішеної на дроті (мг);

$L$  - довжина дроту (мм);

$l$  - довжина ділянки дроту, що занурюється у воду (мм);

$\rho_1$  - щільність дроту (для мідного дроту  $\rho = 8,96$  мг/мм<sup>3</sup>);

$\rho_2$  - густина води залежно від її температури (мг/мм<sup>3</sup>).

Вміст мінерального та органічного компонентів у різних кістках щурів визначали завдяки тому, що кісткову тканину уявили у вигляді системи з трьох основних компонентів: мінеральний, органічний і вода. Мінеральний компонент значною мірою складається з солей кальцію, переважно з гідроксиапатиту, органічний компонент - з колагену. Кожен із наведених компонентів має індивідуальні значення щільності  $\rho_{\text{мін}}$  і  $\rho_{\text{орг}}$ , які приймали як константні значення. Вагове та об'ємне відношення мінерального і органічного компонентів в кістці формує певне значення щільності мінерального-органічного комплексу. Завдяки використанню значень щільності мінерального компоненту, органічного компоненту і мінерального-органічного комплексу оцінювали ваговий вміст мінерального і органічного компонентів у досліджуваній кістці.

Базою для обчислення абсолютного та відносного вмісту компонентів в кістках є формула визначення об'ємного вмісту:

$$V_{\text{мін}} = V_{\text{мок}} \times \frac{\rho_{\text{мок}} - \rho_{\text{орг}}}{\rho_{\text{мін}} - \rho_{\text{орг}}}$$



де:

$V_{\text{мін}}$  – об’єм мінерального компоненту,  $\text{мм}^3$ ;

$V_{\text{мок}}$  – об’єм мінерального-органічного комплексу,  $\text{мм}^3$ ;

$\rho_{\text{мок}}$  – щільність мінерального-органічного компоненту,  $\text{мг}/\text{мм}^3$ ;

$\rho_{\text{мін}}$  – щільність мінерального компоненту,  $\text{мг}/\text{мм}^3$ ;

$\rho_{\text{орг}}$  – щільність органічного компоненту,  $\text{мг}/\text{мм}^3$ .

Об’єм та щільність мінерального-органічного компоненту розраховували шляхом попереднього визначення маси вологої і висушеної кістки, та її об’єму» [10].

#### 2.4.2 Підрахунок органного індексу

Органний індекс матки та яєчників розраховували як співвідношення маси органу (мг) до маси тіла (г), за формулою:

$$\text{OI} = \frac{m_1}{m_2}$$

де:

OI – органний індекс;

$m_1$  – маса матки або яєчників (мг)

$m_2$  – маса тіла щура (г)

#### 2.5 Методи біохімічного дослідження кісткової тканини

«Гомогенати кісткової тканини готували при низькій температурі (на лотку з льодом) для збереження активності ферментів. Очищені цільні кістки зважували на терезах, кістки подрібнювали за допомогою кусачок і поміщали в охолоджену ступку. Гомогенати готували на 0,1 N цитратному буфері рН 6,1 за співвідношенням 75 мг кістки на 1 мл буфера» [10]. Пробірки з гомогенатами струшували на шейкері протягом 15 хвилин при Т від 0 до 4°C. Після цього гомогенати центрифугували 20 хвилин при 2 500 об/хв та Т від 0 до 4°C. Потім відбирали надосадову рідину для аналізу [17].

«Активність кислої та лужної фосфатази визначають на основі гідролізу субстрату *p*-нітрофенілфосфату за методом Бессея-Лоурі-Брока. Субстрат для кислої фосфатази готують цитратному буфері з рН 4,8, для лужної фосфатази – з рН 10,5. Під впливом фосфатаз від субстрату відщеплюється *p*-нітрофенол, що в лужному середовищі має жовтий колір. Інтенсивність забарвлення розчину пропорційна активності ферменту. Активність ферментів виражали в мікрокаталах на 1 кг кісткової тканини (мккат/кг). За 1 катал приймали активність ферменту, що здатна утворити 1 моль *p*-нітрофенолу» [17].

Активність еластази оцінювали за ступенем гідролізу субстрату *N*-*t*-BOC-L-alanine-*p*-nitrophenyl ester (BOC). «Під дією еластази від субстрату відщеплюється *p*-нітрофенол жовтого кольору, при цьому інтенсивність забарвлення розчину пропорційна рівню активності еластази» [17].

Метод визначення активності каталази у кістковій тканині «заснований на здатності пероксиду водню утворювати з молібдатом амонію стійкий забарвлений комплекс з максимумом поглинання при 410 нм. Активність каталази оцінюють по інтенсивності забарвлення розчинів та виражають в мккат/кг» [17].

Визначення вмісту малонового діальдегіду (МДА) «проводили з 2-тіобарбітуровою кислотою, з якою він реагує при високій температурі в кислому середовищі, утворюючи забарвлений триметиловий комплекс, с максимумом поглинання при довжині хвилі 532 нм. Кількість МДА виражена в ммоль/кг тканини» [17].

## **2.6 Методика дослідження засвоєння та виведення кальцію**

«Для дослідження кількості надходження та виведення кальцію у щурів використовували спеціальні метаболічні камери, в яких розташовували тварин. Дослідження проводили впродовж трьох діб, збираючи залишки корму, калу та сечі. Корм, яким годували тварин впродовж дослідження,

попередньо зважували (50 г на кожну тварину) і розташовували у годівниці метаболічної камери.

Збирали залишки добового калу, розміщували на фільтрувальному папері і висушували у сушильній шафі при 65 °С. Сухий кал зважували, відбирали наважку у 1 г для подальшого визначення у ньому вмісту кальцію. Сечу кожної тварини збирали, вимірювали її кількість мірним циліндром та відбирали 1 мл для проведення аналізу. У калі та сечі визначали вміст кальцію шляхом аналізу концентрації, яку множили на кількість залишеного матеріалу і таким чином визначали кількість виведеного кальцію з сечею та калом.

У кормі також аналізували вміст кальцію, завдяки чому визначали кількість введеного кальцію щурам. Ступінь абсорбції кальцію – це різниця між введеною кількістю та сумарною кількістю виведеного кальцію із сечею та калом» [13].

## **2.7 Методи біохімічного дослідження слизових оболонок травного тракту та сироватки крові**

«Гомогенати слизових оболонок порожнини рота, шлунку, тонкої та товстої кишки готували на 0,05 М трис-НСІ буфері рН 7,6 із розрахунку 50 мг тканини на 1 мл буфера. Гомогенізацію здійснювали у порцелянових ступках, які були розташовані на заморожених акумуляторах холоду. Гомогенати при постійному помішуванні витримували 30 хв в холодильнику, потім центрифугували при 2500 об/хв і +4°С протягом 15 хв. Супернатант переносили у чисті пробірки і використовували для біохімічного аналізу» [10].

У слизових оболонках ротової порожнини, шлунка, тонкої та товстої кишки проводили визначення активності кислої фосфатази, еластази (маркери запалення) та вмісту малонового діальдегідц (маркер перекисного окислення ліпідів). Визначення даних показників у відділвх травного тракту ґрунтується на тих самих принципах, які були викладені в підрозділі 2.6.

У слизових оболонках травного тракту визначали також активність уреаз. «Визначення активності уреаз засноване на здатності цього ферменту розщеплювати сечовину до аміаку, який з реактивом Неслера дає жовте забарвлення. Інтенсивність забарвлення проби прямо пропорційна активності уреаз в гомогенаті» [17]. Активність уреаз виражали у мікрокаталах на 1 кг слизової оболонки, «де 1 катал – це активність ферменту, що каталізує відщеплення 1 молу аміаку за 1 секунду» [17].

Визначення рівня естрадіолу у сироватці крові щурів проводили у приватній медичній лабораторії «Смартлаб», м. Одеса, вул. Академіка Воробйова, 5а. Рівень естрадіолу визначали за допомогою хемолюмінісцентного імуноаналізу з використанням набору реагентів IMMULATE 2000 Estradiol (Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd., UK) та виражали у пікограмах на 1 мл сироватки (пг/мл). Зразок сироватки крові в об'ємі 25 мкл інкубували з твердою фазою, вкритою поліклональними кролячими антитілами до естрадіолу протягом 60 хвилин. Протягом цього часу естрадіол зі зразка конкурував з естрадіолом рідкої фази реагента за зв'язування з обмеженою кількістю антитіл на поверхні твердої фази. Через 60 хвилин незв'язаний естрадіол досліджуваного зразка та реагента видаляли під час промивання шляхом центрифугування. В кінці у пробірку додавали хемілюмінісцентний субстрат, сигнал генерувався відповідно кількості зв'язаного ферменту.

## **2.8 Метод визначення тривалості естрального циклу**

Метод визначення ґрунтувався на зборі клітин з вагінального каналу щура шляхом отримання піхвових мазків. Дослідження проводилося щоденно в один і той самий час впродовж місяця. Для отримання піхвового мазка тварину та її передні лапи фіксували та відтягували хвіст для візуалізації піхви. В стерильну піпетку набирали 0,2 мл фізіологічного розчину. Піпетку вводили на 3 – 4 мм вглиб вагінального каналу та вводили фізіологічний розчин, який потім відбирали цією ж піпеткою. Рідину, яка

представляла собою клітинну суспензію наносили на предметне скло. Під світловим мікроскопом «Біолам» за допомогою десятикратного збільшення визначали клітинний склад мазка. Стадії естрального циклу (проеструс, еструс, метеструс, діеструс) ідентифікували шляхом візуальної оцінки співвідношення епітеліальних неороговілих клітин, епітеліальних ороговілих клітин, лейкоцитів та слизу в отриманому мазку [53, 91].

## 2.9 Статистичні методи дослідження

Статистичну обробку результатів проводили з використанням Т-критерію Стьюдента з поправкою Бонфероні. Під час проведення розрахунків використовувався пакет Microsoft ®EXCEL. «Розраховували середнє арифметичне значення (М), похибку середнього арифметичного значення (m) і наводили у вигляді (М ± m)» [13].

Статистично достовірними вважали відмінності при значеннях  $p \leq 0,05$ .

Середнє арифметичне визначали за формулою [43]:

$$M = \frac{\sum x}{n}$$

де:

М – середнє арифметичне;

x – результат виміру;

n – число визначень.

Визначення квадратичної помилки одиничного виміру проводили за формулою [43]:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n - 1}}$$

де:

σ – квадратична помилка;

d – відмінність одиничного виміру від контролю;

n – число визначень.

Визначали середню арифметичну помилку, за формулою [43]:

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

де:

$m$  – середня арифметична помилка;

$\sigma$  – квадратична помилка;

$n$  – число визначень.

Критерій вірогідності  $p$  визначали за допомогою таблиці Стьюдента – Фішера, попередньо визначивши показник вірогідності відмінностей за формулою [43]:

$$t = \frac{|M_1 - M_2|}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$

де:

$t$  – показник вірогідності відмінностей;

$M_1$  – середнє арифметичне дослідної групи;

$M_2$  – середнє арифметичне контрольної групи;

$m_1$  – середня арифметична помилка дослідної групи;

$m_2$  – середня арифметична помилка контрольної групи.

### **РОЗДІЛ 3**

## **ОСТЕОПРОТЕКТОРНА ЕФЕКТИВНІСТЬ КОМПЛЕКСУ КВЕРЦЕТИНУ, ВІТАМІНІВ ТА МІНЕРАЛІВ В ОВАРІОЕКТОМОВАНИХ САМОК ЩУРІВ**

Основною метою першого етапу дослідження було встановлення остеопротекторної ефективності профілактичного комплексу на основі кверцетину, мінералів та вітамінів у оваріоектомованих щурів, які отримували неповноцінний за вмістом кальцію та білка раціон.

### **3.1 Морфометричні дослідження стегнових кісток, хребців та альвеолярної частини нижньої щелепи**

В стегнових кістках та поперекових хребцях самок щурів, які зазнали двосторонньої оваріоектомії, визначали щільність, вміст мінерально-органічного комплексу (МОК), вміст мінерального (МК) та органічного (ОК) компонентів окремо. В альвеолярній частини нижньої щелепи досліджували ступінь атрофії.

В результаті проведення необхідних вимірів та статистичної обробки даних, були отримані показники, які представлені у таблиці 3.1. Як можна побачити, щільність стегнової кістки у оваріоектомованих щурів вірогідно зменшилась на 8,96 % ( $p \leq 0,001$ ). Це може свідчити про переважання резорбційних процесів над утворенням кісткової тканини, що є цілком закономірним при гіпоестрогенії та дефіциті кальцію в організмі. Об'єм кістки не зазнав змін, але маса кістки зменшилась на 20,42 % ( $p \leq 0,05$ ), що може виступити додатковим доказом розвитку остеодистрофічних явищ.

Взагалі, хімічний склад кісткової тканини можна уявити як мінерально-органічний комплекс (МОК) та воду. У таблиці 3.1 показано зменшення вмісту МОК у стегновій кістці щурів з оваріоектомією на 13,17 % ( $p \leq 0,001$ ), що було викликано зменшенням МК на 22,84 %. Вміст ОК залишився незмінним. МОК кісткової тканини формується остеобластами. Органічний компонент цього комплексу забезпечує певну гнучкість кістки та слугує матрицею для мінералізації. Мінеральний компонент необхідний для надання

кістці міцності. Але варто зазначити, що спроможність КТ опиратися деформації та витримувати фізичні навантаження, обумовлена синергією цих двох складових позаклітинного матриксу.

Таблиця 3.1

**Щільність, мінерально-органічний комплекс (МОК), органічний компонент (ОК), мінеральний компонент (МК) у стегнових кістках оваріоектомованих самок щурів при дефіциті білка і кальцію та за умови профілактики**

Показник	Група		
	Інтактна (n = 8)	ОЕ + НКБД (n = 8)	ОЕ+НКБД+К (n = 8)
Маса, мг	470,73 ± 26,57	374,63 ± 24,26 p ≤ 0,05	448,24 ± 25,82 p ≥ 0,4 p <sub>1</sub> ≥ 0,05
Об'єм, мм <sup>3</sup>	302,85 ± 14,99	264,98 ± 16,35 p ≥ 0,1	296,72 ± 16,79 p ≥ 0,5 p <sub>1</sub> ≥ 0,1
Щільність, мг/мм <sup>3</sup>	1,551 ± 0,016	1,412 ± 0,009 p ≤ 0,001	1,510 ± 0,017 p ≥ 0,1 p <sub>1</sub> ≤ 0,001
Вміст МОК, % (вагова частка)	66,23 ± 0,79	57,51 ± 0,66 p ≤ 0,001	63,23 ± 1,13 p ≤ 0,05 p <sub>1</sub> ≤ 0,001
Вміст МК, % (вагова частка)	42,04 ± 1,18	32,44 ± 0,78 p ≤ 0,001	39,73 ± 1,10 p ≥ 0,1 p <sub>1</sub> ≤ 0,001
Вміст ОК, % (вагова частка)	24,19 ± 0,50	25,07 ± 0,59 p ≥ 0,2	23,50 ± 0,29 p ≥ 0,2 p <sub>1</sub> ≤ 0,05

Примітка: ОЕ + НКБД – група щурів з оваріоектомією, які вживали раціон з низьким вмістом білка та кальцію; ОЕ+ НКБД+К – група щурів з патологією, які отримували профілактичний комплекс; p – достовірність різниці показників по відношенню до показників інтактної групи, p<sub>1</sub> – достовірність різниці показників по відношенню до показників у самок щурів з патологією.

Зміни в співвідношенні окремих компонентів слугують надійним індикатором, який сигналізує про розвиток патологічних ускладнень у кістці [233, 241]. Так, зменшення маси кістки та її щільності, можна пояснити саме зменшенням вмісту мінеральної складової стегнової кістки, як результату активації остеокластів в умовах нестачі статевих гормонів та аліментарного дефіциту кальцію і білка. Відсутність змін вмісту ОК є ознакою, характерною



для тривалої відсутності естрогенової регуляції та може означати посилення утворення колагену I типу остеобластами.

При вживанні вітамінно-мінерального комплексу з кверцетином самками щурів на тлі оваріоектомії, спостерігали збільшення щільності стегнової кістки на 6,94 % ( $p_1 \leq 0,001$ ). Хоча в показниках об'єму та маси не відмічено значущих змін, за умови профілактики прослідковується характерна тенденція до їх збільшення: маса кістки зросла на 19,65 %, об'єм – на 11,98 %.

Вміст МОК у стегновій кістці за умови вживання комплексу збільшився на 9,95 % ( $p_1 \leq 0,001$ ), за рахунок підвищення МК, яке склало 22,47 % ( $p_1 \leq 0,001$ ). Показник ОК став меншим на 6,26 % ( $p_1 \leq 0,05$ ), що можна пояснити збільшенням мінеральної частки позаклітинного матриксу.

В кістці поперекових хребців оваріоектомованих щурів при аліментарному дефіциті кальцію і білка зміни морфометричних показників були схожі. Як можна побачити з таблиці 3.2. патологія викликала зменшення щільності кістки хребців на 8,43 % ( $p \leq 0,001$ ), яке відбувалось на тлі зниження маси та об'єму хребця на 38,18 % та 32,47 %, відповідно.

Зниження щільності КТ хребців, як і у випадку зі стегною кісткою, відбувалось за рахунок зменшення МОК на 13,89 % та вагової частки МК, яке склало 29,63 % ( $p \leq 0,001$ ), а вміст ОК не зазнав змін (табл. 3.2).

Застосування профілактичного комплексу сприяло збільшенню маси на 37,71 % та об'єму на 30,11 % ( $p_1 \leq 0,05$ ), що обумовило зростання щільності хребців на 5,48 % ( $p_1 \leq 0,001$ ). Вміст МОК при цьому зріс на 9,23 % за рахунок збільшення вмісту МК – на 26,94 % ( $p_1 \leq 0,001$ ). Показники МОК та МК у хребцях третьої групи тварин були достовірно меншими ніж в інтактній групі, тобто не досягли нормальних значень (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

**Щільність, мінерально-органічний комплекс (МОК), органічний компонент (ОК), мінеральний компонент (МК) у хребцях оваріоектомованих самок щурів при дефіциті білка і кальцію та за умови профілактики**

Показник	Група		
	Інтактна (n=8)	ОЕ + НКБД (n=8)	ОЕ+НКБД+К (n=8)
Маса, мг	118,51 ± 6,54	73,26 ± 5,44 p ≤ 0,001	100,89 ± 8,13 p ≥ 0,2 p <sub>1</sub> ≤ 0,05
Об'єм, мм <sup>3</sup>	82,58 ± 4,47	55,77 ± 4,21 p ≤ 0,001	72,56 ± 5,44 p ≥ 0,2 p <sub>1</sub> ≤ 0,05
Щільність, мг/мм <sup>3</sup>	1,435 ± 0,013	1,314 ± 0,004 p ≤ 0,001	1,386 ± 0,014 p ≤ 0,05 p <sub>1</sub> ≤ 0,001
Вміст МОК, % (вагова частка)	59,26 ± 1,02	51,03 ± 0,59 p ≤ 0,001	55,74 ± 0,94 p ≤ 0,05 p <sub>1</sub> ≤ 0,001
Вміст МК, % (вагова частка)	33,92 ± 0,80	23,87 ± 0,51 p ≤ 0,001	30,30 ± 1,20 p ≤ 0,05 p <sub>1</sub> ≤ 0,001
Вміст ОК, % (вагова частка)	25,34 ± 0,36	27,16 ± 0,86 p ≥ 0,05	25,44 ± 0,60 p ≥ 0,5 p <sub>1</sub> ≥ 0,1

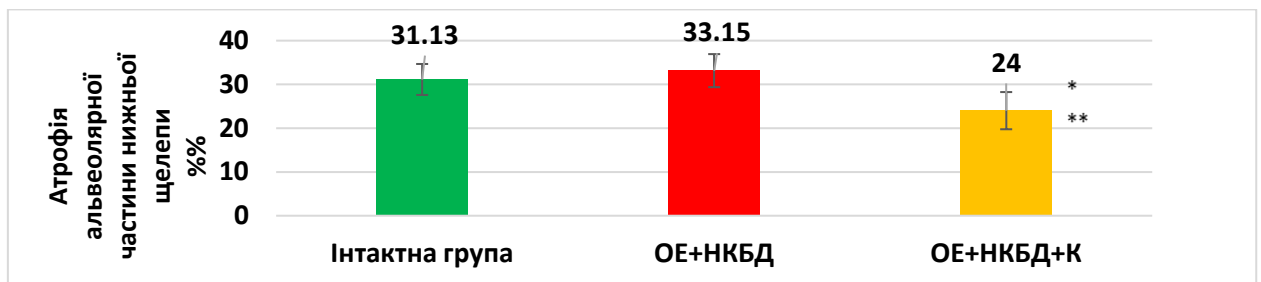
Примітка, як до таблиці 3.1.

Схожі зміни щільності та вмісту МК в обох видах кісток оваріоектомованих самок на тлі аліментарного дефіциту кальцію і білка вказують на глибоке ураження як кортикальної, так і трабекулярної кістки при дефіциті естрогенів і нутриєнтів. Нормалізація зазначених параметрів при вживанні щурами профілактичного комплексу відбувалась, перш за все, за рахунок наявності кверцетину та цитрату кальцію в його складі. Можна припустити, що флавоноїд кверцетин через свою естрогеноподібність компенсував прояви гіпоестрогенії, взаємодіючи з рецепторами естрогенів та активуючи експресію білків остеогенезу. Цитрат кальцію завдяки своїм фармакокінетичним властивостям легко засвоювався в організмі та

депонувався в кістковій тканині оваріоектомованих самок за допомогою вітамінів і мінералів профілактичного комплексу.

Альвеолярна частина нижньої щелепи є однією з найбільш чутливих скелетних ділянок до резорбтивної дії остеокластів, що зумовлено інтенсивним процесами ремоделювання [95]. Ступінь атрофії цієї кістки прямо пропорційний руйнуванню кісткового матриксу. Тому, було проведено вимірювання ступеня атрофії даної ділянки нижньої щелепи та ряду біохімічних показників з метою деталізації дії запропонованого комплексу в умовах гіпоестрогенії та аліментарного дефіциту кальцію і білка.

Ступінь атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи у інтактній групі тварин склав  $31,13 \pm 1,5\%$ . Згідно даних представлених на рисунку 3.1. цей показник не зазнав достовірних змін у щурів з патологією відносно його рівня в інтактній групі ( $p > 0,4$ ), хоча і був більшим на 6,49 %.



**Рис. 3.1** Ступінь атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи у оваріоектомованих самок щурів при дефіциті білка і кальцію та за умови профілактики

Примітка: \* - достовірність різниці показників по відношенню до показників інтактної групи; \*\* - достовірність різниці показників по відношенню до показників у оваріоектомованих самок щурів з аліментарним дефіцитом кальцію і білка.

При застосуванні комплексу у щурів 3-ої групи відбувалось зменшення атрофії їх альвеолярної частини кістки на 22,9 % відносно показника у інтактних тварин та на 27,6 % відносно групи без профілактики ( $p \leq 0,05$ ;  $p_1 \leq 0,05$ ). Отримані результати свідчать про здібність запропонованого комплексу кверцетину, вітамінів і мінералів ефективно гальмувати резорбційні процеси в кістковій тканині.

### **3.2 Біохімічні дослідження кісткової тканини альвеолярної частини нижньої щелепи**

Зменшення показників міцності КТ є наслідком активації ряду ферментів, які руйнують, як мінеральний, так і органічний компонент позаклітинного матриксу. Фіксація зміни активності та вмісту біохімічних маркерів резорбції, остеогенезу, окислювального стресу є інструментом, який дозволяє більш детально обґрунтувати захисну дію розробленого комплексу в умовах остеодистрофії комбінованої етіології. Тому, з метою уточнення характеру патологічних змін в кістковій тканині альвеолярної частини нижньої щелепи проводили дослідження активності кислої фосфатази (КФ), лужної фосфатази (ЛФ), протеолітичного ферменту еластази, антиоксидантного ферменту каталази та вмісту малонового діальдегіду (МДА).

Отримані дані встановили, що коливання в показниках щільності стегна, хребців, атрофії альвеолярної частини кістки нижньої щелепи супроводжувалися змінами маркерів остеобластів та остеокластів в альвеолярній частині нижньої щелепи (табл. 3.3). За умови оваріоектомії та споживання неповноцінної дієти в кістковій тканині встановлено зростання активності КФ більш ніж у два рази. Кісткова КФ є біохімічним маркером, який свідчить про посилення остеокластогенезу. Відомо, що при менопаузі активність остеокластів значно зростає через зменшення експресії OPG, яке перешкоджає взаємодії RANKL-RANK та пригнічення апоптозу остеокластів.

Активність кісткової ЛФ в умовах патології також збільшилась більш ніж удвічі. Зростання активності ЛФ, яка є характерним маркером остеобластів, в даному випадку можна розглядати, як компенсацію надмірної деструкції матриксу кістки. Даний компенсаторний механізм виявився доволі ефективним, якщо враховувати незначущість змін в показниках атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи .

Збільшення активності еластази у групі з патологією на 37,8 % ( $p \leq 0,02$ ) є ознакою посиленого руйнування органічної основи кісткового матриксу. Відомо, що еластаза є протеолітичним ферментом, який гідролізує колаген I–IV типів. Еластаза здатна стимулювати диференціацію остеокластів, викликати деградацію OPG та активувати матриксні металопротеїнази, які додатково руйнують позаклітинний матрикс кісткової тканини [17, 196].

Таблиця 3.3

**Маркери активності остеокластів, остеобластів та функціонального стану антиоксидантної системи у щурів з патологією кісткової тканини та за умови її корекції в альвеолярній частини нижньої щелепи**

Показник	Група		
	Інтактна (n =8)	ОЕ + НКБД (n =8)	ОЕ+НКБД+К (n =8)
Активність кислої фосфатази (мккат/кг)	5,96 ± 0,28	12,14 ± 0,56 $p \leq 0,001$	6,65 ± 0,20 $p \geq 0,05$ $p_1 \leq 0,001$
Активність лужної фосфатази (мккат/кг)	10,63 ± 0,59	23,87 ± 1,36 $p \leq 0,05$	11,48 ± 0,65 $p \geq 0,001$ $p_1 \leq 0,001$
Активність еластази (мккат/кг)	11,15 ± 1,40	15,37 ± 1,57 $p \leq 0,02$	9,33 ± 1,52 $p \geq 0,05$ $p_1 \leq 0,001$
Активність каталази (мккат/кг)	2,04 ± 0,03	2,26 ± 0,04 $p \leq 0,001$	2,43 ± 0,09 $p \leq 0,002$ $p_1 \geq 0,1$
Вміст малонового діальдегіду (ммоль/кг)	4,43 ± 0,30	5,46 ± 0,52 $p \geq 0,2$	4,40 ± 0,67 $p \geq 0,5$ $p_1 \geq 0,5$

Примітка як до таблиці 3.1.

Застосування комплексу з кверцетином викликало нормалізацію показників КФ, ЛФ та еластази: активність КФ зменшилась на 45,22 %, ЛФ – на 51,91 %, еластази – на 39,30 % ( $p_1 \leq 0,001$ ) (табл. 3.3). Наразі відомо, що кверцетин здатний посилити диференціацію МСК в остеобласти за рахунок

збільшення експресії мРНК RUNX2, активації сигнального шляху Wnt/ $\beta$ -катеніна, збільшення синтезу антиапоптичного білка Bcl-2. В той же час він пригнічує процеси утворення остеокластів, стимулюючи синтез OPG, інгібуючи NFATc1 та збільшуючи рівень проапоптичного білка Bax [194, 258]. Перелічені механізми можуть пояснити остеопротекторну дію комплексу, який містить у своєму складі кверцетин.

Естрогени здатні стимулювати синтез антиоксидантних ферментів та навпаки, менопауза супроводжується утворенням надмірної кількості АФК та окислювальним стресом. При взаємодії АФК з мембранами клітин відбувається процес перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), який супроводжується накопиченням таких кінцевих продуктів, як МДА. АФК здатні посилювати резорбцію кісткової тканини через ініціацію остеокластогенезу. Тому визначали активність ферментативної ланки антиоксидантного захисту за активністю каталази та рівнем МДА в кістковій тканині альвеолярної частини нижньої щелепи оваріоектомованих самок при дефіциті білка і кальцію та за умови профілактики.

При оцінці активності каталази з'ясували збільшення активності цього ферменту на 10,78 % ( $p \leq 0,001$ ) у щурів зі гіпоестрогенією та дефіцитом нутрієнтів (табл. 3.3). Це, на нашу думку, пов'язано з інтенсифікацією антиоксидантного захисту, активність якого направлена на пригнічення вільнорадикальних процесів в умовах патології. У частини альвеолярної кістки щурів з патологією встановлено підвищення вмісту МДА на 23,25 %, що пояснюється активним антиоксидантним захистом в умовах створеної патології.

У щурів, які отримували профілактику, визначено достовірне збільшення активності каталази в альвеолярній кістці відносно рівня у інтактних тварин 19,18 % ( $p \leq 0,002$ ), але даний показник не був достовірно більшим ніж у групі з патологією. Вміст МДА в альвеолярній кістці щурів при вживанні профілактичного комплексу на тлі патології був наближений до значення інтактної групи, але не статистично значуще (табл. 3.3).

### 3.3 Виведення та засвоєння та кальцію у оваріоектомованих самок щурів при дефіциті білка і кальцію та за умови профілактики

Виведення та засвоєння кальцію в організмі щурів з патологією визначали шляхом вимірювання різниці між вмістом кальцію у сечі та калі та кількістю кальцію, яку тварини отримували зі щоденним раціоном.

З таблиці 3.4 можна побачити, що щури з патологією отримували з раціоном на 17,9 % менше кальцію ніж інтактні тварини. Виведення кальцію з сечею у тварин з патологією збільшилось на 14,8 % ( $p \leq 0,001$ ), при цьому виведення кальцію з калом зменшилось на 58,67 %. Відомо, що недостатній рівень естрогенів сприяє зменшенню реабсорбції кальцію у нирках, в тому числі через пригнічення утворення активної форми вітаміну D. Зменшення кількості кальцію в калі, можна пояснити недостатньою кількістю цього елемента у раціоні.

Таблиця 3.4.

#### Виведення та абсорбція кальцію у самок щурів при дефіциті естрогенів, білка, кальцію та за умови профілактики

Показник	Група		
	Інтактна (n =8)	ОЕ + НКБД (n =8)	ОЕ+НКБД+К (n =8)
Загальна кількість кальцію у кормі (мг/добу)	53,84±0,73	44,21±0,34 $p \leq 0,001$	75,50±0,91 $p \leq 0,001$ $p_1 \leq 0,001$
Кількість кальцію, яка виводився з сечею (мг/добу)	0,412±0,005	0,473±0,007 $p \leq 0,001$	0,493±0,009 $p \leq 0,001$ $p_1 \geq 0,1$
Кількість кальцію, яка виводилася з калом (мг/добу)	1,58±0,010	0,653±0,008 $p \leq 0,001$	0,667±0,009 $p \leq 0,001$ $p_1 \geq 0,2$
Сумарне виведення кальцію (мг/100 г)	1,99±0,06	1,12±0,02 $p \leq 0,001$	1,16±0,009 $p \leq 0,001$ $p_1 \geq 0,05$
Абсорбція кальцію (мг/добу)	51,85±0,65	43,08±0,30 $p \leq 0,001$	74,34±0,87 $p \leq 0,001$ $p_1 \leq 0,001$

Примітка: як до таблиці 3.1.

Сумарне виведення кальцію в організмі тварин після оваріоектомії і отримання раціону дефіцитного за нутриєнтами, зменшилось на 43,7 % в порівнянні з цим показником в інтактній групі. На нашу думку, це є компенсацією на аліментарний дефіцит кальцію. В той час, як показник абсорбції кальцію, який відображає загальне його засвоєння, був меншим на 16,9 % ( $p \leq 0,001$ ). Відомо, що нестача кальцію у крові призводить до збільшення продукції ПТГ для активації резорбційних процесів у кістці та підтримання кальцію на необхідному рівні. Тому отримані дані можуть пояснити посилену резорбцію КТ у оваріоектомованих самок щурів з аліментарним дефіцитом кальцію і білка (табл. 3.4).

Кількість кальцію, яку отримували щури з раціоном та профілактикою патології, була на 70,8 % більшою ніж у щурів з патологією та на 40,2 % більше, ніж у інтактних тварин. Кількість кальцію, що виводилася з калом, сечею та загальний показник виведення не відрізнялась від значень у тварин без профілактики. Проте додаткове введення кальцію у складі профілактичного комплексу сприяло зростанню загальної абсорбції кальцію на 72,6 %, ніж у тварин з патологією ( $p_1 \leq 0,001$ ) та на 43,4 % ( $p \leq 0,001$ ), ніж у інтактних тварин. Отриманий результат може вказувати на збільшення каналцевої реабсорбції кальцію та підвищення всмоктування у кишечнику, що обумовлено синергетичною дією компонентів комплексу.

### **3.4 Біохімічні показники запалення та окислювального стресу в слизових оболонках шлунково-кишкового тракту у оваріоектомованих самок щурів при дефіциті білка і кальцію та за умови профілактики**

У слизовій оболонці порожнини рота (СОПР), шлунка, тонкої та товстої кишки визначали активність КФ та еластази (маркерів запалення), уреазу (показника бактеріальної контамінації), вміст МДА (продукт ПОЛ).

Моделювання патології шляхом оваріоектомії та неповноцінного за вмістом кальцію та білка раціоном викликало збільшення активності КФ на 16,49 % ( $p \leq 0,02$ ) у слизовій оболонці ротової порожнини. Це свідчить про



інтенсивний розвиток запального процесу у СОПР самок щурів при недостатньому рівні естрогенів. При цьому не зареєстровано змін іншого маркера запалення за умови патології – активності еластази (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

**Показники запалення та перекисного окислення ліпідів у слизовій оболонці порожнини рота щурів при дефіциті естрогенів, білка, кальцію та за умови профілактики**

Показник	Група		
	Інтактна (n =8)	ОЕ + НКБД (n =8)	ОЕ+НКБД+К (n =8)
Активність кислої фосфатази (мккат/кг)	14,68±0,52	17,10±0,68 $p \leq 0,02$	14,04±0,65 $p \geq 0,2$ $p_1 \leq 0,01$
Активність еластази (мккат/кг)	59,11±2,70	64,56±2,37 $p \geq 0,1$	47,45±1,39 $p \leq 0,002$ $p_1 \leq 0,001$
Вміст малонового діальдегіду (ммоль/кг)	15,71±1,14	19,76±1,42 $p \leq 0,05$	15,71±1,22 $p \geq 0,5$ $p_1 \leq 0,05$

Примітка як до таблиці 3.1

Розвиток експериментальної патології призвів до збільшення вмісту МДА у СОПР на 25,78 %. Що може виступити ознакою інтенсифікації ПОЛ та посиленого руйнування клітинних мембран внаслідок запалення при зменшенні рівня естрогенів та дефіциті білка і кальцію у раціоні.

Вживання комплексу з цитратом кальцію, кверцетином, вітамінами С та D, мікро- та макроелементами призвело до нормалізації активності КФ та вмісту МДА. Активність еластази стала меншою на 26,50 % ( $p_1 \leq 0,05$ ) ніж у групі без профілактики, а також на 19,73 % ( $p \leq 0,002$ ) ніж у інтактних щурів.

З даних представлених у таблиці 3.6 можна побачити, що у оваріоектомованих самок щурів при дефіциті білка і кальцію активність КФ у слизовій оболонці шлунку збільшилась на 23,29 % ( $p \leq 0,01$ ), активність еластази – на 52,55 % ( $p \leq 0,001$ ), а вміст МДА – на 35,36 %.

Таблиця 3.6

**Показники запалення та перекисного окислення ліпідів у слизовій оболонці шлунка щурів при дефіциті естрогенів, білка, кальцію та за умови профілактики патології**

Показник	Група		
	Інтактна (n =8)	ОЕ + НКБД (n =8)	ОЕ+НКБД+К (n =8)
Активність кислої фосфатази (мккат/кг)	34,99±1,57	43,14±2,10 $p \leq 0,01$	33,74±1,45 $p \geq 0,5$ $p_1 \leq 0,005$
Активність еластази (мккат/кг)	149,33±3,79	227,81±8,64 $p \leq 0,001$	190,50±5,20 $p \leq 0,001$ $p_1 \leq 0,005$
Вміст малонового діальдегіду (ммоль/кг)	10,12±0,52	14,24±0,87 $p \leq 0,002$	10,96±0,48 $p \geq 0,2$ $p_1 \leq 0,01$

Примітка як до таблиці 3.1

За умови введення профілактичного комплексу встановлена нормалізація показників, що досліджувались. Активність КФ у слизовій оболонці шлунка зменшилась на 21,79 % ( $p_1 \leq 0,005$ ), вміст МДА – на 23,03 % ( $p_1 \leq 0,01$ ). Активність еластази була на 16,38 % менше, ніж у групі без профілактики, але також на 27,57 % вища за показник інтактної групи.

Як можна побачити з таблиці 3.7 у слизовій оболонці тонкої кишки відбувались схожі зміни досліджуваних біохімічних параметрів. Розвиток патології через видалення яєчників та нестачу білка і кальцію у їжі призвів до збільшення активності КФ на 27,02 % ( $p \leq 0,001$ ), активності еластази – на 93,73 % ( $p \leq 0,001$ ), вмісту МДА – на 26,37 %, але без належного рівня статистичної значущості в слизовій оболонці тонкої кишки (табл. 3.7).

При вживанні профілактичного комплексу у слизовій оболонці тонкої кишки самок щурів активність КФ зменшилася на 8,93 % ( $p_1 \leq 0,05$ ) відносно її рівня у групі без профілактики, але цей показник також був на 15,68 % ( $p \leq 0,01$ ) більшим, ніж у інтактних тварин. Активність еластази зменшилась на 37,85 % ( $p_1 \leq 0,001$ ), вміст МДА мав тенденцію до зниження (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

**Показники запалення та перекисного окислення ліпідів у слизовій оболонці тонкої кишки при дефіциті естрогенів, білка, кальцію та за умови профілактики патології**

Показник	Група		
	Інтактна (n=8)	ОЕ + НКБД (n=8)	ОЕ+НКБД+К (n=8)
Активність кислої фосфатази (мккат/кг)	39,67 ± 1,49	50,39 ± 1,22 p ≤ 0,001	45,89 ± 1,44 p ≤ 0,01 p <sub>1</sub> ≤ 0,05
Активність еластази (мккат/кг)	702,4 ± 60,0	1360,7 ± 87,2 p ≤ 0,001	845,7 ± 54,7 p ≥ 0,05 p <sub>1</sub> ≤ 0,001
Вміст малонового діальдегіду (ммоль/кг)	7,66 ± 0,44	9,68 ± 0,86 p ≥ 0,05	7,69 ± 0,64 p ≥ 0,5 p <sub>1</sub> ≥ 0,1

Примітка як до таблиці 3.1

Показники запалення та руйнування клітинних мембран у слизовій оболонці товстої кишки представленні у таблиці 3.8. Згідно отриманих даних активність КФ у слизовій оболонці товстої кишки при змодельованій патології стала більшою на 29,57 % ( $p \leq 0,002$ ). Ступінь активності еластази збільшився на 28,72 % ( $p \leq 0,005$ ), вміст МДА склав  $11,34 \pm 0,62$  ммоль/кг, що було на 35,65 % ( $p \leq 0,005$ ) більшим, ніж в інтактній групі (табл. 3.8).

При вживанні вітамінно-мінерального комплексу на тлі сформованої патології у слизовій оболонці товстої кишки зареєстровано зменшення активності КФ на 21,39 % ( $p_1 \leq 0,005$ ), еластази – на 19,52 % ( $p_1 \leq 0,01$ ) та вмісту МДА – на 22,05 % ( $p_1 \leq 0,01$ ).

Таким чином, при зменшенні кількості естрогенів та неповноцінній за кальцієвим та білковим складом дієти відбувався розвиток запального процесу на всіх ділянках ШКТ. Враховуючи, що естрогени здатні інгібувати шлях передачі сигналів NF- $\kappa$ B, які мають визначальну роль у розвитку запалення, отримані дані є цілком закономірними [168]. Застосування профілактичного комплексу з вмістом флавоноїду кверцетину, вітамінів С та

D<sub>3</sub>, мікро- та макроелементів запобігало проявам запального процесу при змодельованій менопаузі.

Таблиця 3.8

**Показники запалення та перекисного окислення ліпідів у слизовій оболонці товстої кишки при дефіциті естрогенів, білка, кальцію та за умови профілактики патології**

Показник	Група		
	Інтактна (n = 8)	ОЕ + НКБД (n = 8)	ОЕ+НКБД+К (n = 8)
Активність кислої фосфатази (мккат/кг)	33,34 ± 1,24	43,20 ± 2,12 p ≤ 0,002	33,96 ± 1,72 p ≥ 0,5 p <sub>1</sub> ≤ 0,005
Активність еластази (мккат/кг)	92,86 ± 7,62	119,53 ± 1,24 p ≤ 0,005	96,20 ± 7,40 p ≥ 0,5 p <sub>1</sub> ≤ 0,01
Вміст малонового діальдегіду (ммоль/кг)	8,36 ± 0,54	11,34 ± 0,62 p ≤ 0,005	8,84 ± 0,56 p ≥ 0,5 p <sub>1</sub> ≤ 0,01

Примітка як до таблиці 3.1

В слизових оболонках ШКТ була визначена активність уреаз, яка є показовою щодо оцінки ступеня розвитку дисбіозу за рахунок росту чисельності умовно-патогенних бактерій. Результати вимірювання активності уреаз в слизових оболонках травного тракту представлені у таблиці 3.9.

Як можна побачити з таблиці 3.9 в усіх відділах травного тракту самок з патологією активність уреаз збільшена з високим рівнем вірогідності: у СОПР – на 88,0 %, у слизовій оболонці шлунка – на 227,01 %, у тонкому кишечнику – 41,00 %, у товстому кишечнику – на 58,33 % (p ≤ 0,005 – 0,001).

Таблиця 3.9

**Активність уреазы в слизових оболонках травного тракту щурів при дефіциті естрогенів, білка, кальцію та за умови профілактики патології**

Ділянка ШКТ Група	СОПР	Слизова оболонка шлунка	Слизова оболонка тонкого кишечника	Слизова оболонка товстого кишечника
Інтактна (n = 8)	0,268 ± 0,018	0,348 ± 0,010	0,239 ± 0,020	1,56 ± 0,10
ОЕ + НКБД (n = 8)	0,504 ± 0,024 p ≤ 0,001	1,138 ± 0,020 p ≤ 0,001	0,337 ± 0,021 p ≤ 0,005	2,47 ± 0,16 p ≤ 0,001
ОЕ+НКБД+К (n = 8)	0,162 ± 0,010 p ≤ 0,001 p <sub>1</sub> ≤ 0,001	0,560 ± 0,008 p ≤ 0,001 p <sub>1</sub> ≤ 0,001	0,202 ± 0,023 p ≥ 0,2 p <sub>1</sub> ≤ 0,001	1,69 ± 0,12 p ≥ 0,2 p <sub>1</sub> ≤ 0,002

Примітка: СОПР – слизова оболонка порожнини рота; інші позначення, як в таблиці 3.1.

Висока активність уреазы є ознакою підвищеної контамінації травного тракту умовно-патогенною мікробіотою та розвитку дисбіозу, що є наслідком запальних процесів у слизових оболонках. При застосуванні профілактичного комплексу, активність уреазы вірогідно зменшувалася у досліджуваних відділах травного тракту, що може свідчити про нормалізацію мікробіому організму тварин за рахунок дії компонентів комплексу.

**УЗАГАЛЬНЕННЯ.** Оваріоектомія та дефіцит білка і кальцію призвели до зменшення щільності та вмісту мінерального компоненту у КТ стегна та хребців самок щурів. В альвеолярній частини нижньої щелепи тварин спостерігали двократне збільшення активності кислої та лужної фосфатаз, зростання активності еластази та каталази.

Змодельована патологія призвела до посиленої екскреції кальцію з сечею, зменшення його виведення з калом та зниження загальної абсорбції кальцію в організмі щурів. У слизових оболонках травного тракту встановлено розвиток генералізованого запального процесу за показниками

активності КФ, еластази та вмісту МДА, а також розвиток дисбіозу за зростом активності уреаз.

Вживання профілактичного комплексу оваріоектомованими самками сприяло нормалізації щільності та вмісту МК, об'єму та маси кістки стегон та хребців та зменшенню атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи нижньої щелепи. У альвеолярній частини нижньої щелепи щурів зменшились активності КФ, ЛФ, еластази. Введення комплексу не вплинуло на активність антиоксидантного ферменту каталази та вміст МДА.

Під впливом комплексу препаратів відмічено збільшення загального засвоєння кальцію в організмі тварин, як відносно цього показника у групі з патологією, так і відносно його рівня у контролі. Застосування комплексу вітамінів та мінералів виявило протизапальний, антиоксидантний, антидисбіотичний та цитопротекторний ефект у відділах травного тракту.

Наступним етапом дослідження було заплановано оцінювання профілактичних ефектів комплексу у щурів, за умови тривалого впливу піретроїдного інсектициду  $\alpha$ -циперметрину. Для обґрунтування особливостей взаємодії кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів з  $\alpha$ -рецептором естрогенів ( $ER\alpha$ ), провели дослідження за допомогою докінг-аналізу з використанням програм AutoDock4.2.6, AutoDockVina-1.2.5, Schrödinger Maestro Glide, визначення фармакокінетичних особливостей та потенційних токсичних ефектів досліджуваних сполук *in silico*, для чого використовувалися програми pkCSM та SwissADME.

## РОЗДІЛ 4

### ДОСЛІДЖЕННЯ *IN SILICO* ОСОБЛИВОСТЕЙ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КВЕРЦЕТИНУ, $\alpha$ -ЦИПЕРМЕТРИНУ ТА ЙОГО МЕТАБОЛІТІВ З $\alpha$ -РЕЦЕПТОРОМ ЕСТРОГЕНУ, ЇХ ФАРМАКОКІНЕТИКИ ТА ТОКСИЧНОСТІ

Відомо, що деструктори ендокринної системи, зокрема пестициди, втручаються у механізми гуморальної регуляції шляхом агоністичної або антагоністичної дії на рецептори естрогенів. Тому, на наступному етапі, досліджували особливості зв'язування (докінгу) кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів: 3-РВА, ДССА з  $\alpha$ -рецептором естрогенів ( $ER\alpha$ ) та фармакокінетичні особливості даних сполук *in silico*. Розуміння взаємодії  $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів з рецептором естрогену є важливим з точки зору оцінки потенційних ризиків даного піретроїду для репродуктивної системи та його деструктивного впливу на ендокринну систему.

Естрогеновий рецептор складається з центрального домену зв'язування ДНК, N-кінцевого домену, конформаційно активних ділянок (AF-1 та AF-2), а також з C-кінцевого ліганд зв'язуючого домену (ЛЗД). Передача сигналів через ER починається з приєднання ліганду (ендогенної або екзогенної гормоноподібної сполуки) до ЛЗД. ЛЗД складається з  $\beta$ -шпильки та дванадцяти  $\alpha$ -спіралей (H1-H12). H12 особливо важливий для функціонування ER, оскільки грає роль молекулярного перемикача, тому що має здатність ініціювати зміну конформації ЛЗД в залежності від ліганду, що є вирішальним для активації або інгібування рецептора.

Для проведення докінг-аналізу були обрані 4 ліганд-зв'язуючих домени (ЛЗД)  $ER\alpha$ : 1GWR, 3ERT, 1ERE та 1ERR із бази даних RCSB (<https://www.rcsb.org/>). 3ERT – це кристалічна структура ЛЗД  $ER\alpha$  людини в комплексі з 4-гідрокситамоксифеном – препаратом з антагоністичною дією на  $ER\alpha$ . 1GWR та 1ERE – це кристалічні структури ЛЗД  $ER\alpha$  людини в комплексі з естрадіолом, який є ендогенним агоністом. 1ERR – ЛЗД  $ER\alpha$

людини в комплексі з ралоксифеном – препаратом із естроген-агоністичною дією на КТ.

Референтними лігандами для докінг-аналізу служили такі сполуки: естрадіол (для 1GWR, 1ERE), ралоксифен (для 1ERR), 4-гідрокситамоксифен (для 3ERT). Досліджуваними речовинами були: флавоноїд кверцетин, піретроїдний інсектицид  $\alpha$ -циперметрин та його метаболіти: 3-РВА, DССА. Процедура оцінки особливостей зв'язування дослідних сполук з ЛЗД ER $\alpha$  відбувалась з використанням програм AutoDock4.2.6 (далі – AutoDock4), AutoDockVina-1.2.5 (далі – AutoDockVina), Schrödinger Maestro Glide. Оцінка *in silico* токсичності та фармакокінетичних властивостей кверцетину та  $\alpha$ -циперметрину відбувалась за допомогою платформи для швидкого аналізу декількох фармакокінетичних показників рkCSM та онлайн серверу SwissADME.

#### **4.1 Докінг-аналіз кверцетину, $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів з $\alpha$ -рецептором естрогенів**

При проведенні оцінки докінгу з використанням програми AutoDock 4 та AutoDockVina було встановлено, що всі дослідні сполуки кверцетин,  $\alpha$ -циперметрин, 3-РВА, DССА мали спорідненість до ER $\alpha$ . Сила зв'язування з рецептором виражалась у ккал/моль (у від'ємних числах), чим нижче даний показник, тим сильніше енергія зв'язування ліганда з рецептором. Зв'язування певної сполуки з рецептором з такою ж, або нижчою енергією, як у референтного ліганда, може виступити ознакою високої афінності даної речовини до рецептора та можливістю пригнічувати біологічну активність ендогенних або екзогенних лігандів, які активують даний рецептор через конкурентну взаємодію. Можна припустити, що чим ближче показник афінності дослідної сполуки до показника референтного ліганда, тим вони ближче за фізіологічними ефектами, тобто за проявами агонізму або антагонізму.



У таблиці 4.3 наведена прогнозована енергія зв'язування досліджуваних речовин з ER $\alpha$ . Як можна побачити, найнижчі енергії зв'язування та, як наслідок, високу афінність з обраними ЛЗД ER $\alpha$  мають референтні ліганди: естрадіол (агоніст 1ERE, 1GWR), 4-гідрокситамоксифен (антагоніст 3ERT), ралоксифен (агоніст 1ERR).

Дослідження за допомогою програми AutoDock4 показало, що піретроїдний інсектицид  $\alpha$ -циперметрин продемонстрував найнижчу енергію зв'язування з такими ЛЗД ER $\alpha$ , як 1ERE (-10,4 ккал/моль) та 1GWR (-10,0 ккал/моль), що демонструє високу афінність дослідної сполуки до обраних рецепторних структур (табл. 4.1).

Показники оцінки докінгу  $\alpha$ -циперметрину з 1ERR та 3ERT були майже однаковими: -9,6 ккал/моль для 3ERT та -9,7 ккал/моль для 1ERR (табл. 4.1).

Отримані дані можуть виступити ознакою агоністичної дії даного піретроїда на ER $\alpha$ , оскільки, 1GWR, 1ERE та 1ERR це комплекси ER $\alpha$  з його агоністами (табл. 4.1).

В той же час близькість між значеннями енергії зв'язування  $\alpha$ -циперметрину з 3ERT та 1ERR може вказувати і на потенційну антагоністичну дію даного піретроїду по відношенню до ER $\alpha$ , оскільки 3ERT – це комплекс ЛЗД ER $\alpha$  з 4-гідрокситамоксифеном.

Стосовно докінгу кверцетину з обраними ЛЗД, було встановлено, що енергія його зв'язування є слабшою, як в порівнянні з референтними лігандами ER $\alpha$  та і з  $\alpha$ -циперметрином. Найнижча прогнозована AutoDock4 енергія зв'язування спостерігалась з 1ERR (-8,7 ккал/моль), що може свідчити про його агоністичну дію, в той час як найвища енергія зв'язування спостерігалась з 3ERT (ЛЗД ER $\alpha$  в комплексі з 4-гідрокситамоксифеном): -7,6 ккал/моль, що може означати низький антагонізм даного флавоноїду по відношенню до ER $\alpha$  (табл. 4.1).

Енергії зв'язування кверцетину з 1GWR та 1ERE зі значенням -7,9 ккал/моль та -8,3 ккал/моль можуть також виступити ознакою вираженої спорідненості цієї сполуки та демонстрацією агонізму до ER $\alpha$  (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

**Результати докінгу кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів з рецептором естрогенів за допомогою програмного забезпечення**

**AutoDock4 та AutoDockVina**

ЛЗД ER $\alpha$	Програмне забезпечення	$\alpha$ -Сур	Que	DCCA	3-PBA	E <sub>рл</sub>	РЛ
		Прогнозована енергія зв'язування (ккал/моль)					
3ERT	AutoDock 4	-9,6	-7,6	-5,2	-5,8	-11,1	4-TAM
	AutoDockVina	-7,9	-7,9	-6,1	-7,5	-9,8	4-TAM
1GWR	AutoDock 4	-10,0	-7,9	-5,3	-6,2	-9,6	E <sub>2</sub>
	AutoDockVina	-8,0	-8,1	-6,0	-7,9	-11,2	E <sub>2</sub>
1ERE	AutoDock 4	-10,4	-8,3	-4,8	-6,2	-9,7	E <sub>2</sub>
	AutoDockVina	-8,0	-7,5	-6,0	-8,0	-11,0	E <sub>2</sub>
1ERR	AutoDock 4	-9,7	-8,7	-4,8	-5,9	-12,6	РАЛ
	AutoDockVina	-9,0	-9,4	-5,5	-7,5	-9,6	РАЛ

Примітка: ЛЗД ER $\alpha$  – кристалічна структура ліганд-зв'язуючого домену ER $\alpha$  людини;  $\alpha$ -Сур –  $\alpha$ -циперметрин, Que – кверцетин, 3-PBA – 3-феноксibenзойна кислота; DCCA – 3-(2,2-дихлоетеніл)-2,2-диметилциклопропанкарбонова кислота; E<sub>рл</sub> – енергія зв'язування референтного ліганда; РЛ – референтний ліганд; 1ERE та 1GWR – кристалічні структура ліганд-зв'язуючого домену (ЛЗД) ER $\alpha$  людини в комплексі з естрадіолом; 3ERT – кристалічна структура ЛЗД ER $\alpha$  людини в комплексі з 4-гідротамоксифеном; 1ERR – кристалічна структура ЛЗД ER $\alpha$  людини в комплексі з ралоксифеном.

Незважаючи на те, що енергія зв'язування досліджуваного флавоноїду була слабшою за відповідний показник  $\alpha$ -циперметрину, вона була також значно сильнішою, ніж у метаболітів даного піретроїду (табл. 4.1). Так, при оцінці за допомогою AutoDock4, енергія зв'язування 3-PBA з таким ЛЗД ER $\alpha$  як 3ERT склала -5,8 ккал/моль, з 1GWR та 1ERE: -6,2 ккал/моль, 1ERR: -4,8 ккал/моль. Отримані дані не можна однозначно інтерпретувати як виражений антагоністичний або агоністичний вплив 3-PBA ER $\alpha$ , через близькість значень, що вимагає більш детального уточнення характеру взаємодії між дослідженою сполукою та рецептором. Для DCCA показники зв'язування з ER $\alpha$  були меншими та близькими за значенням між собою: -5,2 ккал/моль

(3ERT),  $-5,3$  ккал/моль (1GWR),  $-4,8$  ккал/моль (1ERR та 1ERE). Наведені оцінки енергії докінгу дозволяють припустити можливість попередження зв'язування наведених метаболітів з ER $\alpha$  при їх конкуренції з кверцетином за рецептор.

Оцінка за допомогою програмного забезпечення AutoDockVina також показала, що  $\alpha$ -циперметрин утворює стабільний комплекс ліганд-рецептор з 1GWR ( $-8,0$  ккал/моль), 1ERE ( $-8,0$  ккал/моль) та 1ERR ( $-9$  ккал/моль). Таким чином, спираючись на оцінку AutoDockVina, можна припустити, що даний піретроїд також проявляє здебільшого агоністичні властивості по відношенню до ER $\alpha$ , хоча в меншому ступені ніж референтні ліганди – естрадіол та ралоксифен. В той же час докінг-аналіз за програмою AutoDockVina показав більш кращі оцінки прогнозованої афінності кверцетину з обраними ЛЗД ER $\alpha$ , ніж при використанні програми AutoDock4 (табл. 4.1). При зв'язуванні кверцетину з 1GWR та 1ERR енергія зв'язування була нижчою, ніж для  $\alpha$ -циперметрину, що може вказувати на потенційну здатність кверцетину витіснити даний піретроїд при конкурентному зв'язуванні з ER $\alpha$ . Також за оцінкою AutoDockVina кверцетин та  $\alpha$ -циперметрин мають однакову енергію зв'язування з 3ERT (табл. 4.1).

Аналіз за допомогою AutoDockVina показав, що метаболіт  $\alpha$ -циперметрину DCCA зв'язувався з обраними ЛЗД ER $\alpha$  слабшою, ніж 3-PBA. 3-PBA за оцінкою AutoDockVina продемонстрував високу афінність до 3ERT та 1GWR, а саме  $-8,0$  ккал/моль та  $-7,9$  ккал/моль відповідно, що може вказувати на його агоністичний вплив на ER $\alpha$ . Для 3ERT та 1ERR енергії зв'язування з 3-PBA були однаковими ( $-7,5$  ккал/моль). З таблиці 4.1 можна побачити, що найнижча енергія зв'язування для метаболіту  $\alpha$ -циперметрину DCCA спостерігалась при його докінгу з 3ERT ( $-6,1$  ккал/моль), що може вказувати на його антагоністичні властивості.

Прогнозовані значення енергії зв'язування кверцетину з ЛЗД ER $\alpha$  за оцінкою AutoDockVina були нижчими, ніж у метаболітів досліджуваного піретроїду, що знову ж таки може вказувати на здатність цього флаваноїду

витісняти піретроїди при конкурентному зв'язуванні з рецептором естрогенів.

В таблиці 4.2 показані результати оцінки докінгу досліджуваних сполук з обраними ЛЗД ER $\alpha$  з використанням програмного забезпечення Schrödinger Maestro Glide (показник Glide score). Як і при використанні AutoDock4 та AutoDockVina, жодна з дослідних сполук не зв'язувалась з ER $\alpha$  міцніше ніж референтні ліганди.

Прогнозовані значення Glide score (Gscore) для піретроїдного інсектициду  $\alpha$ -циперметрину відображують слабку взаємодію з 1GWR (–6,26 ккал/моль) та сильну взаємодію з 3ERT (–9,29 ккал/моль). Отриманий результат дозволяє зробити припущення про більш виражені антагоністичні властивості  $\alpha$ -циперметрину, ніж агоністичні (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

**Результати докінгу кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів з рецептором естрогенів за допомогою програмного забезпечення**

**Schrödinger Maestro Glide**

ЛЗД ER $\alpha$	$\alpha$ -Сур	Que	DCCA	3-PBA	РЛ
	Gscore (ккал/моль)				
3ERT	–9,29	–7,10	–6,39	–8,12	-12,11 (4-TAM)
1GWR	–6,26	–8,69	–6,34	–8,25	-11,11 (E <sub>2</sub> )
1ERE	–8,09	–9,27	–6,56	–8,45	-11,31 (E <sub>2</sub> )
1ERR	–8,50	–9,38	–6,28	–7,89	- 12,75 (РАЛ)

Примітка, як до табл. 4.1.

Кверцетин має прогнозоване значення Gscore, яке відображає його міцну взаємодію з 1ERE та 1ERR (–9,27 ккал/моль та –9,38 ккал/моль відповідно). Кверцетин також демонструє найвищий показник Gscore при зв'язуванні з 3ERT (–7,10 ккал/моль). Отримані дані можна інтерпретувати, як прояв сильного агоністичного потенціалу кверцетину по відношенню до

ER $\alpha$  та слабого антагонізму. Взагалі, результати таблиці 4.2 дозволяють припустити, що кверцетин проявляє більш сильну енергію зв'язування ніж  $\alpha$ -циперметрин з 1GWR, 1ERE, 1ERR, що може вказувати на його захисний потенціал по відношенню до естрогенового рецептору (табл. 4.2). Метаболіт  $\alpha$ -циперметрину DCCA має доволі високі прогнозовані значення Gscore: від –6,28 ккал/моль з 1ERR до –6,39 ккал/моль з 3ERT, що може вказувати на слабку взаємодію з ER $\alpha$ . Інший метаболіт  $\alpha$ -циперметрину – 3-PBA через низький показник Gscore –8,12 ккал/моль, може мати потенційний антагоністичний вплив при взаємодії з рецептором естрогенів, проте варто зазначити, що даний метаболіт загалом має схожі між собою показники Gscore для всіх використаних ЛЗД ER $\alpha$ . Як DCCA так і 3-PBA зв'язувалися з кристалічними структурами ЛЗД ER $\alpha$  людини значно слабше, ніж кверцетин.

За допомогою програми Schrödinger Maestro Glide були встановлені спільні амінокислотні залишки, які беруть участь у взаємодії кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину, 3-PBA, DCCA, референтних лігандів з кристалічними структурами ЛЗД ER $\alpha$ . З таблиці 4.3 можна побачити, що загальними для всіх досліджуваних сполук амінокислотними залишками є LEU391, LEU525, MET388, LEU346, LEU387. Це може означити, що докінг обраних речовин з ER $\alpha$  відбувається через взаємодію з практично однаковими сайтами зв'язування. Подібність розташування дослідних сполук в сайтах зв'язування обраних ЛЗД ER $\alpha$ , була підтверджена також за допомогою програм Auto Dock4 та Auto Dock Vina (додаток, табл. 1).

Незважаючи на схоже розташування молекул референтних лігандів, кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину, 3-PBA, DCCA характер утворення зв'язків між переліченими лігандами та амінокислотними залишками кристалічних структур ЛЗД ER $\alpha$  суттєво відрізнявся.

За результатами прогнозування Schrödinger Maestro Glide  $\alpha$ -циперметрин утворює гідрофобний зв'язок із залишком 3ERT – ARG 394, в той час як референтна сполука 4-гідрокситамоксифен (антагоніст) утворює водневу зв'язок (додаток табл. 4).

Таблиця 4.3

**Спільні амінокислотні залишки, що мають найбільший внесок у взаємодії кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину, його метаболітів та референтних лігандів з  $\alpha$ -рецептором естрогенів (за Schrödinger Maestro Glide)**

<b>1ERR</b>	<b>1ERE</b>	<b>1GWR</b>	<b>3ERT</b>
LEU 346	LEU 346	LEU 346	MET 343
LEU 349	GLU 353	GLU 353	LEU 346
ALA 350	LEU 384	LEU 387	THR 347
LEU 384	LEU 387	MET 388	ALA 350
LEU 387	MET 388	LEU 391	GLU 353
MET 388	LEU 391	ARG 394	LEU 384
LEU 391	PHE 404	PHE 404	LEU 387
LEU 391	HIE 524	HIE 524	MET 388
MET 421	LEU 525	LEU 525	LEU 391
ILE 424			ARG 394
LEU 525			PHE 404
			MET 421
			LEU 525

Примітка: ARG – аргінін, GLU – глютамат, LEU – лейцин, MET – метіонін, THR – треонін, HIE – гістидин, ILE – ізолейцин, PHE – фенілаланін, ALA – аланін; 1ERE та 1GWR – кристалічна структура ліганд-зв'язуючого домену (ЛЗД) ER $\alpha$  людини в комплексі з естрадіолом; 3ERT – кристалічна структура ЛЗД ER $\alpha$  людини в комплексі з 4-гідротамоксифеном; 1ERR – кристалічна структура ЛЗД ER $\alpha$  людини в комплексі з ралоксифеном

Амінокислотні залишки LEU 387 і LEU 525 мають високі внески у енергію взаємодії 4-гідрокситамоксифену ( $-3,58$  ккал/моль та  $-4,15$  ккал/моль відповідно) та  $\alpha$ -циперметрину ( $-3,55$  ккал/моль та  $-3,38$  ккал/моль відповідно) з 3ERT за рахунок Ван-дер-Ваальсової взаємодії (додаток, табл.3). Варто відмітити, що метаболіт  $\alpha$ -циперметрину 3-РВА також утворює міцний зв'язок із LEU 387 3ERT ( $-4,71$  ккал/моль). Такі особливості зв'язування  $\alpha$ -циперметрину та його метаболіту 3-РВА з 3ERT подібні на референтну сполуку 4-гідрокситамоксифен (антагоніст), може вказувати на їх антагоністичний ефект. DCCA та 3-РВА утворюють водневі зв'язки за участю ОН-груп з амінокислотним залишком GLU 353 ліганд зв'язуючого

домену ER $\alpha$  людини, як і антагоніст 4-гідрокситамоксифен. 3-РВА в свою чергу, за рахунок карбоксильної групи утворює водневий зв'язок з ARG394, в той час як 4-гідрокситамоксифен утворює даний тип зв'язку за участю гідроксильної групи ( додатак табл. 4, рис.2).

Кверцетин утворює  $\pi$ - $\pi$  зв'язок з PHE 404 та водневі зв'язки за участі гідроксильних груп з GLU 353 і HIE 524 з 1GWR як референтний ліганд естрадіол. Варто також зазначити, що амінокислотні залишки PHE 404 та HIE 524 мають найбільші внески у енергію взаємодії естрадіолу та кверцетину з 1GWR за рахунок Ван-дер-Ваальсової взаємодії (додаток, табл. 2). Піретроїдний інсектицид  $\alpha$ -циперметрин не мав здатності до утворення водневих зв'язків з амінокислотними залишками 1GWR. 3-РВА формувал водневий зв'язок з ARG 394 та HIE524, в той час як DCCA з HIE524, подібно до референтного ліганду естрадіолу (додаток, рис. 1)

Результати оцінки взаємодії досліджуваних сполук з 1ERE демонструють, що кверцетин утворює водневі зв'язки за участю гідроксильних груп з амінокислотними залишками GLU353, HIE524 та PHE404 ЛЗД 1ERE, подібно до естрадіолу. Піретроїд  $\alpha$ -циперметрин формує водневий зв'язок з амінокислотними залишками HIE524 та GLY521. 3-РВА створює водневі зв'язки за участю карбоксильної групи з ARG 394 та гідроксильної групи – з GLU353. DCCA формує водневий зв'язок з амінокислотним залишком HIE524 ліганд-зв'язуючого домену ER $\alpha$  людини в комплексі з ралоксифеном за участю гідроксильної групи (додаток, рис. 4).

Спостерігалась подібність щодо механізму зв'язування досліджуваних сполук з 1ERR. Кверцетин та 3-РВА формують водневі зв'язки з GLU353 та ARG394 за участю гідроксильних груп, як і референтний ліганд ралоксифен. DCCA формує водневий зв'язок з GLU353 (додаток, рис. 3).

На основі прогнозованих результатів докінгу  $\alpha$ -циперметрин не утворює водневі зв'язки з ЛЗД ER $\alpha$  в комплексі з агоністами у запропонованих конформаціях (1GWR, 1ERE, 1ERR), що може означати низьку агоністичну

дію даного піретроїду. Виключенням є IERE, де  $\alpha$ -циперметрин утворює водневі зв'язки подібно до кверцетину.

#### **4.2 Оцінка *in silico* фармакокінетичних властивостей та токсичності кверцетину, $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів**

Встановлені нами особливості зв'язування та характер взаємодії досліджуваних сполук з ER $\alpha$  *in silico*, а також дані, отримані з літератури стосовно позитивного впливу кверцетину на стан репродуктивної системи та ряду патологій, до яких призводить тривалий вплив піретроїдних інсектицидів, обумовили необхідність в проведенні оцінки лікоподібності, особливостей фармакокінетики та профілю токсичності даних сполук.

З використанням платформи pkCSM було проведено дослідження *in silico* таких параметрів кверцетину та  $\alpha$ -циперметрину: здатність інгібувати цитохрому P450, здатність долати гематоенцефалічний бар'єр (logBB), об'єм розподілу (VD<sub>ss</sub>), інгібування P-глікопротеїну, проникність (з використанням лінії клітин Caco-2 колоректальної карциноми людини), всмоктування у тонкому кишечнику.

В таблиці 4.4 представлені дані, згідно яких,  $\alpha$ -циперметрин проявив здатність інгібувати ферменти CYP3A4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, що може означати про здатність даного піретроїду перешкоджати метаболічним перетворенням ліків та ксенобіотиків за участю цих ферментів [138]. Оскільки ферменти CYP3A4 та CYP1A2 задіяні в метаболізмі естрогенів [138, 16, 247], можна припустити, що  $\alpha$ -циперметрин здатний впливати на процес перетворення жіночих статевих гормонів в організмі.

За оцінкою pkCSM кверцетин виступав інгібітором тільки для CYP1A2, також він не є субстратом для CYP2D6 та CYP3A4 (табл. 4.4). Отримані дані можуть вказувати на те, що кверцетин здебільшого не перешкоджає метаболізму ліків та ксенобіотиків ферментами цитохрому P450 за виключенням CYP1A2.



Таблиця 4.4

**Прогнозований метаболізм кверцетину та  $\alpha$ -циперметрину ферментами цитохрому P450 людини за оцінкою pkCSM**

	$\alpha$ -циперметрин	Кверцетин
CYP2D6 субстрат	Ні	Ні
CYP1A2 інгібітор	Так	Так
CYP2C19 інгібітор	Так	Ні
CYP2D6 інгібітор	Ні	Ні
CYP3A4 інгібітор	Так	Ні

Використання клітин Caco-2 дозволяє встановити здатність речовини до всмоктування у тонкому кишечнику, що певною мірою визначає біодоступність дослідної сполуки. Однією з характеристик лінії клітин Caco-2 є їх спроможність до спонтанної диференціації в моношар клітин, які мають морфологічні та фізіологічні властивості ентероцитів (мікрворсинки, набір відповідних ферментів-транспортів). Згідно прогнозування pkCSM кверцетин має від'ємне значення проникності в лінії клітин епітеліальної колоректальної аденокарциноми людини (Caco-2), що означає гіршу проникність через моношар клітин даної лінії (табл. 4.5). В свою чергу піретроїдний інсектицид  $\alpha$ -циперметрин мав позитивне значення проникності Caco-2 ( $1,016 \log P_{app} / 10^{-6}$  см/сек).

Варто відмітити, що модель відтворення процесів всмоктування безпосередньо у тонкому кишечнику за pkCSM показала доволі високий відсоток всмоктування для обох сполук, який тим не менш вищий для  $\alpha$ -циперметрину (табл. 4.5).

P-глікопротеїн – АТФ-залежний білок-транспорт, який виводить з клітини ксенобіотики. Ґрунтуючись на отриманих прогнозованих значеннях кверцетин є P-глікопротеїновим субстратом. Піретроїд  $\alpha$ -циперметрин за оцінкою pkCSM є інгібітором цього білка. Отримані дані можуть означати здатність P-глікопротеїну виводити флавоноїд кверцетин з клітини, а також спроможність кверцетину посилювати виведення ксенобіотиків. Таким

чином, можна припустити, що кверцетин зменшуватиме абсорбцію  $\alpha$ -циперметрину, через активацію Р-глікопротеїн-залежного механізму виведення.

Таблиця 4.5

**Прогнозовані програмним забезпеченням pkCSM фармакологічні властивості кверцетину та  $\alpha$ -циперметрину**

Параметр	Одиниця виміру	Кверцетин	$\alpha$ -циперметрин
Сасо2 проникність	$\log P_{app} / 10^{-6}$ см/сек	-0,229	1,016
Всмоктування в тонкому кишечнику людини	% всмоктування	77,207	91,299
Р-глікопротеїновий субстрат	<i>Якісна оцінка (так/ні)</i>	Так	Ні
Інгібітор Р-глікопротеїну I	<i>Якісна оцінка (так/ні)</i>	Ні	Так
VDss (людина)	$\log L/\text{кг}$	1,559	0,469
BBB проникність	$\log BB$	-1,098	-0,232

Примітки: BBB – гематоенцефалічний бар'єр, VDss – об'єм розподілу, Сасо2 – лінія клітин епітеліальної колоректальної аденокарциноми людини

Об'єм розподілу (VDss – the volume of distribution at steady state) – теоретичний об'єм, в якому певна кількість речовини повинна бути рівномірно розподілена для отримання концентрації, що дорівнює концентрації в плазмі крові. Чим вище значення VDss, тим більше речовини розподіляється в тканині, ніж у плазмі крові. Прогнозовані значення об'єму розподілу для  $\alpha$ -циперметрину нижчі (0,469  $\log L/\text{кг}$ ), ніж для кверцетину (1,559  $\log L/\text{кг}$ ). Отримані дані можуть вказувати на те, що  $\alpha$ -циперметрин розподіляється ширше в плазмі, в той час як кверцетин скоріше зосереджується у тканинах (табл. 4.5).

За оцінкою pkCSM кверцетин та  $\alpha$ -циперметрин погано долають гематоенцефалічний бар'єр, оскільки значення  $\log BB$  для них менше  $-1$ .

Прогнозування токсичності  $\alpha$ -циперметрину та кверцетину проводили також з використанням платформи pkCSM за визначенням наступних

параметрів: максимальній безпечній допустимій дозі (MRTD), мутагенності (AMES), здатності інгібувати калієві канали (інгібітор hERG I та II), гепатотоксичності; найнижчий рівень шкідливого впливу, що спостерігається (LOAEL), який відображає пероральну токсичність для щурів; токсичність для клітин плоскоголового гол'яна *Pimephales promelas*, токсичність для клітин інфузорії *Tetrahymena pyriformis*.

Згідно даних представлених у таблиці 4.6 прогнозоване за pkCSM значення MRTD було більш високим для кверцетину, воно перевищувало порогове значення у 0,477 log (мг/кг/день), в той час як для  $\alpha$ -циперметрину це значення було нижчим на 36,3 %. Таким чином можна припустити, що  $\alpha$ -циперметрин є більш токсичною сполукою ніж кверцетин, оскільки його максимально безпечна допустима доза менше за значенням, ніж у обраного для дослідження флавоноїду.

Обидві дослідні речовини не виявили мутагенних властивостей, на що вказує відсутність позитивної реакції в тесті AMES (табл. 4.6). Більш високе значення показнику LOAEL для кверцетину (2,612 log мг/кг/день), ніж для  $\alpha$ -циперметрином (1,126 log мг/кг/день) може свідчити про вищий поріг щодо появи негативних ефектів при пероральному прийомі для кверцетину. За цим критерієм кверцетин має меншу токсичність для щурів ніж  $\alpha$ -циперметрин.

Згідно даних, отриманих стосовно токсичності досліджуваних сполук для клітин *T. Pyriformis*, кверцетин та  $\alpha$ -циперметрин є токсичними сполуками. При цьому за критеріями оцінки токсичності для клітин *P. promelas* кверцетин можна розглядати як нетоксичну сполуку, в той час як  $\alpha$ -циперметрин є сполукою з високою гострою токсичністю (табл. 4.6).

Згідно прогнозування pkCSM кверцетин та  $\alpha$ -циперметрин не інгібують калієві канали hERG I та hERG II. Це значить, що дані сполуки не викликають синдрому подовженого інтервалу QT, який призводить до шлуночкової аритмії.

Таблиця 4.6

**Прогнозування токсичності  $\alpha$ -циперметрину та кверцетину з використанням програми pkCSM**

		Кверцетин	$\alpha$ -циперметрин
MRTD,	log (мг/кг/день)	0,499	0,318
AMES токсичність	Якісна оцінка (так/ні)	Ні	Ні
LOAEL	log мг/кг /день	2,612	1,126
hERG I інгібітор	Якісна оцінка (так/ні)	Ні	Ні
hERG II інгібітор	Якісна оцінка (так/ні)	Ні	Ні
Гепатотоксичність	Якісна оцінка (так/ні)	Ні	Ні
Сенсибілізація шкіри	Якісна оцінка (так/ні)	Ні	Ні
<i>P. promelas</i> токсичність,	log mM	3,721	-2,829
<i>T. Pyriformis</i> токсичність,	log мкг/л	0,288	0,424

Примітка: MRTD – максимально безпечна допустима доза, AMES – оцінка мутагенного впливу, hERG I та II – гени, що кодують  $\alpha$ -субодиниці калієвого каналу, LOAEL – найнижчий рівень небажального впливу (для щурів), який спостерігається, *T. Pyriformis* токсичність – токсичність для клітин інфузорії *Tetrahymena pyriformis*, *P. promelas* токсичність - токсичність для клітин плоскоголового гол'яна *Pimephales promelas*.

Жодна з обраних сполук за прогнозованими значеннями не проявляла гепатотоксичності та сенсибілізації шкіри (табл. 4.6). Згідно представлених даних кверцетин можна розглядати як нетоксичну сполуку.

Для уточнення безпечності кверцетину були оцінені параметри лікоподібності даного флавоноїду за допомогою онлайн платформи SwissADME та представлені у таблиці 4.7.

Таблиця 4.7

**Параметри лікоподібності кверцетину за оцінкою програми SwissADME**

Параметр	Допустимий діапазон	Діапазон для кверцетину
Молекулярна маса	$\leq 500$ г/моль	302,24 г/моль
Донор водневого зв'язку	$\leq 5$	5
Акцептор водневих зв'язків	$\leq 10$	7
Ліпофільність	$\leq 5$ LogP	1,23 LogP
Молярний коефіцієнт заломлення	40–130	78,03

Згідно отриманих даних, представлених у таблиці 4.7, кверцетин відповідає необхідним параметрам лікоподібності, які визначаються «правилом п'яти» К. А. Ліпінського [126], що надає змогу використовувати його в якості компоненту профілактики при ряді патологій, в тому числі при станах, які супроводжуються порушенням функції яєчників та обмінних процесів в кістковій тканині.

**УЗАГАЛЬНЕННЯ.** За критеріями оцінки AutoDock4 прогнозується агоністичний вплив  $\alpha$ -циперметрин та 3-РВА на ER $\alpha$ , через низьку енергію зв'язування з 1GWR та 1ERE. DCCA мав високий показник афінності з 3ERT та 1ERE, що допускає як агонізм, так і антагонізм.

Застосування AutoDockVina передбачає близькі показники афінності  $\alpha$ -циперметрину як з 3ERT, так і з 1GWR та 1ERE. 3-РВА також створював стабільні конформації з 1ERE та 1GWR, що може виступити проявом його агонізму до ER $\alpha$ . DCCA показав стабільну взаємодію з кристалічною структурою ЛЗД ER $\alpha$  в комплексу з антагоністом – 3ERT.

Оцінка докінгу за Schrödinger Maestro Glide прогнозує антагонізм  $\alpha$ -циперметрину щодо ER $\alpha$ , оскільки його енергія зв'язування з 3ERT є найнижчою. 3-РВА має високі показники докінгу з 3ERT, але також з 1GWR та 1ERE. DCCA надав найнижчі показники Gscore з 1ERE та 3ERT.

Кверцетин за оцінками всіх використаних програм мав високу афінність з ЛЗД ER $\alpha$  в комплексі з агоністами, що означає виражений агонізм кверцетину. Також за всіма оцінками кверцетин зв'язується сильніше з ER $\alpha$ , ніж метаболіти  $\alpha$ -циперметрину, а за прогнозуванням Schrödinger Maestro Glide навіть сильніше за  $\alpha$ -циперметрин.

Аналіз характеру зв'язування досліджуваних лігандів з обраними структурами ER $\alpha$  з використанням Schrödinger Maestro Glide встановив подібність кверцетину та естрадіолу в утворенні водневих зв'язків з залишками амінокислот 1GWR та 1ERE. Натомість взаємодія  $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів з 1GWR, 1ERE, 1ERR відрізнялась від референтних лігандів, але була подібна на антагоніст 4-гідрокситамоксифен при зв'язуванні з ZERT. Отримані дані можуть вказувати на антагонізм даного інсектициду до ER $\alpha$ .

За даними платформ pkCSM і SwissADME, кверцетин має сприятливі фармакокінетичні властивості та лікоподібність, а також не проявляє надмірної токсичності. Натомість піретроїд  $\alpha$ -циперметрин оцінюється цими платформами як високо токсична сполука.

Дослідження, проведені методом комп'ютерного моделювання, є прогнозованими та мають низку значних обмежень, оскільки не враховується системний вплив дослідних сполук на організм в цілому. У зв'язку з цим, нами було проведено дослідження наслідків тривалого впливу піретроїдного інсектициду  $\alpha$ -циперметрину на функціональний стан яєчників та КТ у самок щурів, а також оцінювали профілактичну ефективність розробленого нами комплексу кверцетину, вітамінів та мінералів.

## РОЗДІЛ 5 СТАН КІСТОК, СЛИЗОВИХ ОБОЛОНОК ТРАВНОГО ТРАКТУ І ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ПОКАЗНИКІВ ЯЄЧНИКІВ У САМОК ЩУРІВ ПІСЛЯ ІНТОКСИКАЦІЇ А-ЦИПЕРМЕТРИНОМ ТА ЇЇ ПРОФІЛАКТИЦІ

Взаємодія естрадіолу з естрогеновими рецепторами КТ дуже важлива для забезпечення остеобластогенезу та збалансованого процесу ремоделювання КТ. В свою чергу, поширені наразі піретроїдні інсектициди мають потенційний деструктивний вплив на стан ендокринної функції яєчників. Тому, тривалий вплив піретроїдів може призвести до розвитку патології КТ, хоча досліджень стосовно такого взаємозв'язку в літературі зустрічається мало. Якщо розглядати піретроїди, як ендокринні деструктори, можна припустити існування такого зв'язку доволі вірогідним.

Проведений нами докінг-аналіз за оцінками програм AutoDockVina, AutoDock4 та Schrödinger Maestro Glide продемонстрував можливість  $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів зв'язуватись з ER $\alpha$  та проявляти антагоністичні властивості, а також перспективу витіснити дані метаболіти при конкурентній дії кверцетину з вираженим агонізмом цього флаваноїду по відношенню до ER $\alpha$ . Крім того, комплекс препаратів на основі кверцетину, вітамінів та мінералів засвідчив високу остеопротекторну ефективність в оваріоектомованих щурів. Тому, на нашу думку, запропонований комплекс може виявитися дієвим проти остеодеструктивних порушень, індукованих піретроїдами, як через гонадотоксичні властивості, так і через активізацію окислювального стресу.

Варто також прийняти до уваги таку властивість піретроїдів, як стереоізомерія. Стереоізомери одного піретроїду можуть суттєво відрізнятися за своїми токсикологічними характеристиками. Так, одним із найбільш поширених наразі піретроїдів у світі є циперметрин, негативні наслідки якого для репродуктивної системи доволі добре досліджені, а про

репродуктивно-токсичні властивості його ізомеру –  $\alpha$ -циперметрину, наразі менше відомостей у наукових джерелах.

Тому наступний етап дослідження присвячений оцінці ряду показників функції яєчників, КТ, травного тракту у самок щурів за умови вживання  $\alpha$ -циперметрину у дозі 10 мг/кг впродовж чотирьох місяців. Одночасно з цим, досліджували профілактичну ефективність комплексу кверцетину, вітамінів та мінералів у дозі 500 мг/кг, проти можливих негативних наслідків тривалої інтоксикації обраним піретроїдом.

### **5.1 Функціональні показники яєчників у самок щурів при інтоксикації $\alpha$ -циперметрином та її профілактиці**

З метою оцінки гонадотоксичного ефекту піретроїдного інсектициду  $\alpha$ -циперметрину та захисної дії комплексу флавоноїду кверцетину, вітамінів та мінералів, була досліджена тривалість естрального циклу самок щурів, рівень естрадіолу в сироватці крові, органні індекси матки та яєчників.

Естральний цикл відображає репродуктивний цикл у гризунів. Він має певну подібність до репродуктивного циклу приматів – менструального циклу. Естральний цикл має чотири стадії: проеструс, еструс, метеструс та діеструс, тривалість яких визначали за допомогою щоденного дослідження піхвових мазків у щурів. Загальна тривалість циклу у щурів складає 4-5 днів.

Фаза проеструсу відповідає фолікулярній (проліферативній) стадії менструального циклу людини, для якої характерна максимальна секреція естрадіолу фолікулами яєчників, що призводить до збільшення рівнів фолікулостимулюючого (ФСГ) та лютеїнізуючого (ЛГ) гормонів. У вагінальному мазку про цю стадію свідчить велика кількість епітеліальних неороговілих клітин округлої форми (додаток, рис. 5).

Для фази еструсу, яка корелює з овуляцією, характерна максимальна концентрація ФСГ, рівень естрадіолу зменшується. Епітеліальні клітини розшаровуються та формують ороговілі луски, які можна побачити у піхвовому мазку (додаток, рис. 5).



На стадії метеструсу, яка виникає тільки при відсутності запліднення, відбувається утворення жовтого тіла та секреція ним прогестинів. Відбувається відторгнення клітин базального шару слизової оболонки піхви. У мазку на цій стадії наявні три типи клітин: епітеліальні неороговілі, епітеліальні ороговілі (у вигляді лусок) та лейкоцити. Наступна стадія – дієструс, характеризується найнижчим рівнем естрогенів, в мазку спостерігають велику кількість лейкоцитів та слизу (додаток, рис. 5). Метеструс та дієструс відповідають ранній та пізній секреторній (лютеїновій) стадії менструального циклу людини [53, 91].

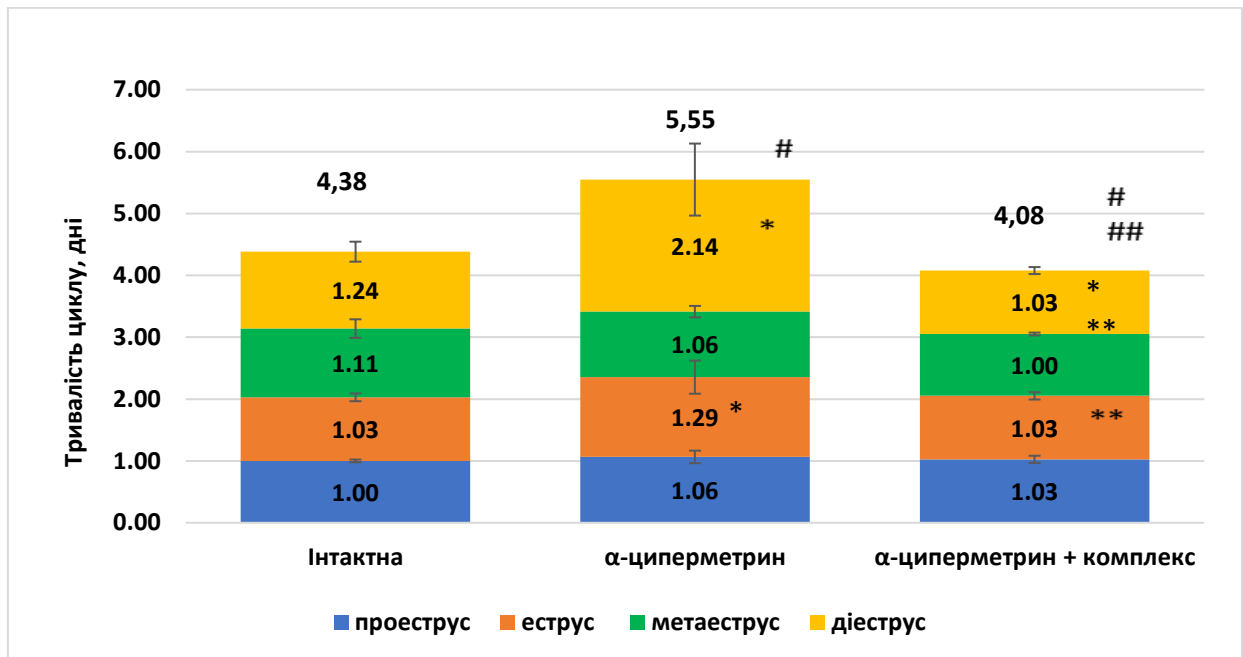
На рисунку 5.1 можна побачити, що тривалість естрального циклу в інтактній групі щурів склала  $4,38 \pm 0,09$  днів. В групі, яка зазнала впливу  $\alpha$ -циперметрину, спостерігали подовження естрального циклу на 26,71 % ( $p \leq 0,05$ ). Зростання тривалості естрального циклу відбувалось передусім за рахунок подовження стадії дієструсу на 72,58 % ( $p \leq 0,05$ ), а також стадії еструсу, яка достовірно збільшилась на 25,24 % ( $p \leq 0,05$ ).

За умови вживання профілактичного комплексу на тлі хронічної інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином тривалість естрального циклу щурів склала  $4,08 \pm 0,04$  дні, тобто встановлено зменшення подовження циклу на 26,49 % ( $p_1 \leq 0,05$ ) відносно показнику групи з патологією, який також достовірно зменшувався і відносно інтактної групи на 6,84 % ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 5.1).

Зменшення подовження естрального циклу у самок третьої групи, перш за все, відбувалось за рахунок нормалізації тривалості фази дієструсу, яка зменшилась на 51,87 % ( $p_1 \leq 0,05$ ). Загалом всі стадії репродуктивного циклу самок після профілактики, займали приблизно однаковий проміжок часу. Така регулярність може свідчити про захисну дію комплексу кверцетину, вітамінів та мінералів по відношенню до функції яєчників в умовах інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином.

Отримані результати показують наявність глибоких порушень у гормональній регуляції репродуктивних функцій самок щурів, які індуковані досліджуваним піретроїдом. Подовження циклу за рахунок дієструсу (фази з

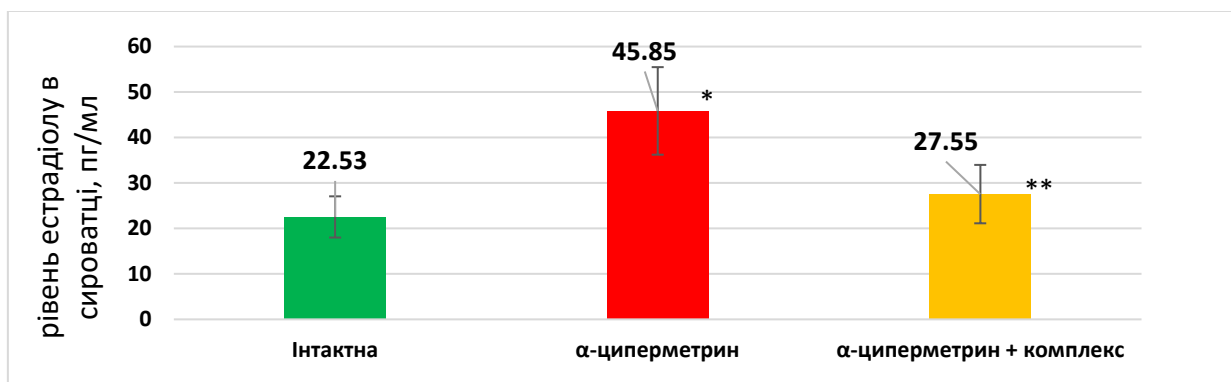
найнижчим рівнем естрогенів) більш ніж в півтора рази є ознакою пригнічення ендокринної функції яєчників.



**Рис. 5.1** Тривалість естрального циклу самок щурів при впливі α-циперметрину та за умови профілактики

Примітка: \* - достовірність різниці показників окремої фази естрального циклу по відношенню до інтактної групи; \*\* - достовірність різниці показників окремої фази естрального циклу по відношенню до групи самок щурів, які отримували α-циперметрин; # - достовірність різниці показників загальної тривалості естрального циклу по відношенню до інтактної групи; ## - достовірність різниці показників загальної тривалості естрального циклу по відношенню до групи самок щурів, які отримували α-циперметрин;

У сироватці крові дослідних тварин, які зазнали тривалого впливу α-циперметрину, спостерігали збільшення рівня естрадіолу більш ніж у два рази (на 103,51 %,  $p \leq 0,05$ ) (рис. 5.2). Отриманий результат можна вважати одним із проявів антагоністичної дії α-циперметрину або його метаболітів, що було встановлено нами за допомогою докінг-аналізу. Наслідком такого антагонізму є блокування та відсутність активації рецепторів естрогенів, що тягне за собою підвищену продукцію гонадотропного релізінг-гормону гіпоталамусом, а також ЛГ та ФСГ гіпофізом. Але через порушення механізмів негативного зворотного зв'язку рівень естрадіолу у сироватці крові також може збільшитися.



**Рис. 5.2 Рівень естрадіолу у сироватці крові самок щурів при тривалому впливі α-циперметрину та за умови профілактики**

Примітка: \* - достовірність різниці показників по відношенню до показників інтактної групи; \*\* - достовірність різниці показників по відношенню до самок щурів, які отримували α-циперметрин;

Блокування рецепторів естроген-залежних тканин, може призводити до порушення процесів нейроендокринної регуляції та чутливості рецепторів до естрадіолу. Досліджуваний піретроїд також може інгібувати ферменти, які задіяні в метаболізмі естрадіолу, насамперед ті, що належать до родини цитохрому P450, як було показано в нашому дослідженні *in silico* за допомогою pkCSM. Також існують свідчення про здатність піретроїдів взаємодіяти з глобуліном, який зв'язує статеві гормони, що перешкоджає зв'язуванню естрадіолу з цим білком та порушує його транспорт до тканин-мішеней [220]. На нашу думку, сукупність цих патологічних властивостей α-циперметрину та його метаболітів викликає збільшення тривалості естрального циклу у самок щурів.

Рівень естрадіолу у крові щурів, які отримували профілактику, нормалізувався ( $p \geq 0,5$ ;  $p_1 \leq 0,05$ ) (рис. 5.2). Можна припустити, що такий ефект комплексу пов'язаний із здатністю флавоноїду кверцетину ініціювати агоністичний ефект по відношенню до рецепторів естрогену, а також попереджувати зв'язування α-циперметрину та його метаболітів з ERα завдяки конкурентній дії. Естрогеноподібна активності кверцетину

спроможна активувати естрогенові рецептори та пригнічувати збільшення рівня естрадіолу викликане тривалим впливом  $\alpha$ -циперметрину.

Додатковим свідченням гонадотоксичності піретроїду  $\alpha$ -циперметрину можуть виступити виміри органних індексів матки та яєчників самок щурів. Як можна побачити з таблиці 5.1, при впливі  $\alpha$ -циперметрину відбувалось зменшення органного індексу яєчників на 28,13 % ( $p \leq 0,05$ ). Отриманий результат загалом є типовим щодо дії піретроїдів на яєчники. Піретроїди фенвалерат, біфентрин, перметрин, циперметрин ініціюють дегенеративні зміни в яєчниках, які супроводжуються апоптозом гранульозних клітин, зменшенням числа фолікулів. Ці зміни можуть опосередковуватися руйнуванням як клітинних мембран, так і мембран мітохондрій через розвиток окислювального стресу та взаємодією піретроїдів з іонними каналами, що супроводжується активацією проапоптичних білків Вах, Bcl-2, каспази 3 [96].  $\alpha$ -циперметрин також може викликати перелічені порушення, що приводить до зменшення органного індексу яєчників у самок щурів.

Таблиця 5.1

**Органний індекс яєчників та матки у щурів з інтоксикацією  $\alpha$ -циперметрином та при її корекції**

Група	Яєчники	Матка
Інтактна (n = 10)	0,32 ± 0,02 мг/г	1,51 ± 0,09 мг/г
$\alpha$ -циперметрин (n = 10)	0,23 ± 0,03 мг/г $p \leq 0,05$	1,59 ± 0,18 мг/г $p \geq 0,5$
$\alpha$ -циперметрин + комплекс (n = 10)	0,38 ± 0,04 мг/г $p \geq 0,2$ $p_1 \leq 0,01$	1,93 ± 0,15 мг/г $p \leq 0,05$ $p_1 \geq 0,5$

Примітка: p – достовірність різниці показників по відношенню до показників інтактної групи,  $p_1$  – достовірність різниці показників по відношенню до показників у самок щурів з інтоксикацією.

Застосування комплексу вітамінів та мінералів викликало збільшення органного індексу яєчників на 65,22 % ( $p_1 \leq 0,01$ ), що можна пояснити цитопротекторним та антиоксидантним потенціалом складових комплексу.

З таблиці 5.1 видно, що тривале вживання  $\alpha$ -циперметрину не викликало зростання органного індексу матки, що можна пояснити відсутністю естрогенової стимуляції тканин матки, це, на нашу думку, свідчить про антиестрогенну дію досліджуваного піретроїду та блокування ним естрогенових рецепторів.

За умови застосування комплексу вітамінів та мінералів, не визначили змін органного індексу матки, хоча прослідковували тенденцію до його підвищення на 21,38 %. При цьому спостерігали збільшення органного індексу матки на 27,81 % в порівнянні з інтактними тваринами ( $p \leq 0,05$ ), що може підтверджувати естрогенні властивості кверцетину у складі комплексу. З іншого боку це може вказувати на можливі ризики прийому флавоноїду, пов'язані із потенційною здатністю викликати гіперплазію та підвищену проліферацію клітин ендометрію матки, що може спричинити розвиток злоякісних новоутворень [250].

Підсумовуючи отримані дані, можна стверджувати, що тривалий вплив  $\alpha$ -циперметрину безумовно здійснює гонадотоксичну дію: подовження естрального циклу, надмірне збільшення естрадіолу у сироватці крові, зменшення органного індексу яєчників щурів. Запропонований нами комплекс продемонстрував протекторні властивості по відношенню до ендокринної функції яєчників в умовах інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином, що виражалось у нормалізації досліджуваних параметрів. Важливим аспектом подальших досліджень є оцінка впливу  $\alpha$ -циперметрину та комплексу вітамінів та мінералів на стан КТ, оскільки відомо, що жіночі статеві гормони відіграють ключову роль у підтримці кісткової маси.

## **5.2 Морфометричні дослідження поперекових хребців, стегнових кісток та альвеолярної частини нижньої щелепи у самок щурів при інтоксикації $\alpha$ -циперметрином та її профілактиці**

В стегнових кістках та поперекових хребцях самок щурів визначали щільність, вміст МОК в цілому, а також окремих складових МОК: МК та ОК,

в альвеолярній частини нижньої щелепи – ступінь атрофії. В гомогенаті альвеолярної частини нижньої щелепи досліджували активність КФ (ферменту, який слугує маркером активності остеокластів), ЛФ (маркер остеобластів), еластази, антиоксидантного ферменту каталази та вміст МДА (маркер ПОЛ).

Як показано у таблиці 5.2 за умови вживання піретроїдного інсектициду  $\alpha$ -циперметрину впродовж чотирьох місяців маса та об'єм стегнової кістки зазнали збільшення на 6,24 % та 3,31 % відповідно, але без належного рівня статистичної значущості ( $p \geq 0,5$ ). Тим не менш, за умови інтоксикації піретроїдом спостерігалось достовірне зменшення щільності стегнової кістки на 3,34 % (табл. 5.2), що можна трактувати в якості одного з доказів підсилення деструкції КТ під впливом  $\alpha$ -циперметрину.

За умови тривалого вживання  $\alpha$ -циперметрину вміст МОК зазнав достовірних змін та став меншим на 5,69 % ( $p \geq 0,05$ ). Вміст МК у стегновій кістці щурів, які отримували  $\alpha$ -циперметрин, зменшився на 10,23 % ( $p \leq 0,05$ ). Цей факт також може виступити ознакою посилення остеорезорбтивних процесів та вказувати на активацію остеокластогенезу в умовах змодельованої інтоксикації. Частка ОК у стегновій кістці при інтоксикації піретроїдом не зазнала змін (табл. 5.2).

Тенденцію до зменшення вагової частки МОК та достовірне зменшення щільності КТ у стегновій кістці можна пояснити саме вірогідним зменшенням вмісту МК, при тривалому надходженні  $\alpha$ -циперметрину в організм дослідних тварин. В свою чергу, відсутність значущих змін в показниках маси та об'єму стегнової кістки при зниженні її щільності може бути пов'язано з дефіцитом МК в одиниці об'єму КТ. Також має місце припущення, щодо активації компенсаторних механізмів в умовах інтоксикації пестицидом, при яких відбувається збереження розмірів кістки, але без належної мінералізації позаклітинного матриксу.

Таблиця 5.2

**Щільність, вміст мінерально-органічного компоненту (МОК),  
органічний компонент (ОК), мінеральний компонент (МК) у стегнових  
кістках самок щурів при інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином та за умови  
профілактики**

Показник	Група		
	Інтактна (n = 10)	$\alpha$ -циперметрин (n = 10)	$\alpha$ -циперметрин + комплекс (n = 10)
Маса, мг	472,61 $\pm$ 29,89	507,05 $\pm$ 30,03 $p \geq 0,2$	501,25 $\pm$ 13,94 $p \geq 0,2$ $p_1 \geq 0,5$
Об'єм, мм <sup>3</sup>	309,97 $\pm$ 19,62	343,60 $\pm$ 19,11 $p \geq 0,1$	327,59 $\pm$ 7,66 $p \geq 0,2$ $p_1 \geq 0,5$
Щільність, мг/мм <sup>3</sup>	1,526 $\pm$ 0,014	1,475 $\pm$ 0,018 $p \leq 0,05$	1,529 $\pm$ 0,015 $p \geq 0,5$ $p_1 \leq 0,05$
Вміст МОК, % (вагова частка)	65,08 $\pm$ 0,79	61,72 $\pm$ 1,35 $p \leq 0,05$	65,19 $\pm$ 0,73 $p \geq 0,5$ $p_1 \leq 0,05$
Вміст МК, % (вагова частка)	40,13 $\pm$ 1,07	36,76 $\pm$ 1,18 $p \leq 0,05$	40,41 $\pm$ 1,14 $p \geq 0,5$ $p_1 \leq 0,05$
Вміст ОК, % (вагова частка)	24,95 $\pm$ 0,75	24,96 $\pm$ 0,62 $p \geq 0,5$	24,78 $\pm$ 0,58 $p_1 \geq 0,2$

Примітка: як у табл. 5.1

При введенні щурам комплексу вітамінів та мінералів на тлі тривалого впливу  $\alpha$ -циперметрину, встановлено збільшення щільності кістки стегна на 3,75 % ( $p_1 \leq 0,02$ ). За умови профілактики, маса та об'єм стегнової кістки значно не змінилися, хоча можна спостерігати ознаки зменшення даних показників: маси кістки – на 1,14 % ( $p_1 \geq 0,5$ ), об'єму – на 4,65 % ( $p_1 \geq 0,5$ ).

Вагова частка МОК стегнових кісток щурів, які вживали профілактичний комплекс, збільшилась на 5,62 % ( $p_1 \leq 0,05$ ), що обумовлено зростанням вмісту МК на 9,93 % ( $p_1 \leq 0,05$ ). Вміст ОК при вживанні профілактичного комплексу не зазнав змін (табл. 5.2).

В КТ поперекових хребців щурів, під впливом  $\alpha$ -циперметрину, зміни показників щільності та вмісту МК були подібні до тих, що спостерігати в стегновій кістці (табл. 5.3).  $\alpha$ -циперметрин призвів до зменшення щільності хребців на 3,21 % ( $p \leq 0,02$ ), що не супроводжувалося зниженням маси та об'єму. Але, на відміну від стегнової кістки, у хребцях можна побачити тенденцію не до збільшення, а навпаки – до зменшення маси (на 6,24 %) та об'єму (на 3,31 %). Це можна пояснити більшою чутливістю трабекулярної кістки хребців до процесів остеорезорбції, що ініційовані  $\alpha$ -циперметрином.

Таблиця 5.3

**Щільність, вміст мінерально-органічного компоненту (МОК), органічний компонент (ОК), мінеральний компонент (МК) у поперекових хребцях самок щурів при інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином та за умови профілактики**

Показник	Група		
	Інтактна (n = 10)	$\alpha$ -циперметрин (n = 10)	$\alpha$ -циперметрин + комплекс (n = 10)
Маса, мг	121,28 $\pm$ 9,25	113,71 $\pm$ 10,21 $p \geq 0,5$	126,44 $\pm$ 6,26 $p \geq 0,5$ $p_1 \geq 0,2$
Об'єм, мм <sup>3</sup>	84,52 $\pm$ 6,29	81,72 $\pm$ 6,85 $p \geq 0,5$	87,82 $\pm$ 4,26 $p \geq 0,5$ $p_1 \geq 0,5$
Щільність, мг/мм <sup>3</sup>	1,433 $\pm$ 0,009	1,387 $\pm$ 0,015 $p \leq 0,02$	1,439 $\pm$ 0,011 $p \geq 0,5$ $p_1 \leq 0,02$
Вміст МОК, % (вагова частка)	60,23 $\pm$ 0,52	56,80 $\pm$ 1,62 $p \geq 0,05$	60,01 $\pm$ 0,68 $p \geq 0,5$ $p_1 \geq 0,05$
Вміст МК, % (вагова частка)	33,01 $\pm$ 0,79	29,63 $\pm$ 0,85 $p \leq 0,02$	33,84 $\pm$ 0,89 $p \geq 0,2$ $p_1 \leq 0,005$
Вміст ОК, % (вагова частка)	27,22 $\pm$ 0,64	27,17 $\pm$ 0,95 $p \geq 0,5$	26,17 $\pm$ 0,38 $p \geq 0,2$ $p_1 \geq 0,2$

Примітка: як у табл. 5.1



Зменшення щільності КТ хребців обумовлено зниженням вмісту МК, показник якого став меншим на 10,24 % ( $p \leq 0,02$ ) ніж у інтактній групі. Варто зазначити, що достовірне зменшення вмісту МК не сприяло зниженню МОК, в свою чергу вміст ОК також не зазнав змін (табл. 5.3).

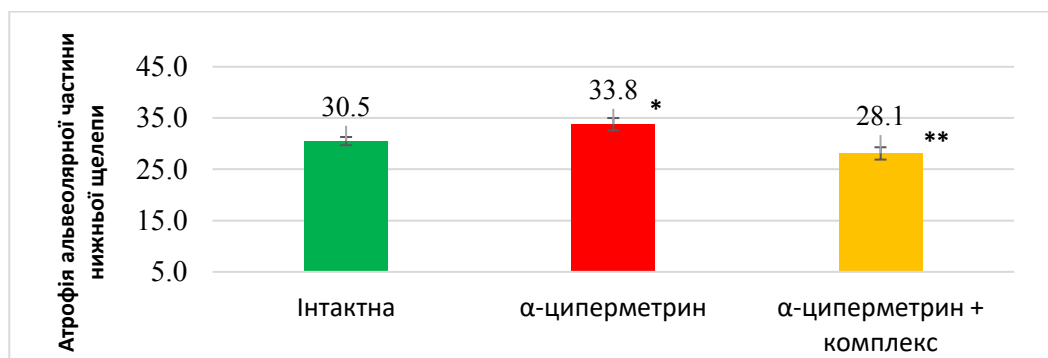
В разі застосування комплексу вітамінів та мінералів на тлі моделювання інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином, у щурів зареєстровано збільшення щільності хребців на 3,75 % ( $p_1 \leq 0,02$ ). Маса та об'єм не зазнали значущих змін, але можна побачити, що для цих показників є характерним збільшення відносно показників у групі з патологією. Так, маса хребців збільшувалась на 11,20 % ( $p_1 \geq 0,2$ ), об'єм – на 7,46 % ( $p_1 \geq 0,5$ ).

Збільшення щільності хребців відбувалось за рахунок зростання вагової частки МК на 14,21% ( $p_1 \leq 0,005$ ), що не сприяло достовірним змінам вмісту МОК у КТ хребців тварин. Вміст ОК у хребцях щурів, які отримували комплекс на тлі патології, також не зазнав змін (табл. 5.3).

Таким чином, за умови впливу піретроїдного інсектициду  $\alpha$ -циперметрину впродовж чотирьох місяців у дозі 10 мг/кг спостерігали зменшення щільності стегнових кісток і хребців самок щурів та зменшення в них вмісту МК, що свідчить про остеодеструктивні процеси.

Зміни досліджуваних параметрів стегнових кісток та хребців, супроводжувалися коливанням ступеня атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи тварин (рис. 5.3). У інтактній групі щурів, показник атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи склав  $30,50 \pm 0,8$  %. За умови інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином встановлено збільшення ступеню атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи на 10,82 % ( $p \leq 0,05$ ).

Застосування комплексу вітамінів і мінералів при інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином гальмувало атрофію альвеолярної частини кістки нижньої щелепи щурів на 16,86 % ( $p_1 \leq 0,005$ ).



**Рис. 5.3** Ступінь атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи у самок щурів при тривалому впливі α-циперметрину та за умови профілактики

Примітка: \* - достовірність різниці показників по відношенню до показників інтактної групи; \*\* - достовірність різниці показників по відношенню до самок щурів, які отримували α-циперметрин;

Отримані результати можуть свідчити про посилення деструкції КТ, зокрема її мінеральної складової, при моделюванні інтоксикації α-циперметрином. В той час як компоненти запропонованого нами комплексу ефективно попереджували прояви остеодистрофії в умовах патології.

### **5.3 Біохімічні дослідження кісткової тканини альвеолярної частини нижньої щелепи у самок щурів при інтоксикації α-циперметрином та її профілактиці**

Для уточнення особливостей розвитку остеодистрофії при тривалому вживанні інсектициду α-циперметрину, а також остеопротекторної ефективності комплексу кверцетину, вітамінів та мінералів в умовах інтоксикації, проведено дослідження активності КФ, ЛФ, еластази, каталази та вмісту МДА у кістковій тканині альвеолярної частини нижньої щелепи самок щурів.

Згідно даних, представлених у таблиці 5.4, тривале пероральне вживання α-циперметрину у дозі 10 мг/кг не супроводжувалося достовірними змінами маркера остеокластів – активності КФ, що можна пояснити великою похибкою. Але, варто зазначити, що збільшення активності цього ферменту

на 29,82 % ( $p \geq 0,1$ ) вказує на посилення диференціації остеокластів, що підтверджується збільшенням атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи

Активність маркеру остеобластів – ЛФ – збільшилась 35,25 % ( $p \leq 0,005$ ), що може свідчити про компенсаторну активацію остеобластів в умовах розвитку патології КТ, яка була викликана піретроїдом (табл. 5.4).

Таблиця 5.4

**Маркери активності остеокластів, остеобластів та стану антиоксидантної системи альвеолярної частини нижньої щелепи щурів при інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином та її корекції**

Показник	Група		
	Інтактна (n = 10)	$\alpha$ -циперметрин (n = 10)	$\alpha$ -циперметрин + комплекс (n = 10)
Активність кислій фосфатази (мккат/кг)	4,66±0,44	6,05±0,52 $p \geq 0,1$	4,81±0,48 $p \geq 0,5$ $p_1 \geq 0,05$
Активність лужної фосфатази (мккат/кг)	14,27±1,17	19,30±0,92 $p \leq 0,005$	11,52±0,78 $p \geq 0,1$ $p_1 \leq 0,001$
Активність еластази (мккат/кг)	6,48±0,52	19,51±1,48 $p \leq 0,001$	13,51±0,97 $p \leq 0,001$ $p_1 \leq 0,005$
Активність каталази (мккат/кг)	2,12±0,14	2,96±0,16 $p \leq 0,002$	2,18±0,14 $p \geq 0,1$ $p_1 \leq 0,002$
Вміст малонового діальдегіду (ммоль/кг)	4,91±0,43	6,82±0,48 $p \leq 0,01$	4,79±0,21 $p \geq 0,8$ $p_1 \leq 0,002$

$p$  – достовірність різниці показників по відношенню до показників інтактної групи,  $p_1$  – достовірність різниці показників по відношенню до показників у самок щурів з інтоксикацією.

У кістковій тканині щурів, які вживали  $\alpha$ -циперметрин впродовж чотирьох місяців, відбувалось збільшення активності еластази на 201,08 % ( $p \leq 0,001$ ), що вказує на посилене руйнування колагену позаклітинного матриксу. Збільшення активності цього ферменту може корелювати зі зниженням синтезу OPG та посиленою диференціацію остеокластів [196].

Незважаючи на достовірне зростання активності ферменту, який руйнує колаген, в даній групі тварин не відбувалося зменшення ОК стегнової кістки та хребців. Це, на нашу думку, можна пояснити компенсацією зі сторони збільшення активності остеобластів, про що може свідчити зростання активності ЛФ (табл. 5.4).

Активність антиоксидантного ферменту каталази у КТ щурів з патологією зросла на 39,62 % ( $p \leq 0,002$ ). При цьому збільшився вміст МДА на 38,90 % ( $p \leq 0,01$ ), що свідчить про посилення процесів ПОЛ через надмірний рівень АФК. Таким чином, можна спостерігати компенсаторну активацію ферментативної ланки антиоксидантного захисту при окислювальному стресі, який ініційований  $\alpha$ -циперметрином (табл. 5.4).

При застосуванні профілактичного комплексу з кверцетином, вітамінами та мінералами зареєстрована нормалізація показників активності ЛФ, еластази, каталази та вмісту МДА у кістковій тканині альвеолярної частини нижньої щелепи щурів в умовах інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином. Активність кісткової ЛФ статистично значуще зменшилась на 40,31 % ( $p_1 \leq 0,001$ ). Такий результат може означати відновлення балансу кісткового метаболізму під впливом комплексу, оскільки створилися умови, в яких надмірна активація остеобластів з метою синтезу позаклітинного матриксу стала непотрібною (табл. 5.4). Активність кісткової КФ після застосування профілактичного комплексу не зазнала статистично значущих змін, хоча даний показник став меншим на 20,50 % ( $p_1 \geq 0,05$ ).

Активність кісткової еластази при вживанні комплексу вітамінів та мінералів на тлі інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином зменшилась на 30,75 % ( $p_1 \leq 0,005$ ), але даний показник був також достовірно удвічі більшим за значення в інтактній групі, тобто не досяг норми (табл. 5.4.).

Активність каталази у альвеолярній частини нижньої щелепи після вживання профілактичного комплексу зазнала зменшення на 26,35 % ( $p_1 \leq 0,002$ ). При цьому, у КТ альвеолярної частини нижньої щелепи групи профілактики відбувалось зменшення вмісту МДА на 29,77 % ( $p_1 \leq 0,002$ ).

Отримані дані демонструють високу антиоксидантну активність комплексу вітамінів та мінералів. На нашу думку, здатність комплексу протидіяти окислювальному стресу передусім пов'язана із наявністю в його складі флавоноїду кверцетину, також – вітаміну С, які є сильними антиоксидантами.

Отримані результати свідчать про розвиток патології КТ при тривалій дії  $\alpha$ -циперметрину, яка виражається остеодистрофічними процесами в стегнових кістках, хребцях, альвеолярних частинах нижніх щелеп, порушеннями активності маркерів ремоделювання та явищами окислювального стресу. На нашу думку, розвиток подібних ускладнень при тривалому впливі піретроїдного інсектициду  $\alpha$ -циперметрину, може бути пов'язаний із його гонадотоксичними ефектами.

#### **5.4 Біохімічні показники запалення та окислювального стресу в слизових оболонках шлунково-кишкового тракту у самок щурів при інтоксикації $\alpha$ -циперметрином та її профілактиці**

У слизових оболонках ротової порожнини, шлунку, тонкої та товстої кишок самок досліджували показники запалення за активністю КФ, еластази та ПОЛ за вмістом МДА (таблиця 5.5). При вживанні впродовж чотирьох місяців піретроїдного інсектициду  $\alpha$ -циперметрину у всіх слизових оболонках травного тракту відбувалось достовірне збільшення активності КФ, яка відображає макрофагальну активність у тканинах та слугує одним з біохімічних маркерів запалення. Отримані значення активності КФ у групі самок щурів з інтоксикацією коливались від  $30,95 \pm 2,10$  мккат/кг у СОПР ( $p \leq 0,05$ ) до  $41,51 \pm 2,10$  мккат/кг у шлунку ( $p \leq 0,05$ ). У відсотковому співвідношенні між групою, яка вживала піретроїди та інтактною групою активність КФ зростала від 15,91 % ( $p \leq 0,05$ ) у тонкій кишці до 29,79 % ( $p \leq 0,005$ ) у товстій кишці (табл. 5.5).

Вживання комплексу вітамінів та мінералів сприяло достовірному зниженню та нормалізації активності КФ у всіх відділах ШКТ щурів, окрім товстої кишки. Зменшення активності даного ферменту, відносно показника

в групі з патологією складало від 14,07 % у тонкій кишці до 20,00 % у СОПР (табл. 5.5).

Таблиця 5.5

**Активність кислої фосфатази в слизових оболонках травного тракту самок щурів при інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином та її профілактиці, мккат/кг**

Група	Слизова оболонка			
	СОПР	Шлунка	Тонкої кишки	Товстої кишки
Інтактна (n = 10)	24,50 ± 1,45	34,97 ± 1,71	29,92 ± 1,48	24,94 ± 1,32
$\alpha$ -циперметрин (n = 10)	30,95 ± 2,10 $p \leq 0,05$	41,51 ± 2,10 $p \leq 0,05$	34,68 ± 1,56 $p \leq 0,05$	32,37 ± 1,78 $p \leq 0,005$
$\alpha$ -циперметрин + комплекс (n = 10)	24,76 ± 1,84 $p \geq 0,5$ $p_1 \leq 0,05$	34,68 ± 1,84 $p \geq 0,8$ $p_1 \leq 0,05$	29,80 ± 1,84 $p \geq 0,8$ $p_1 \leq 0,05$	28,42 ± 1,30 $p \geq 0,1$ $p_1 \geq 0,1$

Примітка: СОПР – слизова оболонка порожнини рота; p – достовірність різниці показників по відношенню до показників інтактної групи,  $p_1$  – достовірність різниці показників по відношенню до показників у самок щурів з інтоксикацією.

Активність іншого ферменту, який слугує маркером запалення у тканинах – еластази, також достовірно збільшилася у всіх відділах травного тракту самок щурів при тривалому впливі піретроїду, окрім ротової порожнини (табл. 5.6). Показники активності еластази у групі з інтоксикацією складали від  $98,90 \pm 2,15$  мккат/кг у шлунку (зріст на 39,43 %,  $p \leq 0,001$ ) до  $1237,70 \pm 32,96$  у тонкій кишці (збільшення на 41,04 %,  $p \leq 0,001$ ). Підвищення активності даного ферменту у товстій кишці склало 50,15 % ( $p \leq 0,001$ ) (табл. 5.6). Дані, щодо зростання активності еластази, можуть трактуватися, як одна з ознак пошкодження клітин слизових оболонок та розвитку запальних процесів у ШКТ під впливом  $\alpha$ -циперметрину.

Застосування профілактичного комплексу викликало значуще зниження та нормалізацію активності еластази в усіх відділах ШКТ, окрім ротової порожнини. Відносно рівня у групі зі змодельованою патологією,

даний показник зменшився від 19,65 % ( $p_1 \leq 0,001$ ) у шлунку до 22,02 % ( $p_1 \leq 0,001$ ) у тонкій кишці (табл.5.6).

Таблиця 5.6

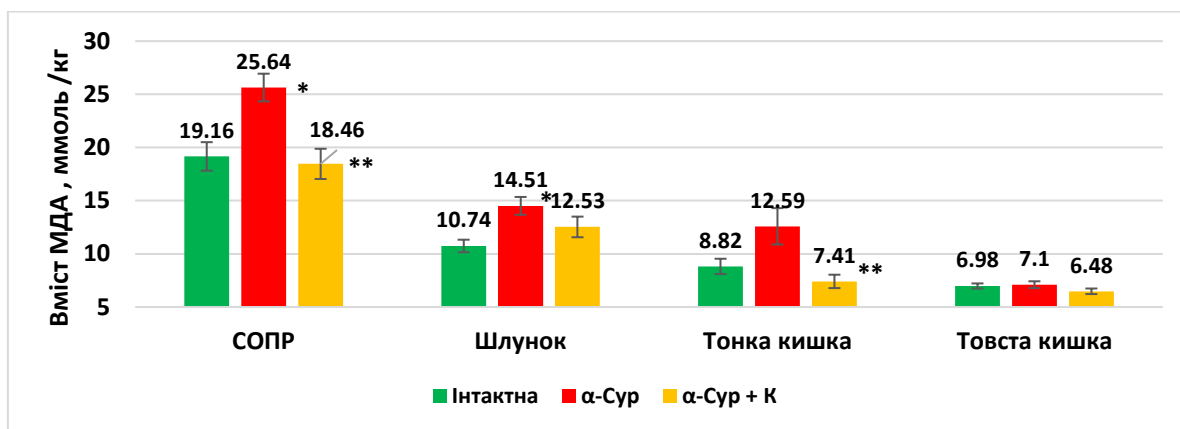
**Активність еластази в слизових оболонках травного тракту самок щурів при інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином та її профілактиці, мккат/кг**

Група	Слизова оболонка			
	СОПР	Шлунка	Тонкої кишки	Товстої кишки
Інтактна (n = 10)	67,92 ± 2,31	70,93 ± 1,98	877,58 ± 5,79	91,73 ± 4,32
$\alpha$ -циперметрин (n = 10)	66,08 ± 2,82 $p \geq 0,5$	98,90 ± 2,15 $p \leq 0,001$	1237,70 ± 32,96 $p \leq 0,001$	137,73 ± 5,67 $p \leq 0,001$
$\alpha$ -циперметрин + комплекс (n = 10)	75,40 ± 3,67 $p \geq 0,2$ $p_1 \geq 0,1$	79,47 ± 2,10 $p \leq 0,01$ $p_1 \leq 0,001$	965,20 ± 32,01 $p \leq 0,05$ $p_1 \leq 0,001$	110,0 ± 6,12 $p \leq 0,05$ $p_1 \leq 0,005$

Примітка, як до таблиці 5.5.

Таким чином, отримані дані можуть свідчити про розвиток запального процесу в травному тракті щурів за умови впливу  $\alpha$ -циперметрину, а також про високу протизапальну ефективність запропонованого нами комплексу кверцетину, вітамінів, макро- та мікроелементів.

Запальний процес у травному тракті щурів внаслідок дії  $\alpha$ -циперметрину закономірно супроводжувався розвитком окислювального стресу та активацією процесів ПОЛ, про що свідчило збільшення вмісту МДА в досліджуваних відділах ШКТ. Як можна побачити з рисунка 5.4, вміст МДА у слизових оболонках інтактних щурів достовірно зростав після інтоксикації пестицидом у СОПР – на 33,82 % ( $p \leq 0,05$ ) та шлунку – на 35,10 % ( $p \leq 0,05$ ). У слизових оболонках тонкої та товстої кишок щурів, які зазнали дії  $\alpha$ -циперметрину, вміст МДА статистично не змінився, хоча простежувалася тенденція до його зростання.



**Рис. 5.4** Вміст малонового діальдегіду у слизових оболонках травного тракту самок щурів при інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином та її профілактиці.

Примітка: СОПР – слизова оболонка порожнини рота; \* - достовірність різниці показників по відношенню до показників інтактної групи; \*\* - достовірність різниці показників по відношенню до самок щурів, які отримували  $\alpha$ -циперметрин; інші позначення, як до рисунку 5.3.

При застосуванні вітамінно-мінерального комплексу на тлі дії пестициду, в слизових оболонках травного тракту щурів визначена нормалізація вмісту МДА. Даний показник, у ШКТ тварин з профілактикою, коливався від  $7,41 \pm 0,63$  ммоль/кг у тонкій кишці (на 8,73 % менше ніж у групі з інтоксикацією) до  $18,46 \pm 1,42$  ммоль/кг у СОПР (на 28,00 % менше ніж у групі з інтоксикацією). В слизових оболонках шлунку та товстої кишки, за умови профілактики, вміст МДА не зазнав достовірних змін, проте, має місце певне зменшення даного показника. Зріст кількості МДА у слизових оболонках травного тракту щурів може бути ознакою руйнації клітинних мембран через ініціацію окислювального стресу, обумовленого впливом піретроїда. В той же час, запропонований комплекс, в умовах інтоксикації пестицидом проявив цитопротекторні та антиоксидантні властивості.

**УЗАГАЛЬНЕННЯ.** За результатами проведеного дослідження встановили збільшення тривалості естрального циклу у самок щурів під впливом  $\alpha$ -циперметрину за рахунок подовження стадії дієструсу. Органний індекс яєчників зменшувався, органний індекс матки не зазнав змін. Також



спостерігали збільшення рівня естрадіолу в сироватці крові. Застосування профілактичного комплексу на тлі інтоксикації сприяло рівномірному протіканню всіх стадій естрального циклу, збільшенню органного індексу яєчників та матки при нормалізації рівня естрадіолу.

Щільність КТ стегна та хребців у щурів при інтоксикації інсектицидом зазнала достовірного зменшення, разом із вмістом МК у цих кістках. В альвеолярній частині кістки нижньої щелепи на тлі підвищення ступеня її атрофії, спостерігали зростання маркерів остеорезорбції (активність КФ та еластази), остеогенезу (активність ЛФ), ПОЛ (за вмістом МДА), але активність антиоксидантного ферменту каталази також зростала. При вживанні  $\alpha$ -циперметрину встановлено зростання активності КФ та еластази, а також вмісту МДА у відділах ШКТ, що є ознакою розвитку запального процесу та інтенсифікації ПОЛ.

Профілактичне застосування комплексу в умовах інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином, викликало збільшення щільності у стегнових кістках та хребцях за рахунок збільшення вмісту МК. Спостерігали зменшення ступеня атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи. Окрім цього, використання комплексу призвело до нормалізації активності кісткових ЛФ та еластази, з тенденцією до зниження активності КФ. Комплекс вітамінів та мінералів сприяв зменшенню вмісту МДА та нормалізації активності каталази в КТ альвеолярної частини нижньої щелепи тварин. Застосування профілактики також ефективно попереджувало розвиток запалення та окислювального стресу в травному тракті, які були індуковані тривалим введенням  $\alpha$ -циперметрину.

Отже, в умовах інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином, запропонований комплекс кверцетину, вітамінів та мінералів ефективно протидієв деструктивним ефектам піретроїду на статеву, кісткову та травну систему.

## РОЗДІЛ 6

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Метаболічні порушення в кістковій тканині, які супроводжуються переважанням процесів резорбції над мінералізацією, призводять до розвитку остеопатії: остеопенії, остеодистрофії, остеопорозу. Дані захворювання КТ є серйозною глобальною проблемою, оскільки супроводжуються підвищеним ризиком переломів, знижують якість життя та тягнуть за собою значні економічні витрати пов'язані із лікуванням ускладнень. Патології, пов'язані зі зменшенням мінеральної щільності кістки, вражають понад 200 млн людей у всьому світі та мають тенденцію до зростання через старіння населення та зміни способу життя, що робить їх однією з найпоширеніших проблем громадського здоров'я [239]. В Україні скринінгове дослідження частоти остеопорозу та остеопенії виявило у жінок віком від 20-87 років, які мешкають у містах-мільйонниках, остеопенію у 47,43 %, а остеопороз – у 7,03 % [14]. В масштабах всієї країни, остеопороз діагностується у 30,7 % жінок та 21,6% чоловіків від 55 років та старше [21].

Страждають на остеопатії більше жінки, тому що нормальне функціонування кісткової тканини, зокрема процесів її ремоделювання, здійснюється за участю жіночих статевих гормонів. Саме тому, такі розлади в ендокринно-статевій системі жінок, як передчасна недостатність яєчників (ПНЯ), менопауза, вимушена кастрація, ведуть до розвитку остеопатій, інвалідизації та ранньої смерті.

Етіологія ПНЯ у жінок включає вплив ендокринних деструкторів (ЕД) – екзогенних хімічних речовин, які втручаються в процеси ендокринної регуляції людини. До ЕД відносять інсектицидні пестициди: фосфорганічні, хлорорганічні, карбаматні та піретроїдні. Останні набули поширення у сільському господарстві, у медичних засобах проти педикульозу та репелентах, через їх відносну безпечність для людини та тварин порівняно з інсектицидами інших класів [66]. Проте з'являються факти про їх негативні

наслідки з боку статевої системи в осіб чоловічої та жіночої статі [96, 131]. Потреба у високій врожайності та запобігання розповсюдження комах-переносників трансмісивних інфекцій змушує збільшувати об'єми застосування інсектицидів, зокрема піретроїдів, які сьогодні складають 19 % від усіх пестицидів загалом [52]. Але однозначної відповіді про їхню безпеку для людини при тривалому використанні на сьогодні не існує.

Тому, дослідження гонадотоксичності піретроїдів та їх впливу на стан кісток є доволі актуальним питанням сучасності. Важливим також є пошук засобів попередження порушень у кістковій системі, що викликані гіпофункцією статевих залоз в осіб жіночої статі.

Вищевикладене дозволяє сформулювати мету роботи – дослідження стану кісток лабораторних самок щурів при порушенні функції яєчників різної етіології та обґрунтування схеми профілактики можливих порушень.

Для реалізації встановленої мети та завдань було проведено дві серії експериментів на самках лабораторних щурів з гіпоестрогенією різного генезу та дослідження *in silico*. Утримування щурів в віварії відбувалось згідно правил роботи з лабораторними тваринами. На першому етапі роботи оцінювали остеопроєкторну та протизапальну ефективність комплексу на основі кверцетину, вітамінів С та D<sub>3</sub>, макро- та мікроелементів на оваріоектомованих самках щурів з аліментарним дефіцитом кальцію та білка. Далі уточнювали особливості взаємодії  $\alpha$ -циперметрину, його метаболітів та кверцетину з ER $\alpha$ , а також параметри їх лікоподібності та токсичності. Останній експеримент виконували для визначення впливу  $\alpha$ -циперметрину на функцію яєчників статевозрілих самок щурів, його ролі у розвитку остеодистрофії та встановлення гонадо- і остеопротекторної ефективності комплексу з вмістом кверцетину, вітамінів та мінералів.

Розуміння взаємодії  $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів з рецепторами естрогенів (ER) є важливим з точки зору оцінки потенційних ризиків цього піретроїду для репродуктивної та кісткової систем. Крім того, існуючі відомості про естрогеноподібні властивості кверцетину ґрунтуються на

доказах його спорідненості до рецепторів естрогенів, що дозволяє припустити можливості цього флавоноїду витіснити піретроїди з рецепторів. Тому для з'ясування патогенезу дисфункції яєчників та остеодистрофії, що викликані тривалою дією  $\alpha$ -циперметрину, доцільно встановити особливості зв'язування  $\alpha$ -циперметрину, його метаболітів та кверцетину з ER $\alpha$ , а також фармакокінетичні особливості даних сполук *in silico*.

Докінг-аналіз за допомогою AutoDock4, AutoDockVina та Schrödinger Maestro Glide встановив афінність до ER $\alpha$   $\alpha$ -циперметрину, його метаболітів 3-РВА, DССА та кверцетину. Прогнозована афінність оцінювалась за енергією зв'язування сполук з кристалічними структурами ЛЗД ER $\alpha$ .

Оцінка за AutoDock4 показує здебільшого агоністичний вплив  $\alpha$ -циперметрину на ER $\alpha$ , оскільки його енергія зв'язування була найнижчою для 1GWR та 1ERE та максимально наближалась до естрадіолу. Аналіз за AutoDockVina також припускає агонізм піретроїду до ER $\alpha$ , але прогнозовані показники афінності для 3ERT (комплекс ЛЗД ER $\alpha$  з антагоністом 4-гідрокситамоксифеном), 1GWR (комплекс з агоністом естраліолом) та 1ERE (комплекс з естрадіолом) були близькими за значенням:  $-7,9$  ккал/моль та  $-8,0$  ккал/моль, що робить неможливим однозначне ствердження та припускає можливість антагонізму піретроїду по відношенню до ER $\alpha$ .

Використання програми Schrödinger Maestro Glide дозволяє встановити антагонізм  $\alpha$ -циперметрину щодо ER $\alpha$ , оскільки його енергія зв'язування при докінгу з 3ERT безперечно є нижчою в порівнянні з іншими варіантами ЛЗД ER $\alpha$  (Gscore склав  $-9,29$  ккал/моль), хоча і не настільки, як у референтного ліганду 4-гідрокситамоксифену.

Метаболіт  $\alpha$ -циперметрину 3-РВА за оцінкою AutoDock4 проявляє агонізм до ER $\alpha$  через високі показники афінності з 1GWR та 1ERE (ЛЗД ER $\alpha$  в комплексі з естрадіолом), які були дуже близькі за значенням для всіх обраних структур ЛЗД ER $\alpha$ , в тому числі для 3ERT. Докінг 3-РВА з ЛЗД ER $\alpha$  з використанням AutoDockVina показав найменшу енергію утворення

стабільної конформації для 1ERE (ЛЗД ER $\alpha$  з естрадіолом) та 1GWR:  $-8,0$  ккал/моль та  $-7,9$  ккал/моль, відповідно, що означає агоністичну дію на ER $\alpha$ . Оцінка за Schrödinger Maestro Glide показала найнижчі показники енергії зв'язування для 3-PBA з 1GWR та 1ERE, найвищі – з 1ERR (ЛЗД ER $\alpha$  в комплексі з ралоксифеном), що підтверджує агоністичну дію даного метаболіту  $\alpha$ -циперметрину.

Метаболіт  $\alpha$ -циперметрину DCCA при використанні AutoDock4 показав найнижчу енергію зв'язування з 3ERT (ЛЗД ER $\alpha$  з антагоністом 4-гідрокситамоксифеном) та 1GWR (ЛЗД ER $\alpha$  з агоністом естрадіолом), що припускає можливість як агонізму так і антагонізму даної сполуки. Найвищі значення для DCCA при застосуванні AutoDock4 встановили при докінгу з 1ERR (ЛЗД ER $\alpha$  з ралоксифеном) та 1ERE (ЛЗД ER $\alpha$  з агоністом естрадіолом), що вказує на його низький агонізм та афінність до ER $\alpha$ . За оцінкою AutoDockVina DCCA показав стабільну взаємодію з кристалічною структурою ЛЗД ER $\alpha$  в комплексі з антагоністом 3ERT ( $-6,1$  ккал/моль). Але прогнозовані енергії зв'язування з 1GWR та 1ERE (агоністи) склали  $-6,0$  ккал/моль. Це припускає наявність як агоністичної, так і антагоністичної дії DCCA на ER $\alpha$ . При використанні Schrödinger Maestro Glide, DCCA продемонстрував найнижчі показники Gscore з 1ERE та 3ERT, що також робить неможливим однозначно стверджувати про активацію чи інактивацію ER $\alpha$  цим метаболітом  $\alpha$ -циперметрину.

Кверцетин за оцінками всіх програм AutoDockVina, AutoDock 4 та Schrödinger Maestro Glide засвідчив нижчі показники енергії зв'язування ніж метаболіти  $\alpha$ -циперметрину, що вказує на його здатність витіснити метаболіти піретроїду з ER $\alpha$  при конкурентному зв'язування. Кверцетин має високу афінність з 1GWR, 1ERE, 1ERR (комплекси ER $\alpha$  з агоністами), що означає виражений агонізм кверцетину по відношенню до ER $\alpha$ . За оцінкою Schrödinger Maestro Glide показники Gscore для кверцетину були нижчими, ніж для  $\alpha$ -циперметрину з 1GWR, 1ERE, 1ERR, що підтверджує здатність флавоноїду витіснити пестицид з ER $\alpha$ .

Аналіз характеру утворених зв'язків з'ясував деякі механізми взаємодії лігандів з ER $\alpha$ . Докінг кверцетину з кристалічною структурою ЛЗД ER $\alpha$  - 1GWR відбувається завдяки утворення водневих зв'язків за участю гідроксильних груп амінокислот GLU353, HIE524 та  $\pi$ - $\pi$  взаємодію з PHE404 – як і естрадіол. З 1ERE кверцетин подібно до естрадіолу утворює водневі зв'язки за участю гідроксильних груп з залишками амінокислот GLU353, HIE524 та PHE404, що вказує на високу афінність та агоністичні властивості кверцетину до ER $\alpha$  через схожі до естрадіолу механізми зв'язування.

Піретроїд  $\alpha$ -циперметрин не створював водневі зв'язки з 1GWR, 1ERE, 1ERR (комплекси з агоністами), а з 3ERT (комплекс з антагоністом) – утворював гідрофобний зв'язок із залишком ARG394. Референтний ліганд для 3ERT – 4-гідрокситамоксифен – формував дуже важливий для стабілізації комплексу ліганд-рецептор водневий зв'язок. Високі внески в енергії взаємодії 4-гідрокситамоксифену та  $\alpha$ -циперметрину відбувались за допомогою залишків LEU387 та LEU525. Це вказує на антагоністичний потенціал  $\alpha$ -циперметрину та доволі високу афінність до ER $\alpha$ , можливо, без утворення стабільного комплексу.

Метаболіт  $\alpha$ -циперметрину 3-РВА демонструє міцний зв'язок з LEU 387 3ERT ( $-4,71$  ккал/моль) зі значенням Ван-дер-Ваальсової взаємодії нижчим, як для вихідної сполуки, так і для референтного ліганду. Цей метаболіт утворює водневі зв'язки з GLU353 та ARG394, як і антагоніст 4-гідрокситамоксифен. При зв'язуванні 3-РВА з 1GWR задіяні амінокислотні залишки ARG394 та GLU353. Ані кверцетин, ні естрадіол не утворюють водневих зв'язків з ARG394, що означає дещо іншу просторову орієнтацію 3-РВА в сайті зв'язування ER $\alpha$  та, як наслідок, відсутність активації рецептора.

DCCA утворює водневий зв'язок з 3ERT через залишок GLU353, як і антагоніст 4-гідрокситамоксифен, а також – зв'язок із 1GWR та 1ERE за рахунок залишку HIE524, як і естрадіол. Отже, DCCA створює водневі зв'язки з меншою кількістю залишків амінокислот в 1GWR та 1ERE на

відміну від естрадіолу та кверцетину, що може спричинити іншу орієнтацію молекули DCCA в сайті зв'язування ER $\alpha$  та відсутність його активації.

Таким чином, оцінка докінгу та характеру взаємодії  $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів 3-РВА і DCCA з залишками амінокислот ЛЗД ER $\alpha$  припускає афінність до ER $\alpha$  з проявом здебільшого антагонізму. Кверцетин також має високу афінність до ER $\alpha$ , але його характер взаємодії схожий на естрадіол, що говорить про виражену агоністичну дію флавоноїду.

При оцінці впливу сполуки на стан ендокринної системи необхідно врахувати механізм її дії на молекулярні мішені, клітинні ефекти, особливості метаболічних перетворень та фізіологічні наслідки для організму в цілому. Використання платформ pkCSM та SwissADME встановило задовільні параметри фармакокінетики та лікоподібності для кверцетину, відсутність надмірної токсичності, що дозволяє використовувати його при деяких патологічних станах через його цитопротекторну, антиоксидантну, естрогеноподібну дію та мінімальні побічні ефекти. Оцінка  $\alpha$ -циперметрину згідно зазначених платформ характеризує його як високотоксичну сполуку. Проведене *in silico* дослідження  $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів допускає їх деструктивний вплив на ендокринну систему за рахунок здатності втручатися у регуляцію рівня естрадіолу через спорідненість до ER $\alpha$  переважно антагоністичного характеру.

Загалом, серед дослідників існують неоднозначні погляди на взаємодію піретроїдів та їх метаболітів з естрогеновими рецепторами. Дослідження на дану тему здебільшого проводились *in vitro*. Естрогеноподібні ефекти піретроїдів встановили тільки на клітинній лінії карциноми молочної залози людини MCF-7. Так, Chen et al. [122] показали частковий агонізм піретроїдів з рецепторами естрадіолу: перметрин > фенвалерат > циперметрин > дельтаметрин, а також Jin et al. [121] – естрогену дію  $\beta$ -циперметрину та 3-РВА на клітинах MCF-7, що можна пояснити особливостями метаболізму дослідних сполук в цих клітинах.

Більша частина наукових публікацій підтверджує антиестрогенні ефекти піретроїдів. В репортерному аналізі генів опосередкованих людським hER $\alpha$  та rER $\alpha$  щурів показано естрогенний потенціал деяких піретроїдів (фенвалерат > циперметрин > перметрин), який виражався в індукуванні експресії люциферази, в той час як їхній метаболіт 3-РВА проявляв антиестрогенний ефект [201]. Це співпадає з висновками дослідження Tyler et al. [165] та дослідями McCarthy et al. [123], в яких доведена антиестрогенна активність 3-РВА в модифікованих клітинах дріжджів та блокування зв'язування естрадіолу з рецептором в даних клітинах.

Brander et al. [203] також довели про антагоністичне зв'язування  $\alpha$ -циперметрину з ER $\alpha$ , яке попереджує зв'язок з естрадіолом. В дослідях Zhang et al. [229] вивчали ендокриннотоксичні особливості стереоізомерів  $\alpha$ -,  $\beta$ - та  $\theta$ -циперметрину шляхом аналізу репортерних генів подвійної люциферази на клітинах рибок даніо. Дослідники встановили антагонізм  $\alpha$ -циперметрину до ER $\alpha$  з проявою найбільшій ендокриннотоксичної дії ніж інші ізомери.

Тестування активності декількох піретроїдів та їх метаболітів через вплив на ER $\alpha$  показало слабку агоністичну дію цигалотрину, дельтаметрину, фенвалерату, перметрину, виражений антиестрогенний вплив 3-РВА, DCCA та антагонізм до рецепторів андрогенів циперметрину Du et al. [61].

Досліджень *in silico* стосовно взаємодії піретроїдів з ER $\alpha$  значно менше. В роботі Hu et al. [147] зазначили високу афінність біфентрину та перметрину до ЛЗД ER $\alpha$  2YJA та припустили більш естрогенний ефект перметрину ніж біфентрину, що показано ними і в дослідженні *in vitro* на клітинах рибок даніо.

Присутні також певні відмінності в докінг-аналізі кверцетину з ER $\alpha$ , між нашими результатами та даними з наукової літератури. Так, Liu et al. [216] за допомогою Schrodinger Suite 2015 відмітили здатність кверцетину зв'язуватися з ZERT з утворенням водневих зв'язків з GLU353, ASP351, ARG394. «В нашому дослідженні встановлено, що водневий зв'язок



кверцетин утворює тільки з ASP351, в той час як з GLU353 та ARG394 ZERT водневий зв'язок утворюють метаболіти  $\alpha$ -циперметрину» [155].

Powers та співавтори [197] демонструють нижчу енергію зв'язування з ER $\alpha$  кверцетину, ніж ендогенного естрадіолу. Але автори використовували інший ЛЗД ER $\alpha$  – 1X7E та програму для докінгу Molegro Virtual Docker v. 6.0. Puranik et al. [100] за допомогою GLIDE встановили силу зв'язування кверцетину з 1GWR –10,136 ккал/моль та з ZERT –9,347 ккал/моль. За нашими результати «сила зв'язування кверцетину із зазначеними ЛЗД була меншою, незалежно від програмного забезпечення. Данні Puranik et al. стосовно енергії зв'язування референтних лігандів естрадіолу та 4-гідрокситамоксифену збігаються з нашими результатами. Автори описали внесок окремих залишків амінокислот у взаємодії кверцетину з ZERT та 1GWR, відмітили наявність  $\pi$ - $\pi$  взаємодії з PHE404 1GWR та дійшли висновку про виражену агоністичну дію кверцетину до ER $\alpha$ » [155].

Аналіз докінгу кверцетину з ER $\alpha$  за власним дослідженням та даними інших авторів дозволяє стверджувати про агоністичні властивості флавоноїду до ER $\alpha$ . «Ми не впевнені, що кверцетин зв'язується з ER $\alpha$  сильніше, ніж  $\alpha$ -циперметрин, але нами встановлено, що кверцетин сильніше зв'язується з ER $\alpha$ , ніж метаболіти  $\alpha$ -циперметрину 3-PBA та DCCA» [155].

Взагалі інтерпретація даних в якості пояснення характеру взаємодії між лігандом та рецептором значною мірою залежить від обраного програмного забезпечення та ускладнюється близькістю показників енергії зв'язування за значенням для різних типів ЛЗД ER $\alpha$ .

Отримані нами дані параметрів лікоподібності та токсичності кверцетину схожі з результатами *in silico* інших дослідників. Al-Nour та співавтори [57] показали відповідність кверцетину вимогам лікоподібності завдяки його фармакокінетиці, профілю токсичності та фармакодинамічним властивостям, оціненим за допомогою SwissADME та pkCSM. Puranik et al. [100] відмічають, що параметри лікоподібності кверцетину знаходяться у допустимих діапазонах за оцінкою QuikProp Schrodinger 2017. Islam разом із

колегами оцінювали лікоподібність кверцетину за Molinspiration WebME Editor 3.81 та дійшли висновку про його відповідність вимогам лікарського засобу [143]. В наведених роботах вказується на відповідність кверцетину «правилам Ліпінського» та на високу пероральну доступність [57, 85, 100, 143].

Аналіз *in silico* є корисним інструментом, але його не достатньо для розуміння патофізіологічних процесів, які протікають в організмі внаслідок впливу певного етіологічного чинника. Дослідження за допомогою комп'ютерного моделювання має ряд суттєвих обмежень. Моделі *in silico* занадто спрощують біологічні системи та часто не враховують можливі компенсаторні механізми та довгострокові ефекти впливу ряду речовин на живий організм, що може відноситися і до ендокринних деструкторів. Обмеження комп'ютерного моделювання визначають необхідність проведення досліджень *in vivo*, які дозволяють більш точно оцінити наслідки впливу екзогенної сполуки для організму [211].

Для з'ясування патогенного впливу  $\alpha$ -циперметрину, а також протекторної ефективності комплексу кверцетину, вітамінів та мінералів на ендокринну функцію яєчників було проведено дослідження на самках щурів. Дослідним тваринам вводили 10 мг/кг  $\alpha$ -циперметрин впродовж 120 днів. На 90 дні визначали тривалість естрального циклу самок, а після евтаназії – рівень естрадіолу у крові та органі індекси матки та яєчників.

Наше дослідження тривалості естрального циклу встановило його збільшення у самок, які отримували  $\alpha$ -циперметрин за рахунок подовження стадії дієструсу на 72,58 %. Такий характер порушення естрального циклу у тварин є ознакою дефіциту естрогенів. В якості прикладу можна навести, що у вагінальних мазках оваріоектомованих щурів присутні тільки лейкоцитарні клітини та слиз, а ороговіння клітин не спостерігається [212].

За нашими даними, рівень естрадіолу у крові самок після інтоксикації збільшувався удвічі, що доказує антиестрогенні властивості піретроїду, який викликав порушення механізмів негативного зворотнього зв'язку [193].

Піретроїд  $\alpha$ -циперметрин призвів до зменшення органного індексу яєчників на 28,13 %, можливо через апоптоз фолікулів та гранульозних клітин, і не вплинув на показники органного індексу матки.

Отримані результати припускають здатність  $\alpha$ -циперметрину порушувати злагоджене функціонування складових вісі гіпоталамус-гіпофіз-яєчники та викликати деструктивні зміни у статевих залозах самок щурів. Характер наслідків впливу обраного піретроїду на функціональні показники яєчників самок щурів, в тому числі надмірне збільшення рівня естрадіолу в крові при відносно незмінному органному індексі матки, означає виражений антагоністичний ефект  $\alpha$ -циперметрину до рецепторів естрогенів аж до їхнього блокування. Антагонізм  $\alpha$ -циперметрину до ER $\alpha$  статевих залоз самок щурів є підтвердженням наших результатів *in silico*. Можливо, саме властивості ендокринного деструктора надають  $\alpha$ -циперметрину здібності порушувати процеси ремоделювання кісткової тканини.

Деякі дослідники також встановили патогенний вплив циперметрину та його ізомерів на статеву систему тварин, хоча наявні і певні відмінності. Введення самкам мишей  $\beta$ -циперметрину у дозах 1,38, 2, 76 та 5,52 мг/кг впродовж 6 місяців дозозалежно зменшило масу яєчників та матки, викликало проблеми з протіканням вагітності, збільшило рівень естрадіолу та фолікулостимулюючого гормону в крові [127]. В дослідженні Liu et al. [111] встановлено підвищення рівня естрадіолу у крові самок щурів за умови впливу високих доз циперметрину. Циперметрин у дозах 1,38, 2,76 и 5,52 мг/кг впродовж трьох місяців викликав збільшення тривалості естрального циклу за рахунок дієструсу, зменшення маси яєчників та збільшення маси матки дозозалежним чином Al-Hamdani et al. [56]. В роботі Sangha et al. [213] застосування циперметрину 50 мг/кг у тримісячних щурів призвело до зменшення маси яєчників, але збільшувало масу матки.

При введенні вагітним щурам  $\beta$ -циперметрину в дозі 10 мг/кг, в нащадків жіночої статі при досягненні ними статевої зрілості відбувалось

подовження дієструсу та зменшення рівня естрадіолу у сироватці крові в порівнянні з нащадками контрольної групи [175].

Наявні протиріччя між власним дослідженням та даними з літератури пов'язані з особливостями гонадотоксичних ефектів ізомерів циперметрину, дозування піретроїду, віку тварин та тривалості експерименту.

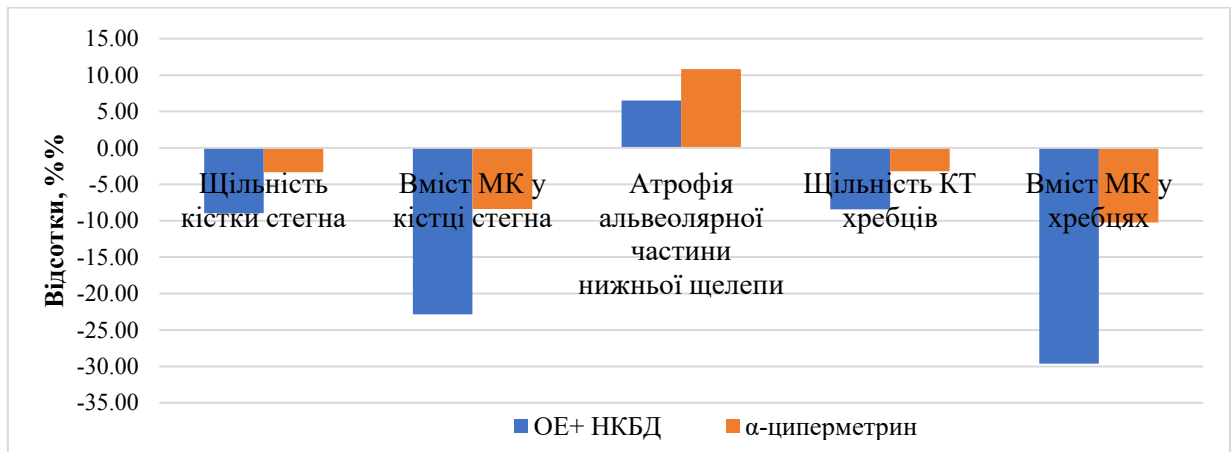
Профілактичне вживання щурами комплексу кверцетину, вітамінів С та D<sub>3</sub>, макро- і мікроелементів на тлі отримання  $\alpha$ -циперметрину викликало нормалізацію естрального циклу, всі стадії якого займали приблизно однаковий проміжок часу (1,00 – 1,03 дні). Рівень естрадіолу не відрізнявся від показника інтактної групи, а органний індекс яєчників збільшився на 65,22 % ( $p_1 \leq 0,01$ ). На нашу думку, комплекс реалізував захисну дію репродуктивної системи щурів завдяки властивостям кверцетину. Відомо, що кверцетин посилює ступінь антиоксидантного захисту яєчників та має естрогеноподібну дію завдяки здатності зв'язуватися з ER $\alpha$  та ER $\beta$ , внаслідок чого активуються процеси транскрипції, які регулюють експресію генів, що обумовлюють розвиток та функціонування репродуктивної системи [204]. Кверцетин здатний впливати на вісь гіпоталамус-гіпофіз-гонади, зменшуючи рівень ЛГ та ФСГ у крові [188, 198]. В дослідженні Shu et al., [109] зазначається, що пероральне введення кверцетину здатне впливати на вагу тіла, розвиток фолікулів та секрецію гормонів яєчниками у мишей препубертатного віку. У старіючих щурів кверцетин та інші поліфеноли здатні підтримувати роботу яєчників через вплив на стан фолікулярного резерву [112]. Застосування екстракту листків шавлії з комплексом флавоноїдів, в тому числі кверцетину, збільшувало активність антиоксидантних ферментів в матці оваріоектомованих щурів, призвело до ороговіння епітеліальних клітин у вагінальних мазках, що підтверджує подібність флавоноїдів до жіночих статевих гормонів та їх здатність нормалізувати протікання естрального циклу Ghorbel et al. [212]. Наші результати та дані інших авторів переконливо доказують, що кверцетин є дуже перспективним та безпечним претендентом на роль ефективного засобу

для попередження розладів статевих функцій, індукованих ендокринними деструкторами.

Враховуючи суттєвий вплив естрогенів на ремоделювання кісткової тканини, а також естрогеноподібні, антиоксидантні та цитопротекторні ефекти кверцетину, наступним етапом нашої роботи стало дослідження стану кісток самок щурів при розладах функції яєчників різного генезу, а також корекції порушень за допомогою обґрунтованого складу комплексу кверцетину, вітамінів і мінералів.

Провели аналіз деяких показників кісток самок щурів, які отримували  $\alpha$ -циперметрин в дозі 10 мг/кг впродовж 120 днів. Для з'ясування механізмів порушень у кістковій системі щурів внаслідок дії  $\alpha$ -циперметрину, отримані результати порівнювали з попередніми відповідними показниками кісток оваріоектомованих самок з аліментарним дефіцитом кальцію і білка, а також оцінювали ефективність попередження остеодистрофії шляхом використання комплексу кверцетину, вітамінів і мінералів.

Результати, що наведені на рис. 6.1 свідчать, що дефіцит естрогенів, білка та кальцію в організмі щурів призвів до зменшення щільності стегнової кістки на 8,96 % та вмісту МК в ній на 22,84 %. У КТ поперекових хребців зменшення щільності відносно контрольної групи склало 13,89 %, що може бути обумовлено зниженням вмісту МК на 29,63 %. Вміст ОК в обох досліджуваних кістках не зазнав змін, що можна пояснити компенсаторними механізмами, дія яких була направлена на збереження якомога більшої цілісності КТ в умовах підвищеної остеорезорбції. Ступінь атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи щелеп у оваріоектомованих самок не зазнав достовірних змін, хоча простежувалася тенденція до його збільшення, що вказує на активацію резорбції кістки (рис. 6.1).



**Рис. 6.1** Зміни щільності, вмісту мінерального компонента (стегна та хребців), атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи при оваріоектомії та дефіциті білка і кальцію та інтоксикації α-циперметрином, % від норми Примітка: КТ- кісткова тканини; МК – мінеральний компонент.

Подібні зміни відбувались у КТ самок щурів й після впливу α-циперметрину: достовірне зменшення щільності стегнових кісток та поперекових хребців на 3,34 % та 3,21 %, відповідно, а також певна тенденція до збільшення маси та об'єму цих кісток, хоча і не достовірна. Зменшення щільності стегнових кісток та хребців у самок, внаслідок інтоксикації піретроїдом, обумовлено зниженням вагової частки МОК за рахунок достовірного падіння вмісту МК на 10,23 % у стегновій кістці та на 10,24 % у хребцях. Вміст ОК в обох досліджуваних кістках не зазнав змін. Інтоксикація α-циперметрином також викликала патологічні зміни у КТ пародонта, на що вказує збільшення ступеня атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи щелеп тварин на 10,82 % (рис. 6.1).

Порівнюючи описані показники двох експериментальних моделей, можна констатувати аналогічність загального характеру змін у КТ стегна, хребців та альвеолярній частині нижньої щелепи, незважаючи на деякі відмінності. Патологічні зміни морфометричних параметрів кісток самок були більш вираженими при моделюванні гіпоестрогенії хірургічним шляхом (рис. 6.1). Цей факт, ймовірно, пов'язано з тим, що оваріоектомія викликає різке та тотальне припинення вироблення естрогенів, тоді як при інтоксикації

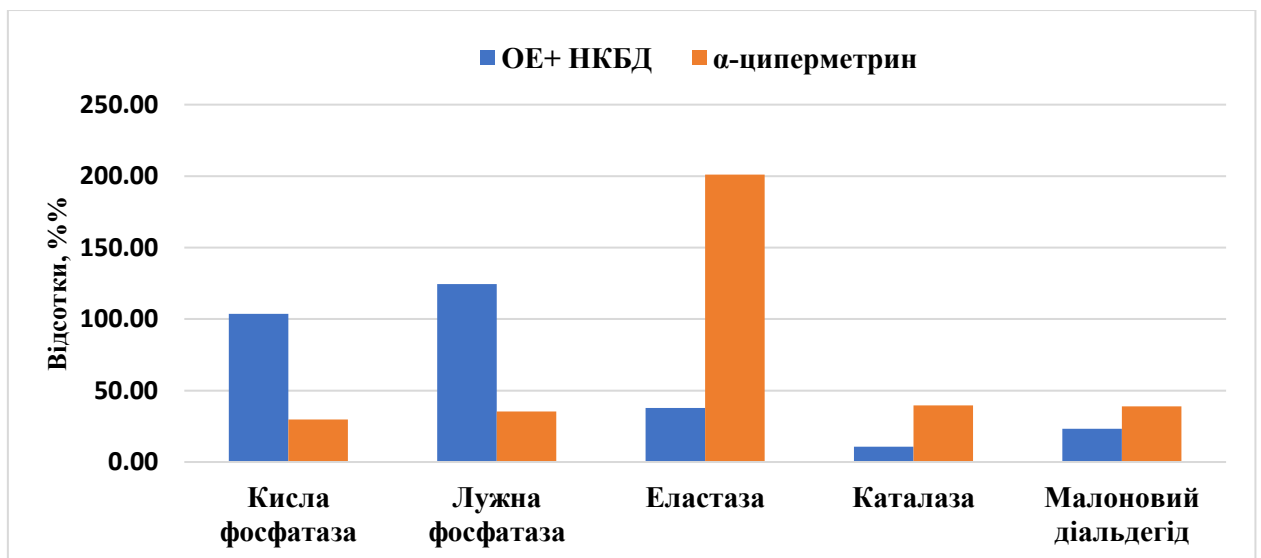
$\alpha$ -циперметрином, здійснюється поступове блокування рецепторів естрогенів, деяка кількість яких продовжує своє функціонування. Тим не менш, ґрунтуючись на отриманих результатах, можна зробити висновок про певну подібність патофізіологічних процесів, які лежать в основі розвитку остеодистрофічних явищ самок при обох станах нестачі естрогенів. Атрофія альвеолярної частини нижньої щелепи була більш вираженою при інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином, можна припустити, що причиною цього є запалення слизової оболонки порожнини рота, через прямий вплив піретроїду на відділи ШКТ. Підвищення рівня прозапальних цитокінів, таких як інтерлейкін-6 (IL-6) і фактор некрозу пухлин альфа (TNF- $\alpha$ ), обумовило посилення запальної реакції та активацію остеокластичної резорбції.

Загалом, оваріоектомія самок є загальноприйнятою моделлю для відтворення жіночого постменопаузального остеопорозу. Часто зменшення мінеральної щільності в хребцях є більш помітним, ніж у стегнових кістках. Кістка хребців є губчастою, тому через високу швидкість ремоделювання втрачається раніше за кортикальну кістку стегна [67, 87, 106, 261]. В нашому дослідженні, зменшення щільності у кістці стегна та хребцях приблизно було однаковим, що можна пояснити дефіцитом кальцію та білка в раціоні. Вважається, що кісткова маса швидко втрачається після настання естрогенового дефіциту, але потім, через 14-21 день, досягає стадії плато, що означає більш збалансований процес ремоделювання [106].

В роботі Naqvi et al. [58] відмічали, що у самок щурів вже через 4 тижні після оваріоектомії збільшувалася експресія генів COL1A1 та COL1A2, які кодують  $\alpha$ 1 та  $\alpha$ 2 ланцюги колагену I типу. В дослідженні Shiavi et al. [118] також показано збільшення експресії COL1A1 та COL1A2 в клітинній культурі мишиних остеобластів при припиненні стимуляції естрадіолом на 14 день. Зміни супроводжувалися зменшенням експресії RUNX2 та фібронектину, що може вказувати на суттєві порушення в диференціації остеобластів та продукції ними матриксу за дефіцитом статевих гормонів. Ці

факти пояснюють відсутність змін частки ОК кісток стегна та хребців в нашому дослідженні.

Ознаки остеодеструктивних процесів під впливом дефіциту естрогенів двох моделей, супроводжувалися змінами біохімічних показників, які є маркерами сигналізації про розлади в процесах ремоделювання КТ (рис. 6.2).



**Рис. 6.2** Зміни вмісту малонового діальдегіду, активності кислої та лужної фосфатази, еластази, каталази в альвеолярній частини нижньої щелепи щурів при оваріоектомії, дефіциті білка і кальцію та інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином, % від норми.

В альвеолярній частини нижньої щелепи оваріоектомованих самок щурів спостерігали збільшення активності маркера остеокластів КФ більш ніж у два рази, що може вказувати на посилене диференціювання остеокластів в умовах розвитку гіпоестрогенії. Також в два рази підвищувалася активність маркеру остеобластів – ЛФ, що може розглядатися, як компенсаторний захисний механізм при посиленому руйнуванні МК кісткової тканини альвеолярної частини нижньої щелепи (рис. 6.2). Зростання активності ЛФ, яке встановлено нами, є цілком закономірним явищем при моделюванні патології КТ шляхом оваріоектомії, яка супроводжується збільшенням як маркерів остеорезорбції, так і остеогенезу [186].



Під впливом  $\alpha$ -циперметрину активність кісткової КФ також збільшилась на 29,82 %. Хоча отримані дані не достовірні, це все ж таки припускає посилення диференціації остеокластів та зростання їх активності в умовах інтоксикації. Посилений остеокластогенез підтверджується зменшенням щільності стегнових кісток та хребців, разом із падінням в них вмісту МК та збільшення ступеня атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи, КТ якого дуже чутлива до остеолітичних ферментів.

При інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином, у КТ альвеолярної частини нижньої щелепи самок, встановлено зростання активності ЛФ на 32,25 %, що може вказувати на активацію механізмів, направлених на збереження цілісності кістки. Факт збільшення активності цього ферменту при оваріоектомії і при інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином може свідчити про певну подібність патогенетичних механізмів у кістковій тканині при гіпоестрогеніях різного генезу (рис. 6.2).

На надмірну деструкцію колагену І типу кісткової тканини оваріоектомованих самок вказує збільшення активності еластази на 37,8 %. Тривала дія  $\alpha$ -циперметрину викликала у кістковій тканині більш значне підвищення активності еластази – більш ніж в три рази, що вказує на посилене руйнування колагену позаклітинного матриксу КТ альвеолярної частини нижньої щелепи (рис. 6.2). Також це може підтверджувати зроблене вище припущення, щодо інтенсифікації запального процесу в тканині пародонта.

Оваріоектомія суттєво не вплинула на вміст маркеру окислювального стресу МДА у КТ, проте достовірно збільшила активність антиоксидантного ферменту каталази на 10,78 %. В той час як піретроїдний інсектицид викликав збільшення вмісту на 38,9 %. Внаслідок активації процесів ПОЛ в умовах інтоксикації встановили компенсаторне збільшення активності антиоксидантного ферменту каталази на 39,62 %.

Рисунок 6.2 демонструє, що оваріоектомія та неповноцінний раціон викликали більше зростання активності кісткових КФ та ЛФ ніж інтоксикація

$\alpha$ -циперметрином. Але, активність кісткової еластази підвищилася набагато суттєвіше після введення піретроїду. Крім того,  $\alpha$ -циперметрин, на відміну від оваріоектомії викликав у КТ зріст вмісту МДА. Активність каталази також збільшилася сильніше, ніж при моделюванні оваріоектомії. Отримані результати говорять про спроможність  $\alpha$ -циперметрину викликати ініціацію ПОЛ та окислювальний стрес у кістковій тканині.

Відомо, що остеопроєкторна активність естрогенів обумовлена посиленням експресії OPG, захистом остеобластів від апоптозу; зменшенням експресії RANKL, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-11, IL-1, IL-3. Порухення функції гонад також може супроводжуватися розвитком окислювального стресу через пригнічення утворення антиоксидантних ферментів, що сприяє остеокластогенезу [24].

Двостороння оваріоектомія разом з дефіцитом кальцію та білку у їжі щурів, впродовж чотирьох місяців призвели до збільшення екскреції кальцію з сечею, зменшення його виведення з калом та зменшення загальної абсорбції кальцію в організмі на 16,9 %. Такі зміни можна пояснити порушенням процесів реабсорбції кальцію у нирках через дефіцит кальцитріолу, утворення якого відбувається залежним від естрадіолу способом. Зменшення виділення кальцію з калом сталось через нестачу цього елемента у їжі. Загальне зменшення засвоєння кальцію, а значить, його дефіцит в організмі оваріоектомованих самок є додатковим етіологічним фактором розвитку остеодистрофії.

В слизових оболонках ШКТ у щурів з оваріоектомією при неповноцінній за кальцієм та білком дієті спостерігали збільшення активності КФ від 16,49 % у ротовій порожнині до 29,57 % у товстій кишці; зріст активності еластази від 28,72 % у ротовій порожнині до 93,73 % у тонкій кишці; підвищення вмісту МДА від 25,78 % у ротовій порожнині до 35,65 % у товстій кишці. Активність уреазы зростала в усіх відділах травного тракту від 41,00 % у тонкому кишечнику до 227,01 % у шлунку. Отримані данні говорять про розвиток запалення, інтенсифікацію ПОЛ та збільшення

мікробної контамінації у слизових оболонках травного тракту самок щурів в умовах дефіциту естрогенів, кальцію і білка у їжі. Такі порушення у травному тракті можуть бути ще одним чинником патогенезу остеодистрофії оваріоектомованих самок, через погіршення перетравлення та засвоєння нутрієнтів.

Тривалий вплив  $\alpha$ -циперметрину спричинив схожі явища у слизових оболонках ШКТ самок щурів: збільшення активності КФ від 14,07 % у тонкій кишці до 20,00 % у ротовій порожнині, еластази – від 39,43 % у шлунку до 41,04 % у товстій кишці, вмісту МДА – у ротовій порожнині та шлунку – на 33,82 %. У тонкій та товстій кишках вміст МДА мав тенденцію до зростання.

Однаковий характер порушень у травному тракті самок щурів при гіпоестрогеніях різного генезу вказує на захисну участь жіночих статевих гормонів у фізіології ШКТ. Естрогени дійсно підтримують слизові оболонки травного тракту в фізіологічному стані, стимулюючи утворення секрету залозистими клітинами, а також модулюють захисну функцію імунних клітин. Дефіцит естрогенів призводить до розвитку виразки, запалення та злоякісних новоутворень у шлунку, тонкому та товстому кишечнику [245].

Розвиток остеорезорбції та запалення у ШКТ при порушенні функції яєчників залежать не тільки від дефіциту або гальмування взаємодії статевих гормонів з рецепторами естрогенів, але також від утворення надмірної кількості АФК. Відомо, що дефіцит естрогенів викликає окислювальний стрес та посилення процесів ПОЛ через пригнічення експресії антиоксидантних ферментів [124, 149, 225]. Хронічний вплив піретроїдів теж призводить до депресії антиоксидантного захисту та інтенсифікації ПОЛ через надмірну кількість АФК [192, 202]. Надлишок АФК викликає запалення, апоптоз клітин та функціональні порушення в усіх відділах травного тракту [65]. АФК також ініціюють мітохондріальну апоптотичну сигналізацію та пригнічують експресію остеогенних маркерів, водночас стимулюючи диференціацію остеокластів [189].

Крім того, циперметрин безпосередньо може виступати як прооксидант через здатність порушувати гомеостаз іонів кальцію, що викликає перенавантаження мітохондрій кальцієм та знижує потенціал мембрани цих органел, які продукують значну кількість АФК. Циперметрин також ініціює або пригнічує окремі ланцюги у шляху мітоген-активованої протеїнкінази (МАРК), що призводить до апоптозу та окислювального стресу [97].

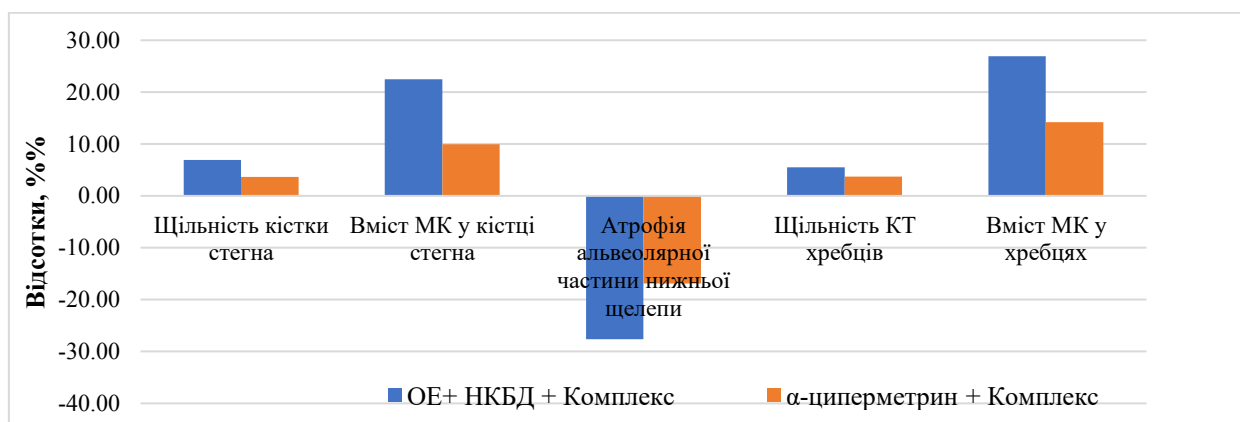
Мікробіом кишечника тісно пов'язаний із метаболізмом естрогенів, дефіцит яких здатний призвести до дисбіозу. В нашому дослідженні на порушення сталості мікробіому ШКТ вказує збільшення активності уреазі, ферменту, який свідчить про збільшення умовно-патогенної мікробіоти. Зростання активності уреазі в усіх відділах травного тракту щурів з оваріоектомією можна пояснити тим, що рівні циркулюючих в організмі стероїдних гормонів тісно пов'язані з бактеріальним складом товстого кишечника. Гіпоестрогенія здатна збільшити численність представників умовно-патогенної мікробіоти, яка у великих кількостях синтезує  $\beta$ -глюкоронідазу, що декон'ює метаболіти естрогенів з метою підвищення рівня статевих гормонів в організмі [141].

Таким чином, встановлений розвиток запальних і перекисних процесів у ШКТ самок при гіпоестрогеніях різного походження, може опосередковано погіршувати стан кісток щурів через імовірне порушення всмоктування та засвоєння кальцію та інших нутриєнтів необхідних для ремоделювання КТ.

Далі розглянемо результати досліджуваних показників кісткової та травної системи у самок щурів з гіпоестрогенією різної етіології, яким проводили профілактику комплексом кверцетину, вітамінів С та D<sub>3</sub>, цитрату кальцію та інших мікро- та мікроелементів.

Як продемонстровано на рис. 6.3, вживання профілактичних препаратів нормалізувало морфометричні показники хребців, альвеолярних та стегнових кісток у щурів на тлі оваріоектомії, дефіциту білка та кальцію. Поліпшення стану кісток виявлялося у збільшенні щільності та вмісту МК,

нормалізації об'єму та маси кістки та зменшенні атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи щурів на 27,6% (рис. 6.3).



**Рис. 6.3** Зміни щільності, вмісту мінерального компоненту (стегна та хребців), атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи за умови профілактики ускладнень змодельованих патологій, % від групи з патологією

Примітка: КТ- кісткова тканини; МК – мінеральний компонент.

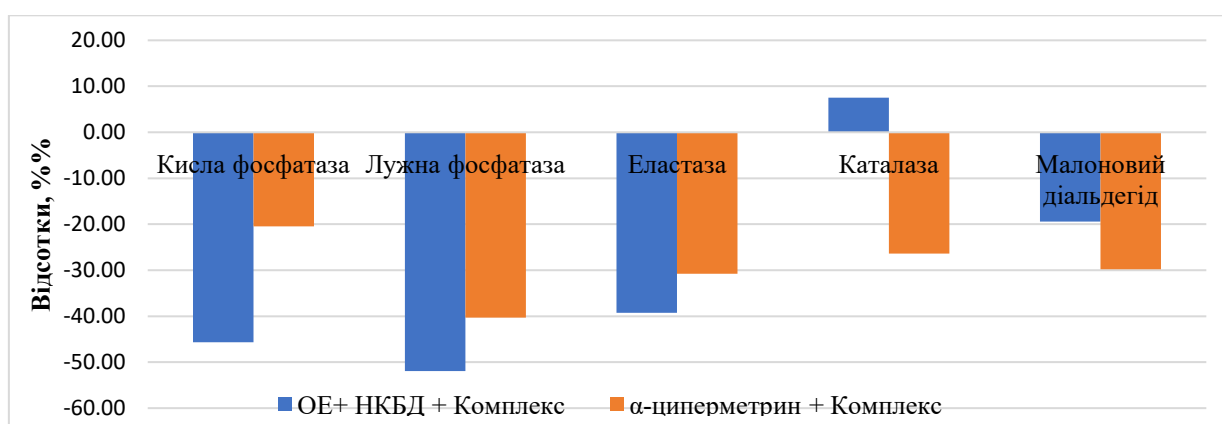
Застосування профілактичного комплексу у щурів з інтоксикацією α-циперметрином також сприяло нормалізації стану кісток: встановлено збільшення щільності кістки стегна на 3,66 % та хребців – на 3,75 %, зростання частки МК на 9,93 % у стегновій кістці та на 14,21% у поперекових хребцях та зменшення атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи на 16,86 % (рис. 6.3).

Остеопротекторний ефект комплексу підтвердив аналіз активності кісткових ферментів альвеолярної частини нижньої щелепи оваріоектомованих самок: показано гальмування активності КФ на 45,22 %, ЛФ на 51,91 % та еластази на 39,30 %, що вказує на нормалізацію функції остеобластів та остеокластів. Проте, вживання профілактичного комплексу суттєво не вплинуло на активність антиоксидантного ферменту каталази та вміст МДА (рис. 6.4).

Профілактика комплексом вітамінів і мінералів у щурів на тлі інтоксикації α-циперметрином, теж сприяла нормалізації біохімічних показників в альвеолярній частині нижньої щелепи: зменшенню активності

КФ на 20,50 %, ЛФ – на 40,31 % , еластази – на 30,75 % та каталази – на 26,35 %, при зниженні вмісту МДА на 29,77 % (рис. 6.4).

Варто відмітити, що використання комплексу кверцетину, вітамінів та мінералів при інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином в більшій мірі знижувало активність каталази та вміст МДА у альвеолярній частини нижньої щелепи ніж при оваріоектомії та дефіциті нутрієнтів (рис. 6.4). Це можна пояснити прямою дією антиоксидантів комплексу на окислювальні властивості  $\alpha$ -циперметрину.



**Рис. 6.4** Зміни вмісту малонового діальдегіду, активності кислої та лужної фосфатази, еластази, каталази в альвеолярній частини нижньої щелепи щурів за умови профілактики ускладнень змодельованих патологій, % від показника групи з патологією.

Отримані дані є переконливим доказом вираженої остеопротекторної ефективності запропонованого комплексу при патології кісткової тканини, яка розвинулась в наслідок дефіциту естрогенів різного генезу. Всі складові комплексу обґрунтовано введені до його складу для стабілізації процесів ремоделювання кісткової тканини в умовах розвитку остеопатій. Але провідне значення у пригніченні остеорезорбції та ініціації остеогенезу при гіпоестрогеніях, на нашу думку, грає кверцетин завдяки естрогеноподібній, антиоксидантній, цитопротекторній та протизапальній дії, а також цитрат кальцію, як додаткове джерело цього елемента, що посилено втрачається при дефіциті жіночих статевих гормонів.

Введення профілактичного комплексу оваріоектомованим самкам сприяло позитивним змінам у травній системі: зменшенню активності КФ від 8,39 у тонкій кишці до 21,79 % у товстій кишці, еластази – від 16,38 % у шлунку до 37,85 % у тонкій кишці, вмісту МДА – від 20,49 % у ротовій порожнині до 23,03 % у шлунку. Активність уреазу у слизових оболонках ШКТ за умови профілактики також знизилася, що означає нормалізацію складу кишкової мікробіоти під впливом компонентів комплексу. Відомо, що раціон збагачений фітоестрогенами, зокрема ізофлавононами або іншими флавоноїдами, здатний змінювати склад мікробіому кишечника, підвищуючи кількість представників облигатної мікробіоти [141]. Профілактика не зменшила кількість виведення кальцію у оваріоектомованих щурів. Але за рахунок додаткового надходження цього елемента у складі комплексу відмічено збільшення його засвоєння в організмі на 72,6 %.

При застосуванні комплексу у самок на тлі впливу  $\alpha$ -циперметрину встановлено гальмування активності прозапальних ферментів у слизових оболонках ШКТ: КФ від 14,07 % у тонкій кишці до 20,00 % у ротовій порожнині, еластази – від 19,65 % у шлунку до 22,02 % у тонкій кишці. Вміст маркера руйнування ліпідів клітинних мембран вільними радикалами МДА теж знизився від 8,73 % у тонкій кишці до 28,00 % у ротовій порожнині. Отримані дані свідчать про пригнічення препаратами комплексу запалення та ПОЛ у травному тракті ініційованих досліджуваним піретроїдом в усіх відділах травного тракту.

Таким чином, проведенні дослідження встановили виражену остопротекторну, протизапальну та антиоксидантну ефективність запропонованого комплексу вітамінів і мінералів у самок щурів в умовах гіпоестрогенії різного генезу. Виявлені ефекти комплексу біологічно активних речовин у значній мірі пов'язані з регуляторними властивостями флавоноїду кверцетину.

Дослідники Akaras et al. [113] теж показали пригнічення кверцетином розвитку ПОЛ та запалення у шлунку при введенні 25 мг/кг циперметрину

впродовж 28 діб. Циперметрин посилював експресію прозапальних цитокінів TNF- $\alpha$  та IL-1, імовірно через активацію шляху NF- $\kappa$ B. Кверцетин у дозі 25 мг/кг сприяв збільшенню активності супероксидисмутази, каталази, зменшенню вмісту МДА та маркерів запалення.

Протизапальні, антиоксидантні та остеопротекторні властивості даного комплексу на тлі хронічної алкогольної інтоксикації у щурів були встановлені в дослідженнях Кіка В. В.: застосування комплексу вітамінів та мінералів сприяло зменшенню ступеня атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи та активності остеодеструктивних ферментів, а в слизових оболонках травного тракту – нормалізації маркерів запалення [10]. В роботах Сакалюк О. В., присвячених вивченню стану кісток при гіпотиреозі, комплекс викликав гальмування атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи, збільшував щільність кісток стегна та хребців, нормалізував активність кісткових ферментів, виявляв протизапальні та антиоксидантні ефекти на слизові оболонки травної системи [29].

На нашу думку, основними компонентами профілактичного комплексу, які зробили найбільший внесок у його остеопротективні властивості були кверцетин та цитрат кальцію. Кверцетин через високу спорідненість до рецепторів естрогену та агоністичну активність компенсував наслідки оваріоектомії та ендокринно-деструктивної дії  $\alpha$ -циперметрину. Взаємодія обраного нами флавоноїду з ER $\alpha$  могла стимулювати експресію ряду білків, таких як OPG, RUNX2, OSX, які викликають диференціацію остеобластів. Цитрат кальцію за підтримки інших мінералів та вітамінів у складі комплексу ефективно засвоювався і накопичувався в кістковій тканині, що сприяло збільшенню вмісту МК.

Остеопротекторна роль кверцетину у оваріоектомованих щурів відмічена іншими дослідниками, які встановили збільшення щільності КТ стегна і числа трабекул при зменшенні активності КФ, після застосування цього флавоноїду [101, 205, 258]. Введення кверцетину у дозі 50 мг/кг/день оваріоектомованим щурам знижувало активність КФ та ЛФ, але також



збільшило рівні кальцію та фосфору у крові [115]. Кверцетин здатний знизити втрату альвеолярної КТ при моделюванні пародонтиту у щурів за рахунок збільшення остеобластичної активності. Водночас під дією цього флавоноїду спостерігали зменшення кількості остеокластів та синтезування ними КФ [232]. Кверцетин стимулює мінералізацію позаклітинного матриксу, посилює диференціювання клітин-попередників остеобластів у кістковому мозку через сигнальні шляхи естрогенів, зв'язуючись з ER $\alpha$  [206]. При гепатиті у щурів, кверцетин нормалізував активності КФ та ЛФ в альвеолярній частини нижньої щелепи, що попереджало деструктивні процеси у КТ пародонта [98], а також сприяло мінералізації колагену позаклітинного матриксу КТ пародонта [41]. Комплекс з кверцетином проявляв виражену протизапальну та антиоксидантну активність у відділах ШКТ за умови моделювання холестазу [15].

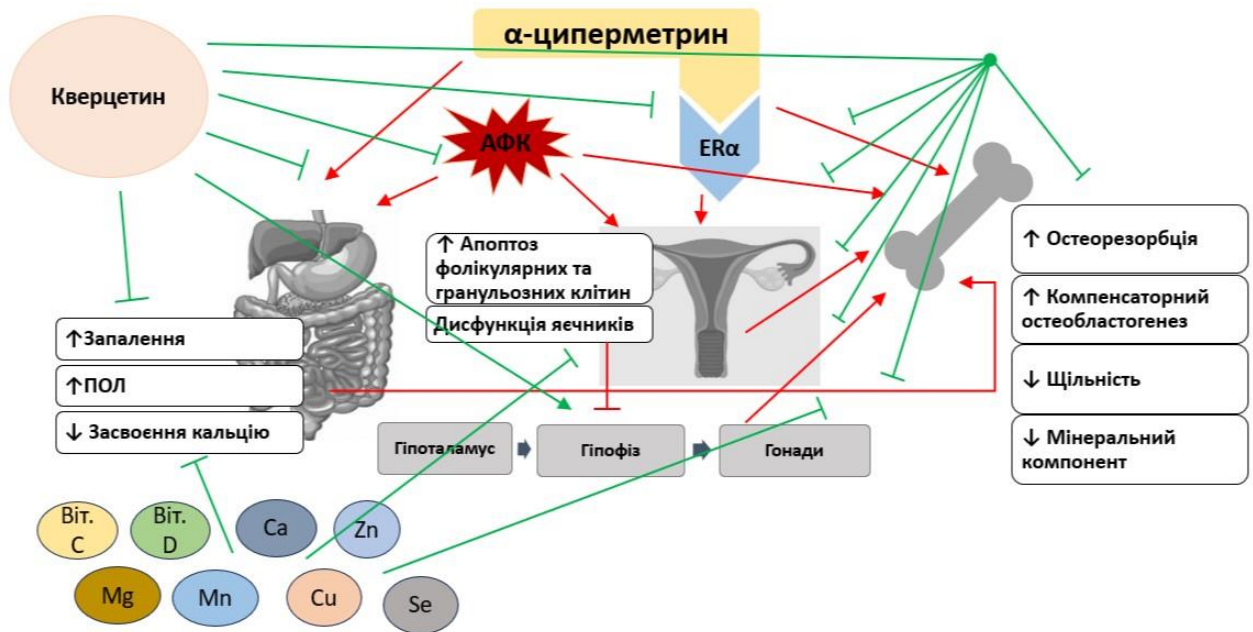
Кверцетин сприяє диференціації МСК в остеобласти та пригнічує диференціацію й проліферацію остеокластів шляхом інгібування NF- $\kappa$ B та AP-1, що знижує експресію остеокластичних маркерів. У макрофагах лінії RAW264.7 він зменшує кількість остеокластів, активність КФ, експресію RANK і c-Fos, а також індукує їх апоптоз. Механізм дії кверцетину пов'язаний із регуляцією сигнальних шляхів MAPK (ERK, p38, JNK), подібною до ефектів естрадіолу. Активація ERK підвищує експресію остеобластичних генів (Osterix, Runx-2, остеокальцин), p38 MAPK сприяє остеогенезу та апоптозу остеокластів, JNK впливає на диференціацію та виживаність клітин. У підсумку кверцетин має двофазний вплив на p38 та JNK, але загалом посилює функцію остеобластів [258].

Завдяки наявності декількох гідроксильних груп у структурі кверцетин забезпечує ефективний захист від вільних радикалів. Антиоксидантний вплив кверцетину опосередковується двома механізмами. Він здатний напряду нейтралізувати вільні радикали через взаємодію між радикалами та атомами водню гідроксильних груп флавоноїду. Останні виступають в даному випадку своєю «пасткою» для АФК, перешкоджаючи їх втручання у

процеси життєдіяльності клітини [1, 174]. Непряма дія кверцетину – посилення експресії та активності ендогенної каталази, супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази, подібно до естрадіолу [174].

Bastin et al. [144] теж відмічали здатність кверцетину зменшувати окислювальний стрес у мононуклеарних клітинах периферичної крові, який викликали ліпополісахаридом, шляхом підвищення активності антиоксидантних ферментів. Окрім цього, кверцетин інгібував шлях активації NF- $\kappa$ B, який ініціює запальний процес та диференціацію остеокластів. В лінії макрофагальних клітин RAW 246.7, активованих ліпополісахаридом, кверцетин в комплексі з рутином зменшував кількість АФК та прозапальних цитокінів TNF- $\alpha$  та IL-6. Порівняльний аналіз між різними флавоноїдами щодо здатності поглинати вільні радикали 2,2-дифеніл-1-пікрілгідрозил з використанням даної клітинної лінії виявив кращу здатність кверцетину видаляти вільні радикали ніж лютеонін, кемпферол, апігенін. Але пригнічення фагоцитарної активності та рівня NO досліджуваних сполук було приблизно однаковим [146, 219].

Результати аналізу *in silico* разом з дослідженнями на самках лабораторних щурів дозволили з'ясувати особливості патогенезу остеодистрофії індукованої піретроїдним пестицидом  $\alpha$ -циперметрином (рис. 6.5). Пусковим механізмом розвитку патології кісткової тканини виявилось накопичення пестициду та його подальше зв'язування з рецепторами естрогенів. Завдяки антагоністичному потенціалу і високій афінності до ER $\alpha$   $\alpha$ -циперметрин та його метаболіти здатні блокувати рецептори, таким чином втручаючись у регуляцію рівня естрадіолу. Наслідок – порушення функціонування складових вісі гіпоталамус-гіпофіз-яєчники, подовження естрального циклу, деструкція яєчників зі зменшенням органного індексу, зростання рівня естрадіолу в крові через механізми пригнічення негативного зворотнього зв'язку. Додатковою характеристикою  $\alpha$ -циперметрину є висока токсичність з ознаками ініціатора АФК.



**Рис. 6.5 Патогенез  $\alpha$ -циперметрин-індукованої остеодистрофії та її корекція кверцетин-вмісним комплексом вітамінів та мінералів.**

Виявлені властивості ендокринного деструктора  $\alpha$ -циперметрину надають йому здатність втручатися у процеси ремоделювання кісткової тканини, оскільки ER $\alpha$  є основним медіатором естрогенних ефектів щодо росту кісток. Дійсно під впливом тривалої дії цього піретроїду у статевозрілих самок щурів зареєстровані ознаки остеодистрофії і запальні явища у травному тракті.

Для запобігання розвитку патологій пов'язаних з антиестрогенною, гонадотоксичною, прооксидантною та прозапальною дією  $\alpha$ -циперметрину теоретично обґрунтовано застосування флавоноїду кверцетину, який має протилежні від інсектициду характеристики. Проведений аналіз *in silico* встановив змогу кверцетину витіснити  $\alpha$ -циперметрин та його метаболіти з ER $\alpha$  завдяки естрогеноподібній дії, відповідність ознакам лікоподібності та відсутність токсичності, що дозволяє використовувати його для попередження порушень у функціонуванні ендокринної регуляції статевої системи та розвитку остеодистрофії.

Профілактичний комплекс з кверцетином, макро- та мікроелементами, вітамінами С та D<sub>3</sub> попереджував розлади естрального циклу, нормалізував

рівень естрадіолу, органний індекс яєчників, морфометричні та біохімічні показники кісткової тканини та травного тракту в самок щурів в умовах інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином. Нормалізація показників в ендокринно-статевій, кістковій і травній системах самок щурів відбувалась завдяки естрогеноподібним, антиоксидантним, цитопротекторним, протизапальним властивостям кверцетину. Додатковий кальцій у вигляді органічної солі, сприяв мінералізації кісток через легке засвоєння та депонування у кістковій тканині. Інші компоненти комплексу посилювали ефективність кверцетину шляхом участі в антиоксидантному захисті, підтримки мінерального балансу і колагеноутворення в позаклітинному матриксі кісткової тканини.

Впровадження запропонованого комплексу з кверцетином, макро- та мікроелементами, вітамінами С та D<sub>3</sub> є перспективним напрямком для попередження гонадотоксичних та остеодеструктивних ефектів піретроїдного пестициду  $\alpha$ -циперметрину, який широко використовується сьогодні у сільському господарстві та медичних засобах.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено експериментально обґрунтоване науково-практичне вирішення актуальної медико-біологічної проблеми, яке пов'язане з поглибленням знань щодо значення дефіциту естрогенів в патогенезі остеодистрофії, зокрема ролі піретроїдного інсектициду  $\alpha$ -циперметрину в пригніченні ендокринної функції жіночих статевих залоз та пропозицією схеми профілактики порушень у кістковій системі при розвитку дисфункції яєчників самок щурів.

1. Оваріоектомія разом із дефіцитом білка та кальцію у їжі щурів призвели до зменшення щільності стегнової кістки на 8,96 % та вмісту мінерального компонента на 22,84 %, щільності поперекових хребців – на 13,89 % та вмісту мінерального компонента на 29,63 %; збільшення в альвеолярній частини нижньої щелепи активності кислої та лужної фосфатази у два рази, активності еластази – на 37,8 %, активності каталази – на 10,78 %. Вживання щурами комплексу кверцетину, вітамінів та мінералів сприяло збільшенню вмісту мінерального компонента у кістці стегна та її щільності на 22,47 % та 6,94 % відповідно, щільності хребців – на 5,48 % через зростання вмісту мінерального компонента на 26,94 %, зменшенню атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи на 22,9 % та зниженню у ньому активності кислої фосфатази на 45,22 %, лужної фосфатази – на 51,91 %, еластази – на 39,30 %.
2. Оваріоектомія на тлі дефіциту білка та кальцію викликала у самок гальмування загальної абсорбції кальцію на 16,9 % через збільшення його екскреції з сечею на 14,8 % та зменшення виведення з калом на 58,67 %; в слизових оболонках травного тракту – зростання активності кислої фосфатази на 16,49 – 29,57 %, еластази – на 28,72 – 93,73 %, уреазі – на 41,00 – 227,01 %, вмісту малонового діальдегіду – на 25,78 – 35,65 %. Введення профілактичного комплексу сприяло підвищенню загальної абсорбції кальцію на 72,6 %; зменшенню у відділах травного тракту

активності кислої фосфатази на 8,39 – 21,79 %, еластази – на 16,38 – 37,85 % та вмісту малонового діальдегіду – на 20,49 – 23,03 %.

3. Докінг-аналіз взаємодії  $\alpha$ -циперметрину з ліганд-зв'язуючими доменами ER $\alpha$  з використанням програмного забезпечення Schrödinger Maestro Glide встановив, що піретроїд має найнижчий показник Glide при зв'язуванні з ZERT (–9,29 ккал/моль); AutoDock4 та AutoDockVina прогнозують найнижчі енергії докінгу  $\alpha$ -циперметрину з ліганд-зв'язуючими доменами в комплексах з агоністами (1GWR, 1ERE та 1ERR); метаболіти 3-PBA та DCCA проявляють афінність з високими значеннями докінгу для всіх обраних кристалічних структур ER $\alpha$ ; кверцетин за оцінками всіх використаних програм мав низькі значення енергії докінгу з 1GWR, 1ERE та 1ERR та демонстрував здатність витіснити 3-PBA та DCCA при конкурентному зв'язуванні з ER $\alpha$ , а за програмами pkCSM та SwissADME – відповідав необхідним параметрам лікоподібності та низької токсичності, в той час як  $\alpha$ -циперметрин володів високотоксичними властивостями.
4. За умови тривалого впливу  $\alpha$ -циперметрину, у самок щурів встановлено подовження естрального циклу на 26,71 % за рахунок збільшення фази дієструсу на 72,58 % та еструсу – на 25,24 %, зменшення органного індексу яєчників на 28,13 %, зростання рівня естрадіолу у крові на 103,51 %. Введення самкам профілактичного комплексу викликало зменшення (нормалізацію) тривалості естрального циклу на 26,49 % за рахунок скорочення фази дієструсу на 51,87 %, збільшення органного індексу яєчників на 65,22 % та зменшення рівня естрадіолу в крові на 39,91 %.
5. Інтоксикація піретроїдом призвела до зменшення щільності стегнової кістки – на 3,34 %, щільності хребців – на 3,21 %, вмісту у них мінерального компоненту – на 10,23 %, до зростання атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи – на 10,82 %; до зростання в альвеолярній частині нижньої щелепи активності лужної фосфатази – на 35,25 %,

еластази – на 201,08 %, каталази – на 39,62 %, вмісту малонового діальдегіду – на 38,90 %.

6. Застосування профілактичного комплексу у щурів сприяло збільшенню щільності кістки стегна на 3,66 % та хребців – на 3,75 %, вагової частки мінерального компоненту на 9,93 % у стегновій кістці та на 14,21% у поперекових хребцях, зменшенню атрофії альвеолярної частини нижньої щелепи на 16,86 %; зниженню у альвеолярній частини нижньої щелепи активності кислої фосфатази на 20,50 %, лужної фосфатази – на 40,31 %, еластази – на 30,75 %, каталази – на 26,35 % та вмісту МДА на 29,77 %.
7. У слизових оболонках шлунково-кишкового тракту самок при інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином визначено збільшення активності кислої фосфатази на 14,07 – 20,00 %, еластази – на 39,43 – 41,04 %; вмісту малонового діальдегіду – на 33,82 %. При застосуванні комплексу в слизових оболонках травного тракту встановлено нормалізацію маркерів запалення за зменшенням активності кислої фосфатази на 14,07 – 20,00 % та еластази – на 19,65 – 22,02 %, а також маркерів окислювального стресу – за зниженням вмісту малонового діальдегіду – на 8,73 – 28,00 %.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Акішева А.С., Сідлецький О. С., Макаренко О. А. Докінг-аналіз взаємодії кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину з  $\alpha$ -рецептором естрогену. *Ідеї. Практики. Перспективи сучасної освіти: тези у збірнику Науково-методичний альманах ОНУ ім. І. І. Мечникова*, 2025. С. 113 – 116.
2. Антиоксидантні властивості деяких природних біофлаваноїдів / О. А. Макаренко, А. П. Левицький, В. І. Литвиненко, І. В. Ходаков. *Вісник Одеського національного університету. Біологія*. 2010. Вип. 15(6). С. 15–21. вилучено із <http://visbio.onu.edu.ua/article/view/258629>
3. Бурлака О. В., Вагнер В. О. Ендокринно-руйнівні хімікати як нова категорія токсичності. Недооцінені ризики в умовах війни та шляхи їхньої мінімізації. *Сучасні аспекти військової медицини*. 2023. Т. 1., Вип. 30. С. 163 – 175. <https://doi.org/10.32751/2310-4910-2023-30-1-15>
4. Венцківська І. В., Загородн О. С., Наритник Т. Т. Раннє припинення менструальної функції: сучасні погляди на патогенез і наслідки. *Репродуктивна ендокринологія*. 2019. Вип. 4(48). С. 8–12. <http://dx.doi.org/10.18370/2309-4117.2018.48.8-12>
5. Головач І. Ю. Сучасні стратегії профілактики та лікування остеопорозу: роль кальцію і вітаміну D. *Сімейна медицина*. 2020. № 4(90). С. 28 – 31.
6. Димань Т. М. Ксеноестрогени антропогенного походження в харчових продуктах та їх вплив на здоров'я людини. Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва: збірник наукових праць / *Білоцерківський національний аграрний університет*. Біла Церква: БНАУ, 2024. Вип. № 1 (186). С. 116–127. <https://doi.org/10.33245/2310-9289-2024-186-1-116-126>
7. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідницьких або інших наукових цілей від 18.03.1986р.: Верховна Рада України, офіційний веб-портал:



- Міжнародні документи (Рада Європи). Електронний ресурс. Режим доступу: <http://zakon4.rada.gov.ua>
8. Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження». Відомості Верховної Ради України. Офіц. вид. 2006. № 27. С. 990, ст. 230. (Бібліотека офіційних видань).
  9. Канзюба А. І., Штробля В. В. Патогенетичні та фармакологічні проблеми кісткового гомеостазу при остеопороз. *Лікарська справа*. 2022. № 3 – 4. С. 5 – 14. [https://doi.org/10.31640/2706-8803-2022-\(3-4\)-01](https://doi.org/10.31640/2706-8803-2022-(3-4)-01)
  10. Кіка О. В. Експериментальне дослідження стану кісткової тканини за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації: дис. ... доктора філософії: 091.09 / Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова. Одеса. 2024. 172 с.
  11. Кісткова тканина — природна наноструктура. Погляд на проблему (огляд літератури); Чекман І. С. [та ін.]. *Ортопедія, травматологія та протезування*. 2011. №4. С. 105 – 110.
  12. Клінічні рекомендації з діагностики, профілактики та лікування остеопорозу / Ігнат'єв О. М. [та ін.]. *Вісник морської медицини*. 2019. Т. 3, Вип. 84. С. 28-38. <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.3465937>
  13. Косенко Т. В. Роль дисбіозу у розвитку печінкової остеодистрофії; дис. ... доктора філософії: 091.09 / Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова. Одеса. 2023. 181 с.
  14. Лук'янець Є. Ю. Скринінг остеопорозу та остеопенії у жінок різного віку в асоціації з факторами ризику хронічних неінфекційних захворювань на рівні надання первинної медичної допомоги; дис. ... доктора філософії: 22.222 / Нац. мед. ун-т ім. О. О. Богомольця. Київ. 2021. 225 с.
  15. Макаренко О. А., Могилевська Т. В. Корекція порушень у травному тракті щурів з хронічним холестазом комплексом Леквін і Мінерол. *Вісник Одеського національного університету. Біологія*. 2023. Т. 28, № 1(52). С. 147 – 158. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.1\(52\).284693](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.1(52).284693)

16. Масіброда Н. Г., Тарасюк О. К., Сторожук М. С. Метаболізм естрогенів. Фактори, які сприяють порушенню обміну естрогенів. *Вісник Вінницького національного медичного університету*. 2017. Т. 21, № 1 (2). С. 356–361.
17. Методи дослідження стану кишечника та кісток у лабораторних щурів. Довідник / Макаренко О. А. [та ін]. Одеса: *Одеський національний університет імені І. І. Мечникова*. 2022. 81 с.
18. Нетюхайло Л. Г., Філатова В. Л., Філатова О. В. Водно-сольовий обмін (огляд літератури). *Вісник проблем біології та медицини*. 2012. Вип. 1(91). С. 32 – 38.
19. Нетюхайло Л.Г., Іщейкіна Л.К. Метаболізм кісткової тканини в нормі та при патології (огляд літератури). *Молодий вчений*. 2014. №6 (09). С. 152 – 158.
20. Обмін різних форм кальцію в організмі щурів з преднізолоновим остеопорозом / О. А. Макаренко, Г. В. Майкова, Н. А. Кириленко, Л. В. Еберле. *Вісник ОНУ. Біологія*. 2020. Т. 25, вип. 1(46). С. 123 – 131. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2020.1\(46\).205837](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2020.1(46).205837)
21. Остеопороз у разі хронічних захворювань печінки: патогенез, діагностика та лікування / Мялюк О. П. [та ін.]. *Одеський медичний журнал*. 2023. № 3. С. 84 – 88. <https://doi.org/10.32782/2226-2008-2023-3-15>
22. Остеопороз: вплив віку, статі, ожиріння та цукрового діабету / Ларін О. С. [та ін.]. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2014. Т. 1, вип. 46. С. 3 – 14.
23. Поворознюк В. В., Григор'єва Н. В. Застосування препаратів кальцію та вітаміну D у профілактиці та лікуванні остеопорозу. *Український ревматологічний журнал*. 2001. №3 – 4 (5 – 6). С. 33 – 38.
24. Поворознюк В. В., Григор'єва Н. В. Менопауза та остеопороз. *Репродуктивна ендокринологія*. 2012. №2 (4). С. 40 – 47.

- 25.Прогнозування механізмів взаємодії кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його похідних з  $\alpha$ -рецептором естрогену (дослідження *in silico*) / А. С. Акішева, О. С. Сідлецький, Ю. О. Молодан, О. А. Макаренко. Вісник ОНУ. Біологія. 2024. Т. 29, вип. 1(54). С. 81 – 105. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2024.1\(54\).309040](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2024.1(54).309040)
- 26.Рекомендації щодо діагностики, профілактики та лікування постменопаузального остеопорозу / Григор'єва Н. В. [та ін.]. *Біль. Суглоби. Хребет*. 2023. Т.13, № 3. С. 28–154. <https://doi.org/10.22141/pjs.13.3.2023.378>
- 27.Розлади жіночого здоров'я внаслідок вікового дефіциту естрогенів а їх корекція (огляд літератури) / Зайченко Г. В. [та ін.]. *Журнал НАМН України*. 2019. Т. 25, №2. С. 211–221.
- 28.Роль макроелементів кальцію та фосфору в харчовому статусі пацієнтів різних вікових груп, які мешкають на територіях, радіоактивно забруднених внаслідок аварії на ЧАЕС / І. Т. Матасар, Л. М. Петрищенко, Т. В. Матасар, В. О. Мойсеєнко. *Актуальні проблеми нефрології*. 2021. № 28. С. 10 – 17 <https://doi.org/10.37321/nefrology.2021.28-01>
- 29.Сакалюк О. В. Обґрунтування профілактики порушень у кістковій та травній системах щурів при гіпотиреозі: дис. ... доктора філософії: 091.09 / Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова. Одеса. 2023. 164 с.
30. Сідлецький О. С., Майкова Г. В., Макаренко О. А. Експериментальне обґрунтування профілактики деструкції кісткової тканини пародонта щурів з оваріоектомією кальційвмісними препаратами. Вісник ОНУ. Біологія. 2022. Т. 27, вип. 2(51). С. 77 – 87. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2022.2\(51\).268534](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2022.2(51).268534)
- 31.Сідлецький О. С., Майкова Г. В., Макаренко О. А. Профілактика резорбції альвеолярного відростка у щурів з оваріоектомією біологічно-активними добавками. XXI-і читання В. В. Підвисоцького:

- бюлетень матеріалів наук конф., м. Одеса, 23-24 червня. 2022 р. Одеса: УкрНДІ медицини транспорту, 2022. С. 98 – 100.
32. Сідлецький О. С., Макаренко О. А. Антиоксидантна ефективність профілактичного комплексу з кверцетином у оваріоектомованих щурів. Вісник ОНУ. Біологія. Т. 28, вип. 2(53). С. 140 – 152. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.2\(53\).293003](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.2(53).293003)
33. Сідлецький О. С., Макаренко О. А. Гепатопротекторна дія комплексу на основі кверцетину при тривалій інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином. XXIII–і читання В. В. Підвисоцького: бюлетень матеріалів наук конф., м. Одеса, 16-17 травня. 2024 р. Одеса: УкрНДІ медицини транспорту, 2024. С. 125 – 128.
34. Сідлецький О. С., Макаренко О. А. Корекція порушень засвоєння кальцію та резорбції кісткової тканини у щурів з гіпоестрогенією та аліментарним дефіцитом білка і кальцію. Актуальні проблеми транспортної медицини. 2023. №3(73). С. 146 – 154. <http://doi.org/10.5281/zenodo.8254462>
35. Сідлецький О. С., Макаренко О. А. Нейротоксичність  $\alpha$ -циперметрину та її профілактика кверцетин-вмісним комплексом. Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку: тези допов. всеукр. наук.-практич. конф. з міжнарод. участю, 9–12 квітня 2024, Одеса: Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2024. С. 47 – 50.
36. Сідлецький О. С., Макаренко О. А. Профілактика остеопоротичного процесу у оваріоектомованих щурів. Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція: тези доп. VII наук.-практич. інт-конф. з міжнар. уч., м. Харків, 14 лист. 2024 р. Харків: НфаУ, 2024. С. 438 – 440.
37. Сідлецький О. С., Макаренко О. А. Профілактика порушень у слизових оболонках травного тракту самок щурів за дефіциту естрогенів, білка та кальцію. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2023. Вип. 89. С. 66–74. <http://doi.org/10.30970/vlubs.2023.89.07>

38. Сідлецький О. С., Макаренко О. А. Стан кісток щурів при тривалому впливі  $\alpha$ -циперметрину. Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації: матеріали V наук-практ. конф. студ. та мол. вчен. з міжнар. уч., м. Харків, 16 травн. 2024 р. Харків: НфаУ, 2024. С. 187 – 188.
39. Сідлецький О. С., Макаренко О. А. Тривалість естрального циклу та рівень естрадіолу у крові самок щурів з інтоксикацією  $\alpha$ -циперметрином. Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція: тези доп. VI наук-практ. інт-конф. з міжнар. уч., м. Харків, 16 лист. 2023 р. Харків: НфаУ, 2023. С. 438 – 440.
40. Сідлецький О.С., Макаренко О.А. Профілактика резорбції щелеп у самок щурів за умови оваріоектомії та неповноцінної за складом дієти. Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації: матеріали V наук-практ. конф. студ. та мол. вчен. з міжнар. уч., м. Харків, 18 травн. 2023 р. Харків: НфаУ, 2023. С. 280-282.
41. Скидан М. І., Скидан К. В., Левицький А. П. Пародонтопротекторна дія кверцетину при токсичному гепатиті у щурів. *Вісник стоматології*. 2012. Т. 80. № 3. С. 12 – 15.
42. Стан кісткової системи щурів з оваріоектомією при вживанні біологічно-активної добавки на основі раковин чорноморських устриць / Сідлецький О.С., Майкова Г.В., Макаренко О.А., Ходаков І.В. Еколого-біологічна освіта в концепції “Єдине здоров’я”: Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. уч., м. Тернопіль, 27 – 29 квітн. 2022 р. С. 68 – 70.
43. Статистичні методи обробки результатів медико-біологічних досліджень: методичні вказівки з дисципліни «Медична інформатика» / Т. В. Левченко та ін. Харків : ХНМУ, 2016. 39 с.

44. Сухомейко Д. О., Рейзвіх О. Е. Вплив лікувально-профілактичного комплексу на стан твердих тканин зубів щурів в умовах аліментарного дефіциту вітаміну D. *Вісник стоматології*. 2023. №4 (125). С. 2 – 9. <https://doi.org/10.35220/2078-8916-2023-50-4.1>
45. Сучасні уявлення про ріст, розвиток та формоутворення кісткового скелета людини / Д.І. Яким'юк, В.В. Кривецький, Б.Ю. Банул, І.В. Кривецький. *Буковинський медичний вісник*. 2013. Т.17, № 2 (66). С. 181 – 185.
46. Федоненко О.В., Ананьєва Т.В., Маренков О.М. Курс лекцій з гістології. Навчальний посібник / Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, Дніпропетровськ: 2013. 63 с.
47. Фізіологія з основами анатомії людини: підручник для студентів вищих навчальних закладів / за ред. проф. Л. М. Малоштан; Малоштан Л. М. [та ін.]. Харків: видавництво НФаУ «Золоті сторінки», 2003. 432 с.
48. Шепельська Н. Р., Проданчук Н. Г., Колянчук Я. В. Пестициди як ендокринні деструктори репродуктивної системи. *Журнал НАМН України*. 2021. Т. 27, № 1. С. 49–62 <https://doi.org/10.37621/JNAMSU-2021-1-6>
49. Шиманський І. О., Лісаковська О. О., Великий М. М. Молекулярно-клітинні механізми захисної дії вітаміну D3 при експериментальному преднізолон-індукованому остеопорозі. *Біль. Суглоби. Хребет*. 2017. Т. 7, № 3. С. 93 – 101. <https://doi.org/10.22141/2224-1507.7.3.2017.116863>
50. A narrative review of diabetic bone disease: Characteristics, pathogenesis, and treatment / Wu B. [et al.]. *Frontiers in endocrinology*. 2022. V. 13. P. 1052592. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1052592>
51. A pathomorphological study of the sublethal toxicity of cypermethrin in Sprague Dawley rats / Remya N. [et al.]. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*. 2011. V. 1(2). P. 179 – 183. <https://doi.org/10.4103/2231-0738.84211>

52. Ahamad A., Kumar J. Pyrethroid pesticides: An overview on classification, toxicological assessment and monitoring. *Journal of Hazardous Materials Advances*. 2023. V. 10. P. 100284. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2023.100284>
53. Ajayi A. F., Akhigbe R. E. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertility Research and Practice*. 2020. V. 6. P. 5. <https://doi.org/10.1186/s40738-020-00074-3>
54. Akhmetshina A., Kratky D., Rendina-Ruedy E. Influence of Cholesterol on the Regulation of Osteoblast Function. *Metabolites*. 2023. V. 13(4). P. 1 – 16. <https://doi.org/10.3390/metabo13040578>
55. Albright F., Smith P. H., Richardson A. M. Postmenopausal osteoporosis: its clinical features. *Journal of the American Medical Association*. 1941. V. 116(22). P. 2465–2474. <https://doi.org/10.1001/jama.1941.02820220007002>
56. Al-Hamdani N. M. H., Yajurvedi H. N. Effect of cypermethrin on the ovarian activity and its impact on fertility and pubertal onset of offspring. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2017. V. 6(4). P. 374 – 382. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2017.07.003>
57. Al-Nour M. Y., Irahim M. M., Elsaman T. Ellagic Acid, Kaempferol, and Quercetin from *Acacia nilotica*: Promising Combined Drug With Multiple Mechanisms of Action. *Current pharmacology reports*. 2019. V. 5(4). P. 255 – 280. <https://doi.org/10.1007/s40495-019-00181-w>
58. Altered extracellular matrix and mechanotransduction gene expression in rat bone tissue following long-term estrogen deficiency / Naqvi S. M. [et al.]. *JBMR Plus*. 2024. V. 8(9). ziae098. <https://doi.org/10.1093/jbmrpl/ziae098>
59. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level / J. Kular, J. Tickner, S. M. Chim, J. Xu. *Clinical biochemistry*. 2012. V. 45(12). P. 863 – 873. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.03.021>
60. Arthur A., Gronthos S. Eph-Ephrin Signaling Mediates Cross-Talk Within the Bone Microenvironment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021. V. 9. P. 598612. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.598612>

61. Assessing Hormone Receptor Activities of Pyrethroid Insecticides and Their Metabolites in Reporter Gene Assays / Du G. [et al.]. *Toxicological Sciences*. 2010. V. 116 (1). P. 58 – 66. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq120>
62. Association between bone mineral density and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies / Ma L. [et al.]. *European Journal of Epidemiology*. 2012. V. 27. P. 319–332 <https://doi.org/10.1007/s10654-012-9674-x>
63. Association of pyrethroids exposure with onset of puberty in Chinese girls / Ye X. [et al.]. *Environmental Pollution*. 2017. V. 227. P. 606 – 612. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.035>
64. Associations of pyrethroid exposure with bone mineral density and osteopenia in adults / Shen Z. [et al.]. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2024. V. 42(2). P. 242–252. <https://doi.org/10.1007/s00774-024-01499-2>
65. Aviello G., Knaus U. G. ROS in gastrointestinal inflammation: Rescue Or Sabotage? *British Journal of Pharmacology*. 2016. V. 174(12). P. 1704 – 1718. <https://doi.org/10.1111/bph.13428>
66. Aznar-Alemany Ò., Eljarrat E. Bioavailability and Bioaccumulation of Pyrethroid Insecticides in Wildlife and Humans. *Pyrethroid Insecticides. The Handbook of Environmental Chemistry*. 2020. V. 92. P. 205 – 225. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-466-4\\_66](https://doi.org/10.1007/978-90-481-466-4_66)
67. Bagi C. M., Berryman E., Moalli M. R. Comparative Bone Anatomy of Commonly Used Laboratory Animals: Implications for Drug Discovery. *Comparative medicine*. 2011. V. 61(1). P. 76 – 85.
68. Baron B., Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nature medicine*. 2013. V. 19(2). P. 179 – 192. <https://doi.org/10.1038/nm.3074>
69. Bassett J. H. D., Williams G. R. Role of Thyroid Hormones in Skeletal Development and Bone Maintenance. *Endocrine reviews*. 2016. V. 37(2). P. 135–187. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1106>



70. Bellido T. Bisphosphonates for osteoporosis: from bench to clinic. *The Journal of clinical investigation*. 2024. V. 134(6). e179942. <https://doi.org/10.1172/JCI179942>
71. Bellido T. Osteocyte-Driven Bone Remodeling. *Calcified tissue international*. 2014. V. 94(1). P. 25–34. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9774-y>
72. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells / Florencio-Silva R. [et al.]. *BioMed Research International*. 2015. P. 421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
73. Blood manganese and nonalcoholic fatty liver disease: A cohort-based case-control study / Zhang [et al.]. *Chemosphere*. 2022. V. 287. 132316. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132316>
74. Bone health in women with premature ovarian insufficiency/early menopause: a 23-year longitudinal analysis / Jones A. R. [et al.]. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2024. V. 39(5). P. 1013 – 1022. <https://doi.org/10.1093/humrep/deae037>
75. Bone Mineral Density across the Lifespan in Patients with Type 1 Diabetes / Halper-Stromberg E. [et al.]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2020. V. 105, Is. 3. P. 746–753. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz153>
76. Bone morphogenetic proteins: Their role in regulating osteoclast differentiation / R. Huntleya, E. Jensena, R. Gopalakrishnana, K. C. Manskyb. *Bone Reports*. 2019. № 10. P. 1 – 9. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2019.100207>
77. Bone remodeling stages under physiological conditions and glucocorticoid in excess: Focus on cellular and molecular mechanisms / V. V. Povoroznyuk, N. V. Dedukh, M. A. Bystrytska, V. S. Shapovalov. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2021. V. 12(2). P. 212 – 227. <https://doi.org/10.15421/022130>

78. Bonewald L. F. The amazing osteocyte. *Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2011. V. 26(2). P. 229–238. <https://doi.org/10.1002/jbmr.320>
79. Bonewald L. F. The Role of the Osteocyte in *Bone and Nonbone Disease*. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2017. V. 46(1). P. 1 – 18. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2016.09.003>
80. Boyce B. F., Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Current osteoporosis reports*. 2007. V. 5(3). P. 98–104. <https://doi.org/10.1007/s11914-007-0024-y>
81. Buo A. M., Stains J. P. Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells. *FEBS letters*. 2014. V. 588(8). P. 1315–1321. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.025>
82. Calcium Intake in Bone Health: A Focus on Calcium-Rich Mineral Waters / Vannucci L. [et al.]. *Nutrients*. 2018. V. 10(12). 1930. <https://doi.org/10.3390/nu10121930>
83. Cell signaling and transcriptional regulation of osteoblast lineage commitment, differentiation, bone formation, and homeostasis / S. Zhu, W. Chen, A. Masson, Y.-P. Li. *Cell discovery*. 2024. V. 10(1). P. 71. <https://doi.org/10.1038/s41421-024-00689-6>
84. c-Fos protein as a target of anti-osteoclastogenic action of vitamin D, and synthesis of new analogs / Takasu H. [et al.]. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006. V. 16, №2. P. 528–535. <https://doi.org/10.1172/JCI24742>
85. Chemical structures and drug-likeness applied to quercetin and its derivatives / Rouane A. [et al.]. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. 2023. V. 15(1). P. 33. <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.1278>
86. Cheng C-H., Chen L.-R., Chen K.-H. Osteoporosis Due to Hormone Imbalance: An Overview of the Effects of Estrogen Deficiency and Glucocorticoid Overuse on Bone Turnover. *International Journal of*

- Molecular Science*. 2022. V. 23. P. 1376.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23031376>
87. Clinical Significance of Discordance between Hip and Spine Bone Mineral Density in Korean Elderly Patients with Hip Fractures / Lee S.-W. [et al.]. *Journal of Clinical Medicine*. 2023. V. 12(20). P. 6448.  
<https://doi.org/10.3390/jcm12206448>
88. Comparison of copper concentration between non-alcoholic fatty liver disease patients and normal individuals: A meta-analysis / Chen Y. [et al.]. *Frontiers in public health*. 2023. V. 11. 1095916.  
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1095916>
89. Connexin 43 Channels in Osteocytes Are Necessary for Bone Mass and Skeletal Muscle Function in Aged Male Mice / Li G. [et al.]. *International journal of molecular sciences*. 2022. V. 23(21). P. 13506.  
<https://doi.org/10.3390/ijms232113506>
90. Connexin hemichannels drive lactation-induced osteocyte acidification and perilacunar-canalicular remodeling / Hua R. [et al.]. *Cell reports*. 2024. V. 43(7). P. 114363. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114363>
91. Cora M. C., Kooistra L., Travlos G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*. 2015. V. 43(6). P. 776-793.  
<https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
92. Correlation between bone mineral density and serum trace elements in response to supervised aerobic training in older adults / A. H. Alghadir, S. A. Gabr, E. S. Al-Eisa, M. H. Alghadir. *Clinical interventions in aging*. 2016. V. 11. P. 265–273. <https://doi.org/10.2147/CIA.S100566>
93. Council Directive 2010 / 63/EU of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Communities*. 2010. L 276. P. 33-79.

94. Courbebaisse M., Lanske B. Biology of Fibroblast Growth Factor 23: From Physiology to Pathology. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2018. V. 8(5). P. a031260. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031260>
95. Cruzoe-Souza M., Sasso-Cerri E., Cerri P. S. Immunohistochemical detection of estrogen receptor  $\beta$  in alveolar bone cells of estradiol-treated female rats: possible direct action of estrogen on osteoclast life span. *Journal of Anatomy*. 2009. V. 215 (6). P. 673 – 681. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01158.x>
96. Cypermethrin exposure reduces the ovarian reserve by causing mitochondrial dysfunction in granulosa cells / Wang H. [et al.]. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2019. V. 379. P. 114693. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114693>
97. Cypermethrin triggers oxidative stress, apoptosis, and inflammation in bovine mammary glands by disruption of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and calcium homeostasis / Kweon J. [et al.]. *Reproductive Toxicology*. 2025. V. 132. P. 108842. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2025.108842>
98. Стоматопротекторна ефективність кверцетину у щурів з токсичним гепатитом на тлі дисбіозу / О. А. Макаренко, О. Є. Успенський, Т. О. Севостьянова, С. А. Шнайдер. *Вісник стоматології*. 2019. Т. 33. № 3. С. 12 – 16.
99. Delgado-Calle J., Bellido T. The osteocyte as a signaling cell. *Physiological reviews*. 2022. V. 102(1). P. 379–410. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2020>
100. Determination and analysis of agonist and antagonist potential of naturally occurring flavonoids for estrogen receptor (ER $\alpha$ ) by various parameters and molecular modelling approach / Puranik [et al.]. *Scientific reports*. 2019. V. 9(1). P. 7450. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43768-5>
101. Dietary quercetin inhibits bone loss without effect on the uterus in ovariectomized mice / Tsuji M. [et al.]. *Journal of Bone and Mineral*

- Metabolism*. 2009. V. 27. P. 673 – 681. <https://doi.org/10.1007/s00774-009-0088-0>
102. Direct cell–cell contact between mature osteoblasts and osteoclasts dynamically controls their functions in vivo / Furuya M. [et al.]. *Nature communications*. 2018. V. 9(1). P. 300. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02541-w>
103. Do bone cells behave like a neuronal network? / C. H. Turner, A. G. Robling, R. L. Duncan, D. B. Burr. *Calcified tissue international*. 2002. V. 70(6). P. 435–442. <https://doi.org/10.1007/s00223-001-1024-z>
104. Do pyrethroid pesticide residues in Chinese mitten crab aquaculture areas have an impact on the ecological environment? *A case study of Yangcheng Lake* / Gu M. [et al.]. *Journal of Hazardous Materials*. 2024. V. 480. P. 135920. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.135920>
105. Dobbs M. B., Buckwalter J., Saltzman C. Osteoporosis. The Increasing Role of the Orthopaedist. *The Iowa orthopaedic journal*. 1999. V. 19. P. 43–52.
106. Early effects of ovariectomy on bone microstructure, bone turnover markers and mechanical properties in rats / X. Guo, X. Yu, Q. Yao, J. Qin. *BMC Musculoskelet Disord*. 2022. V. 23. P. 316. <https://doi.org/10.1186/s12891-022-05265-1>
107. Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review / Mnif W. [et al.]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2011. V. 8(6). P. 2265-2303. <https://doi.org/10.3390/ijerph8062265>
108. Effect of manganese, zinc, and copper on the biological and osteogenic properties of mesoporous bioactive glass nanoparticles / Westhauser F. [et al.]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2020. V. 109(8). P. 1457 – 1467. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37136>
109. Effect of quercetin exposure during the prepubertal period on ovarian development and reproductive endocrinology of mice / Shu X. [et al.]. *Acta pharmaceutica Sinica*. 2011. V. 46(9). P. 1051 – 1057.

110. Effects of Calcium Source, Inulin, and Lactose on Gut-Bone Associations in an Ovariectomized Rat Model / He W. [et al.]. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2022. V. 66 (8). P. 2100883. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100883>
111. Effects of cypermethrin and methyl parathion mixtures on hormone levels and immune functions in Wistar rats / Liu P. [et al.]. *Archives of Toxicology*. 2006. V. 80. P. 449 – 457. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0071-7>
112. Effects of plant polyphenols on ovarian follicular reserve in aging rats / Chen Z.-G. [et al.]. *Biochemistry and Cell Biology*. 2010. V. 88(4). P. 737 – 745. <https://doi.org/10.1139/O10-012>
113. Effects of Quercetin on Cypermethrin-Induced Stomach Injury: The Role of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis / N. Akaras, C. Gür, H. Şimşek, S. Ç. Tuncer. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2023. M. 12(2). P. 556 – 566. <https://doi.org/10.37989/gumussagbil.1225539>
114. Endocrine disrupting chemicals impact on ovarian aging: Evidence from epidemiological and experimental evidence / Ding T. [et al.]. *Environmental Pollution*. 2022. V. 305. P. 119269. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119269>
115. Enhanced therapeutic benefit of quercetin-loaded phytosome nanoparticles in ovariectomized rats / El-Fattah A. I. A. [et al.]. *Chemico-Biological Interactions*. 2017. V. 271. P. 30 – 38. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.04.026>
116. Erben R. G. Physiological Actions of Fibroblast Growth Factor-23. *Frontiers in Endocrinology*. 2018. V. 9. P. 1 – 7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00267>
117. ERK Inhibition Increases RANKL-Induced Osteoclast Differentiation in RAW 264.7 Cells by Stimulating AMPK Activation and RANK Expression and Inhibiting Anti-Osteoclastogenic Factor Expression / E.-B.

- Choi, T. S. Agidigbi, I. S.Kang, C. Kim. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. V. 23. P. 13512. <https://doi.org/10.3390/ijms232113512>
118. Estrogen depletion alters osteogenic differentiation and matrix production by osteoblasts in vitro / J. Schiavi, D.M. Fodera, M.A. Brennan, L.M. McNamara. *Experimental Cell Research*. 2021. V. 408(1). P. 112814. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112814>
119. Estrogen Regulates Bone Turnover by Targeting RANKL Expression in Bone Lining Cells / Streicher C. [et al.]. *Scientific reports*. 2017. V. 7(1). P. 6460. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06614-0>
120. Estrogen stimulates osteoprotegerin expression via the suppression of miR-145 expression in MG-63 cells / J. Jia, H. Zhou, X. Zeng, S. Feng. *Molecular medicine reports*. 2017. V. 15. P. 1539–1546. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6168>
121. Estrogenic activities of two synthetic pyrethroids and their metabolites / Jin M. [et al.]. *Journal of Environmental Sciences*. 2010. V. 22(2). P. 290 – 296. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60107-8](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60107-8)
122. Estrogenicity of Organophosphorus and Pyrethroid Pesticides / Chen H. [et al.]. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2002. V. 11(19). P. 1419 – 1435. <https://doi.org/10.1080/00984100290071243>
123. Estrogenicity of pyrethroid insecticidemetabolites / A. R. McCarthy, B. M. Thomson, I. C. Shaw, A. D. Abell. *Journal of Environmental Monitoring*. 2006. V. 8. P. 197 – 202. <https://doi.org/10.1039/b511209e>
124. Estrogens and androgens in skeletal physiology and pathophysiology / Almeida M. [et al.]. *Physiological Reviews*. 2016. V. 97., Is. 1 P. 135–187. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2015>
125. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasburg: Council of Europe. 1986. V. 123. 52 p.
126. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A. Lipinski, F.

- Lombardo, B.W. Dominy, P. J. Feeney. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001. V. 46 (1 - 3). P. 3 – 26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0)
127. Exposure to beta-cypermethrin impairs the reproductive function of female mice / Zhou Y.-J. [et al.]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2018. V. 95. P. 385 – 394. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.04.015>
128. Felsenfeld A. J., Levine B. S. Calcitonin, the forgotten hormone: does it deserve to be forgotten? *Clinical Kidney Journal*. 2015. V. 8 (2). P. 180 – 187. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfv011>
129. Feng X. Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. *Current chemical biology*. 2009. V. 3(2). P. 189 – 196. <https://doi.org/10.2174/187231309788166398>
130. Foroutan B. Osteoporosis Etiology, Epidemiology, Diagnosis, Diet, and Treatment: A Narrative Review. *OBM Geriatrics*. 2024. V. 8, Is. 2, P. 1-60. <http://dx.doi.org/10.21926/obm.geriatr.2402277>
131. Free Radicals Inhibit The Haematopoietic Elements And Antioxidant Agents Of Rats Exposed To Pyrethroids Insecticides / Atere A. D. [et al.]. *Journal of Experimental Research*. 2019. V. 7, № 1. P. 66 – 74.
132. Friend or Foe? Essential Roles of Osteoclast in Maintaining Skeletal Health / Wang H. [et al.]. *BioMed Research International*. 2020. V. 2020 (1). P. 4791786. <https://doi.org/10.1155/2020/4791786>
133. Functional Roles of Connexins and Gap Junctions in Osteo-Chondral Cellular Components / Zappala A. [et al.]. *International journal of molecular sciences*. 2023. V. 24(4). P. 4156. <https://doi.org/10.3390/ijms24044156>
134. Gajendiran A., Abraham J. An overview of pyrethroid insecticides. *Frontiers in Biology*. 2018. V. 3. P. 79–90 <https://doi.org/10.1007/s11515-018-1489-z>
135. Global, regional prevalence, and risk factors of osteoporosis according to the World Health Organization diagnostic criteria: a systematic review



- and meta-analysis / Xiao P.-L. [et al.]. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2022. V. 33(10). P. 2137 – 2153. <https://doi.org/10.1007/s00198-022-06454-3>
136. Goltzman D. Functions of vitamin D in bone. *Histochemistry and Cell Biology*. 2018. V. 149. P. 305 – 312. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1648-y>
137. Grabowski P. Physiology of Bone. Calcium and Bone Disorders in Children and Adolescents. 2nd, revised edition. Basel: Karger, 2015. Chapter 3. P. 33 – 56. <https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-05467-5>
138. Guengerich F. P. Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes by Drugs—Molecular Basis and Practical Applications. *Biomolecules & therapeutics*. 2022. V. 30(1). P. 1 – 18. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2021.102>
139. Gut, inflammation and osteoporosis: basic and clinical concepts / H. Tilg, A. R. Moschen, A. Kaser, A. Pines, I. Dotan. *Gut*. 2008. V. 57(5). P. 684 – 694. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.117382>
140. Heo J. S., Lee S. G. Kim H. O. Distal-less homeobox 5 is a master regulator of the osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *International journal of molecular medicine*. 2017. V. 40(5). P. 1486 – 1494. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3142>
141. How the Gut Microbiome Links to Menopause and Obesity, with Possible Implications for Endometrial Cancer Development / Schreurs M. P. H. [et al.]. *Journal of Clinical Medicine*. 2021. V. 10(13). P. 2916. <https://doi.org/10.3390/jcm10132916>
142. Hyperparathyroidism in a Fracture Population / G. Lee, T. Cotton, J. Tucci, R. K. Aaron. *Rhode Island medical journal*. 2013. V. 105(8). P. 34–39.
143. In silico QSAR analysis of quercetin reveals its potential as therapeutic drug for Alzheimer's disease / Islam M. R. [et al.]. *Journal of*

- young pharmacists: JYP.* 2013. V. 5(4). P. 173 – 179.  
<https://doi.org/10.1016/j.jyp.2013.11.005>
144. In vitro and Molecular Docking Analysis of Quercetin as an Anti-inflammatory and Antioxidant / Bastin A. [et al.]. *Current Pharmaceutical Design.* 2023. V. 29(11). P. 883–891.  
<http://dx.doi.org/10.2174/1381612829666230330084043>
145. Induction of osteoblast apoptosis stimulates macrophage efferocytosis and paradoxical bone formation; Batoon L. [et al.]. *Bone research.* 2024. V. 12. P. 43. <https://doi.org/10.1038/s41413-024-00341-9>
146. Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of, luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin / Tian C. [et al.]. *South African Journal of Botany.* 2021. V. 137. P. 257–264.  
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.10.022>
147. Investigation on the interaction of pyrethroid pesticides to estrogen receptor alpha through computational and experimental methods / Hu C. [et al.]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2022. V. 216. P. 112565.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112565>
148. Joshi S. C., Bansal B., Jasuja D. Evaluation of reproductive and developmental toxicity of cypermethrin in male albino rats. *Toxicological & Environmental Chemistry.* 2011. V. 93(3). P. 593 – 602.  
<https://doi.org/10.1080/02772248.2010.537441>
149. Khalid A. B., Krum S. A. Estrogen receptors alpha and beta in bone. *Bone.* 2016. V. 87. P. 130–135.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2016.03.016>
150. Kikuta J., Ishii M. Osteoclast migration, differentiation and function: novel therapeutic targets for rheumatic diseases. *Rheumatology.* 2013. V. 52(2), P. 226–234. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes259>
151. Kim J. H., Kim N. Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. *Chonnam Medical Journal.* 2016. V. 52(1). P. 12 – 17.  
<https://doi.org/10.4068/cmj.2016.52.1.12>

152. Kini U., Nandeesh B. N. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. Radionuclide and Hybrid Bone Imaging. Springer, Berlin: Heidelberg. 2012. Chapter 2. P. 29 – 57. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-02400-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-02400-9_2)
153. Knosla S., Pacifici R. Estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis. *Marcus and Feldman's Osteoporosis (Fifth Edition)*. Academic Press, 2021. Chapter 32. P. 773 – 797. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813073-5.00032-0>
154. Li C. H., Amar S. Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. *Journal of Periodontology*. 2007.V. 78, № 6. P. 1120–1128. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060320>
155. Lipid metabolism within the bone microenvironment is closely associated with bone metabolism in physiological and pathophysiological stages / B. Wang, H. Wang, Y. Li, L. Song. *Lipids in Health and Disease*. 2022. V. 21(5). P. 1 – 14. <https://doi.org/10.1186/s12944-021-01615-5>
156. Liu M., Dudley S. C. Magnesium, Oxidative Stress, Inflammation, and cardiovascular disease. *Antioxidants*. 2020. V. 9(10). 907. <https://doi.org/10.3390/antiox9100907>
157. Makarenko O. A., Sidletskiy O. S., Khodakov I. V. The state of the liver, reproductive and musculoskeletal systems in female rats with prolonged exposure to  $\alpha$ -cypermethrin. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2024. V. 15(2). P. 235 – 244. <https://doi.org/10.15421/022435>
158. Managing Early Onset Osteoporosis: The Impact of Premature Ovarian Insufficiency on Bone Health / Meczekalski B., Niwczyk O., Bala G., Szeliga A. *Journal of clinical medicine*. 2023. V. 12(12). P. 4042. <https://doi.org/10.3390/jcm12124042>
159. Mathew A.A., Panonnummal R. ‘Magnesium’-the master cation-as a drug—possibilities and evidences. *Biometals*. 2021. V. 34. P. 955 – 986. <https://doi.org/10.1007/s10534-021-00328-7>

160. Matrix-embedded cells control osteoclast formation / Xiong J. [et al.]. *Nature medicine*. 2011. V. 17, №10. P. 1235 – 1242. <https://doi.org/10.1038/nm.2448>
161. Mature osteoclast– derived apoptotic bodies promote osteogenic differentiation via RANKL-mediated reverse signaling; Ma Q. [et al.]. *The Journal of biological chemistry*. 2019. V. 294(29). P. 11240–11247. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007625>
162. Mechanistic advances in osteoporosis and anti-osteoporosis therapies / Wang H. [et al.]. *MedComm*. 2023. V. 4(3). e244. <https://doi.org/10.1002/mco2.244>
163. Mechanistic Insights and Therapeutic Strategies in Osteoporosis: A Comprehensive Review / Elahmer N. R. [et al.]. *Biomedicines*. 2024. V. 12(8). P. 1635. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12081635>
164. Mechanotransduction in osteogenesis / Stewart S. [et al.]. *Bone & joint research*. 2020. V. 9(1). P. 1 – 14. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.91.BJR-2019-0043.R2>
165. Metabolism and environmental degradation of pyrethroid insecticides produce compounds with endocrine activities / Tyler C. R. [et al.]. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2000. V. 19(4). P. 801 – 809. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190404>
166. Mizoguchi T., Ono N. The diverse origin of bone-forming osteoblasts. *Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2021. V. 36(8). P. 1432–1447. <https://doi.org/10.1002/jbmr.4410>
167. Molecular mechanisms of glucocorticoids on skeleton and bone regeneration after fracture / Hachemi Y. [et al.]. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2018. V. 61(1). P. R75–R90. <https://doi.org/10.1530/JME-18-0024>
168. Monteiro R., Teixeira D., Calhau C. Estrogen Signaling in Metabolic Inflammation. *Mediators of inflammation*. 2014. V. 2014. P. 615917. <https://doi.org/10.1155/2014/615917>

169. Moser S. C., Erden B. C. J. Osteocalcin—A Versatile Bone-Derived Hormone. *Frontiers in Endocrinology*. 2018. V. 9. P. 794. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00794>
170. Multiomics implicate gut microbiota in low cypermethrin (CP) exposure induced multiorgan toxicological effects in pubertal male rats / Yue S. [et al.]. *Journal of Hazardous Materials*. 2023. V. 458. P. 1331721. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131721>
171. Mun S. H., Park P. S. U., Park-Min K.-H. The M-CSF receptor in osteoclasts and beyond. *Experimental & Molecular Medicine*. 2020. V. 52. P. 1239–1254. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0484-z>
172. Noh J. Y., Yang Y., Jung H. Molecular Mechanisms and Emerging Therapeutics for Osteoporosis. *International journal of molecular sciences*. 2020. V. 21(20). P. 7623. <https://doi.org/10.3390/ijms21207623>
173. Nutrition, Physical Activity, and Dietary Supplementation to Prevent Bone Mineral Density Loss: A Food Pyramid / Rondanelli M. [et al.]. *Nutrients*. 2021. V. 14(1). 74. <https://doi.org/10.3390/nu14010074>
174. Nyarko K. Investigating the Antioxidant Properties of Quercetin. *Quercetin-Effects on Human Health*. 2024. Chapter 5. 218 c. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.1004648>
175. Obinna V. C., Agu G. O. Beta cypermethrin exposure and perinatal reproductive development of female fl generation of albino rats. *The Journal of Basic and Applied Zoology*. 2019. V. 80. P. 44. <https://doi.org/10.1186/s41936-019-0121-3>
176. Osredkar J. Introductory Chapter: Quercetin–Effects on Human Health. *Quercetin–Effects on Human Health*. 2024. Chapter 1. 218 c. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.1005227>
177. Osteocalcin differentially regulates  $\beta$  cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice / M. Ferron, E. Hinoi, G. Karsenty, P. Ducy. Proceedings of the

- National *Academy of Sciences of the United States of America*. 2008.V. 105, № 13. P. 5266–5270. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711119105>
178. Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass / Moriishi T. [et al.]. *PLOS Genetics*. 2020. V. 16(5). P. e1008586. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008586>
179. Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone / Xiong J. [et al.]. *PloS One*. 2015. V. 10(9). P. 1 – 19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138189>
180. Osteogenic differentiation of preosteoblasts on a hemostatic gelatin sponge / Kuo Z.-K. [et al.]. *Scientific reports*. 2016. V. 6. P 32884. <https://doi.org/10.1038/srep32884>
181. Osteoporosis and diabetes – possible links and diagnostic difficulties / J. M. Tomasiuk, A. Nowakowska-Płaza, M. Wisłowska, P. Głuszko. *Reumatologia*. 2023. V. 61(4). P. 294–304. <https://doi.org/10.5114/reum/170048>
182. Osteoporosis in Europe: a compendium of country-specific reports / Willers C. [et al.]. *Archives of osteoporosis*. 2022. V. 17(1). P. 23. <https://doi.org/10.1007/s11657-021-00969-8>
183. Osteoporosis treatment: current drugs and future developments / Chen Y. [et al.]. *Frontiers in Pharmacology*. 2024. V. 15. P. 1456796. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1456796>
184. Osteoporosis: Causes, Mechanisms, Treatment and Prevention: Role of Dietary Compounds / Stromsnes K. [et al.]. *Pharmaceuticals*. 2024. V. 17. P. 1697. <https://doi.org/10.3390/ph17121697>
185. Osteoporosis: Pathophysiology and therapeutic options / Föger-Samwald U. [et. al.]. 2020. *EXCLI journal*. 2020. V. 19. P. 1017–1037. <https://doi.org/10.17179/excli2020-2591>

186. Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide / N. Yousefzadeh, K. Kashfi, S. Jeddi, A. Ghasemi. *EXCLI journal*. 2020. V. 19. P. 89 – 107. <https://doi.org/10.17179/excli2019-1990>
187. Overexpression of c-Fos reverses osteoprotegerin-mediated suppression of osteoclastogenesis by increasing the Beclin1-induced autophagy / Tong X. [et al.]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020. V. 25(2). P. 937 – 945. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16152>
188. Overview of biological effects of Quercetin on ovary / Rashidi Z. [et al.]. *Phytotherapy Research*. 2020. V. 35(1). P. 33 – 49. <https://doi.org/10.1002/ptr.6750>
189. Oxidative stress: A common pathological state in a high-risk population for osteoporosis / Zhang C. [et al.]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023. V. 163. 114834. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114834>
190. Pannexin 3 and connexin 43 modulate skeletal development through their distinct functions and expression patterns / Ishikawa M. [et al.]. *Journal of Cell Science*. 2016. V. 129(5). P. 1018–1030. <https://doi.org/10.1242/jcs.176883>
191. Pannexins in the musculoskeletal system: new targets for development and disease progression / Luo Y. [et al.]. *Bone Research*. 2024. V. 12(1), P. 1 – 15. <https://doi.org/10.1038/s41413-024-00334-8>
192. Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review / Wang X. [et al.]. *Environmental research*. 2016. V. 149. P. 86 – 104. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.05.003>
193. Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? / Bretveld [et al.]. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2006. V. 4. P. 30. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-30>

194. Pharmacological and mechanistic aspects of quercetin in osteoporosis; Deng T.-T. [et al.]. *Frontiers in Pharmacology*. 2024. V. 15. P. 1138951. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1338951>
195. Pharmacological Therapy of Osteoporosis: A Systematic Current Review of Literature / Pavone V. [et al.]. *Frontiers in pharmacology*. 2017. V. 8. P. 803. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00803>
196. Possible involvement of elastase in enhanced osteoclast differentiation by neutrophils through degradation of osteoprotegerin / Sugisaki [et al.]. *Bone*. 2020. V. 132. P. 115216. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.115216>
197. Powers C., Setzer W. N. A molecular docking study of phytochemical estrogen mimics from dietary herbal supplements. *In silico pharmacology*. 2015. V. 3. P. 4. <https://doi.org/10.1186/s40203-015-0008-z>
198. Preliminary Study of Quercetin Affecting the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis on Rat Endometriosis Model / Cao Y. [et al.]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014. V. 2014(1). P. 781684. <https://doi.org/10.1155/2014/781684>
199. Premature ovarian insufficiency associated with environmental chemical exposure among Korean women: a study based on the Korean National Environmental Health Survey (2009–2012) / Kim Y. J. [et al.]. *Molecular & Cellular Toxicology*. 2023. V. 20. P. 465 – 471. <https://doi.org/10.1007/s13273-023-00358-x>
200. Proteoglycans: key partners in bone cell biology / Lamoureux L. [et al.]. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2007. V. 29(8). P. 758 – 771. <https://doi.org/10.1002/bies.20612>
201. Pyrethroid and their metabolite, 3-phenoxybenzoic acid showed similar (anti)estrogenic activity in human and rat estrogen receptor  $\alpha$ -mediated reporter gene assays / Sun H. [et al.]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2014. V. 37(1). P. 371 – 377. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.11.031>



202. Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and its metabolites induce liver injury through the activation of oxidative stress and proinflammatory gene expression in rats following acute and subchronic exposure / Aouey B. [et al.]. *Environmental science and pollution research international*. 2017. V. 24(6). P. 5841 – 5856. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8323-4>
203. Pyrethroid pesticides as endocrine disruptors: molecular mechanisms in vertebrates with a focus on fishes / Brander S. M. [et al.]. *Environmental Science & Technology*. 2016. V. 50(17). P. 8977 – 8992. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02253>
204. Quercetin and Ferulic Acid Elicit Estrogenic Activities In Vivo and In Silico / Slighoua M. [et al.]. *Molecules*. 2023. V. 28(13). P. 5112. <https://doi.org/10.3390/molecules28135112>
205. Quercetin rescued TNF-alpha-induced impairments in bone marrow-derived mesenchymal stem cell osteogenesis and improved osteoporosis in rats / Yuan Z. [et al.]. *American Journal of Translational Research*. 2018. V. 10(12). P. 4313 – 4321.
206. Quercetin Stimulates Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Differentiation through an Estrogen Receptor-Mediated Pathway / Pang X.-G. [et al.]. *BioMed Research International*. 2018. V. 2018(1). 4178021. <https://doi.org/10.1155/2018/4178021>
207. Reactive sulfur and selenium species in the regulation of bone homeostasis / A. K. Gilbert, T. D. Newton, M. H. Hettiaratchi, M. D. Pluth. *Free Radical Biology and Medicine*. 2022. V. 190. P. 148 – 157. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.08.002>
208. Reid I. R., McCluding M. R. Osteopenia: a key target for fracture prevention. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2024. V. 12 (11). P. 856 – 864. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(24\)00225-0](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(24)00225-0)
209. Robey P. G. Bone Matrix Proteoglycans and Glycoproteins. *Principles of Bone Biology. Second edition*. Academic press, 2002. Chapter 14. P. 225 – 237. <https://doi.org/10.1016/B978-012098652-1.50116-5>

210. Ross F. P. M-CSF, c-Fms, and Signaling in Osteoclasts and their Precursors. *Annals New York Academy of Sciences*. 2006. № 1068. P. 110 – 116. <https://doi.org/10.1196/annals.1346.014>
211. Saeidnia S., Manayi A., Abdollahi M. The Pros and Cons of the In-silico Pharmaco-toxicology in Drug Discovery and Development. *International Journal of Pharmacology*. 2013. V. 9(3). P. 176 – 181. <http://dx.doi.org/10.3923/ijp.2013.176.181>
212. *Salvia officinalis* mitigates uterus and liver damages induced by an estrogen deficiency in ovariectomized rats / Koubaa-Ghorbel F. [et al.]. *Journal of food biochemistry*. 2020. V. 45(5). e13542. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13542>
213. Sangha G. K., Kaur K., Khera K. S. Cypermethrin induced pathological and biochemical changes in reproductive organs of female rats. *Journal of environmental biology*. 2013. V. 34(1). P. 99 – 105.
214. Sankar P., Telang A. G., Manimaran A. Protective effect of curcumin on cypermethrin-induced oxidative stress in Wistar rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2012. V. 64 (5). P. 487 – 493. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.11.003>
215. Sapir-Koren R., Livshits G. Osteocyte control of bone remodeling: is sclerostin a key molecular coordinator of the balanced bone resorption-formation cycles? *Osteoporosis international*. 2014. V. 25(12). P. 2685 – 2700. <https://doi.org/10.1007/s00198-014-2808-0>
216. Selected Phytoestrogens Distinguish Roles of ER $\alpha$  Transactivation and Ligand Binding for Anti-Inflammatory Activity / Liu H. [et al.]. *Endocrinology*. 2018. V. 159(9). P. 3351 – 3364. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00275>
217. Selenium Status and Its Antioxidant Role in Metabolic Diseases / J. Huang, L. Xie, A. Song, C. Zhang. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022. V. 2022(1). 7009863. <https://doi.org/10.1155/2022/7009863>

218. Senile Osteoporosis: The Involvement of Differentiation and Senescence of Bone Marrow Stromal Cells / Quadir A. [et al.]. *International Journal of Molecular Science*. 2020. V. 21(1). P. 349. <https://doi.org/10.3390/ijms21010349>
219. Shanmugasundaram D., Roza M. J. Assessment of anti-inflammatory and antioxidant activity of quercetin-rutin blend (SophorOx™) - an in vitro cell based assay. *Journal of complementary & integrative medicine*. 2022. V. 19(3). P. 637 – 644. <https://doi.org/10.1515/jcim-2021-0568>
220. Sheikh I. A., Beg M. A., Macha M. A. Pyrethroids and reproductive function: some endocrine disrupting perspectives from molecular simulations. *Ecotoxicology*. 2024. V. 33. P. 1086 – 1095. <https://doi.org/10.1007/s10646-024-02801-8>
221. Shepelska N. R., Prodanchuk M. G., Kolianchuk Y. V. Comparative analysis of two methodological approaches to the study of endocrine disruptor alpha-cypermethrin reproductive toxicity. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2021. V. 12(4). P. 724 – 732. <https://doi.org/10.15421/0221100>
222. Shulhai A.-M., Palanza P., Street M. E. Current Evidence on the Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs) on Bone Growth and Health. *Expo Health*. 2024. V. 16. P. 1001 – 1025. <https://doi.org/10.1007/s12403-023-00607-3>
223. Siddiqui J. A., Partridge N. C. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology*. 2016. V. 31(3). P. 233 – 245. <https://doi.org/10.1152/physiol.00061.2014>
224. Signaling pathways in human osteoclasts differentiation: ERK1/2 as a key player / Pennanen P. [et al.]. *Molecular Biology Reports*. 2021. V. 48. P. 1243–1254. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06128-5>
225. Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids / Almeida M. [et al.]. *The Journal of*

- biological chemistry*. 2007. V. 282(37). P. 27285–27297.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M702810200>
226. Soysa N. S., Alles N. Positive and negative regulators of osteoclast apoptosis. *Bone Reports*. 2019. V. 11. P. 100225.  
<https://doi.org/10.1016/j.bonr.2019.100225>
227. Spica Prunella Extract Inhibits Phosphorylation of JNK, ERK and I $\kappa$ B $\alpha$  Signals during Osteoclastogenesis / Ko W.-K. [et al.]. *Food Science and Biotechnology*. 2013. V. 22. P. 1691 – 1698.  
<https://doi.org/10.1007/s10068-013-0268-5>
228. Šromová V., Sobola D., Kaspar P. A. Brief Review of Bone Cell Function and Importance. *Cells*. 2023. V. 12(1). P. 2576.  
<https://doi.org/10.3390/cells12212576>
229. Stereoisomeric selectivity in the endocrine-disrupting potential of cypermethrin using in vitro, in vivo, and in silico assays / Zhang Q. [et al.]. *Journal of Hazardous Materials*. 2021. V. 414. P. 125389.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125389>
230. Sugiatno E., Herminajeng E., Sosroseno W. The Role of Prostaglandin E2 on Osteoblast Proliferation Induced by Hydroxyapatite. *Journal of Biosciences and Medicines*. 2020. V. 8. P. 42 – 55.  
<https://doi.org/10.4236/jbm.2020.81006>
231. Szeliga A., Maciejewska-Jeske M., Męczekalski B. Bone health and evaluation of bone mineral density in patients with premature ovarian insufficiency. *Menopause reviews*. 2018. V. 17(3). P. 112–116. DOI:  
<https://doi.org/10.5114/pm.2018.78552>
232. Taskan M. M., Gevrek F. Quercetin decreased alveolar bone loss and apoptosis in experimentally induced periodontitis model in wistar rats. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents)*. 2020. V. 19(4). P. 436 – 448.  
<https://doi.org/10.2174/1871523019666200124114503>

233. The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration / X. Lin, S. Patil, Y.-G. Gao, A. Qian. *Frontiers in Pharmacology*. 2020. V. 11. P. 757. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00757>
234. The effect of quercetin on bone healing in an experimental rat model / Yurteri A. [et al.]. *Joint Diseases and Related Surgery*. 2023. V. 34(2). P. 365–373. <https://doi.org/10.52312/jdrs.2023.870>
235. The Effects of Calcium, Magnesium, Phosphorus, Fluoride, and Lead on Bone Tissue / Ciosek Z. [et al.]. *Biomolecules*. 2021. V. 11(4). 506. <https://doi.org/10.3390/biom11040506>
236. The ERK MAPK Pathway Is Essential for Skeletal Development and Homeostasis / Kim J-M. [et al.]. 2019. *International journal of molecular sciences*. V. 20(8). P. 1803. <https://doi.org/10.3390/ijms20081803>
237. The essential role of combined calcium and vitamin D supplementation in the osteoporosis scenario in italy: Expert opinion paper / Carugo S. [et al.]. *Archives of osteoporosis*. 2024. V. 19(1). P. 99. <https://doi.org/10.1007/s11657-024-01451-x>
238. The Estrogen Receptor- $\alpha$  in Osteoclasts Mediates the Protective Effects of Estrogens on Cancellous But Not Cortical Bone / Martin-Millan M. [et al.]. *Molecular Endocrinology*. 2010. V. 24(2). P. 323–334. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0354>
239. The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis / Salari N. [et al.]. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2021. V. 16(1). P. 609. <https://doi.org/10.1186/s13018-021-02772-0>
240. The global prevalence of premature ovarian insufficiency: a systematic review and meta-analysis / Li M. [et al.]. *Climacteric*. 2022. V. 26(2). P. 95 – 102. <https://doi.org/10.1080/13697137.2022.2153033>
241. The impact of hydroxyapatite crystal structures and protein interactions on bone's mechanical properties / Sun Y. [et al.]. *Scientific Reports*. 2024. V. 14. P. 9786. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60701-7>

242. The influence of M-CSF on fracture healing in a mouse model; Starlinger J. [et al.]. *Scientific Reports*. 2021. V. 11. P. 22326. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01673-w>
243. The osteocyte and its osteoclastogenic potential / Marahleh A. [et al.]. *Frontiers in endocrinology*. 2023. V. 14. P. 1121727. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1121727>
244. The osteocyte: A multifunctional cell within the bone / Tresguerres F.G.F. [et al.]. *Annals of Anatomy*. 2020. V. 227. P. 151422. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2019.151422>
245. The roles of estrogen and estrogen receptors in gastrointestinal disease / Chen C. [et al.]. *Oncology letters*. 2019. V. 18(6). P. 5673 – 5680. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10983>
246. The Roles of RANK/RANKL/OPG in Cardiac, Skeletal, and Smooth Muscles in Health and Disease/ L. Marcadet, Z. Bouredji, A. Argaw, J. Frenette. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022. V. 10. P. 903657. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.903657>
247. Tsuchiya Y., Nakajima M., Yokoi T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer letters*. 2005. V. 227(2). P. 115-124. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.10.007>
248. Turan S. Endocrine disrupting chemicals and bone. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2021. V.35, Is. 5. P. 101495. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2021.101495>
249. Two to three years of hormone replacement treatment in healthy women have long-term preventive effects on bone mass and osteoporotic fractures: the PERF study / Bagger Yu. Z. [et al.]. *Bone*. 2004. V. 34, Is. 4. P. 728 – 735. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.12.021>
250. Uterine responses to feeding soy protein isolate and treatment with 17 $\beta$ -estradiol differ in ovariectomized female rats / Ronis M. J. [et al.]. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2016. V. 297. P. 68 – 80. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.02.019>

251. Vaananen K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption—rationale for the design of new therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005. V. 57 (2005) P. 959– 971. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.12.018>
252. Vitamin C reverses bone loss in an osteopenic rat model of osteoporosis / Deyhim F. [et al.]. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2018. V. 88(1 – 2). P. 58 – 64. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000486>
253. Wacker M., Holick M. F. Vitamin D - effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. *Nutrients*. 2013. V. 5(1). P. 111–148. <https://doi.org/10.3390/nu5010111>
254. What is really responsible for bone loss in spontaneous premature ovarian failure? A new enigma / Lana M. B. P. [et al.]. *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2010. V. 26(10). P. 755 – 759. <https://doi.org/10.3109/09513590.2010.487599>
255. Williams G. R., Bassett J. H. D. Thyroid diseases and bone health. *Journal of endocrinological investigation*. 2018. V. 41(1). P. 99–109. <https://doi.org/10.1007/s40618-017-0753-4>
256. Wnt Pathway in Bone Repair and Regeneration – What Do We Know So Far / Houschyar K. S. [et al.]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2019. V. 6. P. 170. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00170>
257. Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases / Kim J. H. [et al.]. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*. 2013. V. 5(1). P. 13 – 31. <https://doi.org/10.1177/1759720X12466608>
258. Wong S. K., Chin K. Y., Ima-Nirwana S. Quercetin as an Agent for Protecting the Bone: A Review of the Current Evidence. *International journal of molecular sciences*. 2020. V. 21(17). P. 6448. <https://doi.org/10.3390/ijms21176448>

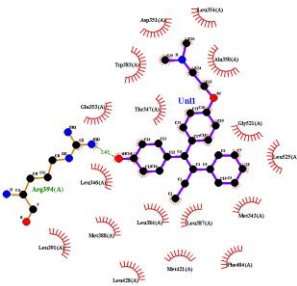
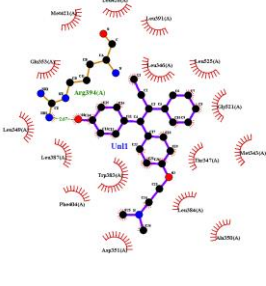
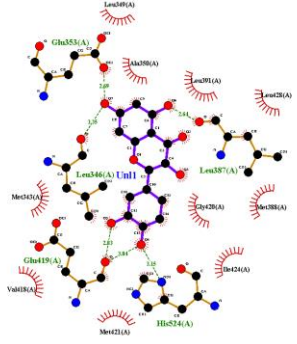
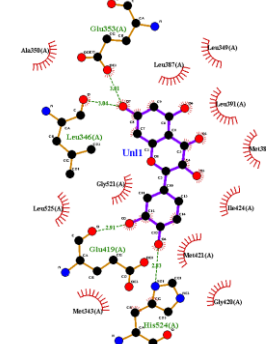
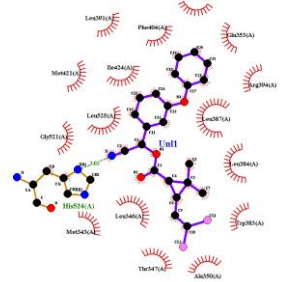
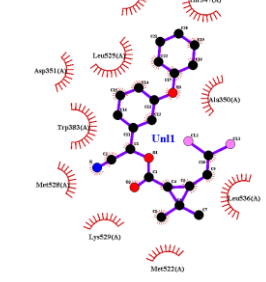
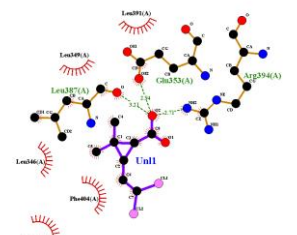
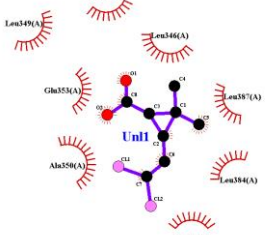
259. Yavropoulou M. P., Yovos J. G. The molecular basis of bone mechanotransduction. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2016. V. 16 (3). P. 221–236.
260. Ye X., Liu J. Effects of pyrethroid insecticides on hypothalamic-pituitary-gonadal axis: A reproductive health perspective. *Environmental Pollution*. 2019. V. 245. P. 590 – 599. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.031>
261. Yoon B.-H., Kim D.-Y. Discordance between Hip and Spine Bone Mineral Density: A Point of Care. *Journal of bone metabolism*. 2021. V. 28(4). P. 249 – 251. <https://doi.org/10.11005/jbm.2021.28.4.249>
262. Zinc as a Therapeutic Agent in Bone Regeneration / O'Connor J. P. [et al.]. *Materials*. 2020. V. 13(10). P. 2211. <https://doi.org/10.3390/ma13102211>



## ДОДАТОК

Таблиця 1

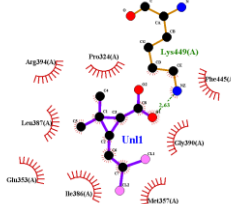
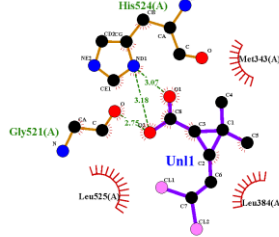
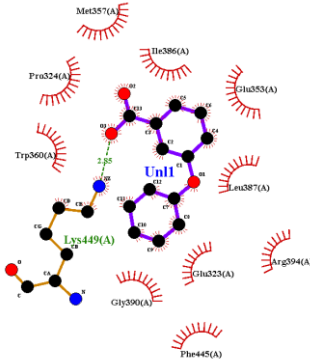
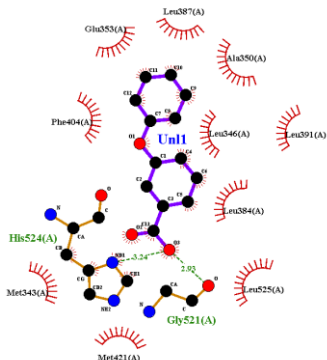
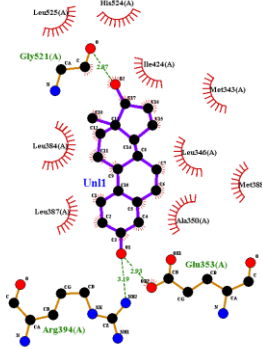
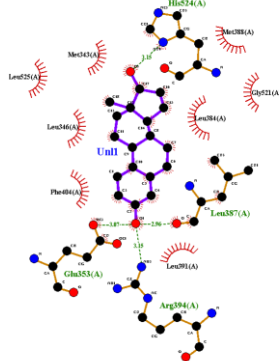
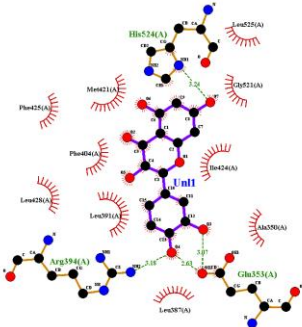
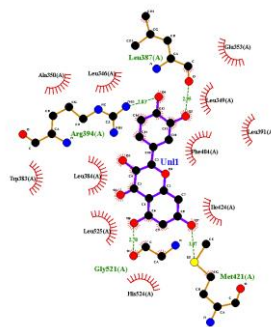
Візуалізація розташування референтних лігандів, кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його похідних в специфічних сайтах зв'язування естрогенових рецепторів (3ERT, 1GWR, 1ERE, 1ERR) *Auto Dock*, *Auto Dock Vina*

Ліганд	Auto Dock	Auto Dock Vina
1	2	3
<b>3ERT</b>		
Референтний ліганд 4-гідрокси-тамоксифен		
Кверцетин		
$\alpha$ -циперметрин		
DCCA		

Таблиця 1 (продовження)

1	2	3
<b>ЗЕРТ</b>		
<b>3-РВА</b>		
<b>1GWR</b>		
<b>Естрадіол</b>		
<b>Кверцетин</b>		
<b>α-циперметрин</b>		

Таблиця 1 (продовження)

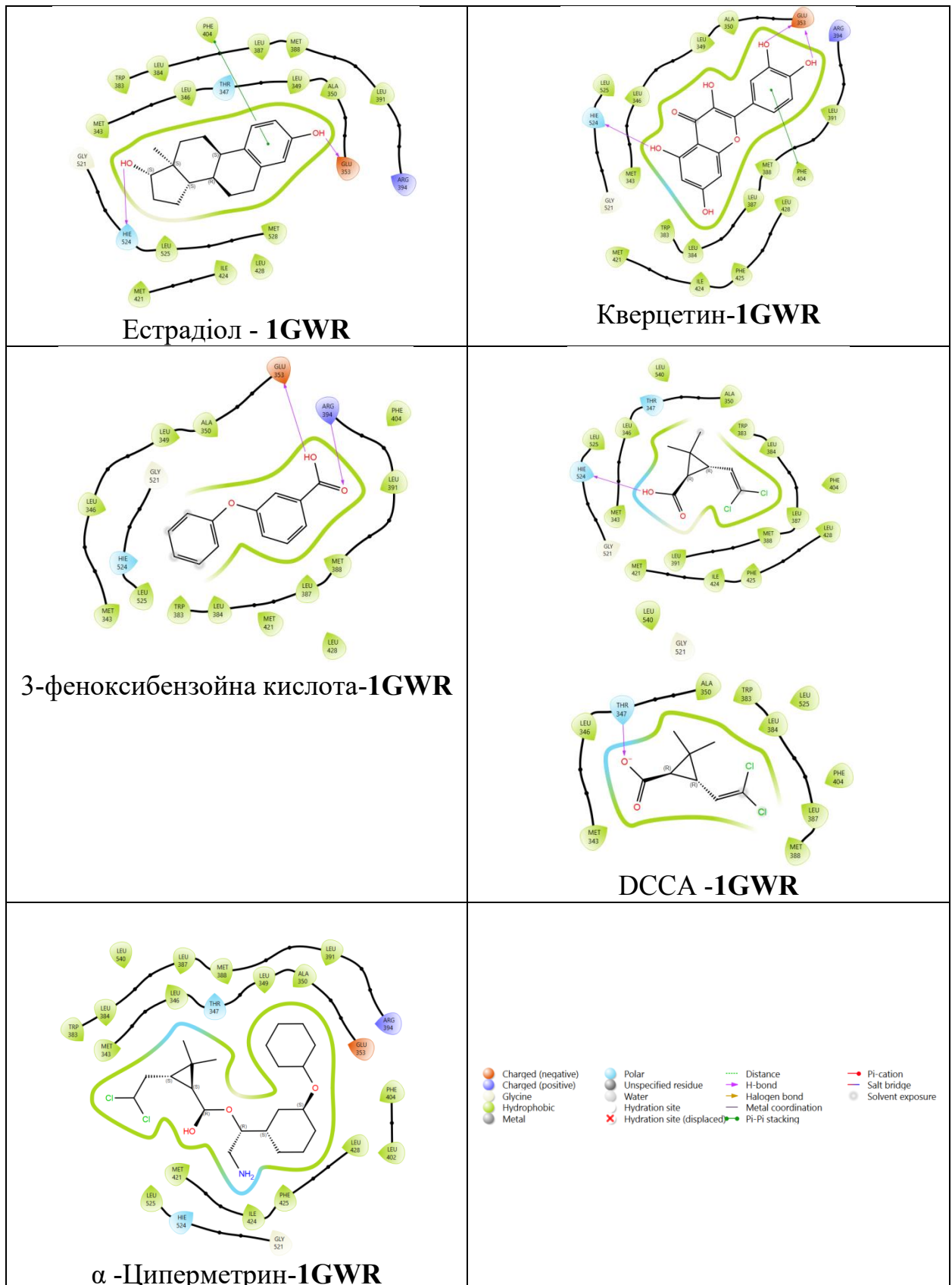
1	2	3
<b>1GWR</b>		
<p>цис/транс- DCCA</p>		
<p>3-фенокси- бензойна кислота</p>		
<b>1ERE</b>		
<p>Референтний ліганд (Естрадіол)</p>		
<p>Кверцетин</p>		

Таблиця 1 (продовження)

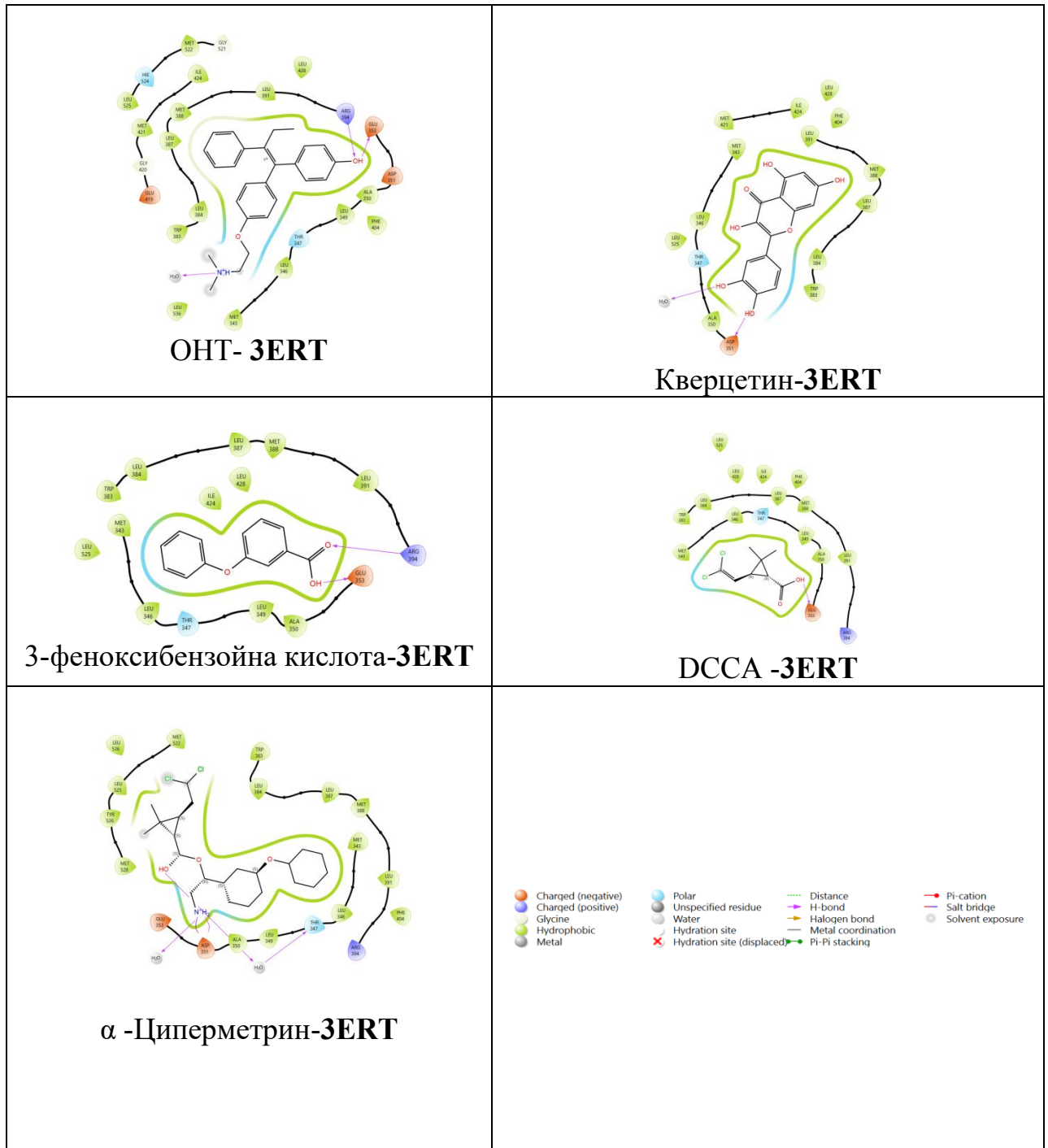
1	2	3
<b>1ERE</b>		
<p><b>α-циперметрин</b></p>		
<p><b>DCCA</b></p>		
<p><b>3-PBA</b></p>		
<b>1ERR</b>		
<p><b>Референтний ліганд Ралоксифен (1ERR)</b></p>		

Таблиця 1 (продовження)

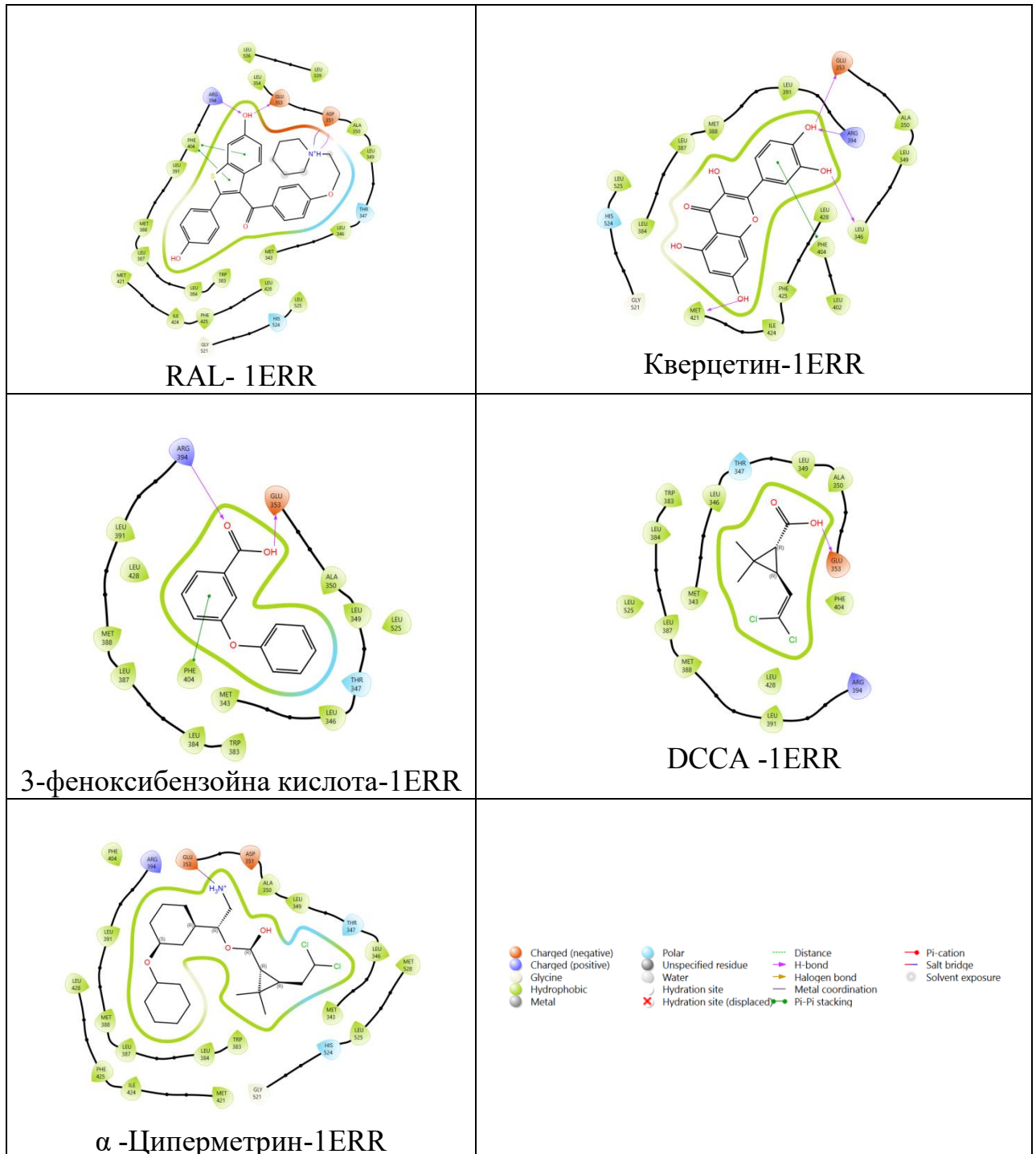
1	2	3
<b>1ERR</b>		
Кверцетин		
α-циперметрин		
DCCA		
3-РВА		



**Рисунок 1. Візуалізація розташування кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його похідних в специфічному сайті зв'язування естрогенового рецептору (1GWR) *Maestro Schrödinger Suite***

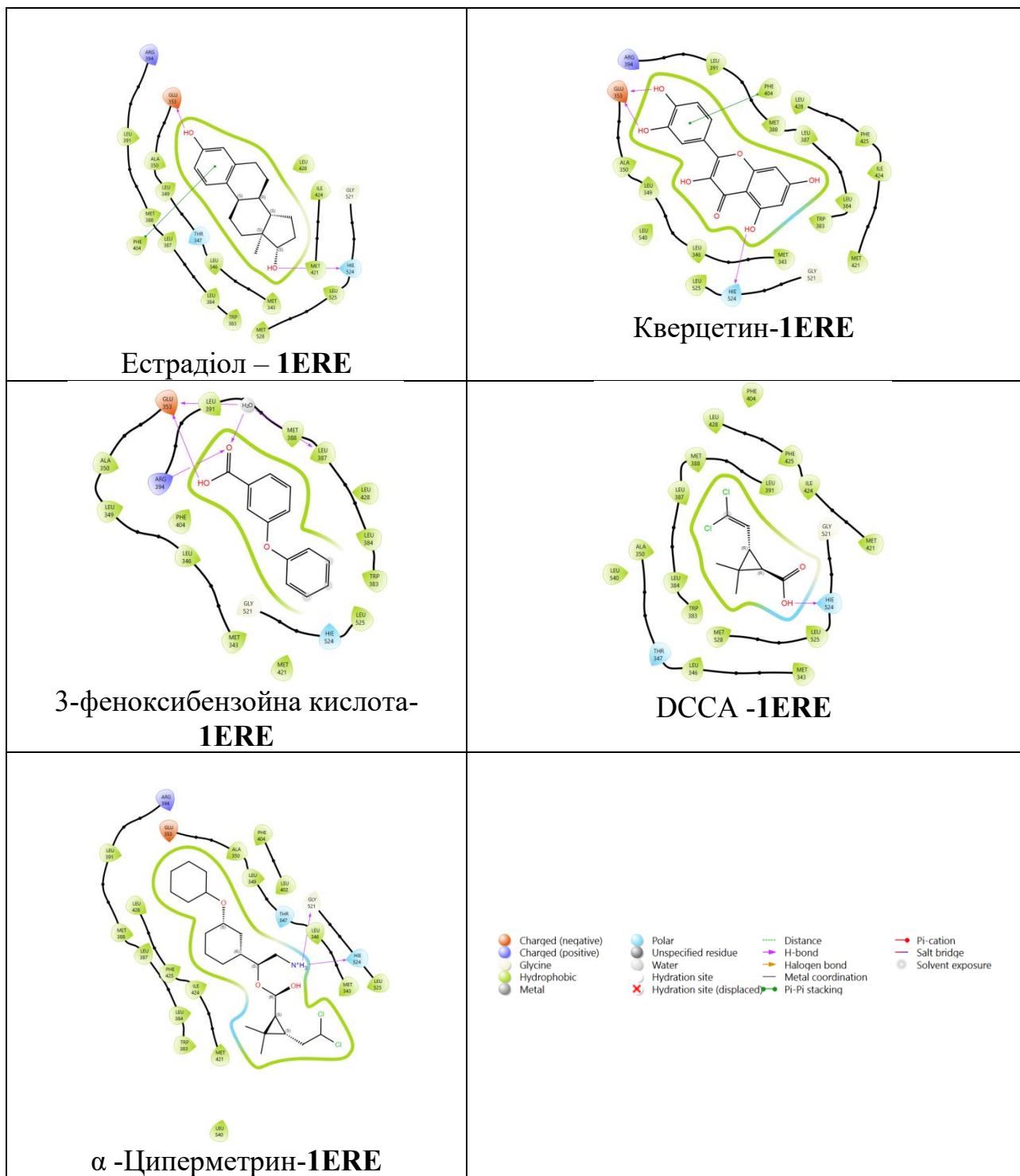


**Рисунок 2.** Візуалізація розташування кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його похідних в специфічному сайті зв'язування естрогенового рецептору (ZERT) *Maestro Schrödinger Suite*



**Рисунок 3.** Візуалізація розташування кверцетину,  $\alpha$ -диперметрину та його похідних в специфічному сайті зв'язування естрогенового рецептору (1ERR) *Maestro Schrödinger Suite*





**Рисунок 4.** Візуалізація розташування кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його похідних в специфічному сайті зв'язування естрогенового рецептору (1ERE) *Maestro Schrödinger Su*

Таблиця 2

**Внесок окремих амінокислотних залишків у загальну енергію взаємодії  
кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його похідних з 1GWR (Schrödinger  
Maestro Glide)**

Ліганди	EvdW	ECoul	HB
1	2	3	4
<b>LEU 346</b>			
Естрадіол	-3.46	-0.28	0
Кверцетин	-2.47	0.02	0
3-РВА	-2.65	0	0
DCCA	-1.52	0.06	0
$\alpha$ -Циперметрин	5.29	-0.36	0
<b>GLU 353</b>			
Естрадіол	-0.49	-6.21	-0.15
Кверцетин	-0.88	-15.73	
3-РВА	1.77	-12.39	0
DCCA	-0.03	0.09	0
$\alpha$ -Циперметрин	0.10	-0.70	0
<b>LEU 387</b>			
Естрадіол	-3.70	0.22	0
Кверцетин	-3.96	0.089	0
3-РВА	-4.79	0.25	0
DCCA	-0.38	0.03	0
$\alpha$ -Циперметрин	-4.83	-0.15	0
<b>MET 388</b>			
Естрадіол	-3.22	0.40	0
Кверцетин	-2.40	0.03	0
3-РВА	-2.34	0.28	0
DCCA	-1.85	-0.17	0
$\alpha$ -Циперметрин	-2.26	0.01	0
<b>LEU 391</b>			
Естрадіол	-2.53	-0.11	0
Кверцетин	-1.98	0	0
3-РВА	-2.50	-0.16	0
DCCA	-0.65	-0.07	0
$\alpha$ -Циперметрин	0.38	0	0
<b>ARG 394</b>			
Естрадіол	-0.32	-3.65	-0.093
Кверцетин	0.14	-0.96	0
3-РВА	-0.50	-2.11	-0.13
DCCA	-0.02	-0.23	0
$\alpha$ -Циперметрин	-0.70	0.42	0

Таблиця 2 (продовження)

1	2	3	4
<b>РНЕ 404</b>			
Естрадіол	-3.47	-0.25	0
Кверцетин	-2.79	-0.43	0
3-РВА	-2.61	-0.38	0
DCCA	-1.10	-0.04	0
$\alpha$ -Циперметрин	1.53	-0.36	0
<b>НІЕ 524</b>			
Естрадіол	-2.23	-2.34	-0.30
Кверцетин	-2.26	-2.34	0
3-РВА	-1.08	-0.28	0
DCCA	-1.72	-4.04	0
$\alpha$ -Циперметрин	0.53	-1.86	0
<b>LEU 525</b>			
Естрадіол	-2.87	-0.74	0
Кверцетин	-3.02	-0.86	0
3-РВА	-1.67	0.08	0
DCCA	-2.71	-0.32	0
$\alpha$ -Циперметрин	-1.67	-0.06	0

Таблиця 3

**Внесок окремих амінокислотних залишків у загальну енергію взаємодії кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його похідних з 3ERT (Schrödinger Maestro Glide)**

Ліганди	EvdW	ECoul	НВ
1	2	3	4
<b>МЕТ 343</b>			
Кверцетин	-1.76	-1.31	0
$\alpha$ -Циперметрин	-2.08	-2.55	0
3-РВА	-1.57	-0.33	0
DCCA	-1.17	0.30	0
Тамоксифен	-2.56	-1.94	0
<b>LEU 346</b>			
Кверцетин	-4.18	0.24	0
$\alpha$ -Циперметрин	-3.26	-0.87	0
3-РВА	-4.14	0.076	0
DCCA	-5.08	-0.29	0
ОНТ	-5.86	-0.74	0

Таблиця 3 (продовження)

1	2	3	4
<b>THR 347</b>			
Кверцетин	-2.42	-1.05	0
$\alpha$ -Циперметрин	-2.82	-3.76	0
3-РВА	-1.71	-0.30	0
DCCA	-1.44	-0.02	0
Тамоксифен	-3.42	-1.84	0
<b>ALA 350</b>			
Кверцетин	0.48	0.11	0
$\alpha$ -Циперметрин	-2.97	2.79	0
3-РВА	-2.54	-0.37	0
DCCA	-2.16	-0.17	0
Тамоксифен	-2.82	1.04	0
<b>ASP 351</b>			
Кверцетин	0.02	-11.01	0
$\alpha$ -Циперметрин	2.81	-54.12	-0.18
3-РВА	-0.27	-0.84	0
DCCA	-0.13	-0.04	0
Тамоксифен	-1.16	-36.2	0
<b>GLU 353</b>			
Кверцетин	-0.30	1.052	0
$\alpha$ -Циперметрин	-1.08	-17.26	0
3-РВА	5.66	-14.46	0
DCCA	0.18	-10.6	0
Тамоксифен	1.63	-22.83	-0.16
<b>TRP 383</b>			
Кверцетин			0
$\alpha$ -Циперметрин	-4.52	-0.42	0
3-РВА	-1.29	0.05	0
DCCA	-0.49	-0.07	0
Тамоксифен	-2.29	0.23	0
<b>LEU 384</b>			
Кверцетин	-2.73	0.21	0
$\alpha$ -Циперметрин	-2.37	0.04	0
3-РВА	-2.18	0.02	0
DCCA	-1.73	-0.08	0
Тамоксифен	-2.72	0.36	0
<b>LEU 387</b>			
Кверцетин	-2.84	-0.58	0
$\alpha$ -Циперметрин	-3.55	0.86	0
3-РВА	-4.71	0.44	0
DCCA	-2.76	0.08	0
Тамоксифен	-3.58	1.07	0
<b>MET 388</b>			
Кверцетин	-2.93	0.21	0
$\alpha$ -Циперметрин	-1.26	0.61	0
3-РВА	-2.36	0.28	0
DCCA	-1.54	0.05	0
Тамоксифен	-2.18	0.56	0

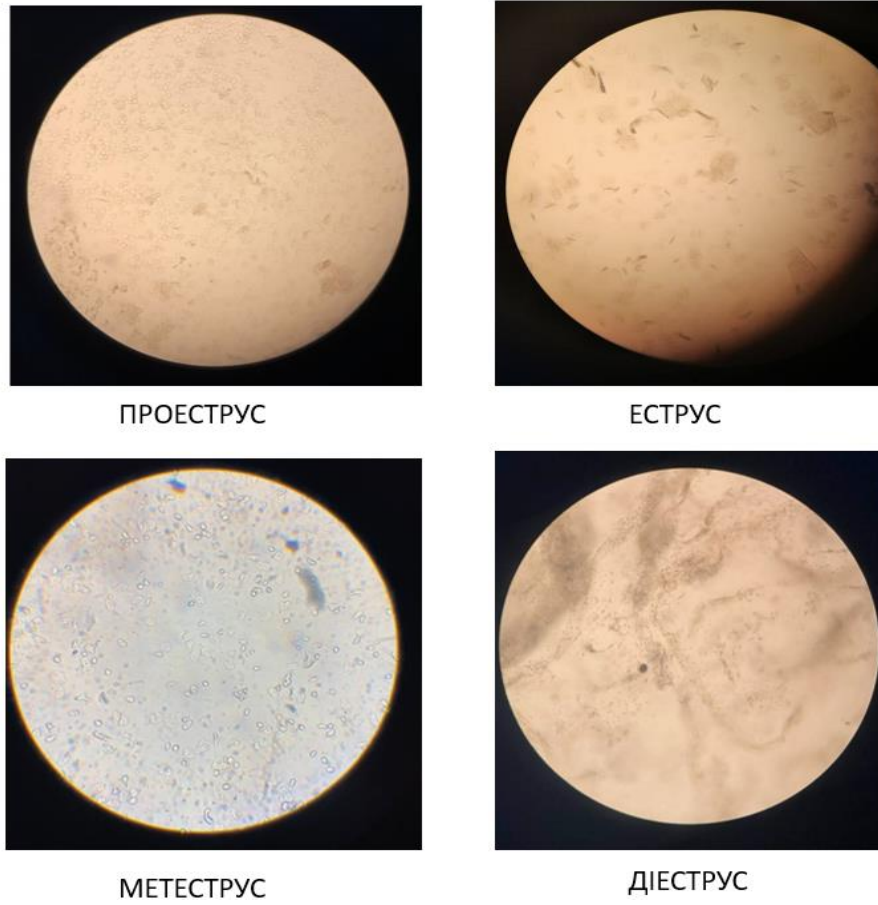
Таблиця 3 (продовження)

1	2	3	4
<b>LEU 391</b>			
Кверцетин	-1.67	0.22	0
$\alpha$ -Циперметрин	-1.81	0.53	0
3-РВА	-2.31	-0.11	0
DCCA	-1.25	-1.25	0
Тамоксифен	-2.32	0.32	0
<b>ARG 394</b>			
Кверцетин	-0.14	-0.74	0
$\alpha$ -Циперметрин	-0.54	13.39	0
3-РВА	-0.53	-3.39	-0.13
DCCA	-0.25	0.93	0
Тамоксифен	-0.04	5.84	-0.13
<b>PHE 404</b>			
Кверцетин	-1.11	-0.10	0
$\alpha$ -Циперметрин	-1.34	-0.22	0
3-РВА	-1.24	-0.09	0
DCCA	-1.48	-0.21	0
Тамоксифен	-1.99	-0.08	0
<b>MET 421</b>			
Кверцетин	-1.68	-0.16	0
$\alpha$ -Циперметрин	-1.34	-0.22	0
3-РВА	-0.40	0.10	0
DCCA	-0.44	0.03	0
Тамоксифен	-3.18	-0.27	0
<b>LEU 525</b>			
Кверцетин	-1.95	0.15	0
$\alpha$ -Циперметрин	-3.38	0.70	0
3-РВА	-1.71	-0.08	0
DCCA	-1.28	-0.01	0
Тамоксифен	-4.15	0.15	0

Таблиця 4

**Амінокислотні залишки, що беруть участь в утворенні водневих зв'язків між досліджуваними сполуками у сайтах зв'язування естрогенових рецепторів (3ERT, 1GWR, 1ERE, 1ERR)**

Ліганди	AutoDock	Vina	Schrödinger Maestro Glide
<b>1GWR</b>			
Кверцетин	HIS 524, GLU 353	GLY 521, ARG 394, GLU 353	GLU 353, HIE 524
α -Циперметрин	-	ARG 394	-
DCCA	LYS 449	HIS 524, GLY 521	HIE 524, THR 347
3-РВА	LYS 449	HIS 524, GLY 521	GLU 353, ARG 394
Естрадіол	HIS 524, ARG 394	HIS 524, ARG 394	GLU 353, HIE 524
<b>3ERT</b>			
Кверцетин	GLU 353, LEU 346, GLU 419, HIS 524, LEU 387	GLU 353, LEU 346, GLU 419, HIS 524	ASP 351
α -Циперметрин	HIS 524	-	-
DCCA	GLU 353, LEU 387, ARG 394	-	GLU 353
3-РВА	ARG 394, GLU 353	ARG 394, LEU 387	GLU 353, ARG 394
Тамоксифен	ARG 394	ARG 394	ARG 394, GLU 353
<b>1ERE</b>			
Кверцетин	HIS 524, ARG 394, GLU 353	LEU 387, ARG 394, GLY 521, MET 421	GLU 353, HIE 524
α -Циперметрин	HIS 524	LEU 387, GLU 353	GLY 521, HIE 524
DCCA	HIS 524	HIS 524	HIE 524
3-РВА	ARG 394	HIS 524, GLY 521	GLU 353, ARG 394,
Естрадіол	GLY 521, ARG 394, GLU 353	HIS 524, GLU 353, ARG 394	GLU 353, HIE 524
<b>1ERR</b>			
Кверцетин	MET 421, HIS 524, GLU 353, ARG 394	MET 421, HIS 524, ARG 394, GLU 353	MET 421, GLU 353, ARG 394
DCCA	LEU 346	-	GLU 353
3-РВА	ARG 394, GLU 353	ARG 394, LEU 387	ARG 394, GLU 353
Ралоксифен	GLY 521, HIS 524, ARG 394, LEU 387	ARG 394, HIS 524	ARG 394, GLU 353



**Рис. 5. Фази естрального циклу (фото авторів).**