

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

БЄЛЯЄВА Аляксандра Вікторівна

УДК 576.08:576.53+615.017

ДИСЕРТАЦІЯ

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ТА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ
СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЗА ДІЇ КАНДЕСАРТАНУ ЦИЛЕКСЕТИЛУ ТА
РЕСВЕРАТРОЛУ

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

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

_____ А.В. Беляєва

Науковий керівник: Гарманчук Людмила Василівна, д. б. н., проф.

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Беляєва А.В. Цитогенетичні та морфофункціональні характеристики стовбурових клітин за дії кандесартану цилексетилу та ресвератролу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена визначенню цитогенетичних та морфофункціональних характеристик стовбурових клітин, отриманих із кісткового мозку і крові тварин та жирової тканини людини, за дії кандесартану цилексетилу та ресвератролу. На сьогодні, серцево-судинні захворювання широко поширені в світі, про що свідчать дані щодо зростання в десятки разів протягом останнього десятиріччя випадків захворюваності цією патологією у багатьох країнах. Зараз багато вчених та лікарів намагаються створити і дослідити нові більш ефективні і безпечні препарати і їх комбінації та новітні технології для лікування серцево-судинних патологій. Кандесартан цилексетил є антагоністом рецептора ангіотензину II і використовується як антигіпертензивний засіб пролонгованої дії. Кандесартан цилексетил підвищує стійкість до стресу і витривалість під час фізичних навантажень у людей з гіпертензією. Однак відомо, що кандесартан цилексетил також має ряд побічних ефектів, таких як запаморочення, слабкість, головний біль. Також, високі дози кандесартану цилексетилу впливають на утворення окремих субпопуляцій клітин кісткового мозку та збільшення апоптичних клітин та клітин з мікроядрами. Актуальним є пошук засобів супровідної терапії, що могло би призводити до зменшення побічних ефектів, спричинених дією кандесартану цилексетилу. Ресвератрол, природний поліфенол, володіє плеїотропними антиоксидантними властивостями, проявляє протизапальну, антивікову, кардіопротекторну і нейропротекторну активності. Відомо, що ця речовина зменшує синтез ліпідів у печінці і

ейкозаноїдів у лейкоцитах тварин, пригнічує активацію/агрегацію тромбоцитів, знижує активність протеїнази, пригнічує утворення активних форм кисню.

Виходячи з вищенаведених даних мета роботи полягала у визначенні цитогенетичних та морфофункціональних показників стовбурових клітин за дії кандесартану цилексетилу/кандесартану та ресвератролу в різних концентраціях та співвідношеннях в експерименті.

Основними об'єктами дослідження були культури клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6, жирової тканини людини, миші ліній C57Bl/6, Balb/C, миші ICR.

Вперше виявлено, що кандесартану цилексетил в концентраціях 1,5 мкг/мл і 3 мкг/мл знижує число ендотеліальних прогеніторних клітин з фенотипом CD117+ *in vitro*; в концентрації 3 мкг/мл збільшує вміст клітин з ушкодженнями генетичного матеріалу. Кандесартан в концентраціях 1,5 мкг/мл і 3 мкг/мл збільшує вміст клітин з поверхневим клітинним маркером CD117 в культурах кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 і жирової тканини людини, однак також призводить до збільшення вмісту клітин з ушкодженнями генетичного матеріалу в обох культурах. Ресвератрол в концентраціях 30 мкг/мл і 50 мкг/мл стимулює утворення клітин з CD117+ в культурі кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6, а в концентраціях 10 мкг/мл, 30 мкг/мл і 50 мкг/мл збільшує кількість клітин з фенотипом CD117+ в культурі жирової тканини людини, і не є цитотоксичним. Використання кандесартану цилексетилу в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролу в концентраціях 30 мкг/мл і 50 мкг/мл збільшує число ендотеліальних прогеніторних клітин в обох культурах. Вперше показано, що застосування кандесартану в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролу в концентраціях від 1 мкг/мл до 50 мкг/мл призводить до значного збільшення числа клітин з фенотипом CD117+ *in vitro*. Також вперше виявлено *in vitro*, що використання кандесартану і ресвератролу в цих співвідношеннях зменшує число клітин з мікроядрами та ознаками апоптозу за рахунок нівелювання ресвератролом негативного ефекту кандесартану. Вперше показано, що кандесартану цилексетил в дозі 3 мг/кг стимулює утворення в кістковому мозку мишей лінії C57Bl/6 клітин

з фенотипом CD117+, а в дозах 1,5 мг/кг і 3 мг/кг призводить до збільшення кількості останніх в крові тварин. Ресвератрол призводить до збільшення вмісту клітин з фенотипом CD117+ в кістковому мозку і в крові мишей лінії C57Bl/6, а також не є цитотоксичним. Вперше встановлено, що спільне використання кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 1 мг/кг призводить до збільшення кількості клітин з фенотипом CD117+ в крові мишей лінії C57Bl/6, а застосування кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозах 10 мг/кг і 50 мг/кг – до збільшення кількості зазначених клітин в кістковому мозку і в крові тварин.

Кандесартану цилексетил в дозі 3 мг/кг після фізичних навантажень суттєво збільшує число клітин з фенотипом CD117+ в кістковому мозку і в крові мишей лінії Balb/C, а в дозі 1,5 мг/кг призводить до збільшення числа клітин з фенотипом CD117+ в крові тварин. Вперше виявлено, що спільне використання кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозах 10 мг/кг, 30 мг/кг і 50 мг/кг після фізичних навантажень призводить до збільшення кількості клітин з фенотипом CD117+ в кістковому мозку і в крові мишей лінії Balb/C. Ефект збільшення кількості зазначених клітин більше, ніж при застосуванні моноречовини кандесартану цилексетилу.

Таким чином, було виявлено, що антагоністи рецепторів ангіотензину II кандесартану цилексетил і кандесартан, як PPAR-регулятори, здатні стимулювати збільшення числа ендотеліальних клітин-попередників *in vitro* і *in vivo*, однак ці речовини є цитотоксичними. Використання природного антиоксиданта ресвератролу (PPARs- і HDAC-регулятора) збільшувало кількість ендотеліальних клітин-попередників *in vitro* і *in vivo* і було безпечним для клітин. Застосування кандесартану цилексетилу/кандесартану в комбінації з ресвератролом збільшувало вміст ендотеліальних клітин-попередників *in vitro* і *in vivo*. Спільне застосування кандесартану цилексетилу/кандесартану і ресвератролу дозволяє знизити дозування перших речовин і знизити їх побічні ефекти на клітини і організм.

Дослідження цитофлуориметричних параметрів клітин, таких як розподіл клітин за фазами клітинного циклу, кількість апоптичних клітин і клітин з мікроядрами, число стовбурових клітин і ендотеліальних клітин-попередників, продемонструвало можливість комплексного підходу до оцінки ефективності та безпеки дії досліджуваних речовин і їх комбінацій.

Ключові слова: серцево-судинні захворювання, кандесартан, кандесартану цилексетил, ресвератрол, стовбурові клітини, ендотеліальні клітини-попередники, цитогенетичні параметри, морфофункціональні показники.

SUMMARY

Beliaeva A.V. Cytogenetic and morphofunctional parameters of stem cells under using candesartan cilexetil and resveratrol. – The manuscript.

Dissertation for a candidate of biological sciences degree in the specialty 03.00.11 – cytology, cellular biology, histology. – ESC “Institute of Biology and Medicine”, Kyiv National Taras Shevchenko University, Kyiv, 2021.

The dissertation work is devoted to investigation of cytogenetic and morphofunctional characteristics of stem cells of bone marrow and blood of animals and human adipose tissue under using of candesartan cilexetil and resveratrol. Now cardiovascular diseases are widespread in the world. There is information about increasing of incidence of this pathology in ten times in many countries in recent years. At present many scientists and doctors try to study and create new more effective and safe drugs and their combinations, new technologies to treat cardiovascular diseases. Candesartan cilexetil is an angiotensin II receptor antagonist. It is used as a long-term antihypertensive agent. Candesartan cilexetil increases resistance to stress and endurance during exercise in people with hypertension. However, it is shown that candesartan cilexetil has also a number of side effects, such as dizziness, weakness, headache. High doses of candesartan cilexetil influence the formation of separate subpopulations of cells in bone marrow, increase the number of apoptotic and micronucleated cells. It's actual to search accompanying therapy, which could decrease the number of side effects caused by candesartan cilexetil. Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, shows pleiotropic health beneficial effects, including anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-aging, cardioprotective and neuroprotective activities. It's known that this substance decreases the synthesis of lipids in liver and eicosanoids in leukocytes in animals, inhibits platelet activation/aggregation, decreases the activity of protein kinases, inhibits formation of reactive oxygen species.

The purpose of this work is investigation of cytogenetic and morphofunctional characteristics of stem cells under using candesartan cilexetil/candesartan and resveratrol in different concentrations in the experiment.

Cell cultures of bone marrow of C57Bl/6 mice and human adipose tissue, Balb/C mice, C57Bl/6 mice, ICR mice were used in the experiments.

It is the first evidence that candesartan cilexetil at 1.5 µg/ml dose and 3 µg/ml dose reduces the number of CD117+ endothelial progenitor cells *in vitro*; using candesartan cilexetil at 3 µg/ml dose increases the amount of cells with damage of genetic material. Candesartan at 1.5 µg/ml dose and 3 µg/ml dose increases the count of CD117+ stem cells in cell culture of bone marrow of C57Bl/6 mice and human adipose tissue, but it also increases the number of cells with damage of genetic material. Resveratrol at 30 µg/ml and 50 µg/ml doses stimulates the formation of CD117+ stem cells in cell culture of bone marrow of C57Bl/6 mice; and at 10 µg/ml, 30 µg/ml and 50 µg/ml doses increases the number of CD117+ stem cells in human adipose tissue culture. It is not cytotoxic. The use of candesartan cilexetil at 1.5 µg/ml dose with resveratrol at 30 µg/ml dose and 50 µg/ml dose increases the number of endothelial progenitor cells in both cultures. Candesartan at 1.5 µg/ml dose and resveratrol at 1 µg/ml dose to 50 µg/ml dose significant increase the count of CD117+ stem cells *in vitro*. It was found first time that using candesartan with resveratrol at these doses reduced the number of cells with damage of genetic material *in vitro*. Resveratrol decreases the negative effect of candesartan. It's the first evidence that candesartan cilexetil at 3 mg/kg dose stimulates the formation of CD117+ stem cells in the bone marrow of C57Bl/6 mice, at 1.5 mg/kg and 3 mg/kg doses increases the number of these cells in blood of animals. Resveratrol increases the content of CD117+ stem cells in bone marrow and blood of mice and is not cytotoxic. It is the first evidence that candesartan cilexetil at 1.5 mg/kg dose and resveratrol at 1 mg/kg dose increase the amount of CD117+ stem cells in blood of C57Bl/6 mice. Candesartan cilexetil at 1,5 mg/kg dose and resveratrol at 10 mg/kg and 50 mg/kg doses increase the number of these cells in bone marrow and blood of C57Bl/6 mice.

Candesartan cilexetil at 3 mg/kg dose significantly increases the number of CD117+ stem cells in bone marrow and blood of Balb/C mice after physical training, and at 1.5 mg/kg dose stimulates the formation of CD117+ stem cells in blood. It's the first evidence that combined use of candesartan cilexetil at 1.5 mg/kg dose and

resveratrol at 10 mg/kg, 30 mg/kg and 50 mg/kg doses after physical training increases the number of CD117+ stem cells in bone marrow and blood of Balb/C mice. The effect of mobilization of stem cells was higher than the effect of using only candesartan cilexetil.

It was revealed that antagonists of angiotensin II receptors (candesartan, candesartan cilexetil), as PPARs-regulators, are able to provoke increase of the number of endothelial progenitor cells *in vitro* and *in vivo*, but these substances are cytotoxic. Using resveratrol (PPARs- and HDACs-regulator) raised the number of endothelial progenitor cells *in vitro* and *in vivo* and was safe for cells. Application of candesartan/candesartan cilexetil in the combination with natural antioxidant resveratrol increased the number of endothelial progenitor cells *in vitro* and *in vivo*. Mixed use of candesartan/candesartan cilexetil and resveratrol allows to reduce the dosage of the former substances, and alleviate its side effects on cells and organism.

Investigation of cytofluorimetric parameters, such as distribution of cells at stages of cell cycle, the number of apoptotic and micronucleated cells, and the amount of stem cells and endothelial progenitor cells, demonstrated the possibility complex approach to assessment of efficiency and safety of effects of substances and combinations thereof.

Keywords: cardiovascular diseases, candesartan, candesartan cilexetil, resveratrol, stem cells, endothelial progenitor cells, cytogenetic parameters, morphofunctional characteristics.

Список публікацій здобувача:

Статті у наукових фахових виданнях:

1. **Beliaeva A**, Garmanchuk L. Morphofunctional parameters of bone marrow of mice under using of antihypertensive agent. Fundamental and applied researches in practice of leading scientific schools. 2020;42(6):4-6. doi: 10.33531/farplss.2020.6.1.

2. **Beliaeva A**. Impact of an angiotensin II receptor antagonist and antioxidant on count of stem cells and on morphofunctional parameters in animals. Fundamental and applied researches in practice of leading scientific schools. 2020;41(5):100-5. doi: 10.33531/farplss.2020.5.18.

3. **Beliaeva A**, Garmanchuk L. Candesartan, candesartan cilexetil, resveratrol and their combinations change the amount of endothelial progenitor cells, cytogenetic and cytokinetic parameters in adipose tissue cell culture. Fundamental and applied researches in practice of leading scientific schools. 2019;36(6):96-9. doi: 10.33531/farplss.2019.6.14.

4. **Beliaeva A**, Garmanchuk L. Changing in the number of CD117+ stem cells, cytogenetic and cytokinetic parameters under the using of candesartan, candesartan cilexetil and resveratrol *in vitro*. Вісн. Київ. нац. ун-ту імені Тараса Шевченка. Серія. Біологія. 2019;(3):54-7.

5. **Беляева АВ**, Афонин ВЮ. Влияние ресвератрола на изменения количества эндотелиальных прогениторных клеток, цитогенетических показателей и параметров клеточной кинетики в эксперименте. Новости медико-биол. наук. 2016;14(4):30-5.

6. **Беляева АВ**. Влияние ресвератрола и кандесартана на клеточный цикл, апоптоз и мобилизацию клеток CD117. Новости медико-биол. наук. 2013;8(3):64-8.

Тези наукових доповідей на конференціях:

1. **Beliaeva A**. Candesartan cilexetil and resveratrol stimulate mobilization

of CD117+ stem cells in C57Bl/6 mice. В: Матеріали Міжнар. наук.-практ. конф.-шк. студентів та молодих вчених BIOMED Talks – 2019; 2019 Жовт 15-17. Київ; 2019. с. 13-4.

2. **Beliaeva A.** Analysis of the effect of resveratrol on the number of stem cells, cytokinetic and cytogenetic parameters *in vitro*. In: Ninth International Medical Congress of the Southeast European Medical Forum (SEEMF); 2018 Sep 6-9; Teslic, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina. Teslic; 2018. p. 52-3.

3. **Beliaeva A.** P1983. Influence of candesartan cilexetil and resveratrol on changes in the number of stem cells, cytogenetic and cytokinetic parameters of bone marrow of mice. Eur J Heart Fail. 2018;20(Suppl S1, Abstracts of the Heart Failure 2018 and the World Congress on Acute Heart Failure; 2018 May 26-29; Vienna, Austria):517.

4. **Beliaeva AV.** Investigation of changes of cytokinetic and cytogenetic parameters in the experiment under the influence of candesartan, candesartan cilexetil and resveratrol. In: Eighth International Medical Congress of the Southeast European Medical Forum (SEEMF); 2017 Sep 7-10; Athens, Greece. Athens; 2017. p. 46-7.

5. **Beliaeva A.** P1813. Candesartan cilexetil and extract of Polygonum sp. influence on the number of stem cells *in vitro*. Eur J Heart Fail. 2016;18(Suppl 1, Abstracts of the Heart Failure 2016 Conference; 2016 May 21-24; Florence, Italy):436.

6. **Беляева АВ.** Влияние кандесартана цилексетила и ресвератрола на число стволовых клеток с CD117+, CD34+, CD117+/CD34+, CD31+ в исследовании *in vitro*. В: Тез. III Междунар. форума русскоговорящих врачей Новая волна в медицине; 2015 Авг 6-8; Рига – Юрмала, Латвия. Юрмала; 2015. с. 9.

7. **Beliaeva AV, Darafeyenka IS, Vlasenka AK, Sazanov VB, Afonin VYu.** The influence of candesartan and resveratrol on the mobilization of stem cells CD117 in C57Bl/6 mice. In: Abstracts book of the I International Scientific Conference of Students and PhD Students Cell Technology Week 2013; 2013 May 14-17; Kyiv. Kyiv; 2013. p. 28.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	16
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1	23
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	23
1.1 Основні уявлення про ангіогенез	23
1.2 Особливості стовбурових клітин.....	27
1.2.1 Ембріональні і фетальні стовбурові клітини.....	27
1.2.2 Стовбурові клітини пуповинної крові	29
1.2.3 Скелетні міобласти.....	29
1.2.4 Клітини-сателіти серцевого м'язу	31
1.2.5 Стовбурові клітини крові	31
1.2.6 Стовбурові клітини кісткового мозку	32
1.2.7 Стовбурові клітини жирової тканини	36
1.3. Фармакологічна регуляція стовбурових клітин	37
1.3.1 Гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор.....	37
1.3.2 Еритропоетин.....	38
1.3.3 Препарати класу тiazолідиндіонів (піоглітазон)	39
1.3.4 Гіпоглікемічні препарати (ситагліптин)	41
1.3.5 Інгібітори 3-гідрокси-3-метилглутарил-коензим А-редуктази (статины).....	42
1.3.6 Інгібітори ангіотензин-перетворюючого ферменту	43
1.3.7 Антагоністи рецепторів ангіотензину II (сартани).....	45
1.4 Використання природних сполук для лікування серцево-судинних захворювань	50
1.4.1 Патринія	50
1.4.2 Женьшень.....	51
1.4.3 Ресвератрол.....	52
Висновки до розділу I	54
РОЗДІЛ 2	55

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	55
2.1 Реактиви та обладнання.....	55
2.2 Об'єкти дослідження	56
<u>2.2.1</u> Експериментальні тварини	56
2.2.2 Культури клітин	56
2.3 Дослідження на експериментальних тваринах	57
2.3.1 Вивчення ефектів кандесартану цилексетилу і ресвератролу на цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики у мишей лінії C57Bl/6	57
2.3.2 Вивчення ефектів кандесартану цилексетилу і ресвератролу на цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики при фізичних навантаженнях у мишей лінії Balb/C	59
2.3.3 Вивчення показників токсичності кандесартану цилексетилу та ресвератролу	60
2.3.4 Методи введення досліджуваних речовин лабораторним тваринам.....	61
2.3.5 Методи забору крові у лабораторних тварин.....	61
2.3.6 Оцінка рухливості мишей	61
2.3.7 Оцінка маси тіла та внутрішніх органів лабораторних тварин	62
2.3.8 Дослідження кількості клітин з фенотипом CD117+ в кістковому мозку та в крові тварин.....	62
2.3.9. Оцінка цитогенетичних показників і параметрів клітинної кінетики кісткового мозку і крові тварин за допомогою проточної цитофлуориметрії.....	64
2.4 Дослідження <i>in vitro</i>	65
2.4.1 Дослідження впливу кандесартану цилексетилу, кандесартану і ресвератролу на зміни кількості клітин-попередників ендотелію, цитогенетичних показників і параметрів клітинної кінетики <i>in vitro</i> в культурах клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 і жирової тканини людини	65

2.4.2 Дослідження впливу кандесартану цилексетилу, кандесартану та ресвератролу на зміну кількості клітин з фенотипом CD117+, CD34+, CD117+/CD34+ та CD31+ <i>in vitro</i>	67
2.4.3 Аналіз впливу кандесартану цилексетилу, кандесартану та ресвератролу на зміну цитогенетичних показників та параметрів клітинної кінетики <i>in vitro</i>	67
2.4.4 Метилтетразолієвий тест на визначення інгібуючих концентрацій ресвератролу <i>in vitro</i>	70
2.5 Статистична обробка отриманих результатів	71
РОЗДІЛ 3	72
ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ КАНДЕСАРТАНУ ЦИЛЕКСЕТИЛУ, КАНДЕСАРТАНУ І РЕСВЕРАТРОЛУ НА ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ПОКАЗНИКИ І ПАРАМЕТРИ КЛІТИННОЇ КІНЕТИКИ <i>IN VITRO</i>	72
3.1 Вивчення впливу кандесартану цилексетилу, кандесартану та ресвератролу на зміни кількості клітин з CD117+ в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6	73
3.2 Вивчення впливу кандесартану цилексетилу, кандесартану і ресвератролу на цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6	81
3.3 Вплив кандесартану цилексетилу, кандесартану і ресвератролу на число клітин з CD117+, CD34+, CD117+/CD34+ і CD31+ в культурі клітин жирової тканини людини	90
3.4 Вплив кандесартану цилексетилу, кандесартану і ресвератролу на цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики в культурі клітин жирової тканини людини	96
Висновки до Розділу 3	105
РОЗДІЛ 4	107
ВИВЧЕННЯ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ПОКАЗНИКІВ І ПАРАМЕТРІВ КЛІТИННОЇ КІНЕТИКИ КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА КРОВІ ТВАРИН ПРИ ЗАСТОСУВАННІ КАНДЕСАРТАНУ ЦИЛЕКСЕТИЛУ І РЕСВЕРАТРОЛУ ..	107

4.1 Вивчення впливу кандесартану цилексетилу і ресвератролу на число клітин з CD117+ в кістковому мозку і в крові мишей лінії C57Bl/6	107
4.2 Дослідження цитогенетичних показників і параметрів клітинної кінетики кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 при використанні кандесартану цилексетилу і ресвератролу.....	111
4.3 Дослідження цитогенетичних показників і параметрів клітинної кінетики крові мишей лінії C57Bl/6 при використанні кандесартану цилексетилу і ресвератролу.....	120
4.4 Вплив кандесартану цилексетилу і ресвератролу на зміну відносної маси серця мишей лінії C57Bl/6	126
4.5 Дослідження рухової активності мишей лінії C57Bl/6 при короткочасному і тривалому введенні кандесартану цилексетилу і ресвератролу	128
Висновки до розділу 4	135
РОЗДІЛ 5	137
ДОСЛІДЖЕННЯ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ПОКАЗНИКІВ І ПАРАМЕТРІВ КЛІТИННОЇ КІНЕТИКИ КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА КРОВІ ТВАРИН ПРИ ФІЗИЧНИХ НАВАНТАЖЕННЯХ, А ТАКОЖ ПРИ ПОДАЛЬШОМУ ЗАСТОСУВАННІ КАНДЕСАРТАНУ ЦИЛЕКСЕТИЛУ І РЕСВЕРАТРОЛУ ..	137
5.1 Вивчення впливу фізичних навантажень і подальше застосування кандесартану цилексетилу і ресвератролу на число клітин з CD117+ в кістковому мозку і в крові мишей лінії Balb/C	137
5.2 Вивчення впливу фізичних навантажень і подальшого застосування кандесартану цилексетилу і ресвератролу на цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики кісткового мозку мишей лінії Balb/C.....	140
5.3 Вивчення впливу кандесартану цилексетилу і ресвератролу на цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики крові мишей лінії Balb/C при фізичних навантаженнях.....	146
5.4 Вплив кандесартану цилексетилу і ресвератролу на зміну маси серця мишей лінії Balb/C при фізичних навантаженнях	155

Висновки до розділу 5	157
РОЗДІЛ 6	159
ВИВЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ТОКСИЧНОСТІ КАНДЕСАРТАНУ ЦИЛЕКСЕТИЛУ І РЕСВЕРАТРОЛУ	159
Висновки до розділу 6	161
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	162
ВИСНОВКИ.....	170
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	172
Додаток 1	203

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АГ	–	артеріальна гіпертензія
АПФ	–	ангіотензин-перетворюючий фермент
АТ	–	ангіотензин
Г-КСФ	–	гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор
ГСК	–	гемопоетичні стовбурові клітини
ДНК	–	дезоксирибонуклеїнова кислота
ЖК	–	жирні кислоти
ІХС	–	ішемічна хвороба серця
ІМ	–	інфаркт міокарда
ЛШ	–	лівий шлуночок
ЛС	–	лікарська сировина
МСК	–	мезенхімальні стовбурові клітини
ВКМ	–	відносний коефіцієнт маси
ЗПОС	–	Загальний периферичний опір судин
РНК	–	рибонуклеїнова кислота
ЦД	–	цукровий діабет
СКЖТ	–	стовбурові клітини жирової тканини
ССЗ	–	серцево-судинні захворювання
ССС	–	серцево-судинні система
ФВЛШ	–	фракція викиду лівого шлуночка
ФНП	–	фактор некрозу пухлин
ЕПК	–	ендотелиальні прогеніторні клітини
ЕСК	–	ембріональні стовбурові клітини
HDACs	–	histone deacetylases, деацетилази гістонів
PBS	–	phosphate buffered saline, фосфатно-сольовий буфер
PPARs	–	peroxisome proliferator-activated receptors,

рецептори, які активуються регулятором
проліферації пероксисом

- SDF-1 – stromal cell-derived factor-1, фактор стромальних клітин-1
- VEGF – vascular endothelial growth factor, ендотеліальний фактор росту

ВСТУП

Актуальність теми. Серцево-судинні захворювання (ССЗ) сьогодні є одними з найпоширеніших патологій у всьому світі. В основі цих захворювань лежать порушення нормального функціонування та цілісності серцевого м'яза і судин. Ішемічна хвороба серця (ІХС), інфаркти та інсульти є одними з найпоширеніших і небезпечних хвороб. ССЗ є основною причиною смертності населення у всіх країнах, причому спостерігається тенденція до розвитку цих патологій у людей молодшого віку. Патології системи кровообігу є причиною близько 17 мільйонів смертельних випадків щорічно в світі, що становить 30% від усіх смертей [1, 2]. Згідно прогнозів Всесвітньої організації охорони здоров'я до 2030 року приблизно 23,6 мільйонів осіб у всьому світі помре від ССЗ, головним чином, від захворювань серця та інсультів [3]. Саме тому, розробка інноваційних ефективних і безпечних методів профілактики, діагностики та лікування захворювань серця і судин, створення нових ліків і їх комбінацій сьогодні є актуальними в усьому світі.

Останнім часом для лікування різних захворювань, включно із ССЗ, широко використовуються клітинні технології, які можна розділити в цілому на два способи. Перший спосіб полягає в отриманні стовбурових клітин та клітин-попередників в системі *in vitro* з наступним введенням їх в кровоток і/або імплантацією в пошкоджені тканини і органи [4 – 6]; другий – в ендогенній індукції утворення стовбурових клітин і клітин-попередників в організмі з метою активації процесів репарації введенням речовин, в тому числі регуляторів рецепторів, що активуються пероксисомними проліфераторами (PPARs), а також інгібіторів деацетилаз гістонів (HDACs) [7 – 11]. Ці речовини часто використовуються для мобілізації і отримання стовбурових клітин, які в подальшому виділяються з крові для маніпуляцій *in vitro* (перший спосіб). Як було показано на тваринах у разі ССЗ мобілізовані стовбурові клітини і клітини-попередники ендотелію здатні мігрувати в серцевий м'яз і ендотелій з подальшим позитивним терапевтичним ефектом [12 – 14].

Таким чином, дослідження можливості застосування різних лікарських засобів, зокрема, гіпотензивного засобу кандесартану цилексетилу/кандесартану (регулятор PPARs), а також природних сполук, таких як ресвератрол (регулятор PPARs і HDACs), які мають потенційний ефект стимуляції утворення ендотеліальних прогеніторних клітин, за новим призначенням, а саме для мобілізації стовбурових клітин і клітин-попередників ендотелію в кістковому мозку і збільшення їх кількості в крові, є актуальним для лікування ССЗ.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках бюджетної тематики «Розробка методичних рекомендацій використання хондропротекторів та мультипробіотиків для корекції патології суглобів» (№ д/р 0118U000243, 2018-2020 рр.) фундаментальної програми «Цито-і гістологічні ефекти метаболічних та проліферативних порушень та способи їх корекції» (№ д/р 0120U103507, 2020 – 2023рр).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягала у визначенні цитогенетичних та морфофункціональних показників стовбурових клітин за дії кандесартану цилексетилу/кандесартану та ресвератролу в різних концентраціях та співвідношеннях в експерименті.

Відповідно до поставленої мети вирішувались наступні завдання:

1. Вивчити *in vitro* на моделях кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 і жирової тканини людини вплив кандесартану цилексетилу, кандесартану і ресвератролу в різних концентраціях і співвідношеннях на вміст ендотеліальних прогеніторних клітин, апоптичних клітин, клітин з мікроядрами і розподіл клітин за фазами клітинного циклу;

2. вивчити *in vivo* на моделях експериментальних тварин вплив кандесартану цилексетилу і ресвератролу в різних дозуваннях і співвідношеннях на рівень ендотеліальних прогеніторних клітин, апоптичних клітин, клітин з мікроядрами і розподіл клітин за фазами клітинного циклу в кістковому мозку і в крові;

3. визначити цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики кісткового мозку і крові тварин при фізичних навантаженнях та при подальшому застосуванні кандесартану цилексетилу і ресвератролу.

Об'єкти і предмет дослідження. Основними *об'єктами* дослідження були культури клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6, жирової тканини людини, миші ліній Balb/C, C57Bl/6, миші ICR. *Предмет дослідження* – ендотеліальні прогеніторні клітини, апоптичні клітини, клітини з мікроядрами, клітинний цикл.

Методи дослідження: цитофлуориметричний, молекулярно-біологічні, біохімічні та імунологічні методи, методи клітинної біології, культура клітин, методи експериментальної біології, методи статистичного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше встановлено, що антагоніст рецепторів ангіотензину II кандесартану цилексетил збільшує вміст ендотеліальних прогеніторних клітин *in vivo* (експерименти на мишах ліній C57Bl/6 і Balb/C), а його активна форма кандесартан призводить до стимуляції утворення ендотеліальних прогеніторних клітин *in vitro* (дослідження на культурах клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 і жирової тканини людини). Вперше виявлено, що сумісне застосування кандесартану або кандесартану цилексетилу з природним антиоксидантом ресвератролом, призводить до збільшення кількості клітин-попередників ендотелію *in vitro* і *in vivo*, і є більш безпечним порівняно з використанням тільки кандесартану або кандесартану цилексетилу, оскільки дозволяє в 2 рази знизити дозу синтетичних речовин, що мають побічну дію, яка проявляється у вигляді збільшення кількості клітин з ушкодженнями генетичного матеріалу, при цьому не втрачається ефект стимуляції утворення ендотеліальних прогеніторних клітин. Отримані дані вносять істотний внесок в розвиток уявлень про мобілізацію ендотеліальних прогеніторних клітин за допомогою використання речовин, які є регуляторами PPARs і інгібіторами HDACs.

Практичне значення одержаних результатів. Результати дисертаційної роботи доводять, що антагоніст рецепторів ангіотензину II кандесартан, який є регулятором рецепторів, що активуються пероксисомними проліфераторами

(PPARs), призводить до збільшення кількості ендотеліальних прогеніторних клітин з фенотипом CD117+ у тварин *in vivo* (при використанні кандесартану цилексетилу) та *in vitro* (при використанні кандесартану), проявляючи при цьому негативну побічну дію, що складається в збільшенні числа клітин з ушкодженнями генетичного матеріалу.

Показано, що природний антиоксидант ресвератрол, який є регулятором рецепторів, що активуються пероксисомними проліфераторами (PPARs), і інгібітором деацетилаз гістонів (HDACs), стимулює утворення ендотеліальних прогеніторних клітин *in vitro* та *in vivo* і не є цитотоксичним.

За сумісного використання ресвератролу з кандесартаном (*in vitro*) і ресвератролу з кандесартану цилексетилом (*in vivo*) спостерігається односпрямована дія обох комбінацій, що проявляється у збільшенні числа клітин-попередників ендотелію з фенотипом CD117+, рівного або вищого ефекту ніж лише при застосуванні кандесартану/кандесартану цилексетилу. При цьому ресвератрол компенсує негативну побічну дію відповідної форми антагоніста рецепторів ангіотензину II.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто здійснено постановку цілей і завдань, обрані моделі експериментальних досліджень, вивчено вплив речовин (кандесартану цилексетилу, кандесартану, ресвератролу) і їх комбінацій на зміни числа ендотеліальних прогеніторних клітин, апоптичних клітин, клітин з мікроядрами і розподіл клітин за фазами клітинного циклу *in vitro* і *in vivo*. Самостійно розроблена нова модель дослідження показників кісткового мозку і крові, що включає кількісний аналіз ендотеліальних прогеніторних клітин, проведення досліджень рівня апоптичних клітин, клітин з мікроядрами і розподілу клітин за фазами клітинного циклу. Аналіз результатів досліджень, формулювання висновків, статистична обробка отриманих даних, написання дисертації, підготовка та опублікування статей у рецензованих виданнях, у матеріалах конференцій і тез доповідей здійснено здобувачем самостійно. Планування досліджень та обговорення результатів проводились спільно з науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Основні результати роботи були представлені на I International Scientific Conference of Students and PhD Students «Cell Technology Week 2013» (Kiev, Ukraine, 2013); Міжнародному форумі лікарів «Новая волна в медицине» (Рига – Юрмала, Латвія, 2015); Heart Failure (Florence, Italy, 2016); Eighth International medical congress of the Southeast European Medical Forum (Athens, Greece, 2017); Heart Failure 2018 & World Congress on Acute Heart Failure (Vienna, Austria, 2018); Ninth International Medical Congress of the Southeast European Medical Forum (Banja Vrućica, Bosnia and Herzegovina, 2018), міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених BIOMED Talks – 2019 (Київ, Україна, 2019).

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 6 статей у фахових виданнях, затверджених переліком МОН України та у міжнародних періодичних виданнях (4 публікації у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз, в тому числі Index Copernicus), та 7 тез доповідей у збірниках матеріалів конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 269 найменувань. Дисертацію викладено на 204 сторінках друкованого тексту та проілюстровано 17 рисунками та 11 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Основні уявлення про ангіогенез

Ангіогенез є поширеним біологічним явищем, яке характерне для ссавців, у тому числі і для людини. Ангіогенез – складний процес формування нових кровоносних судин, який є фундаментальним у регуляції роботи системи кровообігу. Найбільш активно процеси ангіогенезу відбуваються у фетальному періоді. У дорослої людини інтенсивність росту і відновлення кровоносних судин низька. Однак при патологічних станах відбувається активізація процесів розвитку клітин судин. Цей факт дозволяє говорити про компенсаторні реакції, які, своєю чергою, спрямовані на зміну умов кровообігу [15, 16].

Ангіогенез складається з ряду послідовних етапів, серед яких виділяють наступні: а) активація ендотеліальних клітин і перицитів; б) деградація базальної мембрани; в) міграція і проліферація ендотеліальних клітин і перицитів; г) утворення просвіту в новій капілярній судині; д) утворення перицитів навколо нового капіляра; е) поява нової базальної мембрани; е) утворення капілярних петель; ж) інволюція колишніх і диференціювання нових судин; з) створення капілярної мережі; і) формування великих за розміром судин [1].

Активація, міграція, проліферація і реорганізація клітин ендотелію регулюється про- і антиангіогенними механізмами. Дія хронічного гіпоксичного стану опосередковується ефектами низьки цитокінів [17, 15, 18]. Основними найбільш важливими проангіогенними (стимулюючими) медіаторами ангіогенезу є фактор росту фібробластів, ендотеліальний фактор росту (VEGF), ангіогенін, фактор росту тромбоцитів, трансформуючий фактор росту бета, фактор некрозу пухлини. До негативних регуляторів процесу ангіогенезу належать інгібітори металопротеїназ, альфа-інтерферон, тромбоцитарний фактор типу 4 та ін. [1; 16].

При вивченні ангіогенезу велика увага приділяється рецепторам, які активуються лігандами пероксисом (PPARs). PPARs є компактними білковими

молекулами, які мають у своєму складі близько 500 амінокислотних залишків, і розташовані поблизу дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) всередині ядер клітин. Ці рецептори активуються шляхом зв'язування з лігандами з подальшим приєднанням до специфічних ділянок ДНК-активатором проліферації пероксисом, які пов'язані з промоторами генів-регуляторів транскрипції. У тварин і людини існують 3 види PPARs: PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ , які кодуються генами PPARG, PPARG і PPARG [19, 20]. PPAR α експресуються в основному в тканинах з високим рівнем катаболізму жирних кислот (ЖК) – мозок, печінка, жирова тканина, серце, скелетні м'язи, нирки. У цих тканинах PPAR α регулює роботу генів, що відповідають за метаболізм ЖК, опосередковує баланс між ЖК клітини і метаболізмом глюкози, особливо при фізіологічному або метаболічному стресах (гіпертрофія міокарда, ішемія, серцева недостатність і резистентність до інсуліну). PPAR β/δ – ядерний гормональний рецептор, який експресується у всіх тканинах. Важливою є його участь в окисненні ЖК в адіпоцитах і скелетних м'язах. PPAR β/δ – медіатор чутливості до інсуліну. Цей рецептор безпосередньо пов'язаний з процесами гіпертрофії міокарда і ожиріння через інгібування ядерного фактора каппа В (NF- κ B) [19, 21, 22]. Встановлено, що продукція PPAR β/δ збільшується в ході фізичних вправ поряд з посиленням секреції інтерлейкіна (ІЛ)-6 в м'язах [23]. PPAR γ існують у трьох ізоформах. PPAR γ 1 і 3 мають ідентичну структуру, але відрізняються на рівні синтезу. PPAR γ 1 і 2 – результат розщеплення відповідної інформаційної рибонуклеїнової кислоти (іРНК). При цьому PPAR γ 2 має додаткові 28 амінокислоти в N-кінцевій області. PPAR γ експресується головним чином в ендотелії судин, жировій тканині, макрофагах, кишечнику і селезінці, меншою мірою – в серці, скелетних м'язах, печінці та інших тканинах [20, 24].

В процесі ангиогенезу також велика роль відводиться механізму "хоумінгу"^о – здатності клітин мігрувати в органи-мішені (орган, тканину або в зону пошкодження). Міграція зумовлена біохімічними сигналами, що поступають із зони пошкодження, системою рецепції клітини і здатністю до хемотаксису. Найкраще вивчений "хоумінг" гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК). Факторами "хоумінгу" для цих клітин є білок SDF-1 (stromal-derived factor), білок

IGF-1 (insulin-like growth factor-1). SDF-1 продукується стромальними клітинами кісткового мозку і утримує ГСК у стовбуровій ніші, тобто особливому клітинному мікрооточенні, що дозволяє клітинам зберігати свої властивості, перебуваючи в стані «арешту», і координувати свою поведінку з потребами організму. У мишей при генетичному ушкодженні SDF-1 спостерігаються важкі розлади гемопоезу ще при ембріогенезі, що пояснюють порушенням міграції ГСК з органів раннього гемопоезу в кістковий мозок [17, 25]. Гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (Г-КСФ), як основний цитокін для мобілізації стовбурових клітин кісткового мозку, є функціональним антагоністом SDF-1. Вважається, що він активує ферменти нейтрофілів, які порушують взаємодію SDF-1 зі своїм рецептором CXCR-4 у стовбуровій ніші і звільняє клітини [26]. Надекспресія SDF-1 у трансгенних мишей викликає мобілізацію ГСК у системний кровотік [27].

Неоангіогенез і збільшення щільності капілярів при місцевому збільшенні концентрації SDF-1 були відзначені у мишей при моделюванні ішемії кінцівок. SDF-1 вводили після проведення трансплантації людських ендотеліальних прогеніторних клітин (ЕПК). Спостерігали значне збільшення концентрації введених клітин в областях ін'єкцій білка [28].

Для IGF-1 показано, що локальне збільшення його концентрації в пошкодженому м'язі призводить до стимуляції міграції клітин кісткового мозку. IGF-1-трансгенним опроміненим мишам вводили мічені зеленим флуоресцентним білком (green fluorescent protein, GFP) клітини кісткового мозку, після чого через 2 і 6 тижнів викликали токсичне ушкодження м'язів нижніх кінцівок тварин введенням токсину. Міотоксин призводив до локального підвищення кількості IGF-1 в пошкодженій м'язовій тканині, що викликало міграцію клітин з ендотеліальними маркерами CD45, c-kit, Sca-1 з кісткового мозку. Спостерігалось 4 – 5-кратне збільшення числа стовбурових клітин кісткового мозку в м'язі в порівнянні зі здоровими тваринами; також виявлено збільшення рівнів продуктів регенерації м'язів і ознаки можливого міогенного трансдиференціювання клітин кісткового мозку [29].

Існує також механізм дії на стовбурові клітини через деацетилази гістонів (HDACs). Останні є ферментами, що каталізують видалення ацетильної групи ε-N-ацетил-лізину гістонів, модифікація яких призводить до зміни експресії генів. Гістондеацетилази беруть участь в гіпоацетилюванні, що призводить до зменшення відстані між нуклеосою і нанизаною на неї ДНК, і зменшує доступність останньої для транскрипційних факторів. Відповідно спостерігається репресія транскрипції. Існує ряд інгібіторів HDACs, серед яких виділяють як прості сполуки (бутират), так і складні, отримані з грибів і бактерій (ТСА, тапоксін). HDACi витісняють іони цинку з області активного центру HDACs, інактивуючи систему зміни зарядів [30 – 32]. Сьогодні існують дані про вплив інгібіторів HDACs на процеси ангіогенезу, мобілізації стовбурових клітин, ЕПК [10, 11].

Таким чином, останнім часом багато дослідників вивчають можливість нормалізації кровообігу і скорочувальної здатності міокарда при ІХС шляхом стимуляції ангіогенезу і міогенезу. Оскільки ендогенної експресії ангіогенних факторів при ішемії недостатньо для розвитку колатерального кровотоку, необхідна екзогенна стимуляція, що і є завданням терапевтичного ангіогенезу. З цією метою використовують власне ангіогенні фактори і кодують їх гени, причому застосування генних технологій є кращим варіантом, ніж власне готових білків, так як введені гени підтримують більш тривалу і стабільну експресію проангіогенних факторів. Також актуальним є дослідження дії клітин-попередників на процеси відновлення судин (ембріональні стовбурові клітини, скелетні міобласти, клітини гладеньких м'язів, клітини кісткового мозку та ін.). Керований процес неоваскуляризації міокарда або периферичних тканин – це альтернатива таким складним методам лікування, як ангіопластика, аортокоронарне шунтування. Однак реалізація подібного підходу може бути обмежена потенційно негативним ефектом неоваскуляризації і несприятливим впливом ряду індукторів ангіогенезу (наприклад, VEGF) на процес атерогенезу.

1.2 Особливості стовбурових клітин

Стовбурові клітини – популяція незрілих, недиференційованих клітин, які мають здатність до довгострокового самовідтворення і диференціювання в будь-який тип тканини дорослого організму. Існує поняття про наївні стовбурові клітини, такі як ембріональні, фетальні, стовбурові клітини пуповинної крові. Для цих клітин характерні найбільший потенціал диференціювання, самооновлення, плюрипотентності. Однак їх використання в клініці обмежено, що пов'язано з етичною стороною питання [33, 17].

У дорослому організмі виділяють постнатальні стовбурні клітини. Основними місцями локалізації цих клітин є кістковий мозок (де знаходяться мезенхімальні (стромальні) стовбурові клітини (МСК), ендотеліальні прогеніторні клітини (ЕПК) і гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК)), скелетні м'язи і жирова тканина. Також в кожному органі існує власний резерв тканинних стовбурових клітин, активація якого відбувається під впливом певних біологічно активних речовин при виникненні пошкоджень органу. У серцевому м'язі клітини з описаними властивостями називаються м'язовими «клітинами-сателітами». Однак для них характерні гетерогенність і незначна кількість в органі, що визначає невисоку швидкість перетворення в необхідні органоспецифічні клітини, а також низьку здатність до взаємного трансдиференціювання [33, 34].

1.2.1 Ембріональні і фетальні стовбурові клітини

Вперше стабільні клітинні лінії ембріональних стовбурових клітин (ЕСК) людини були отримані в 1998 році Дж. Томсоном [35]. Ці клітини формуються на 5-у добу після запліднення і є найбільш раннім типом популяції стовбурових клітин. ЕСК плюрипотентні, а також мають високу проліферативну активність. ЕСК здатні до необмеженої кількості мітотичних поділів і диференціювання в будь-який вид соматичної клітини, включаючи кардіоміоцити. У ЕСК мишей здатність диференціюватися в кардіоміоцити вище в порівнянні з людськими. Також в експерименті на щурах було показано, що ЕСК стимулюють продукцію

VEGF, дія якого в свою чергу направлена на захист міокарда від можливих ушкоджень [17, 36, 37]

У 2001 році отримано кардіоміоцити з ЕСК людини: після спонтанного диференціювання були відзначені скоротливі клітини на 4 – 22 добу після транспозиції ембріодних тіл на желатинізоване живильне середовище [38]. На сингенних щурах показана здатність неонатальних кардіоміоцитів, отриманих у тих же щурів, колонізувати інфарктну область. Вживання тварин після лігування коронарної артерії зберігалось мінімум протягом 6 місяців. У експериментальної групи зменшилось систолічне випинання інфарктної зони, збільшилася фракція викиду лівого шлуночка (ФВЛШ), товщина стінки лівого шлуночка (ЛШ) була більше [39]. Після трансплантації неонатальних кардіоміоцитів в зону інфаркту міокарда (ІМ) виявлено поліпшення регіонального кровопостачання міокарда, зниження систолічного і діастолічного обсягів ЛШ, зменшення маси інфарктної ділянки [40].

Фетальні стовбурові клітини – це клітини, які отримують після абортів з плодового матеріалу. У зв'язку з цим використання цього матеріалу зачіпає етичні питання. Також при застосуванні цієї групи стовбурових клітин існує ризик розвитку ряду вірусних інфекцій. При дослідженні впливу фетальних кардіоміоцитів на процеси ремоделювання ЛШ щурів встановлено зменшення дилатації ЛШ, збільшення товщини інфарктної області, збільшення ФВЛШ. На фоні введення цих клітин в перикард дорослих сингенних щурів спостерігалася здатність клітин приживатися в місцях пошкодження серцевого м'яза, а також відбувалася експресія кардіоспецифічних білків (α -саркомерного актину і коннексина-43) [41, 8].

Таким чином, використання ЕСК і фетальних стовбурових клітин є перспективним видом клітинної терапії, проте існують і негативні сторони застосування цих клітин: розвиток злоякісних новоутворень, можливість зараження різними інфекційними захворюваннями, а також моральні аспекти. Тому використання цих клітин здійснюється тільки в експериментальних дослідженнях.

1.2.2 Стовбурові клітини пуповинної крові

Пуповинна кров – найбільш повноцінне і доступне джерело стовбурових клітин, таких як МСК, мононуклеарні стовбурові клітини, клітини-попередники ендотелію, стимулюючі фактори росту, які мають високу проліферативну активність. Переваги використання цього типу клітин полягає в тому, що для них характерна здатність до швидкого диференціювання, клітини пуповинної крові досить легко виділяти, спостерігається низька ймовірність імунного відторгнення і побічних ефектів, а також існує можливість їх зберігання протягом тривалого періоду часу [42, 43] .

Було показано, що клітини з ендотеліальними маркерами CD34 і CD133, отримані з пуповинної крові, мають здатність до диференціювання в зрілі ендотеліальні і м'язові клітини, а також стимулюють процеси неоваскуляризації ішемізованої скелетної м'язової структури [44]. На щурах було встановлено, що клітини CD133+, виділені з пуповинної крові, мігрують, колонізують і проліферують в області ішемії при інфаркті міокарда. Деякі клітини диференціювалися в клітини, що беруть участь у свою чергу в процесі неоангіогенезу. Також було зафіксовано результат запобігання дисфункції і ремоделювання ЛШ [45].

Таким чином, терапія стовбуровими клітинами пуповинної крові є ефективним способом лікування ССЗ, який супроводжується низькою ймовірністю розвитку імунної відповіді, що дозволяє говорити про достатню безпеку використання цього методу.

1.2.3 Скелетні міобласти

Скелетна м'язова тканина здатна самовідновлюватися і регенерувати. Ця властивість пов'язана з наявністю незрілих клітин-сателітів і міобластів [46]. Застосування скелетних міобластів в клітинній кардіоміопластиці є перспективним напрямком, оскільки спостерігається відсутність імунної відповіді при трансплантації, процес виділення клітин досить простий (проводиться біопсія

м'язу), також не виникає питання про порушення етичних норм. Однак існує ряд проблем при використанні цього методу. Основна з них це розвиток порушень серцевого ритму, що може призвести до раптової смерті пацієнта. У дослідженнях, проведених на тваринах, а також в клінічних випробуваннях, трансплантація скелетних міобластів приводила до значних шлуночкових порушень ритму, причина яких полягала в природній електричній нестабільності міоциту, що призвело до необхідності імплантувати кардіовертер-дифібрилятор пацієнтам перед проведенням клітинної терапії [47]. Слід зазначити, що скелетна м'язова тканина морфологічно відрізняється від серцевої: вона не може здійснювати ритмічне скорочення, здатна до розвитку раптової слабкості і тетанії. При введенні пацієнтам в довколорубцеву зону виділених з стегового м'язу міобластів відзначено приживлення останніх в зоні ІМ. Відзначено поліпшення стану пацієнтів. Однак спостерігався і небажаний ефект – розвиток важких порушень ритму [48]. При інтраміокардіальному введенні аутологічних скелетних міобластів пацієнтам, які перенесли обширний ІМ передньої стінки ЛШ, в область рубця спостерігалось потовщення стінки міокарда в області ін'єкції, збільшення ФВЛШ [49]. Описувані клітини стійкі до ішемії. Тому скелетні міобласти здатні виживати і нормально функціонувати в ішемізованому міокарді, для якого характерне недостатнє кровопостачання [50].

Існують результати дослідження спільного застосування коронарної ангіопластики та трансплантації аутологічних міобластів у пацієнтів з ІМ. За допомогою навантажувальної ехокардіографії з добутамином визначали області акінезії і дискінезії, куди в подальшому вводили аутологічні міобласти, отримані при біопсії стегового м'язу. Відзначено збільшення ФВЛШ у пацієнтів, однак у двох з десяти людей зафіксовано розвиток шлуночкової тахікардії [51]. Отримано результати комбінованого використання прогеніторних клітин і скелетних міобластів у щурів з ішемічною кардіоміопатією. У тварин з ІМ в пошкоджену область і в перинфарктну зону робили ін'єкцію клітин CD133+ людини і скелетних міобластів щурів, в результаті чого зменшилася площа інфаркту зони,

збільшилася ФВЛШ, знизився індекс апоптозу, змінилася щільність капілярів [52].

Можна зробити висновок, що використання скелетних міобластів має як позитивні, так і негативні моменти. До перших відноситься досить простий спосіб виділення міобластів, аутологічного субстрату, відсутність етичних проблем. Однак високий ризик настання раптової смерті через шлуночкові порушення ритму, необхідність імплантації кардіовертерів-дефібриляторів та складності ведення таких пацієнтів обмежують використання скелетних міобластів в клітинній кардіоміопластиці.

1.2.4 Клітини-сателіти серцевого м'язу

У міокарді виявлена субпопуляція клітин з фенотипом $lin-/CD117+$, які знаходяться в місцях пошкодження і мобілізуються при порушеннях. Активація цих клітин відбувається в результаті індукції експресії фактора стовбурових клітин після ішемії міокарда [53]. Трансплантація клітин $lin-/CD117+$ сприяє регенерації ендотелію, міокарду і клітин гладеньких м'язів, покращує серцеву діяльність у мишей з артеріальною оклюзією, знижує кінцевий діастолічний тиск ЛШ; нові міоцити експресують міоцитарний індукуючий фактор (MEF-2), специфічний кардіальний транскрипційний фактор (GATA-4) і коннексин [12].

1.2.5 Стівбурові клітини крові

У крові постійно циркулюють стівбурові клітини. Як правило, це клітини CD34+. Дослідження в галузі клітинної терапії з використанням цієї популяції клітин показали позитивні результати у тварин [54]. Вивчена інтраміокардіальна трансплантація стівбурових клітин крові у людей з дилатаційною кардіоміопатією та ішемічною кардіоміопатією без можливості немедикаментозної терапії. Стівбурові клітини виділяли з крові шляхом гемофореза, після чого вводили інтраміокардіально, що призвело до поліпшення ФВЛШ, зменшення функціонального класу хронічної серцевої недостатності за класифікацією Нью-Йоркської асоціації серця (ФК ХСН за NYHA) [55].

1.2.6 Стівбурові клітини кісткового мозку

Для гемопоетичних фракцій клітин з фенотипом CD34+/CD117+/lin- характерне самовідновлення, диференціація в спеціалізовані уніпотентні клітини, виділення в кров з кісткового мозку і схильність до процесів апоптозу. Використовується цей тип клітин при лікуванні онкологічних захворювань, гемобластозів і захворювань імунної системи. Також встановлено, що ГСК не диференціюються в кардіоміоцити. Введення інтраміокардіально мишам таких клітин в область ІМ і в нормальний серцевий м'яз показало, що ГСК не можуть служити джерелом клітинної кардіоміопластики [56].

Мезенхімальні стівбурові клітини (МСК) або ж стромальні стівбурові клітини знаходяться у крові і в кістковому мозку та беруть участь в гемопоезі шляхом синтезу факторів росту, цитокінів, молекул адгезії та інтегринів. МСК є мультипотентними клітинами [54]

«Дорослі» стівбурові клітини, які використовуються для клітинної кардіоміопластики, є аутологічним субстратом. Застосування алогенних МСК не запускає процес відторгнення «трансплантат проти господаря». Ці клітини мають низьку експресію молекул головного комплексу гістосумісності II класу і дефіцит ко-стимулюючої поверхневої молекули В-7, яка бере участь в процесі активації Т-клітинної імунної відповіді, що дозволяє використовувати в клітинній терапії також алогенних МСК [57].

Міграція цього типу клітин до місць пошкодження («хоумінг»-ефект) при ішемії і гіпоксії зумовлена виробленням цитокінів та експресією молекул адгезії, що запускають механізм міграції клітин. Після ІМ в серцевому м'язі збільшується рівень металопротеїнази-9, яка бере участь в регуляції мобілізації стівбурових клітин з кісткового мозку [12]. Відомо, що фактор стромальних клітин, а також хемокіни класів CC, CXC і CX (3) C індукують трансміграцію стівбурових клітин кісткового мозку в ендотелій. У пацієнтів з ішемічною кардіоміопатією міграційна відповідь, яку досліджували на клітинах з CD34+/CD133+, CD49d+ і CXCR4+, нижче при дії VEGF і фактора-1 стромальних клітин в порівнянні зі

здоровими особами, що говорить про можливу початкову дисфункцію стовбурових клітин кісткового мозку у пацієнтів з вказаним захворюванням. Цей факт свідчить про обмеження терапевтичного потенціалу кардіоміопластики з використанням аутологічних клітин [58].

Г-КСФ також відіграє важливу роль в процесі «хоумінгу» і диференціювання МСК. Введення фактора стовбурових клітин і Г-КСФ за 5 днів до і через 3 дні після експериментального ІМ призводить до збільшення числа клітин $\text{lin}^-/\text{CD117}^+$, включаючи МСК, збільшення ФВЛШ, зменшення зони ІМ, зниження числа апоптичних клітин [59]. У свині при трансендокардіальному введенні аутологічних клітин кісткового мозку в область ІМ відзначено поліпшення колатерального кровотоку і функції міокарда [60]. Аналогічні дані отримані у щурів: після введення мононуклеарних клітин кісткового мозку виявлено збільшення числа колатеральних судин, поліпшення ФВЛШ. Ендотеліальні клітини кісткового мозку експресували VEGF, фактор росту фібробластів, ІЛ-1 β , ангіопротейн, ФНП, які беруть участь в ангіогенезі [61]. У щурів з гіпертрофією «перевантаження» показано, що при інтракоронарному введенні МСК поліпшується систолічна функція ЛШ, збільшується толерантність до фізичних навантажень, знижується рівень ІЛ-1, ІЛ-6, ФНП і мозкового натрійуретичного пептиду. [62].

Після трансплантації аутологічних МСК кісткового мозку у тварин і в деяких дослідженнях у людини спостерігалось транзиторне збільшення рівня мозкового натрійуретичного пептиду, незважаючи на поліпшення роботи серця і підвищення толерантності до фізичних навантажень. Можливо, це можна розглядати як ознаку кардіоміогенезу [63].

У людей, що піддавалися клітинній терапії, зафіксоване достовірне збільшення ФВЛШ, зниження ймовірності смертельного випадку, повторного ІМ і необхідність повторної реваскуляризації [64].

У 2003 році з'явилися результати першого клінічного дослідження з аналізу використання аутологічних МСК у пацієнтів з ХСН. У людей з ХСН після терапії

виявлено зниження ФК ХСН за NYHA, збільшення ФВЛШ, збільшення толерантності до фізичного навантаження [65].

Таким чином, мультипотентність МСК, прості методи культивування, можливість криозберігання, мінімальний вплив на імунну систему дозволяють використовувати цей тип клітин в якості оптимального джерела клітинної кардіоміопластики.

Виділення аутологічних мононуклеарних стовбурових клітин кісткового мозку значно дешевше і швидше в порівнянні з роботою з істинними МСК. В результаті проведеного нерандомізованого відкритого дослідження трансендокардіального введення аутологічних мононуклеарів кісткового мозку пацієнтам з термінальною стадією ХСН встановлено, що через 4 місяці після введення аутологічних мононуклеарів зменшувався кінцевий систолічний об'єм ЛШ, збільшувалася ФВЛШ, виявлялася позитивна динаміка при аналізі скоротувальної функції і перфузії міокарда, що свідчить про стимуляцію ангиогенезу [66]. У пацієнтів з рефрактерною стенокардією та ішемічною кардіоміопатією при застосуванні аутологічних мононуклеарних клітин кісткового мозку спостерігалася зменшення функціонального класу стенокардії, поліпшення скоротливості ЛШ, зменшення кількості зон ішемії, збільшення ФВЛШ, поліпшення якості життя хворих [67].

При проведенні пацієнтам з рефрактерною стенокардією та ішемією трансендокардіальної ін'єкції клітин CD34+ в міокард у ішемізовану зону відзначено поліпшення роботи серцевого м'яза, збільшення толерантності до фізичних навантажень [68]. Через 12 місяців після застосування аутологічних клітин кісткового мозку у пацієнтів з ІХС зафіксовані поліпшення якості життя, поліпшення перфузії міокарда, відсутність випадків виникнення гострого інфаркту міокарда, а також смертельного результату [69]. Дослідження ефективності хірургічного втручання при лікуванні ІХС в поєднанні з субепікардіальною трансплантацією аутологічних стовбурових клітин CD34+ кісткового мозку показало, що в групі пацієнтів, яким проводили комбіновану терапію, відбувалося поступове збільшення ФВЛШ протягом 12 місяців [70].

Таким чином, використання МСК – найбільш ефективний, доступний і зручний варіант клітинної терапії при лікуванні ССЗ. Широко використовується моноклеарна фракція кісткового мозку як альтернатива МСК. Ефективність клітинної терапії багато в чому залежить і від способу введення стовбурових клітин. Інтраміокардіальне введення є найоптимальнішим, оскільки спостерігається найбільша кількість позитивних результатів в лікуванні ССЗ

В основі ССЗ лежать порушення цілісності та функціонування ендотелію судин. У роботах останніх років обговорюється роль ЕПК в процесі відновлення ендотеліального шару і підтримці його нормальної функції, а також в неоваскуляризації ішемізованих тканин. ЕПК є уніпотентними, тобто диференціюються лише в клітини ендотелію судин. Ці клітини характеризуються експресією специфічного для клітин-попередників ендотелію поверхневих клітинних маркерів (CD34+, CD133+, VEGF-R2 (рецептора 2 типу до фактору росту ендотелію судин та ін.). Ці клітини можуть бути отримані з пуповинної крові, кісткового мозку, крові і жирової тканини [17, 71]. Під впливом певних біоактивних молекул, таких як VEGF і хемотоксичного для макрофагів білку 1 (MCP-1), цей тип клітин виходить в кровотік, через який мігрує до місць пошкодження, де бере участь в неоангіогенезі [17].

Вивчено дію інтракоронарної трансплантації аутологічних МСК і ЕПК. У 5 пацієнтів з передньоперегородковою ІМ відзначалося поліпшення скорочувальної функції міокарда в одному або декількох сегментах ішемізованої зони [72].

ЕПК є моноклеарами CD34+, мають низьку імуногенність, оскільки матеріал завжди аутологічний, що є великою перевагою використання цього виду клітин. Однак використання ЕПК обмежується їх невеликою кількістю. Останнім часом розробляються методики культивування цього виду клітин *ex vivo*, однак це може мати негативний вплив на «хоумінг»-ефект і негативно вплинути на клітинну терапію [71].

1.2.7 Стобурові клітини жирової тканини

Р.А. Zuk зі співавторами вперше виявили, що жирова тканина у людини може слугувати джерелом мультипотентних стобурових клітин. Зараз жирова тканина розглядається в якості перспективного джерела МСК, оскільки здатна до диференціювання в адіпогенному, ендотеліальному, міогенному, остеогенному, хондрогенному, гепатоцитарному, епітеліальному і нейрогенному напрямках. Отримують жирову тканину при проведенні операції ліпосакції у вигляді ліпоаспірата, що є досить безпечним способом [73].

При проведенні порівняння експресії генів МСК жирової тканини і кісткового мозку встановлено, що менше 1% генів відрізняється за рівнями експресії. Гени ID і DKK-1, які беруть участь в регуляції проліферації стобурових клітин, мають більш виражену експресію в МСК жирової тканини [74]. Імуносупресивна активність МСК з жирової тканини не поступається активності МСК кісткового мозку [75].

Вивчення ендотеліального диференціювання стобурових клітин з жирової тканини (СКЖТ) *in vitro* показало, що інгібітор кінази PI3 LY294002 перешкоджає диференціюванню в ендотеліальні клітини. У дослідженні *in vivo* ці клітини під дією місцевих сигналів диференціювалися в ендотеліальні і брали участь в процесі неоангіогенезу у мишей з ішемією задніх кінцівок. Отримані результати дозволяють зробити висновок, що СКЖТ є джерелом ендотеліальних клітин для проведення клітинної терапії [76].

СКЖТ здатні диференціюватися в міогенному напрямку [73]. Виявлено спонтанне диференціювання первинної суспензії клітин з стромальної васкулярної фракції в міогенному напрямку, яка посилюється при спільному культивуванні з міобластами, а також в умовах, що виключають контакт. Після співкультивування і трансплантації мишам в ішемічно пошкоджені м'язи клітини з стромальної васкулярної фракції вбудовувалися у м'язові волокна і були здатні до експресії дистрофіна [77]. Клітини з стромальної васкулярної фракції експресують міогенні маркери (α -актин, кальдесмон, кальпонін, SM22, важкий ланцюг міозину і смустелін) після культивування у середовищі в присутності

гепарину. Наявність згаданих маркерів підтверджено імунофенотиповими і генетичними методами [78].

Таким чином, жирова тканина є альтернативним джерелом МСК. Відносна простота, низька травматичність проведення процедури отримання зазначеної тканини з подальшою можливістю виділення з неї великої кількості стовбурових клітин дозволяють розглядати СКЖТ як перспективний об'єкт для аутологічних трансплантацій.

1.3. Фармакологічна регуляція стовбурових клітин

1.3.1 Гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор

Г-КСФ у людини є Q-глікозильованим 19,6 кДа глікопротеїном і біологічно активний в мономерній формі. До складу цього глікопротеїну входить 201 амінокислота. Ген Г-КСФ знаходиться на хромосомі 17q21-q22, а його рецептор CD114 відноситься до мембранних білків типу III і картований на хромосомі 1q35-34,3. Зв'язування Г-КСФ і рецептора призводить до димеризації останнього з подальшою трансдукцією ростових сигналів і диференціювання. Г-КСФ діє на JAK-сімейство кіназ, що викликають фосфорилування фактора транскрипції STAT3. Надалі STAT3 активізує проліферацію і диференціювання стромальних стовбурових клітин [79, 80].

При ІМ ефект цитокінової терапії пов'язаний зі значним посиленням процесів проліферації нейтрофілів, які впливають на тканини міокарда в місцях некрозу цитокіновим каскадом, що активізує роботу і регенерацію серцевого м'язу за рахунок стовбурових клітин, які там присутні [81].

У хворих з ІМ мобілізовані аутологічні стовбурові клітини вбудовуються в область пошкодження і некрозу, що призводить до відновлення кардіоміоцитів і формування повноцінної тканини міокарду замість рубця. Стимуляція Г-КСФ мобілізації аутологічних стовбурових клітин з кісткового мозку попереджає процеси ремоделювання серця, відновлює систологічну функцію останнього, збільшуючи число нормально функціонуючих кардіоміоцитів, запобігаючи розвитку рубцевої тканини [12].

Існують і суперечливі дані, що стосуються процесів мобілізації стовбурових клітин. Показано, що Г-КСФ впливає на активізацію стовбурових клітин, в тому числі ЕПК з фенотипом CD34+ і CD133+. Лікування пацієнтів з гострим ІМ із застосуванням Г-КСФ призводить до збільшення кількості клітин з фенотипом CD34+ в крові [82].

Виявлено, що число клітин з маркерами CD117, CD62L, CD49d, CD58, характерними для CD34+ клітин кісткового мозку і крові, зменшується після використання Г-КСФ у пацієнтів з онкологічними захворюваннями [83].

1.3.2 Еритропоетин

Еритропоетин – глікопротеїдний гормон, який бере участь в регуляції еритропоезу в організмі: впливає на утворення еритроцитів з пізніх клітин-попередників і стимулює вихід ретикулоцитів з кісткового мозку. Еритропоетин проявляє ефект в дуже низьких (пікомолярних) концентраціях. У літературі описані механізми дії цього гормону через PPARs і HDACs. У дорослих людей еритропоетин синтезується в основному нирками, невелика кількість виробляється печінкою. Експресія рецептора еритропоетину ідентифікована в клітинах нервової тканини, кардіоміоцитах, гладком'язових клітинах судин, ендотеліоцитах, яєчниках, матці, епітелії ниркових каналців, легенях. Ці клітини не тільки мають рецептори еритропоетину, а й здатні синтезувати гормон [84 - 86].

Еритропоетин відіграє важливу роль у кровотворенні, відновлювальних і тканезахисних процесах. Цей гормон сприяє диференціюванню, проліферації і пригніченню апоптотичних процесів в бурст- і гранулоцитарно-моноцитарно-мегакаріоцитарно-еритроцитарних колонієутворюючих одиницях [86]. Еритропоетин прискорює загоєння ран у щурів, що пов'язано з проангіогенезом в грануляційній тканині [87].

Цей гормон відновлює зростання клітинних культур RAW264.7 і PC12, з яких видалена фетальна бичача сироватка. Механізм відновлення здатності клітин

до проліферації пов'язаний з експресією білків c-Fos і c-Jun, що формують фактор транскрипції AP-1 [88].

Існують дані про те, що еритропоетин впливає на процеси мобілізації ЕПК. Опубліковані результати дослідження стимулюючої дії еритропоетину на ЕПК у мишей. Цей гормон призводить до посилення процесів проліферації і значного збільшення числа клітин з фенотипом CD34+/flk-1+, ідентифікованих як гемангіобласти, у кістковому мозку і крові піддослідних тварин. Еритропоетин стимулює постнатальну неоваскуляризацію, посилюючи мобілізацію ЕПК з кісткового мозку в кров [89]. Лікування рекомбінантним еритропоетином призводить до значного збільшення числа циркулюючих клітин з фенотипом CD34+/CD45+ в крові, а також числа функціонально активних ЕПК у пацієнтів з нирковою анемією [90]. У дарбепоетину (рекомбінантного аналога еритропоетину) є здатність стимулювати утворення стовбурових клітин. Встановлено збільшення кількості функціонально активних ЕПК і циркулюючих клітин з фенотипом CD34+ у пацієнтів з нирковою анемією при прийомі дарбепоетину [91].

У 2007 році проведено дослідження на пацієнтах, які перенесли ІМ. Встановлено, що рівень еритропоетину в плазмі крові був вищим у пацієнтів із захворюванням і корелював з числом клітин з фенотипами CD34+, CD133+, VEGFR-2+ [92].

1.3.3 Препарати класу тіазолідиндіонів (піоглітазон)

Сьогодні активно проводиться вивчення впливу цукрознижувальних засобів на перебіг і результат ССЗ, оскільки останні стали основною причиною смерті людей з цукровим діабетом (ЦД). Ці ліки позитивно впливають на кілька етапів розвитку ССЗ, включаючи атеросклероз і мікроангіопатію. Однак існують дані про негативний ефект розиглітазону на серцево-судинну систему [93].

Піоглітазон впливає на запальні та метаболічні процеси, які пов'язані з патофізіологією ССЗ, в тому числі на основні фактори серцево-судинного ризику: АГ, дисліпідемію, дисфункцію ендотелію, інсулінорезистентність, запальні

цитокіни, дію молекул адгезії і медіаторів коагуляції, маркери стабільності бляшок. Цей препарат знижує ризик розвитку ІМ [93]. Піоглітазон уповільнює прогресування нефропатії, яку відносять до фактору ризику розвитку патологій з боку серцево-судинної системи (ССС). Використання піоглітазону зменшує екскрецію альбуміну з сечею у людей з ЦД 2-го типу на тлі нормо-і мікроальбумінурії. При лікуванні пацієнтів з діабетичною нефропатією піоглітазон в поєднанні з лозартаном уповільнює прогресування хронічної ниркової недостатності. Цей препарат сприяє посиленню процесів реваскуляризації [93, 94]. Жирова інфільтрація печінки пов'язана з раннім атеросклерозом сонної артерії і розвитком ССЗ. Піоглітазон перешкоджає накопиченню ектопічного жиру: м'язово-клітинного і інтрапечінкового. Цей препарат є регулятором PPARs [94 – 97].

Дослідження «The prospective pioglitazone clinical trial in macrovascular events» (PROactive) показало, що лікування піоглітазоном призводить до зменшення ризику розвитку макроваскулярних процесів у людей з ЦД 2-го типу з раніше існуючими макроваскулярними захворюваннями. Отримані дані пояснюються антиатерогенним ефектом піоглітазону [94].

Лікування мишей піоглітазоном, який є лігандом PPAR γ , призводить до збільшення числа ЕПК з фенотипом Sca-1+/VEGFR-2+ в кістковому мозку і крові тварин, зниження рівня апоптотичних клітин *in vivo* та в культурі людських ЕПК [95].

Показано, що використання піоглітазону призводить до збільшення кількості клітин CD34+/KDR+ у пацієнтів з ЦД 2-го типу, підсилює функціональну здатність ЕПК, нівелює апоптотичні процеси, беручи участь в підтримці балансу між ендотеліальним пошкодженням і репараційною здатністю [98, 99]. Також застосування цього препарату збільшує частку клітин з фенотипом CD34+ у людей з ішемічною хворобою серця [96].

Проведені клінічні дослідження піоглітазону (ідентифікаційний номер NCT00770835 в базі даних Clinical trials. Gov Національного інституту здоров'я

США (A service of U.S. National Institutes of Health) дозволили виявити, що цей препарат сприяє захисту клітин ССС [100].

1.3.4 Гіпоглікемічні препарати (сітагліптин)

Сітагліптин є препаратом класу гліптінов, що використовується для лікування ЦД 2-го типу. Сітагліптин - високоселективний інгібітор ферменту дипептидилпептидази 4. Пригнічуючи фермент дипептидилпептидазу 4, сітагліптин інгібує гідроліз інкретинів (глюкагоноподібного пептиду 1 (ГПП-1) і глюкозо-залежного інсулінотропного пептиду), підвищуючи концентрації активних форм останніх, збільшує вихід інсуліну і знижує секрецію глюкагону. Ці зміни призводять до зменшення концентрації глікозильованого гемоглобіну та зниження плазмової концентрації глюкози [101]. Рецептори до ДПП-1 знаходяться в острівцевих клітинах, мозку, серці, легенях, нирках і шлунково-кишковому тракті [102, 103]. Існує інформація, що сітагліптин діє через PPARs [104].

Було показано, що інфузія ДПП-1 стимулює захоплення глюкози клітинами міокарда, покращує скоротливість ЛШ тварин, а також обмежує область інфаркту і захищає від ішемічної міокардіальної «нечутливості» [105]. Прийом сітагліптину в дозі 100 мг/добу пацієнтами з ІХС і збереженою функцією ЛШ покращує регіональну і глобальну скоротливість ЛШ, міокардіальна відповідь ЛШ на стрес, послаблює післяішемічне «оглушення» [106]. Сітагліптин модулює частоту серцевих скорочень і ударний об'єм, сприяє збереженню рівня клубочкової фільтрації, потенціює позитивну інотропну дію мозкового натрійуретичного пептиду без збільшення енергетичних потреб міокарда [107].

У пацієнтів, які отримували цей препарат, достовірно знижувалися показники систолічного і діастолічного тиску в порівнянні з людьми, яким давали плацебо [101, 108].

Застосування цього препарату у пацієнтів з ЦД 2 типу протягом 4 тижнів призводить до значного підвищення рівня ЕПК і SDF-1 α в крові [109].

На мишах встановлено вплив сітагліптіну на мобілізацію клітин з фенотипом CD34+/Flk-1+, експресію маркера CD31, що підсилює процеси ангиогенезу. Після 7 тижнів прийому цього препарату спостерігалось значне збільшення кількості капілярів у ішемічній області [110].

Існують дані використання сітагліптіну в поєднанні з мобілізацією стовбурових клітин під впливом Г-КСФ у пацієнтів з ІМ. Описувана терапія посилює «хоумінг»-ефект ЕПК, позитивно впливає на процеси міокардіальної регенерації і є безпечною. Цей факт надає нові можливості використання сітагліптіну в медицині [111].

1.3.5 Інгібітори 3-гідрокси-3-метилглутарил-коензим А-редуктази (стати́ни)

Статини використовуються для лікування людей з ішемічною хворобою серця і з проявами атеросклерозу, також при порушеннях ліпідного обміну у пацієнтів зі спадковими і вторинними дісліпідеміями [112]. Цей клас ліків впливає на зменшення гіпертрофії серця і його фіброз через вплив на механізми, які беруть участь в процесах виникнення і прогресування ремоделювання міокарда, наприклад, діючи на сигнальні молекули, які відповідають за контролювання функцій скорочувальних білків і беруть участь у відновленні серцевого м'яза шляхом впливу на колаген I, на ізоформи важкого ланцюга фетального міозину, зменшення ефекту накопичення внутрішньоклітинних іонів кальцію [113, 114]. Одними з можливих механізмів дії статинів є регуляція PPARs і інгібування HDACs [115, 116].

Встановлено, що симвастатин зменшує ризик виникнення серцево-судинних порушень у пацієнтів з помірною хронічною нирковою недостатністю, з ІМ і з коронарною ревазуляризацією, знижує частоту смертей від серцево-судинних патологій [117, 118].

Цей клас ліків здатний стимулювати і пригнічувати процес неоваскуляризації. Для досягнення антиапоптотичного і антипроліферативного ефектів потрібні дози, що перевищують ті, які застосовуються в клініці. Для

стимуляції утворення нових судин потрібні більш низькі дози аторвастатину і церивастатину, ніж для пригнічення ангіогенезу, що є важливим фактом, оскільки неоваскуляризація в межах судинної стінки або бляшки несе небезпеку дестабілізації останньої [119]. Цей клас речовин посилює мобілізацію стовбурових клітин, впливає на «хоумінг», сприяє виживанню і кращому приживленню стовбурових клітин при трансплантації [120]. Статини призводять до посилення мобілізації ЕПК, неоваскуляризації міокарда, знижують показники дисфункції ЛШ і збільшують виживання мишей після ІМ [121]. Лікування щурів лінії Sprague-Dawley симвастатином призвело до відновлення функціонування ендотелію, збільшення числа циркулюючих ЕПК у тварин і посилення адгезивних здібностей ЕПК людини *in vitro* шляхом регуляції $\alpha 5$ -, $\beta 1$ -, αv - і $\beta 5$ -субодиниць інтегрінових рецепторів [122].

Після закінчення 1-го тижня з початку лікування аторвастатином пацієнтів із ІХС відзначено істотне збільшення числа циркулюючих в крові клітин з маркерами CD34, CD133. Виявлено поліпшення функціональної активності ЕПК і їх міграційної здатності [123]. Аторвастатин, мевастатин і симвастатин стимулюють утворення ЕПК, в тому числі клітин з фенотипом CD34+, в культурі клітин людини. Показано, що у мишей лінії C57Bl/6, які отримували симвастатин, кількість клітин з фенотипом CD117+/sca-1+ в кістковому мозку була вища [124].

Статини також впливають на розвиток ракових пухлин. Встановлено, що використання препаратів цього класу сприяє пригніченню інтенсивності неоваскуляризації та розвитку ракових утворень, індукує загибель різних пухлинних клітин шляхом апоптозу [125].

1.3.6 Інгібітори ангіотензин-перетворюючого ферменту

Інгібітори ангіотензинперетворювального ферменту (АПФ) мають високу ефективність, широкий спектр показань до прийому і є досить безпечними. Серед цих препаратів виділяють лізиноприл, каптоприл, цілазаприл, які спочатку є фармакологічно активною формою ліків, а також препарати, що є проліками (наприклад, еналаприл, що перетворюється в активний метаболіт енапрілат).

Інгібітори АПФ ефективні при зменшенні гіпертрофії ЛШ, мікроальбумінурії та протеїнурії, при запобіганні порушень функції нирок. Існують дані про те, що препарати цієї групи ліків діють через механізм, опосередкований PPARs [126, 127]

Встановлено, що раміприл знижує систолічний та діастолічний тиск, зменшує масу міокарда, затримує розвиток АГ у людей з високим тиском, знижує ймовірність виникнення ІМ та смертності від ускладнень з боку серцево-судинної системи, має антиаритмічні, антиатеросклеротичні, нефропротективні властивості [128, 129].

У мишей лінії C57Bl/6 відзначено зменшення фіброзу і гіпертрофії серцевого м'яза після введення раміприлу, тельмісартану і комплексного використання препаратів. Через день після перев'язки аорти в групі мишей, які отримували раміприл, спостерігалось збільшення числа ЕПК [130].

Трансдукція АПФ2 за допомогою лентівірусів призвела до посилення експресії АПФ2 в ЕПК, що супроводжувалося збільшенням експресії синтази оксиду азоту (NO-синтази) в ендотеліальних клітинах і продукції NO, в результаті чого посилювалася міграційна здатність ЕПК, знижувався розмір інфарктної зони головного мозку і зменшувалися прояви неврологічних розладів [131].

У пацієнтів після ІМ періндоприл призводить до відновлення ендотелію шляхом стимуляції утворення клітин з маркером CD34. Також спостерігається збільшення рівня фактора росту ендотелію судин і зниження кількості ФНП- α [132].

У пацієнтів з помірною гіпертонією лікування еналаприлом або зофеноприлом збільшує число ЕПК. Значущих відмінностей в цьому показнику між описаними групами людей не було виявлено [133].

Проведене дослідження впливу періндоприлу на число клітин з фенотипом CD45-/low+CD34+CD133+KDR+ у пацієнтів, які перенесли ІМ з супутнім ЦД 2-го типу, показало, що при прийомі препарату відбувається збільшення кількості циркулюючих ЕПК, рівня VEGF в порівнянні з контрольною групою людей. Використання періндоприлу приводить до поліпшення роботи ЛШ, зниження

частоти виникнення симптомів серцевої недостатності та рівня смертності у пацієнтів [134].

1.3.7 Антагоністи рецепторів ангіотензину II (сартани)

Ангіотензин - олігопептидний гормон, який викликає вазоконстрикцію, підвищення кров'яного тиску і вивільнення альдостерону з надниркових залоз в кровотік. Ангіотензин II – активна форма ангіотензину (октапептид), що утворюється з декапептиду ангіотензину I під дією АПК.

Сартани є високоселективними сполуками, які діють на ренін-ангіотензин-альдостеронову систему, блокують рецептори ангіотензину II типу 1 (AT1 II) і сприяють активації рецепторів ангіотензину II типу 2 (AT 2 II), які відповідають за антипроліферативні процеси, вазодилатацію та апоптоз [135]. Антагоністи AT II знижують АТ, також як і інші антигіпертензивні препарати. Однак цей клас засобів має кращу переносимість і спричинює менше побічних ефектів. Застосування антагоністів AT II особливо ефективно у людей з ЦД 2-го типу, ускладненим нефропатією і АГ, а також у пацієнтів із застійною серцевою недостатністю в комплексі з інгібіторами АПФ або ж при непереносимості останніх. Режими фармакотерапії на основі сартанів знижують ризик розвитку діабету. Оскільки ЦД збільшує ймовірність виникнення віддалених серцево-судинних ускладнень, ліки цієї групи мають значну перевагу [136]. Дія сартанів призводить до зниження вазоконстрикції, зменшення секреції реніну, ендотеліну 1, норадреналіну, нейтралізації проліферативних ефектів AT II на клітини гладеньких м'язів судин і на кардіоміоцити, зменшення викиду норадреналіну [135].

Лозартан, що є похідним імідазолу, був першим серед антагоністів рецепторів AT 1 II. Цей препарат нівелює всі ефекти AT II (збільшення продукції альдостерону, вазопресорну дію, стимуляцію адренергічної іннервації і т.д.). Лозартан знижує загальний периферичний опір судин (ЗПОС), сприяючи зниженню артеріального тиску і навантаження на серце. Сартан зменшує вміст альдостерону в крові, має діуретичну дію, стимулює виведення сечової кислоти з

організму. Встановлено, що лозартан знижує число апоптотичних клітин судин сітківки ока у експериментальних тварин. Цей препарат характеризується тривалою дією (24 години і більше), що пояснюється утворенням карбоксильного метаболіту, який є в 10 – 40 разів активніший, ніж лозартан. Лозартан відноситься до регуляторів PPARs. [135, 137, 138].

Кількість ЕПК і рівень їх міграції нижче у щурів лінії SHR в порівнянні з щурами лінії WKY. Також показано, що лозартан знижує систолічний тиск у щурів лінії SHR, збільшує міграцію і число циркулюючих ЕПК (CD117+), покращує проліферативні процеси у щурів лінії SHR, що дозволяє зробити висновок про ефективність застосування препарату для лікування пошкоджень судин при гіпертензії [8, 9].

Проведено дослідження з вивчення впливу лозартану на процеси мобілізації ЕПК у людей. Показано, що цей препарат сприяє збільшенню кількості ендотеліальних прогеніторних клітин у пацієнтів з ІХС, що доводить здатність лозартану мобілізувати клітини-попередники у кров, покращуючи і відновлюючи функцію ендотелію [139].

Ірбесартан – антигіпертензивний препарат, антагоніст рецепторів АТ 1 II. Застосування цього препарату знижує концентрацію альдостерону в плазмі крові і усуває судинозвужувальний ефект АТ II. Ірбесартан не потребує метаболічної активації для прояву ефекту. Цей препарат є регулятором PPARs. Відзначено уповільнення розвитку серцево-судинних і ниркових уражень при використанні ірбесартану. Цей препарат забезпечує надійний контроль АТ у 70% хворих. Встановлено ефективність ірбесартану у людей з ураженням нирок і з ЦД [135, 140].

На хом'яках проведено дослідження проникнення ЕПК в стінки судин під впливом цього препарату. Встановлено, що прийом останнього призводить до стимуляції міграції цих клітин в артеріальні судини [141]. Показано, що прийом препарату пацієнтами з ЦД 2-го типу протягом 12 тижнів призводить до значного збільшення кількості ЕПК у пацієнтів [142].

Валсартан відноситься до антигіпертензивних засобів, які впливають на рецептори АТ II. Блокада АТ1 II-рецепторів призводить до збільшення концентрації АТ II в плазмі, який стимулює незаблоковані АТ2 II-рецептори. При прийомі валсартану спостерігається зниження перед- і постнавантаження на серце, зменшення загального периферичного спротиву судин (ЗПСС) [135]. Валсартан є активатором PPARs і інгібітором HDACs [143, 144].

В експерименті на щурах лінії SHR-SP показано, що валсартан стимулює утворення ЕПК. Експресія матричної РНК (мРНК) CD117+ і Рах-2 в клітинах нирок значно збільшилася при використанні досліджуваного препарату. Отримані результати говорять про захисні властивості валсартану на ССС і клітини нирок [145]. У дослідженні на щурах лінії WKY встановлено, що застосування валсартану призводить до стимуляції мобілізації ЕПК з кісткового мозку у тварин [146].

Телмісартан – специфічний антагоніст рецепторів АТ II, який має високу спорідненість до АТ 1 II-рецепторів. Сартан витісняє АТ II із комплексу з рецептором, не будучи агоністом стосовно цього рецептора. Зв'язування носить тривалий характер. Телмісартан не є спорідненим до АТ2-рецепторів АТ II. Прийом цього препарату призводить до збільшення в крові альдостерону. У пацієнтів з АГ телмісартан знижує систолічний та діастолічний тиск, зменшує ЗПСС, практично не впливає на частоту серцевих скорочень (ЧСС). Встановлено, що цей препарат призводить до значного зменшення маси ЛШ у людей з АГ і гіпертрофією ЛШ [135].

В експерименті *in vitro* на клітинах людини показано, що телмісартан призводить до збільшення числа клітин з фенотипом acLDL+/lectin+, посилення міграційної здатності ЕПК, знижує частку апоптотичних ендотеліальних стовбурових клітин, а також ймовірність виникнення окисного стресу. Ефект телмісартану – дозозалежний і пригнічується селективним PPARs-антагоністом GW9662, що свідчить про механізм дії через PPAR-g. Комбінація телмісартану і симвастатину також призводить до збільшення числа ЕПК. У мишей дикого типу ці препарати викликали стимуляцію утворення ЕПК з фенотипом sca-1+/flk-1+ в

кістковому мозку і в крові, клітин з фенотипом acLDL+/lectin+ в селезінці, а також впливали на мобілізацію досліджуваних клітин. При пошкодженні сонної артерії телмісартан, симвастин і їх комбінація активізували процеси репарації тканин [147 – 149]. При обробці телмісартаном одноядерних клітин крові здорових людей відзначається дозозалежне збільшення числа ЕПК. В якості маркерів ендотеліальних клітин використовувалися CD31 і CD34. Показано, що ефекти тестованого препарату регулюються фосфоінозитидін-3-кіназним або p21 сигнальними шляхами [148]. Виявлено ефективність телмісартану при стимуляції проліферації і диференціації ЕПК, через процеси посилення фосфорилування кінази Akt в ЕПК. Інгібування активації кінази Akt знижує ефект телмісартану, що вказує на важливу роль кінази Akt в мобілізації стовбурових клітин при дії телмісартану [149].

Виявлено, що прийом телмісартану протягом 4 тижнів призводить до значного збільшення клітин з CD34+/KDR+/CD45-, CD133+/KDR+/CD45- у людей з ішемічною хворобою серця. Показано, що препарат впливає на регенеративні процеси і покращує функціонування ендотелію [150].

Олмесартану медоксоміл – сильнодіючий селективний антагоніст AT 1 II-рецепторів. Селективний антагонізм AT1 II-рецепторів призводить до збільшення концентрації реніну, AT I і II в плазмі крові, до зниження концентрації альдостерону. Цей препарат призначають при АГ, і його прийом призводить до дозозалежного тривалого зниження артеріального тиску. Олмесартану медоксоміл - проліки, які під дією естераз слизової оболонки кишківника і в крові портальної вени під час абсорбції з травного тракту швидко перетворюється в фармакологічно активний метаболіт олмесартан [151].

У дослідженні впливу олмесартану на мобілізацію ЕПК у пацієнтів з ЦД 2-го типу встановлено, що цей препарат при прийомі протягом 12 тижнів призводить до значного збільшення числа стовбурових клітин [142].

Кандесартану цилексетил є антагоністом рецепторів AT II, селективно діє на AT 1 II-рецептори. Цей препарат має високу антигіпертензивну активність. При блокуванні AT1 II-рецепторів спостерігається дозозалежне збільшення рівня

реніну, АТ I, АТ II, зниження кількості альдостерону в плазмі крові. Антигіпертензивний ефект зумовлений зниженням ЗПСС, при цьому ЧСС не змінюється [135, 152].

Показано, що кандесартану цилексетил призводить до збільшення числа колоній ЕПК у мишей лінії SHR-SP. Цей препарат знижує експресію в органах ССС мРНК NADPH-оксидази, ферменту, що є головним джерелом вільних радикалів в кардіоміоцитах і сприяє прогресії ССЗ. Встановлено, що кандесартану цилексетил збільшує експресію мРНК CD117 в серці, що свідчить про збільшення числа або тривалості життя ендотеліальних стовбурових клітин за рахунок антиоксидантної дії цього препарату [9].

Дослідження на тваринах дозволили встановити, що кандесартану цилексетил дає проангіогенний ефект на ендотеліальні клітини мікросудин мозку, підсилюючи проліферативну активність стовбурових клітин і їх міграційну здатність. На щурах лінії Wistar встановлено, що разове введення кандесартану цилексетилу в дозі 1 мг/кг призводить до тривалого проангіогенного ефекту. У експерименті *in vitro* показано, що цей препарат впливає на ендотеліальні клітини мозку, підсилюючи їх проліферативну активність [152, 153].

Використання кандесартану цилексетилу призводить до зменшення числа пошкоджених нейронів, покращує мозковий кровообіг, впливає на рухові навички мишей. Сумісне введення кандесартану цилексетилу і антагоніста PPAR- γ призводило до втрати ряду позитивних властивостей першого, що дозволяє зробити висновок про те, що кандесартану цилексетил є лігандом PPARs [154].

Введення цього препарату сприяє поліпшенню роботи серцевого м'яза. Кандесартану цилексетил підвищує витривалість при фізичних навантаженнях у людей, які страждають на гіпертензію [155]. Клінічні дослідження кандесартану цилексетилу (ідентифікаційний № NCT00139386 в базі даних Clinical trials. Gov Національного інституту здоров'я США (A service of US National Institutes of Health)) показали, що ця речовина запобігає розвитку гіпертензії та серцево-судинних порушень у людей, а також знижує ймовірність виникнення ІМ [156, 157].

Однак цей препарат має ряд побічних ефектів з боку центральної нервової системи, серцево-судинної, дихальної, травної систем. Також існують дані, що високі дози кандесартану цилексетилу пригнічують процеси формування окремих субпопуляцій клітин в кістковому мозку і в крові [158, 159].

1.4 Використання природних сполук для лікування серцево-судинних захворювань

Останнім часом зростає інтерес до лікарських засобів рослинного походження, оскільки вони мають значно меншу кількість побічних ефектів у порівнянні з синтетичними. Рослинні препарати можуть стати альтернативними засобами лікування ряду захворювань, в тому числі і патологій з боку ССС. Вивчення нових властивостей природних компонентів і використання останніх для ефективної діагностики, профілактики і лікування пацієнтів сьогодні є актуальним.

1.4.1 Патринія

Патринія (*Patrinia*) – це рід рослин, що відноситься до підродини Валеріанові (*Valerianoideae*) сімейство Жимолостеві (*Caprifoliaceae*). У патринії містяться сапоніни, алкалоїди, дубильні речовини, ефірні масла, азотовмісні основи. Використовується патринія в основному у якості заспокійливого засобу, перевершуючи в цьому відношенні валеріановий корінь. Однак ця рослина токсичніша: при передозуванні можуть виникнути порушення роботи серця, сну, підвищення згортання крові. Патринія має антигіпертензивні, нефропротекторні, антидіабетичні, антиоксидантні, гепатопротекторні властивості [160, 161]. Для патринії скабіозолистої характерна адаптогенна, седативна і гіполіпідемічна дії. Екстрактивними речовинами цього виду рослин є глікозиди, ліпіди, полісахариди [160]. Тритерпеноїди олеанолова кислота і урсолова кислота, які містяться в глікозильованому вигляді в патринії скабіозолистій [162], відомі як регулятори PPARs і інгібіторів HDACs [163, 164].

Застосування патринії є ефективним при лікуванні злоякісних пухлин. Встановлено, що маса пухлини мишей, які отримували полісахариди з патринії, була значно меншою в порівнянні з такими показниками в контрольній групі тварин. Відзначено збільшення числа апоптотичних клітин, накопичення клітин в G2/M фазах клітинного циклу, зниження кількості клітин в S фазі при використанні полісахаридів з патринії. Показано, що полісахариди, отримані з патринії, підсилюють експресію інгібітора каспаз p53, що індукує апоптоз, і медіатора p53-індукованого апоптозу Вах, а також пригнічують утворення інгібітора апоптозу Bcl-2 в пухлинній тканині [165]. Застосування екстракту патринії скабіозолистої зменшує розмір пухлини прямої кишки, уповільнює зростання ракових клітин *in vivo* та *in vitro*, впливаючи на процеси проліферації клітин [166].

Екстракт патринії скабіозолистої пригнічує фосфорилування STAT3 в клітинах U266 мієломи людини, ініціює процеси апоптозу і інгібує проліферацію клітин. Застосування екстракту патринії скабіозолистої пригнічує експресію промотора клітинної проліферації цикліну D1 і інгібітора апоптозу Bcl-2 [167]. Використання ізовальтрату ацетоксихідрину, отриманого з патринії, індукує процес апоптозу в ракових клітинах шлунка людини SGC-7901 за допомогою арешту цих клітин в G2/M фазах клітинного циклу. Відзначено також зниження кількості білка Bcl-2 і посилення синтезу білка Вах [168].

1.4.2 Женьшень

Женьшень належить до роду *Ranax*. Препарати на основі женьшеню покращують якість життя людей при різних захворюваннях, що пояснюється наявністю в цій рослині біологічно активних речовин, які мають адаптогенні властивості. До складу женьшеню входять тетрациклічні тритерпенові сапоніни, трінолеїн, полісахариди, глікопептиди, флавоноїди. Трінолеїн – триацілгліцерол, що має кардіоваскулярну активність, полісахариди мають імуностимулюючі властивості, для глікопептидів характерна гіпоглікемічна функція [169 – 171]. Встановлено, що женьшень регулює PPARs і HDACs [172, 173].

Виявлено позитивні ефекти женьшеню на перебіг ССЗ. Встановлено вплив речовин цієї рослини на відновлення ритму серцевих скорочень, насосну функцію серця. Препарати женьшеню сприяють підвищенню стійкості міокарда до патогенних впливів: ішемії, геморагічного шоку, реперфузії. Відзначено, що використання сировини з женьшеню покращує коронарний кровотік, обмежує інфарктну область, перешкоджає розвитку гіпертрофії серцевого м'яза, а також сприяє помірному зниженню артеріального тиску [174 – 177].

Застосування женьшеню протягом 1 тижня впливає на збільшення кількості клітин з фенотипом CD34+ в крові людей з ССЗ і підсилює мобілізацію стовбурових клітин з кісткового мозку, що призводить до поліпшення роботи серця [177].

1.4.3 Ресвератрол

Ресвератрол – природна сполука, яка виявлена в какао, горіхах, винограді та інших фруктах. Ця речовина зустрічається у вигляді глікозиду і двох цис- і транс-стереоізомерів [178]. Лікарська форма є транс-стереоізомером (транс-3,4', 5-тригідроксистільбен); тільки цей ізомер є біологічно активним. Встановлено, що ресвератрол підсилює експресію PPARs і пригнічує активність HDACs [179, 180].

В експериментах на тваринах показано його протипухлинні, протизапальні, кардіопротекторні, нейропротекторні і інші позитивні ефекти. Проведено дослідження на різних біологічних моделях, які демонструють протипухлинні властивості природного антиоксиданту ресвератролу. Ефективність використання ресвератролу для уповільнення розвитку ракових клітин була показана на різних клітинних моделях [181 – 183].

Ресвератрол знижує ризик розвитку ССЗ. Це пов'язано зі стимуляцією активності ендотеліальної синтази оксиду азоту, відповідальної за вазодилатацію, пригніченням процесів окислення ліпопротеїнів низької щільності, пригніченням агрегації тромбоцитів, зменшенням атеросклеротичних бляшок [184, 185].

Встановлено, що прийом ресвератролу зменшує утворення бляшок в мозку тварин, характерних для хвороби Альцгеймера, а також інших нейродегенеративних захворювань [186].

Показано, що цей антиоксидант захищає епітеліальні клітини легенів людини від процесів апоптозу, індукованих H_2O_2 , а також накопичення активних форм кисню [187]. Ресвератрол впливає і на тривалість життя [188]. Проводяться дослідження ендотеліо- і кардіопротективної активності комплексу ресвератролу з лозартаном, а також з еналаприлом [189 – 191].

Ресвератрол підсилює ендотеліопротективну активність лозартану калію, амлодипіну, еналаприлу, індапаміду, небівололу та може використовуватися як додатковий засіб при захворюваннях серцево-судинної системи, що супроводжуються ендотеліальною дисфункцією [192, 193].

Висновки до розділу I

В результаті проведеного аналізу наукової літератури можна зробити висновок, що створення нових препаратів і розробка комбінацій відомих біологічно активних речовин і лікарських засобів, дія яких зумовлена механізмами, що реалізуються за допомогою PPARs і HDACs, сьогодні є перспективними.

Можна зробити висновок, що речовини, відомі як активатори PPARs і інгібіторів HDACs, здатні стимулювати неоангіогенез шляхом мобілізації в кровотік ендотеліальних прогеніторних клітин, які за допомогою механізму «хоумінг» потрапляють в різні органи і тканини, включаючи серце, де беруть участь у процесах відновлення мікроциркуляції. Дані про те, що кандесартану цилексетил і ресвератрол функціонують як активатори PPARs і інгібіторів HDACs, стали основою для вивчення їх здатності стимулювати утворення клітин-попередників ендотелію.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Реактиви та обладнання

Реактиви: кандесартану цилектесил (№ серії 20110116, «All Pro Corporation», Китай) (чистота ≥ 98 %, HPLC), ресвератрол (транс-ресвератрол (далі по тексту ресвератрол)) (чистота ≥ 98 %, HPLC) (№ серії NSIG04038-RVE, «Naturalin Bio-Resources Co., Ltd.», Китай), кандесартан («Shuya», Китай) (чистота ≥ 95 %, HPLC), моноклональні антитіла до CD117, мічені фікоеритрином CD117-PE та моноклональні антитіла до CD117, мічені флуоресцеїн ізотіоціанатом CD117-FITC («Beckman Coulter», США), моноклональні антитіла до CD117, мічені фікоеритрином CD117-PE («Exbio», Чехія), моноклональні антитіла до CD34, мічені флуоресцеїн ізотіоціанатом CD34-FITC («Exbio», Чехія), моноклональні антитіла до CD31, мічені фікоеритрином CD31-PE («Exbio», Чехія), культуральне середовище Hanks' Balanced Salt («Sigma-Aldrich», США), середовище DMEM («Sigma-Aldrich», США), ембріональна теляча сироватка («HyClone», США), антибіотиковий та протигрибковий розчин Antibiotic-antimycotic solution («Sigma-Aldrich», США), лізуючий розчин OptiLyse C («Beckman Coulter», США), РНК-аза («Sigma-Aldrich», США), пропідіум йодид («Sigma-Aldrich», США), 0,25 % розчин трипсин-ЕДТА («Sigma-Aldrich», США), набір реагентів CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, США), PBS tablets («Sigma-Aldrich», США), гепарин, крохмаль.

Обладнання: протоковий цитофлуориметр «Cytomics FC500» («Beckman Coulter», США), актометр «Opto-Varimex» («Columbus Instrum», США), рідер для мікропланшетів «Stat Fax 3200» («Awareness Technology», США), CO₂-інкубатор «Heracell 150» («Thermo Scientific», США), ламінар «MSC 12» («Thermo electron corporation», США), термостат «Heraeus function line» («Thermo electron corporation», США), ваги «Explorer Pro EP214C» («Ohaus», США) та «Scout Pro SPU202» («Ohaus», США), центрифуга «ОПН – 3,02» (ОАО ТНК «Дастан»,

Киргизстан), 12-лункові планшети для культури клітин «Cellstar» («Griener Bio-one», Німеччина), флакони для клітинних культур «Cellstar» («Griener Bio-one», Німеччина)

2.2 Об'єкти дослідження

2.2.1 Експериментальні тварини

Для проведення експериментів *in vivo* в якості тест-об'єктів використовували мишей ліній C57Bl/6, Balb/C. Тварини перебували в стандартних умовах утримання та годівлі в віварії.

Миші лінії C57Bl/6 є інбредними. Забарвлення шерсті – чорного кольору. Ця лінія є стандартною для індукції патологій, пов'язаних з мутаціями: фізіологічних, поведінкових, забарвлення шерсті. Описувані тварини мають чутливість до канцерогенів. Миші лінії C57Bl/6 використовуються в багатьох галузях медико-біологічних досліджень: при вивченні захворювань серцево-судинної системи, в гематології, імунології, патофізіології, нейробиології, біології розвитку і при вивченні ендокринних захворювань.

Миші лінії Balb/C є інбредними. Забарвлення шерсті цих тварин біле, альбіноси. Для мишей лінії Balb/C характерна схильність до розвитку серцево-судинних захворювань. У цих тварин відзначається високий систолічний тиск крові. Для старих мишей обох статей також характерний атеросклероз. Миші лінії Balb/C використовуються в дослідженнях для розробки і створення нових біомедичних технологій та потенційних лікарських засобів. Основними галузями використання цих тварин є нейробиологія, патології серцево-судинної системи і дослідження онкологічних захворювань.

2.2.2 Культури клітин

Дослідження *in vitro* проводили з використанням культур клітин, отриманих із жирової тканини людини та кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6. Клітини кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 отримували, як вказано в розділі 2.4.1.

Для отримання клітин жирової тканини людини використовували тканину практично здорових донорів за поінформованою згодою після процедури ліпосакції.

2.3 Дослідження на експериментальних тваринах

2.3.1 Вивчення ефектів кандесартану цилексетилу і ресвератролу на цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики у мишей лінії C57Bl/6

Для проведення дослідження були взяті здорові статевозрілі самці мишей лінії C57Bl/6 (90 особин), яких розділили на 9 груп. Мишам 8-ми груп вводили кандесартану цилексетил (№ серії 20110116, «All Pro Corporation», Китай) і ресвератрол (№ серії NSIG04038-RVE, «Naturalin Bio-Resources Co., Ltd.», Китай) інтрагастрально (розділ 2.3.4) в різних дозуваннях протягом 7 тижнів: мишам групи 1 вводили кандесартану цилексетил в дозі 3 мг/кг (максимальна терапевтична доза), тварини групи 2 отримували кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг, миші групи 3 отримували ресвератрол в дозі 1 мг/кг, тваринам групи 4 вводили ресвератрол в дозі 10 мг/кг, 5 група мишей отримувала ресвератрол в дозі 50 мг/кг, тварини групи 6 отримували кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг і ресвератрол в дозі 1 мг/кг, мишам групи 7 вводили кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг і ресвератрол в дозі 10 мг/кг, тварини 8 групи отримували кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг і ресвератрол в дозі 50 мг/кг. Контрольним мишам давали інтрагастрально 1%-й розчин крохмалю протягом 7 тижнів.

Розрахунок щоденних доз досліджуваних речовин, які вводили тваринам проводили за формулою міжвидового перерахунку (формула 2.3.1) [194]:

$$A = \frac{B \times \kappa(B)}{\kappa(A)} \quad (2.3.1)$$

де А – доза, отримана згідно міжвидового перерахунку;

B – відома доза;

k (B) – коефіцієнт перерахунку на вагу тіла B;

k (A) – коефіцієнт перерахунку на вагу тіла A.

Зважували тварин, відбирали кров (розділ 2.3.5); забивали тварин, вилучали серце і отримували кістковий мозок (розділ 2.3.8).

Вивчали наступні показники:

- кількість клітин з фенотипом CD117+ в кістковому мозку;
- кількість клітин з фенотипом CD117+ в крові;
- кількість клітин з ознаками апоптозу в кістковому мозку;
- кількість клітин з ознаками апоптозу в крові;
- кількість клітин з мікроядрами в кістковому мозку;
- кількість клітин з мікроядрами в крові;
- розподіл клітин за фазами клітинного циклу (G_0/G_1 , S, G_2/M) в кістковому мозку;
- розподіл клітин за фазами клітинного циклу (G_0/G_1 , S, G_2/M) в крові;
- масу тіла тварин;
- масу серця тварин;
- відносний коефіцієнт маси (ВКМ) серця тварин.

Аналіз кількості клітин з CD117+ (розділ 2.3.8), числа клітин з ознаками апоптозу і мікроядрами, розподілу клітин за фазами клітинного циклу (G_0/G_1 , S, G_2/M) (розділ 2.3.9) проводили з використанням проточного цитофлуориметра «Cytomics FC500» («Beckman Coulter», США) [74, 76].

Масу серця визначали за допомогою ваги «Explorer Pro, EP214C» («Ohaus», США) (розділ 2.3.7). Масу тіла вимірювали шляхом зважування тварин на вагах «Scout Pro SPU202» («Ohaus», США) (розділ 2.3.7).

В ході дослідження була також проведена оцінка рухової активності мишей при введенні досліджуваних речовин за допомогою актометра «Opto-Varimex» («Columbus Instrum», США) (розділ 2.3.6).

2.3.2 Вивчення ефектів кандесартану цилексетилу і ресвератролу на цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики при фізичних навантаженнях у мишей лінії Balb/C

Для проведення експерименту були взяті здорові статевозрілі самці мишей лінії Balb/C (80 особин). Тварин розділили на 8 груп. Мишей контрольної групи використовували для оцінки зазначених нижче параметрів до початку експерименту (восени). Тварини шести груп піддавалися тривалим фізичним навантаженням: плавання з 2% -м вантажем від маси тіла на витривалість щодня протягом 2 місяців. З цією метою використовували циліндри, діаметр яких становив 50 см, а висота була 40 см, з водою, температура якої постійно підтримувалася на рівні 22 – 24°C. У той же час контрольна група 1 залишалася інтактною. Далі тваринам 1 – 5 груп щодня протягом 7 тижнів вводили інтрагастрально кандесартану цилексетил і ресвератрол (розділ 2.3.3) в різних дозуваннях і комбінаціях: мишам групи 1 – кандесартану цилексетил в дозі 3 мг/кг, тваринам групи 2 – кандесартану цилексетил в концентрації 1,5 мг/кг; миші групи 3 отримували кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг і ресвератрол в дозі 10 мг/кг; мишам групи 4 давали кандесартану цилексетил в концентрації 1,5 мг/кг і ресвератрол в дозі 30 мг/кг; тварини групи 5 отримували кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг і ресвератрол в концентрації 50 мг/кг. Мишам контрольної групи 1 (інтактні, що не піддавалися фізичним навантаженням і введенню речовин) і контрольної групи 2 (піддавалися тільки фізичним навантаженням) інтрагастрально вводили щодня протягом 7 тижнів 1%-й розчин крохмалю.

Зважували тварин, відбирали кров (розділ 2.3.4); забивали тварин, вилучали серце і отримували кістковий мозок (розділ 2.3.7).

Надалі оцінювали наступні параметри:

- кількість клітин з фенотипом CD117⁺ в кістковому мозку;
- кількість клітин з фенотипом CD117⁺ в крові;
- кількість клітин з ознаками апоптозу в кістковому мозку;
- кількість клітин з ознаками апоптозу в крові;

- кількість клітин з мікроядрами в кістковому мозку;
- кількість клітин з мікроядрами в крові;
- розподіл клітин за фазами клітинного циклу (G_0/G_1 , S, G_2/M) в кістковому мозку;
- розподіл клітин за фазами клітинного циклу (G_0/G_1 , S, G_2/M) в крові;
- масу тіла тварин;
- масу серця тварин;
- ВКМ серця тварин.

Аналіз кількості клітин з CD117+ (розділ 2.3.7), числа клітин з ознаками апоптозу і мікроядрами, розподілу клітин за фазами клітинного циклу (G_0/G_1 , S, G_2/M) (розділ 2.3.8) проводили з використанням проточного цитофлуориметра «Cytomics FC500» («Beckman Coulter», США).

Масу серця визначали за допомогою ваги «Explorer Pro EP214C» («Ohaus», США), масу тіла - за допомогою ваги «Scout Pro SPU202» («Ohaus», США) (розділ 2.3.6).

2.3.3 Вивчення показників токсичності кандесартану цилексетилу та ресвератролу

Для проведення цього експерименту використовувалися здорові статевозрілі нелінійні миші (самці і самки, 40 особин). Тварини були розділені на наступні групи: контрольна група 1 (самці), дослідна група 1 (самці), контрольна група 2 (самки), дослідна група 2 (самки). Мишам дослідних груп одноразово інтрагастрально вводили розчин досліджуваних речовин, що містить кандесартану цилексетил і ресвератрол з розрахунку 1,5 мг і 50 мг на 1 кг маси тіла тварини, відповідно. Тварини контрольних груп одноразово інтрагастрально отримували 1%-й розчин крохмалю (розділ 2.3.4). Введені дози досліджуваних речовин розраховували за формулою міжвидового перерахунку [224], як зазначено вище в розділі 2.3.1.

Після закінчення 2 тижнів після введення речовин проводили виведення тварин з експерименту. Для оцінки впливу речовин на внутрішні органи

здійснювали забір наступних органів: серця, селезінки, нирок, легенів, печінки і головного мозку. Надалі оцінювали наступні показники:

- масу тіла тварин в день виведення останніх з експерименту;
- масу внутрішніх органів;
- ВКМ внутрішніх органів.

Масу внутрішніх органів визначали за допомогою ваги «Explorer Pro EP214C» («Ohaus», США), масу тіла вимірювали на вагах «Scout Pro SPU202» («Ohaus», США) (розділ 2.3.7).

2.3.4 Методи введення досліджуваних речовин лабораторним тваринам

Введення досліджуваних речовин лабораторним тваринам здійснювали інтрагастральним способом. Для цього досліджувані речовини розчиняли/суспендували в 1%-му розчині крохмалю при кімнатній температурі і в подальшому вводили мишам в об'ємі 0,8 мл за допомогою тонкого металевого зонда. Останній був голкою від шприца з напаяною на кінці оливою.

2.3.5 Методи забору крові у лабораторних тварин

Забір крові у лабораторних мишей проводили із ретробульбарного венозного сплетіння за допомогою пастерівської мікропіпетки.

2.3.6 Оцінка рухливості мишей

Рухову активність дослідних тварин вимірювали за допомогою актометра «Opto-Varimex» («Columbus Instrum», США), який працює спільно з програмою Auto-Track System ver. 4.51, встановленою на стаціонарному комп'ютері. Розмір камери актометра становить 40x40x25 см. Цей прилад дозволяє роздільно реєструвати горизонтальний і вертикальний компоненти рухової активності тварин за допомогою вбудованих фотодатчиків. Реєстрацію рухів здійснювали в тиші і в темряві протягом 30 хвилин. Оцінку рухової активності проводили в умовних одиницях. При проведенні аналізу враховували такі показники рухової активності експериментальних тварин:

- DT – відстань, пройдену тваринам;
 RT – час, проведений в спокої;
 ST – грумінг;
 AT – час, витрачений на пересування;
 BSM – кількість актів грумінгу;
 AC – кількість пересувань.

2.3.7 Оцінка маси тіла та внутрішніх органів лабораторних тварин

Вивчали морфометричні показники експериментальних тварин: масу тіла, абсолютну і відносну маси серця, селезінки, нирок, легенів, печінки, головного мозку. Маса внутрішніх органів визначали за допомогою ваги Explorer Pro EP214C («Ohaus», США). Маса тіла вимірювали зважуванням тварин на вагах Scout Pro SPU202 («Ohaus», США). Масові індекси внутрішніх органів розраховували як відношення маси органу до маси тіла в день виведення тварин з експерименту (формула 2.3.7):

$$\text{ВКМ} = \frac{A}{B} \times 1000 \quad (2.3.7)$$

де ВКМ – відносний коефіцієнт маси органу;

A – маса органу;

B – маса тіла.

2.3.8 Дослідження кількості клітин з фенотипом CD117+ в кістковому мозку та в крові тварин

В кістковому мозку і в крові експериментальних мишей ліній C57Bl/6 (розділ 2.3.1) і Balb/C (розділ 2.3.2) визначали кількість клітин з фенотипом CD117+ наступним чином. Використовували кров, узятую з очного синуса (розділ 2.3.5). Клітини кісткового мозку отримували зі стегнових кісток тварин: обережно зрізали епіфізи, потім кістковий мозок вимивали середовищем Hanks 'Balanced

Salt («Sigma-Aldrich», США) в центрифужну пробірку. Осаджували клітини центрифугуванням з використанням центрифуги ОПН-3,02 (ВАТ ТНК «Дастан», Киргизстан) при 1000 обертах/хвилину протягом 5 хвилин, потім відбирали надосадову рідину. Доливали 400 мкл того ж середовища і суспендовали піпетуванням. Суспензію ділили на дві частини, одну з яких використовували для оцінки цитогенетичних показників і параметрів клітинної кінетики кісткового мозку (розділ 2.3.9), а іншу – для визначення кількості клітин з фенотипом CD117+, яку проводили, як зазначено нижче. В окремі центрифужні пробірки додавали необхідну кількість моноклональних антитіл до CD117 (згідно з інструкцією), мічених фікоеритрином IOTest CD117-PE або моноклональні антитіла до CD117, мічені флуоресцеїн ізотіоціанатом CD117-FITC («Beckman Coulter», США) і 100 мкл крові або клітинної суспензії кісткового мозку, потім отриману суміш залишали на 10 – 20 хвилин в темряві при кімнатній температурі. Далі додавали сольовий лізуючий розчин (1 літр розчину містить: 8,29 г NH₄Cl (0,15 M), 1 г KHCO₃ (10,00 mM), 37,20 мг Na₂EDTA (0,10 mM), H₂O; pH 7,2 – 7,4) з розрахунку 2,5 мл на пробу, витримували проби протягом 8 хвилин в темряві при кімнатній температурі. Потім клітини відмивали PBS: в пробірки вносили по 1 мл PBS, вміст пробірок витримували протягом 10 хвилин в темряві при кімнатній температурі і після центрифугування при 1000 оборотах/хвилину протягом 5 хвилин надосадову рідину відбирали; промивання клітин PBS повторювали 4 рази. Проби аналізували на проточному цитофлуориметрії «Cytomics FC 500» («Beckman Coulter», США).

Флуоресценцію PE і FITC збуджували лазерним променем довжиною хвилі 488 нм, емісію детектували при 575 нм і 525 нм, відповідно.

Виділення областей досліджуваних клітин для аналізу здійснювали за параметрами «прямого» і «бічного» світлорозсіяння (FSC vs SSC), в змішаних лінійно-логарифмічних режимах (SSC vs FL1, FL2, FL3) або тільки із застосуванням параметрів флуоресценції з логарифмічним посиленням сигналу (log/log).

2.3.9. Оцінка цитогенетичних показників і параметрів клітинної кінетики кісткового мозку і крові тварин за допомогою проточної цитофлуориметрії

За допомогою проточної цитофлуориметрії в кістковому мозку і в крові експериментальних тварин на підставі гістограм розподілу ДНК в клітинах визначали долю клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами, а також кількість клітин в G_0/G_1 , S, G_2/M фазах клітинного циклу.

Для аналізу використовували клітини кісткового мозку і крові тварин (мишей ліній C57Bl/6 (розділ 2.3.1)) і Balb/C (розділ 2.3.2). Кров отримували з очного синуса лабораторних тварин, як зазначено в розділі 2.3.5. Клітини кісткового мозку виділяли зі стегнових кісток, як зазначено в розділі 2.3.8.

У центрифужні пробірки додавали 100 мкл крові або 100 мкл суспензії клітин кісткового мозку тварин і комерційний лізуючий розчин OptiLyse C («Beckman Coulter», США) з розрахунку 0,5 мл на пробу. Проби витримували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Відмивали клітини PBS чотири рази, як зазначено вище (розділ 2.3.8).

В кожен пробірку з осадом клітин доливали по 1 мл охолодженого етанолу (70%) до -200°C , суспендували і зберігали проби при -200°C до проведення експерименту. Фіксовані в етанолі клітини відмивали PBS чотири рази, як зазначено вище (розділ 2.3.8), після чого обробляли розчином РНК-ази («Sigma-Aldrich», США) (150 Од/мл) протягом 20 хвилин в темряві при кімнатній температурі. Додавали розчин флуорофора пропідіум йодиду («Beckman Coulter», США) (50 мкг/мл) і інкубували протягом 30 хвилин в темряві при кімнатній температурі.

Флуоресценцію пропідіум йодиду збуджували лазерним променем довжиною хвилі 535 нм, емісію детектували при довжині хвилі 617 нм.

Проводили аналіз зразків з використанням проточного цитофлуориметру «Cytomics FC 500» («Beckman Coulter», США), як зазначено нижче в розділі 2.4.3.

2.4 Дослідження *in vitro*

2.4.1 Дослідження впливу кандесартану цилексетилу, кандесартану і ресвератролу на зміни кількості клітин-попередників ендотелію, цитогенетичних показників і параметрів клітинної кінетики *in vitro* в культурах клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 і жирової тканини людини

Використовували клітини жирової тканини людини (розділ 2.2.2) і клітини кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6, отримані як зазначено нижче.

Після взяття у тварин стегнові кістки витримували її протягом години в 1°%-му розчині антибіотичного і протигрибкового розчину Antibiotic-antimycotic solution («Sigma-Aldrich», США). Потім обережно зрізали епіфізи кісток і кістковий мозок вимивали середовищем DMEM («Sigma-Aldrich», США). Осад клітин доводили до стану одноклітинної суспензії шляхом механічної дисоціації за рахунок пропускання через голки зі зменшуваним діаметром за допомогою шприца. Осаджували клітини центрифугуванням з використанням центрифуги ОПН-3,02 (ВАТ ТНК «Дастан», Киргизстан) при 1000 оборотах/хвилину протягом 5 хвилин, потім надосадову рідину відбирали.

До осаду клітин додавали культуральне середовище (90 % середовища DMEM («Sigma-Aldrich», США), 10 % ембріональної бичачої сироватки («HyClone», США), 0,1% антибіотичного і протигрибкового розчину Antibiotic-antimycotic solution («Sigma-Aldrich», США)) і переводили осад клітин в суспензію з концентрацією клітин, приблизно рівній $10^4/\text{см}^3$. Вносили суспензію в лунки 12-лункових планшетів Cellstar («Griener Bio-one», Німеччина) з розрахунку 100 мкл на лунку. Клітини інкубували в CO₂-інкубаторі «Heracell 150» («Thermo Scientific», США) (37°С, 5 % CO₂) протягом 10 днів. Зміну середовища проводили кожні 3 – 4 дні. При першій зміні середовища видаляли неприкріплені гематопоетичні клітини, залишаючи адгезивні стромальні кістковомозкові стовбурові клітини.

Клітини жирової тканини людини культивували аналогічним чином.

У відповідні лунки з клітинами кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 або жирової тканини людини додавали кандесартану цилексетил, кандесартан і ресвератрол: кандесартану цилексетил в концентраціях 1,5 мкг/мл і 3 мкг/мл, кандесартан в концентраціях 1,5 мкг/мл і 3 мкг/мл, ресвератрол в концентраціях 1 мкг/мл; 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 30 мкг/мл, 50 мкг/мл, кандесартану цилексетил в концентрації 1,5 мкг/мл, у поєднанні з ресвератролом в концентраціях 1 мкг/мл; 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 30 мкг/мл, 50 мкг/мл і кандесартан в концентрації 1,5 мкг/мл, у поєднанні з ресвератролом в концентраціях 1 мкг/мл; 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 30 мкг/мл, 50 мкг/мл (всього шість серій лунок для культури клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 відповідно до зразків і чотири серії лунок для культури жирової тканини людини). Клітини інкубували, як зазначено вище, протягом одного пасажу. Після формування моношару надосадову рідину видаляли і в культуральні флакони вносили розчин, що містить 0,25 г трипсину і 0,2 г 4Na-ЕДТА (0,25 % трипсин/ЕДТА («Sigma-Aldrich», США). Після відкріплення клітин їх обережно змивали, добовляли до них ембріональну бичачу сироватку («HyClone», США) і переносили з лунок до відповідних центрифужних пробірок. Клітини відмивали двічі PBS, як зазначено вище (розділ 2.3.8), і суспендованих в малому обсязі того ж буфера.

Кожну суспензію клітин використовували для аналізу наступних показників:

- кількості клітин з фенотипом CD117+;
- кількості клітин з фенотипом CD34+;
- кількості клітин з фенотипом CD117+/CD34+;
- кількості клітин з фенотипом CD31+;
- кількості клітин з ознаками апоптозу;
- кількості клітин з мікроядрами;
- розподілу клітин за фазами клітинного циклу (G_0/G_1 , S, G_2/M).

Аналіз кількості клітин з CD117+, CD34+, CD117+/CD34+ і CD31+ (розділ 2.4.2), числа клітин з ознаками апоптозу і мікроядрами, розподілу клітин за фазами клітинного циклу (G_0/G_1 , S, G_2/M) (розділ 2.4. 3) проводили з

використанням проточного цитофлуориметра «Cytomics FC500» («Beckman Coulter», США).

2.4.2 Дослідження впливу кандесартану цилексетилу, кандесартану та ресвератролу на зміну кількості клітин з фенотипом CD117+, CD34+, CD117+/CD34+ та CD31+ *in vitro*

Дослідження кількості клітин з фенотипом CD117+ в культурі кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 і клітин з CD117+, CD34+, CD117+/CD34+ і CD31+ в культурі жирової тканини людини проводили методом проточної цитофлуориметрії. Клітини культивували і інкубували з кандесартану цилексетилом, кандесартаном і ресвератролом, промивали і суспендовали, як зазначено в розділі 2.4.1. У відповідні центрифужні пробірки вносили 100 мкл одного із зразків суспензії клітин і необхідну кількість моноклональних антитіл до CD117 (згідно з інструкцією), мічених фікоеритрином IOTest CD117-PE («Beckman Coulter», США), моноклональними антитілами до CD34, мічених флуоресцеїн ізотіоціанатом CD34-FITC («Exbio», Чехія), моноклональні антитіла до CD31, мічених фікоеритрином CD31-PE («Exbio», Чехія). Отриману суміш залишали на 10 – 20 хвилин в темряві при кімнатній температурі. Проби аналізували, використовуючи проточний цитофлуориметр «Cytomics FC 500» («Beckman Coulter», США), як зазначено в розділі 2.3.8.

2.4.3 Аналіз впливу кандесартану цилексетилу, кандесартану та ресвератролу на зміну цитогенетичних показників та параметрів клітинної кінетики *in vitro*

Клітини кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 і жирової тканини людини культивували і інкубували з кандесартану цилексетилом, кандесартаном і ресвератролом, як зазначено в розділі 2.4.1. У відповідні центрифужні пробірки вносили один із зразків суспензії клітин (100 мкл). Проби відмивали в 1 мл PBS (зразки витримували протягом 10 хвилин в темряві при кімнатній температурі, після центрифугування при 1000 оборотах/хвилину протягом 5 хвилин відбирали

надосадову рідину). Потім зразки фіксували в охолодженому етанолі (70 %) і зберігали при -20°C до проведення експерименту.

Клітини, фіксовані в етанолі відмивали PBS, після чого обробляли РНК-зою («Sigma-Aldrich», США) і інкубували з пропідіум йодидом («Sigma-Aldrich», США), як зазначено вище в розділі 2.3.9. Проводили аналіз зразків з використанням проточного цитофлуориметра «Cytomics FC 500» («Beckman Coulter», США). За стандартними методиками визначали кількість клітин з ознаками апоптозу, з мікроядрами, проводили оцінку проліферативної активності клітин, аналізуючи розподіл клітин за фазами клітинного циклу (G_0/G_1 , S, G_2/M). Кількість апоптотичних клітин розраховували на підставі вимірювання вмісту в них у гіподіплоїдній зоні ДНК. На гістограмі в регіоні M1 реєстрували апоптотичні клітини з вмістом ДНК менше $2n2c$ (рисунок 2.1), де c – вміст ДНК в гаплоїдному геномі з числом хромосом, рівним n .

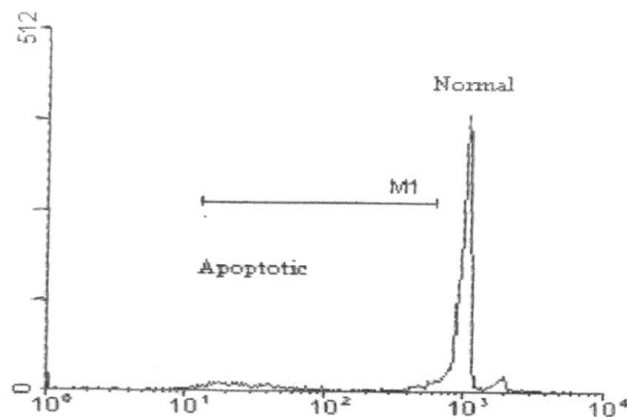


Рис. 2.1. Типова ДНК-гістограма розподілу апоптотичних клітин на прикладі кісткового мозку миші: по осі абсцисс – інтенсивність флуоресценції, пропорційна вмісту ДНК; по осі ординат – число клітин з цим вмістом ДНК.

Тип ядер визначали за інтенсивністю флуоресценції (інтенсивність світлорозсіювання пропорційна розміру клітин). На рисунку 2.2 відзначені два пула ядер. Перший пул (N) містить диплоїдні і тетраплоїдні ядра, другий (MN) – мікроядра. З урахуванням отриманих даних і, виходячи з припущення, що одна клітина містить одне мікроядро, розраховували частку клітин з мікроядрами,

тобто тих які містять ДНК в кількості, що становить не більше 50 % від такого в диплоїдному ядрі.

Аналіз розподілу клітин на ДНК-гістограмі по фазах клітинного циклу проводили за допомогою програми Cell FIT. На гістограмах нормальної диплоїдної популяції клітини, що знаходяться у фазі G_0/G_1 , містять $2c$ ДНК, що відповідає 1-му піку, в фазі G_2/M – $4c$ ДНК (2-й пік), а в S стадії – проміжна величина (рисунок 2.3) (де c – вміст ДНК в гаплоїдному геномі).

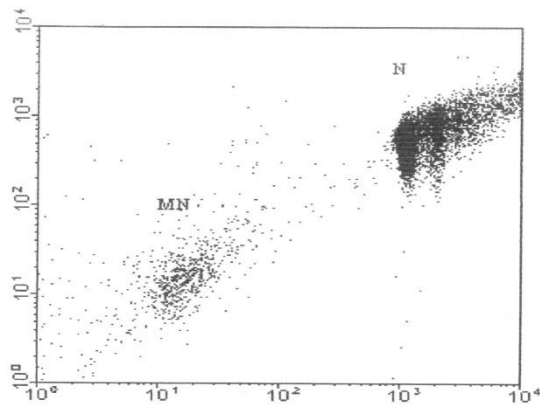


Рис. 2.2. Точковий графік розподілу клітин з мікроядрами на прикладі кісткового мозку мишей: по осі абсцис – інтенсивність флуоресценції, пропорційна вмісту ДНК; по осі ординат – інтенсивність світлорозсіювання, пропорційна розміру клітин.

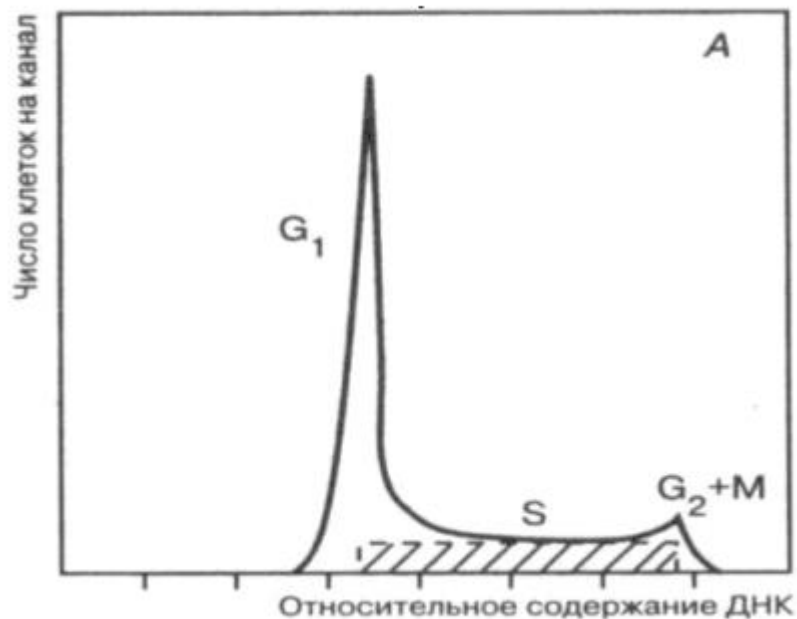


Рис. 2.3. ДНК-гістограма диплоїдних клітин. Долю клітин в S фазі вираховують, вписавши прямокутник в область кривої між G₁- і G₂-піками.

2.4.4 Метилтетразолієвий тест на визначення інгібуючих концентрацій ресвератролу *in vitro*

Цей тест заснований на здатності живих метаболічно активних клітин переводити сіль тетразоліну (MTS) до формагану, розчинного в середовищі культивування. Поглинання формагану прямо пропорційно кількості життєздатних клітин в культурі.

Для проведення експерименту клітини жирової тканини людини (розділ 2.2.2) вирощували в CO₂-інкубаторі «Heracell 150» («Thermo Scientific», США) при 37°C, 5%-м CO₂, в лунках 96-лункових планшетів. У відповідні лунки з прикріпленими клітинами (другу добу культивування) вносили ресвератрол в концентраціях 50 мкг/мл і 100 мкг/мл. Після 24-годинної експозиції досліджуваних зразків в умовах, зазначених вище для росту клітин, промивали проби PBS як зазначено вище в розділі 2.3.8. У кожен лунку вносили розчини, які є компонентами набору реагентів CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, США), інкубували протягом 20 хвилин в термостаті «Heraeus function line» («Thermo electron corporation», США) при 37°C.

Фотометрично визначали сумарну активність мітохондріальних дегідрогеназ клітин в кожній лунці, вимірюючи поглинання формагану при довжині хвилі 492 нм з використанням рідера для мікропланшетів «Stat Fax 3200» («Awareness Technology», США). Активність кожного зразка оцінювали за показником IC₅₀ (середня інгібіторна концентрація – концентрація речовини, яка пригнічує на 50 % цю клітинну функцію) і відносній частці загиблих клітин, значення якої обчислюють за формулою 2.3.4:

$$\% \text{ загибелі} = 100 - \text{ОПе} / \text{ОПк} * 100 \quad (2.3.4)$$

де ОПе – експериментальний показник середньої оптичної щільності;

ОПк – оптична щільність в контролі.

2.5 Статистична обробка отриманих результатів

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням статистичних пакетів прикладних програм «Microsoft Excel» і «Statistica 6.0». Як характеристику отриманих вибірок використовували середнє, стандартну помилку середнього, обсяг вибірки. Статистичну достовірність відмінностей між групами даних оцінювали за допомогою параметричних методів (ANOVA, Student's t-test, Tukey range test, Newman-Keuls test) і непараметричних методів (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U-test, Wilcoxon signed-rank test, Dunn's test, Chi-square), але в кінцевому підсумку були обрані ANOVA, Student's t-test (при нормальному розподілі), Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U-test, (при розподілі, відмінному від нормального), як найбільш адекватні для проведених експериментів, оскільки вони найбільш точно і повно дозволяють оцінити відмінності між групами і врахувати всі умови. Тест Фішера використовувався для перевірки рівності дисперсій. Для цього також були взяті потужніші тести (критерій Левена, критерій Флігнера). Тести Колмогорова – Смирнова і Шапіро – Уїлкі використовувалися в дисертації для перевірки вибірки на нормальність. Статистично значимі відмінності між порівнюваними групами фіксували при рівні $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕНН ВПЛИВУ КАНДЕСАРТАНУ ЦИЛЕКСЕТИЛУ, КАНДЕСАРТАНУ І РЕСВЕРАТРОЛУ НА ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ПОКАЗНИКИ І ПАРАМЕТРИ КЛІТИННОЇ КІНЕТИКИ *IN VITRO*

Останнім часом спостерігається великий інтерес до вивчення фармацевтичних композицій, що містять природні сполуки, для створення лікарських препаратів, які були б більш ефективними і безпечними порівняно з тими, які уже існують на сьогодні. Так, є дані досліджень комбінацій, що містять ресвератрол. Описана комбінація ресвератролу і симвастатину, яка має гіпохолестеринемічну дію, вивчається комплекс ресвератролу з еналаприлом із метою розробки препарату з остеопротекторною дією, комбінація ресвератролу з лозартаном, еналаприлом для дослідження ендотеліо- та кардіопротекторної активності [189 – 191].

ЕПК, як і інші клітини-попередники, дуже специфічні для певного клітинного ряду. Встановлено, що ЕПК включають різномірну популяцію клітин, які здатні до диференціювання тільки в клітини ендотелію [195 – 197]. На поверхні ЕПК експресуються такі маркери, як CD34, CD133, CD31, CD117 (або c-kit+), VEGFR-2.

Маркер CD34 є мембранним білком, що складається з 385 амінокислот і кодується геном CD34 [198, 199]. Клітинний маркер CD34 експресується на ранніх гемопоетичних клітинах, також він є в незначній кількості на зрілих клітинах ендотелію [200 – 202]. Клітини з фенотипом CD34+ виявлені в кістковому мозку, пуповині, на мезенхімальних стовбурових клітинах, ЕПК, ендотеліальних клітинах судин, дендритних клітинах, а також на ракових клітинах (DFSP, GIST, SFT, HPC, MPNSTs) [203]. Наявність маркера CD34 на різних етапах клітин говорить про те, що саме цей маркер є більш загальним, а не специфічним для певного типу клітин.

Клітинний маркер CD133 є глікопротеїном і кодує у людини геном PROM1 [204, 205]. Цей маркер виявили на гемопоетичних, гліальних, нейронних стовбурових клітинах, ЕПК, гліобластомах, клітинах нирок, молочних, слинних залоз, плаценти, трахеї, травного тракту, пухлинах головного мозку [206 – 211]. В цілому, маркер CD133 є примітивним, як і CD34, однак на відміну від останнього, експресія маркера CD133 відбувається тільки на незрілих типах клітин [201].

Маркер CD31 – це глікопротеїн, мембранний білок суперсімейства імуноглобулінів, який складається з 738 амінокислот. Використовується маркер CD31 для ідентифікації ендотеліальних клітин, в менших кількостях його виявлено на циркулюючих моноцитах, тромбоцитах, нейтрофілах, деяких типах Т-клітин [212, 213].

Маркер VEGFR-2 (або KDR (Kinase insert domain receptor)) кодується геном KDR. Цей маркер присутній на зрілих ендотеліальних клітинах і опосередковує сигнал фактора росту ендотелію. Відомо, що лише 0,1 – 0,4 % клітин з фенотипом CD34+ в кістковому мозку і в крові після мобілізації G-CSF експресують VEGFR-2 маркер на своїй поверхні [201, 214].

Клітинний маркер CD117+ є цитокіновим рецептором – продуктом гена KIT. Відомо, що CD117 експресується на поверхні ЕПК [215, 216]. У клінічній практиці іноді цей маркер також застосовують для діагностики онкологічних захворювань. Експресія маркера CD117 спостерігається рідко при остеосаркомі, а також при раку шлунково-кишкового тракту і в самих тканинах яєчників [217 – 219].

3.1 Вивчення впливу кандесартану цилексетилу, кандесартану та ресвератролу на зміни кількості клітин з CD117+ в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6

В ході виконання дисертаційної роботи було вивчено дію кандесартану цилексетилу, кандесартану і ресвератролу в різних концентраціях і співвідношеннях на зміну числа ЕПК в культурі клітин кісткового мозку мишей

лінії C57Bl/6. Для проведення цього дослідження зміни кількості ЕПК було обрано поверхнево клітинний маркер CD117 (або c-kit) (табл. 3.1).

Таблиця 3.1.

Вміст клітин з CD117+ в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 при застосуванні кандесартану цилексетилу, кандесартану та ресвератролу

Група	Вміст клітин з CD117+, %
1	2
1. Контроль	6,38±0,10
2. Канд. цил. 3 мкг/мл	3,40±0,14
3. Канд. цил. 1,5 мкг/мл	4,18±0,16
4. Канд. 3 мкг/мл	7,75±0,26
5. Канд. 1,5 мкг/мл	7,02±0,14
6. Ресв. 1 мкг/мл	6,42±0,17
7. Ресв. 5 мкг/мл	6,53±0,18
8. Ресв. 10 мкг/мл	6,63±0,16
9. Ресв. 30 мкг/мл	8,68±0,14
10. Ресв. 50 мкг/мл	10,12±0,20
11. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв. 1 мкг/мл	4,32±0,21
12. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв. 5 мкг/мл	4,57±0,23
13. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв. 10 мкг/мл	6,73±0,18
14. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв. 30 мкг/мл	8,45±0,23
15. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв. 50 мкг/мл	10,03±0,19
16. Канд. 1,5 мкг/мл і ресв. 1 мкг/мл	7,13±0,24
17. Канд. 1,5 мкг/мл і ресв. 5 мкг/мл	7,57±0,19
18. Канд. 1,5 мкг/мл і ресв. 10 мкг/мл	8,22±0,28
19. Канд. 1,5 мкг/мл і ресв. 30 мкг/мл	9,18±0,36
20. Канд. 1,5 мкг/мл і ресв. 50 мкг/мл	11,38±0,27
	$p_{1-2}<0,05$; $p_{4-9}<0,05$; $p_{9-12}<0,05$; $p_{1-3}<0,05$; $p_{4-10}<0,05$; $p_{9-13}<0,05$; $p_{1-4}<0,05$; $p_{4-11}<0,05$; $p_{9-15}<0,05$; $p_{1-5}<0,05$; $p_{4-12}<0,05$; $p_{9-16}<0,05$; $p_{1-9}<0,05$; $p_{4-13}<0,05$; $p_{9-17}<0,05$; $p_{1-10}<0,05$; $p_{4-15}<0,05$; $p_{9-20}<0,05$; $p_{1-11}<0,05$; $p_{4-19}<0,05$; $p_{10-11}<0,05$; $p_{1-12}<0,05$; $p_{4-20}<0,05$; $p_{10-12}<0,05$; $p_{1-14}<0,05$; $p_{5-6}<0,05$; $p_{10-13}<0,05$; $p_{1-15}<0,05$; $p_{5-9}<0,05$; $p_{10-14}<0,05$; $p_{1-16}<0,05$; $p_{5-10}<0,05$; $p_{10-16}<0,05$;

1	2
	<p> $p_{1-17} < 0,05$; $p_{5-11} < 0,05$; $p_{10-17} < 0,05$; $p_{1-18} < 0,05$; $p_{5-12} < 0,05$; $p_{10-18} < 0,05$; $p_{1-19} < 0,05$; $p_{5-14} < 0,05$; $p_{10-20} < 0,05$; $p_{1-20} < 0,05$; $p_{5-15} < 0,05$; $p_{11-13} < 0,05$; $p_{2-3} < 0,05$; $p_{5-17} < 0,05$; $p_{11-14} < 0,05$; $p_{2-4} < 0,05$; $p_{5-18} < 0,05$; $p_{11-15} < 0,05$; $p_{2-5} < 0,05$; $p_{5-19} < 0,05$; $p_{11-16} < 0,05$; $p_{2-6} < 0,05$; $p_{5-20} < 0,05$; $p_{11-17} < 0,05$; $p_{2-7} < 0,05$; $p_{6-9} < 0,05$; $p_{11-18} < 0,05$; $p_{2-8} < 0,05$; $p_{6-10} < 0,05$; $p_{11-19} < 0,05$; $p_{2-9} < 0,05$; $p_{6-11} < 0,05$; $p_{11-20} < 0,05$; $p_{2-10} < 0,05$; $p_{6-12} < 0,05$; $p_{12-13} < 0,05$; $p_{2-11} < 0,05$; $p_{6-14} < 0,05$; $p_{12-14} < 0,05$; $p_{2-12} < 0,05$; $p_{6-15} < 0,05$; $p_{12-15} < 0,05$; $p_{2-13} < 0,05$; $p_{6-16} < 0,05$; $p_{12-16} < 0,05$; $p_{2-14} < 0,05$; $p_{6-17} < 0,05$; $p_{12-17} < 0,05$; $p_{2-15} < 0,05$; $p_{6-18} < 0,05$; $p_{12-18} < 0,05$; $p_{2-16} < 0,05$; $p_{6-19} < 0,05$; $p_{12-19} < 0,05$; $p_{2-17} < 0,05$; $p_{6-20} < 0,05$; $p_{12-20} < 0,05$; $p_{2-18} < 0,05$; $p_{7-9} < 0,05$; $p_{13-14} < 0,05$; $p_{2-19} < 0,05$; $p_{7-10} < 0,05$; $p_{13-15} < 0,05$; $p_{2-20} < 0,05$; $p_{7-11} < 0,05$; $p_{13-17} < 0,05$; $p_{3-4} < 0,05$; $p_{7-12} < 0,05$; $p_{13-18} < 0,05$; $p_{3-5} < 0,05$; $p_{7-14} < 0,05$; $p_{13-19} < 0,05$; $p_{3-6} < 0,05$; $p_{7-15} < 0,05$; $p_{13-20} < 0,05$; $p_{3-7} < 0,05$; $p_{7-17} < 0,05$; $p_{14-15} < 0,05$; $p_{3-8} < 0,05$; $p_{7-18} < 0,05$; $p_{14-16} < 0,05$; $p_{3-9} < 0,05$; $p_{7-19} < 0,05$; $p_{14-17} < 0,05$; $p_{3-10} < 0,05$; $p_{7-20} < 0,05$; $p_{14-20} < 0,05$; $p_{3-13} < 0,05$; $p_{8-9} < 0,05$; $p_{15-16} < 0,05$; $p_{3-14} < 0,05$; $p_{8-10} < 0,05$; $p_{15-17} < 0,05$; $p_{3-15} < 0,05$; $p_{8-11} < 0,05$; $p_{15-18} < 0,05$; $p_{3-16} < 0,05$; $p_{8-12} < 0,05$; $p_{15-20} < 0,05$; $p_{3-17} < 0,05$; $p_{8-14} < 0,05$; $p_{16-18} < 0,05$; $p_{3-18} < 0,05$; $p_{8-15} < 0,05$; $p_{16-19} < 0,05$; $p_{3-19} < 0,05$; $p_{8-17} < 0,05$; $p_{16-20} < 0,05$; $p_{3-20} < 0,05$; $p_{8-18} < 0,05$; $p_{17-19} < 0,05$; $p_{4-5} < 0,05$; $p_{8-19} < 0,05$; $p_{17-20} < 0,05$; $p_{4-6} < 0,05$; $p_{8-20} < 0,05$; $p_{18-20} < 0,05$; </p>

1	2
	$p_{4-7} < 0,05$; $p_{9-10} < 0,05$; $p_{19-20} < 0,05$. $p_{4-8} < 0,05$; $p_{9-11} < 0,05$;

Примітки:

1. Канд. цил. – кандесартану цилексетил;
2. Канд. – кандесартан;
3. Ресв. – ресвератрол.

Фермент епітелію кишківника карбоксилестерази 1, 2 (ЄС 3.1.1.1) *in vivo* гідролізує проліки кандесартану цилексетил та утворює біологічно активний метаболіт кандесартан. У зв'язку з цим в експериментах *in vitro* використовували кандесартан, імітуючий ситуацію, яка відбувається *in vivo* при пероральному введенні кандесартану цилексетилу і його метаболізму, а кандесартану цилексетил виступав в якості контролю [220, 221].

Отримані результати експериментальної роботи щодо вивчення впливу кандесартану цилексетилу, кандесартану та ресвератролу на стимуляцію утворення клітин з фенотипом CD117+ *in vitro* представлені в таблиці 3.1. В ході проведення дослідження було встановлено, що кандесартану цилексетил в концентраціях 3 мкг/мл і 1,5 мкг/мл знижує кількість клітин з фенотипом CD117+ в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 порівняно з контролем ($p < 0,05$). Показано, що кандесартан стимулює утворення клітин з фенотипом CD117+ (табл. 3.1).

Аналізуючи дію ресвератролу на зміну числа ЕПК *in vitro* в різних концентраціях ми виявили дозозалежне збільшення кількості клітин з фенотипом CD117+ (табл. 3.1). Так, вміст клітин, які досліджували при застосуванні ресвератролу в концентраціях 1 мкг/мл, 5 мкг/мл і 10 мкг/мл порівняно з контролем, достовірно не відрізнявся. Виявлено, що ресвератрол в концентраціях 30 мкг/мл і 50 мкг/мл призводить до збільшення кількості клітин з CD117+ в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6, порівняно з контрольним значенням, в пробах з кандесартаном цилексетилу в концентраціях 3 мкг/мл і 1,5

мкг/мл, кандесартаном в концентраціях 3 мкг/мл і 1,5 мкг/мл, а також в зразках з ресвератролом в концентраціях 1 мкг/мл, 5 мкг/мл і 10 мкг/мл ($p < 0,05$) (табл. 3.1).

Показано, що при застосуванні кандесартану цилексетилу в концентрації 1,5 мкг/мл, в поєднанні з ресвератролом в концентрації 1 мкг/мл число клітин з CD117+ знижується порівняно з контрольними значеннями і у всіх пробах з ресвератролом та збільшується у порівнянні зі значенням, отриманим при використанні кандесартану цилексетилу в концентрації 3 мкг/мл ($p < 0,05$) (табл. 3.1).

Кількісний аналіз клітин з CD117+ за дії кандесартану цилексетилу в концентрації 1,5 мкг/мл, в поєднанні з ресвератролом в концентрації 5 мкг/мл показав, що цей показник був нижчим порівняно з контролем та усіма зразками з ресвератролом і вище значень для кандесартану цилексетилу в концентрації 3 мкг/мл ($p < 0,05$) (табл. 3.1).

Встановлено, що при використанні кандесартану цилексетилу в концентрації 1,5 мкг/мл в поєднанні з ресвератролом в концентрації 10 мкг/мл спостерігалось значне підвищення числа досліджуваних клітин в порівнянні з отриманими при застосуванні тільки кандесартану цилексетилу в концентраціях 3 мкг/мл і 1,5 мкг/мл і при використанні кандесартану цилексетилу в концентрації 1,5 мкг/мл в поєднанні з ресвератролом в концентраціях 1 мкг/мл і 5 мкг/мл, і були нижчі значення в пробах з ресвератролом в концентраціях 30 мкг/мл та 50 мкг/мл ($p < 0,05$) (табл.3.1).

Кандесартану цилексетил в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератрол в концентраціях 30 мкг/мл і 50 мкг/мл призводять до збільшення кількості ЕПК порівнянно з контрольними значеннями, зразками з кандесартану цилексетилом, концентрація яких 3 мкг/мл і 1,5 мкг/мл, зразками з ресвератролом в концентрації 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, зразками з кандесартану цилексетилом в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролом в концентрації 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл ($p < 0,05$). Виявлено, що при застосуванні кандесартану цилексетилу в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролу в концентрації 30 мкг/мл число клітин CD117+ в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 було нижче

порівняно з використанням ресвератролу в концентрації 50 мкг/мл ($p < 0,05$). Показано, що кількість ЕПК при додаванні в культуру клітин кандесартану цилексетилу в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролу в концентрації 50 мкг/мл збільшується порівняно з застосуванням тільки ресвератролу в концентрації 30 мкг/мл ($p < 0,05$) (табл. 3.1).

Встановлено, що використання кандесартану в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролу в концентрації 1 мкг/мл призводить до значного збільшення вмісту клітин з фенотипом CD117+ порівняно з контрольними значеннями і в пробах з ресвератролом в концентрації 1 мкг/мл, проте достовірно нижче показника в зразках з ресвератролом в концентрації 30 мкг/мл і 50 мкг/мл (табл. 3.1).

Виявлено, що кандесартан в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератрол в концентрації 5 мкг/мл стимулюють утворення ЕПК в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 порівняно з контролем. Відмінності були достовірно вищі в порівнянні з використанням тільки кандесартану в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролу в концентрації 1 – 50 мкг/мл (табл. 3.1).

Кандесартан в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератрол в концентрації 10 мкг/мл збільшують вміст клітин з фенотипом CD117+ порівняно з контролем, зразками з кандесартаном в концентрації 1,5 мкг/мл і з ресвератролом в концентраціях 1 мкг/мл, 5 мкг/мл і 10 мкг/мл (табл. 3.1).

Показано, що кандесартан в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератрол в концентраціях 30 мкг/мл чи 50 мкг/мл призводять до збільшення вмісту ЕПК в культурі кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 в порівнянні з контролем, використанням тільки кандесартану в концентраціях 3 мкг/мл і 1,5 мкг/мл, а також ресвератролу в концентраціях 1 мкг/мл, 5 мкг/мл чи 10 мкг/мл ($p < 0,05$). Застосування кандесартану в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролу в концентрації 50 мкг/мл призвело до достовірного збільшення клітин з фенотипом CD117+ в порівнянні з дією ресвератролу в концентраціях 30 мкг/мл і 50 мкг/мл (табл. 3.1).

У літературі є дані про те, що кандесартан в концентраціях 0,1 мкг/мл, 1,0 мкг/мл і 10,0 мкг/мл збільшує експресію VEGF-A і VEGF-B *in vitro* [153].

Alhusban та співавтори встановили, що кандесартан підсилює процеси ангиогенезу, проліферацію, міграцію ендотеліальних клітин мозку *in vitro* [152].

Існує інформація, що ресвератрол підсилює процеси реендотелізації і зменшує ймовірність утворення фіброзної оболонки після ушкодження ендотелію. Встановлено, що ресвератрол також впливає на процеси «хоумінга» ЕПК. Були досліджені концентрації ресвератролу від 5 μM до 100 μM (тобто від 1,15 мкг/мл до 23,00 мкг/мл). Показано, що при використанні ресвератролу в концентраціях 5 – 20 μM (тобто від 1,15 мкг/мл до 4,60 мкг/мл) кількість клітин не змінюється. При застосуванні ресвератролу в концентрації 100 μM (тобто 23,00 мкг/мл) спостерігалось зменшення кількості клітин, а також виявлено цитотоксичний ефект цієї речовини, який не спостерігався при використанні ресвератролу в інших концентраціях. Встановлено, що ресвератрол в концентрації 20 μM (тобто 4,60 мкг/мл) здатний індукувати утворення ендотеліальних маркерів клітин. При цьому ця речовина не має суттєвого впливу на процеси проліферації і апоптозу клітин [185].

Встановлено, що ресвератрол в концентраціях 10 μM , 25 μM чи 50 μM (тобто 2,30 мкг/мл, 5,75 мкг/мл чи 11,50 мкг/мл, відповідно) призводить до посилення проліферації і міграції ЕПК, в концентрації 100 μM (тобто 23,00 мкг/мл) спостерігаються зниження проліферативних процесів і загибель клітин *in vitro*, що свідчить про цитотоксичний ефект ресвератролу в високих концентраціях. Хіа та співавтори показали, що ресвератрол сприяє збільшення числа ЕПК, покращує функціональну активність, посилює проліферацію та міграцію клітин з маркерами CD34, CD133, CD45 *in vitro*. Встановлено, що ресвератрол впливає на життєздатність ЕПК, причому в концентрації 50 μM (тобто 11,50 мкг/мл) спостерігається максимальний ефект. При застосуванні цієї речовини в концентрації 100 μM (тобто 23,00 мкг/мл) спостерігається цитотоксичний ефект, виявлено збільшення числа апоптотичних клітин, тоді як в концентрації 50 μM (тобто 11,50 мкг/мл) ресвератрол не чинив токсичний ефект на клітини [185, 222].

У літературі є відомості про те, що ресвератрол в концентраціях 1 μM , 10 μM , 50 μM (тобто 0,23 мкг/мл, 2,30 мкг/мл чи 11,50 мкг/мл, відповідно) перешкоджає старінню ЕПК, причому максимальний ефект досягає при використанні ресвератролу в концентрації 50 μM (тобто 11,50 мкг/мл) [223].

Wang та співавтори встановили на ЕПК, які були ізольовані з крові людей і культивували в присутності ресвератролу в концентраціях 1 μM , 10 μM чи 25 μM , 50 μM (тобто 0,23 мкг/мл, 2,30 мкг/мл, 5,75 мкг/мл і 11,50 мкг/мл, відповідно), встановили що досліджувана речовина призводить до збільшення числа ЕПК, підсилює проліферацію, адгезію і міграцію стовбурових клітин, активуючи процеси ангиогенезу *in vitro* [224].

Gu та співавтори також показали, що ресвератрол в концентрації 1 μM (тобто 0,23 мкг/мл) значно підсилює проліферацію, міграцію і адгезію ЕПК людини *in vitro*, тоді як концентрація ресвератролу 60 μM (тобто 13,80 мкг/мл) пригнічує вищезгадані ефекти [225].

Таким чином, результати впливу речовин, які досліджували, на зміну числа ЕПК, отримані в ході виконання дисертаційної роботи, підтверджується літературними даними.

В той час дослідники встановили, що ресвератрол в концентрації 50 μM (тобто 11,50 мкг/мл) має цитотоксичний ефект на ЕПК крові людей в дослідженнях *in vitro*, що проявляється зниженням кількості цих клітин у зразках [226].

Таким чином, в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 для кандесартану цилексетилу в концентраціях 3 мкг/мл і 1,5 мкг/мл вперше показано зниження кількості клітин з фенотипом CD117+. Виявлено, що кандесартан в концентраціях 3 мкг/мл чи 1,5 мкг/мл стимулює утворення ЕПК *in vitro*. При аналізі впливу ресвератролу на зміну числа ЕПК встановлено, що при застосуванні цієї речовини в концентрації 30 мкг/мл відбувається значне збільшення кількості досліджуваних клітин, а при використанні ресвератролу в концентрації 50 мкг/мл ми спостерігали збільшення стимуляції клітин з CD117+. Вперше вставлено, що комплексне застосування кандесартану цилексетилу в

концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролу в концентраціях 30 мкг/мл чи 50 мкг/мл збільшує число ЕПК з фенотипом CD117+ *in vitro*, причому значення показників відповідають таким, які отримані при дії тільки ресвератролу в концентраціях 30 мкг/мл і 50 мкг/мл. Вперше встановлено, що використання кандесартану цилексетилу в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролу в концентраціях 1 – 50 мкг/мл достовірно збільшує кількість ЕПК. Таким чином, ефект стимуляції утворення клітин з фенотипом CD117+ при комбінації дії кандесартану, в поєднанні з ресвератролом досягається за рахунок односпрямованої дії двох досліджуваних речовин на культуру клітин, а при комбінованій дії кандесартану цилексетилу, в поєднанні з ресвератролом – за рахунок останнього.

3.2 Вивчення впливу кандесартану цилексетилу, кандесартану і ресвератролу на цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6

Вивчення основних цитогенетичних показників і параметрів клітинної кінетики є необхідною умовою для визначення ефективності дії препаратів, їх цитопротекторних, цитостатичних і цитотоксичних властивостей. Існують дані про те, що кандесартану цилексетил знижує ймовірність виникнення апоптичних процесів в культурі мезенхімальних клітин [227].

Є інформація, що ресвератрол впливає на диференціювання клітин, стимулюючи перехід з G₀/G₁ фаз клітинного циклу в S стадію [223]. У концентрації 50 μM (тобто 11,5 мкг/мл) ця речовина призводить до перерозподілу клітин за стадіями клітинного циклу: спостерігається збільшення кількості клітин в S фазі і зниження числа клітин в G₀/G₁ фазах [224]. У культурі ракових клітин ресвератрол призводить до збільшення числа апоптотичних клітин, а решту клітин на G₀/G₁ стадії клітинного циклу [228].

В дисертаційній роботі були вивчені зміни наступних цитогенетичних показників і параметрів клітинної кінетики *in vitro* при використанні кандесартану цилексетилу, кандесартану та ресвератролу в різних концентраціях і співвідношеннях: число клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами, розподіл

клітин за стадіями клітинного циклу (кількість клітин, що знаходяться в G_0/G_1 , S, G_2/M фазах клітинного циклу). Отримані в ході проведення роботи результати експерименту представлені в таблиці 3.2.

Відзначено збільшення кількості апоптотичних клітин при використанні кандесартану цилексетилу в концентрації 3 мкг/мл в порівнянні з контролем ($p < 0,05$). Кандесартану цилексетил в концентрації 1,5 мкг/мл не мав впливу на зміну числа клітин з ушкодженням ДНК. Встановлено, що кандесартан в концентраціях 3 мкг/мл і 1,5 мкг/мл призводить до збільшення кількості апоптотичних клітин і клітин з мікроядрами в порівнянні з контрольним значенням ($p < 0,05$). Виявлено, що застосування ресвератролу в концентраціях 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 30 мкг/мл чи 50 мкг/мл не змінює число клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 (табл. 3.2).

В результаті проведеного дослідження встановлено, що використання кандесартану цилексетилу в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролу в концентраціях 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 30 мкг/мл і 50 мкг/мл не впливало на кількість клітин з ознаками пошкодження генетичного матеріалу (табл. 3.2).

Показано, що при застосуванні кандесартану в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролу в концентраціях 1 мкг/мл, 5 мкг/мл і 10 мкг/мл вміст апоптотичних клітин був значно вищим за контрольні значення, в поєднанні з ресвератролом в діапазоні концентрації від 1 мкг/мл до 50 мкг/мл, проте значно нижчі значення в пробах з кандесартаном в концентрації 3 мкг/мл. Кандесартан в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератрол в концентрації 10 мкг/мл зменшили кількість апоптотичних клітин в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 в порівнянні з кандесартаном в концентрації 1,5 мкг/мл ($p < 0,05$) (табл. 3.2).

Виявлено, що кандесартан в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератрол в концентраціях 30 мкг/мл чи 50 мкг/мл зменшують вміст клітин з ознаками апоптозу в порівнянні з дією тільки кандесартану в концентраціях 3 мкг/мл і 1,5 мкг/мл ($p < 0,05$) (табл. 3.2).

В ході вивчення впливу кандесартану цилексетилу на число клітин з мікроядрами встановлено, що така речовина в концентраціях 3 мкг/мл і 1,5 мкг/мл не має впливу на цей показник. Відзначено значне збільшення вмісту клітин з мікроядрами при використанні кандесартану в концентраціях 3 мкг/мл і 1,5 мкг/мл в порівнянні з контрольним значенням ($p < 0,05$) (табл. 3.2).

Встановлено, що ресвератрол в концентрації 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 30 мкг/мл чи 50 мкг/мл не змінює кількість клітин з мікроядрами в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 (табл. 3.2).

В результаті проведеного дослідження дії кандесартану цилексетилу в концентрації 1,5 мкг/мл в поєднанні з ресвератролом в концентраціях від 1 мкг/мл до 50 мкг/мл на число клітин з мікроядрами показано, що ці речовини не впливають на зміну досліджуваного параметра (табл. 3.2).

Виявлено, що застосування кандесартану в поєднанні з ресвератролом призводить до зниження кількості клітин з мікроядрами в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 за рахунок дії природної речовини ресвератролу. Так, показано, що кандесартан в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератрол в концентраціях 10 мкг/мл, 30 мкг/мл і 50 мкг/мл значно зменшує вміст клітин з мікроядрами в порівнянні з використанням моноречовини кандесартану в концентрації 1,5 мкг/мл, причому кандесартан в концентрації 1,5 мкг/мл у поєднанні з ресвератролом в концентраціях 30 мкг/мл і 50 мкг/мл відновлює значення досліджуваного показника до контрольних значень (табл. 3.2).

Також було вивчено розподіл клітин за фазами клітинного циклу при використанні кандесартану цилексетилу, кандесартану і ресвератролу. Встановлено, що обрані речовини в різних концентраціях не впливають на параметри клітинної кінетики в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 (табл. 3.2).

Таким чином, виявлено, що кандесартану цилексетил в концентрації 3 мкг/мл призводить до збільшення кількості апоптотичних клітин в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6. Кандесартан в концентраціях 3

мкг/мл і 1,5 мкг/мл збільшує число клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами, що говорить, що активна форма кандесартану є цитотоксичнішою в порівнянні з проліками кандесартану цилексетилу. Встановлено, що ресвератрол має цитопротекторні властивості, які проявляються в зниженні цитотоксичної дії кандесартану *in vitro*.

Таблиця 3.2.

Цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 *in vitro* при введенні кандесартану цилексетилу, кандесартану і ресвератролу

Група	Число апоптотичних клітин, %	Розподіл клітин за фазами клітинного циклу			Число клітин з мікроядрами, %
		G ₀ /G ₁ , %	S, %	G ₂ /M, %	
1	2	3	4	5	6
1. Контроль	2,85±0,11	83,41±1,64	13,53±1,66	3,07±0,23	3,01±0,24
2. Канд. цил.3 мкг/мл	3,42±0,19	83,78±2,05	12,06±0,95	4,16±1,31	3,13±0,25
3. Канд. цил.1,5 мкг/мл	3,03±0,20	84,33±2,74	11,67±1,74	4,00±1,56	3,04±0,20
4. Канд. 3 мкг/мл	6,85±0,41	83,49±2,54	13,33±2,32	3,19±0,45	6,06±0,34
5. Канд. 1,5 мкг/мл	5,21±0,24	84,37±2,51	11,87±2,36	3,76±0,47	4,96±0,12
6. Ресв. 1 мкг/мл	2,88±0,13	82,92±3,01	12,74±1,85	4,34±1,25	3,09±0,14
7. Ресв. 5 мкг/мл	2,90±0,18	83,28±2,79	12,19±2,32	4,54±1,12	2,92±0,24
8. Ресв. 10 мкг/мл	2,90±0,14	80,76±3,27	14,93±2,47	4,31±0,86	3,11±0,17
9. Ресв. 30 мкг/мл	2,87±0,24	82,79±2,25	13,09±2,08	4,12±0,89	3,09±0,19
10. Ресв. 50 мкг/мл	2,83±0,22	83,50±2,42	13,59±2,19	2,91±0,37	2,94±0,22
11. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв. 1 мкг/мл	2,93±0,21	81,17±3,80	15,76±2,92	3,08±1,12	3,10±0,17
12. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв. 5 мкг/мл	2,91±0,25	84,51±4,17	12,01±3,74	3,49±0,62	3,01±0,25
13. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв. 10 мкг/мл	2,92±0,29	83,95±2,83	12,97±2,25	3,08±0,74	3,10±0,18
14. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв. 30 мкг/мл	2,95±0,29	80,17±5,34	15,84±5,11	3,99±0,56	3,09±0,29
15. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв. 50 мкг/мл	2,91±0,25	79,58±6,22	16,38±5,91	4,04±0,71	3,11±0,18
16. Канд. 1,5 мкг/мл і ресв. 1 мкг/мл	5,10±0,21	81,45±3,10	13,72±2,52	4,83±1,46	5,02±0,16
17. Канд. 1,5 мкг/мл і ресв. 5 мкг/мл	5,05±0,26	80,30±2,89	15,08±2,00	4,62±1,44	4,85±0,38
18. Канд. 1,5 мкг/мл і ресв. 10 мкг/мл	4,26±0,32	81,14±2,76	14,16±2,59	4,71±1,03	4,17±0,16
19. Канд. 1,5 мкг/мл і ресв. 30 мкг/мл	3,37±0,45	83,22±2,12	14,09±1,51	2,69±0,69	3,66±0,19
20. Канд. 1,5 мкг/мл і ресв. 50 мкг/мл	3,12±0,34	81,35±3,81	14,22±3,11	4,43±0,96	3,52±0,36
	p ₁₋₂ <0,05 p ₁₋₄ <0,05				p ₁₋₄ <0,05 p ₁₋₅ <0,05

Продовж. табл. 3.2

1	2	3	4	5	6
	$p_{1-5} < 0,05$ $p_{1-16} < 0,05$ $p_{1-17} < 0,05$ $p_{1-18} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$ $p_{2-5} < 0,05$ $p_{2-6} < 0,05$ $p_{2-16} < 0,05$ $p_{2-17} < 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$ $p_{3-5} < 0,05$ $p_{3-16} < 0,05$ $p_{3-17} < 0,05$ $p_{3-18} < 0,05$ $p_{4-5} < 0,05$ $p_{4-6} < 0,05$ $p_{4-7} < 0,05$ $p_{4-8} < 0,05$ $p_{4-9} < 0,05$ $p_{4-10} < 0,05$ $p_{4-11} < 0,05$ $p_{4-12} < 0,05$ $p_{4-13} < 0,05$ $p_{4-14} < 0,05$ $p_{4-15} < 0,05$ $p_{4-16} < 0,05$				$p_{1-16} < 0,05$ $p_{1-17} < 0,05$ $p_{1-18} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$ $p_{2-5} < 0,05$ $p_{2-16} < 0,05$ $p_{2-17} < 0,05$ $p_{2-18} < 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$ $p_{3-5} < 0,05$ $p_{3-16} < 0,05$ $p_{3-17} < 0,05$ $p_{3-18} < 0,05$ $p_{4-5} < 0,05$ $p_{4-6} < 0,05$ $p_{4-7} < 0,05$ $p_{4-8} < 0,05$ $p_{4-9} < 0,05$ $p_{4-10} < 0,05$ $p_{4-11} < 0,05$ $p_{4-12} < 0,05$ $p_{4-13} < 0,05$ $p_{4-14} < 0,05$ $p_{4-15} < 0,05$ $p_{4-16} < 0,05$ $p_{4-18} < 0,05$

Продовж. табл. 3.2

1	2	3	4	5	6
	$p_{4-17} < 0,05$ $p_{4-18} < 0,05$ $p_{4-19} < 0,05$ $p_{4-20} < 0,05$ $p_{5-6} < 0,05$ $p_{5-7} < 0,05$ $p_{5-8} < 0,05$ $p_{5-9} < 0,05$ $p_{5-10} < 0,05$ $p_{5-11} < 0,05$ $p_{5-12} < 0,05$ $p_{5-13} < 0,05$ $p_{5-14} < 0,05$ $p_{5-15} < 0,05$ $p_{5-18} < 0,05$ $p_{5-19} < 0,05$ $p_{5-20} < 0,05$ $p_{6-16} < 0,05$ $p_{6-17} < 0,05$ $p_{6-18} < 0,05$ $p_{7-16} < 0,05$ $p_{7-17} < 0,05$ $p_{7-18} < 0,05$ $p_{8-16} < 0,05$ $p_{8-17} < 0,05$ $p_{8-18} < 0,05$				$p_{4-19} < 0,05$ $p_{4-20} < 0,05$ $p_{5-6} < 0,05$ $p_{5-7} < 0,05$ $p_{5-8} < 0,05$ $p_{5-9} < 0,05$ $p_{5-10} < 0,05$ $p_{5-11} < 0,05$ $p_{5-12} < 0,05$ $p_{5-13} < 0,05$ $p_{5-14} < 0,05$ $p_{5-15} < 0,05$ $p_{5-18} < 0,05$ $p_{5-19} < 0,05$ $p_{5-20} < 0,05$ $p_{6-16} < 0,05$ $p_{6-17} < 0,05$ $p_{6-18} < 0,05$ $p_{6-19} < 0,05$ $p_{7-16} < 0,05$ $p_{7-17} < 0,05$ $p_{7-18} < 0,05$ $p_{7-19} < 0,05$ $p_{8-16} < 0,05$ $p_{8-17} < 0,05$ $p_{8-18} < 0,05$

Продовж. табл. 3.2

1	2	3	4	5	6
	$p_{9-16} < 0,05$ $p_{9-17} < 0,05$ $p_{9-18} < 0,05$ $p_{10-16} < 0,05$ $p_{10-17} < 0,05$ $p_{10-18} < 0,05$ $p_{11-16} < 0,05$ $p_{11-17} < 0,05$ $p_{11-18} < 0,05$ $p_{12-16} < 0,05$ $p_{12-17} < 0,05$ $p_{12-18} < 0,05$ $p_{13-16} < 0,05$ $p_{13-17} < 0,05$ $p_{13-18} < 0,05$ $p_{14-16} < 0,05$ $p_{14-17} < 0,05$ $p_{14-18} < 0,05$ $p_{15-16} < 0,05$ $p_{15-17} < 0,05$ $p_{15-18} < 0,05$ $p_{16-19} < 0,05$ $p_{16-20} < 0,05$ $p_{17-19} < 0,05$ $p_{17-20} < 0,05$				$p_{9-16} < 0,05$ $p_{9-17} < 0,05$ $p_{9-18} < 0,05$ $p_{9-19} < 0,05$ $p_{10-16} < 0,05$ $p_{10-17} < 0,05$ $p_{10-18} < 0,05$ $p_{11-16} < 0,05$ $p_{11-17} < 0,05$ $p_{11-18} < 0,05$ $p_{12-16} < 0,05$ $p_{12-17} < 0,05$ $p_{12-18} < 0,05$ $p_{13-16} < 0,05$ $p_{13-17} < 0,05$ $p_{13-18} < 0,05$ $p_{14-16} < 0,05$ $p_{14-17} < 0,05$ $p_{14-18} < 0,05$ $p_{15-16} < 0,05$ $p_{15-17} < 0,05$ $p_{15-18} < 0,05$ $p_{16-18} < 0,05$ $p_{16-19} < 0,05$ $p_{16-20} < 0,05$ $p_{17-19} < 0,05$

Продовж. табл. 3.2

1	2	3	4	5	6
					$p_{17-20} < 0,05$

Примітки:

1. Канд. цил. – кандесартану цилексетил;
2. Канд. – кандесартан;
3. Ресв. – ресвератрол.

3.3 Вплив кандесартану цилексетилу, кандесартану і ресвератролу на число клітин з CD117+, CD34+, CD117+/CD34+ і CD31+ в культурі клітин жирової тканини людини

Для проведення аналізу кількості ЕПК в експериментах крім поверхневого клітинного маркера CD117 використовують CD34 і CD31 [110, 132, 148, 177]. У літературі раніше було відзначено, що кандесартану цилексетил, а також ресвератрол стимулює процеси ангиогенезу в експериментах *in vitro* [152, 153, 185, 222, 224, 225]. При дослідженні стимулюючих ефектів кандесартану цилексетилу, кандесартану і ресвератролу на процеси диференціювання стовбурових клітин, отриманих з жирової тканини людини, була вивчена зміна числа клітин з фенотипами CD117+, CD34+, CD117+/CD34+ і CD31+. Виявлено значні зміни показників кількості ЕПК *in vitro* при застосуванні вищенаведених речовин. Отримані результати експерименту представлені в таблиці 3.3.

Показано, що при використанні кандесартану цилексетилу в концентраціях 3 мкг/мл і 1,5 мкг/мл у кількості клітин з фенотипами CD117+, CD34+, CD117+/CD34+ і CD31+ значних змін не спостерігали (табл. 3.3).

Виявлено, що кандесартан в концентраціях 3 мкг/мл і 1,5 мкг/мл стимулює утворення клітин з маркером CD117 в порівнянні з контролем і з зразками із кандесартану цилексетилом в концентраціях 3 мкг/мл і 1,5 мкг/мл ($p < 0,05$). Також відзначено, що кандесартан в концентрації 3 мкг/мл призводить до значного збільшення числа клітин з фенотипом CD34+ в порівнянні з контролем. При дослідженні дії ресвератролу в різних концентраціях було встановлено дозозалежне збільшення кількості ЕПК в культурі клітин жирової тканини людини. Так, отримано дані, що ресвератрол в концентраціях 1 мкг/мл і 5 мкг/мл не впливає на утворення ЕПК, тоді як в концентраціях 10 мкг/мл, 30 мкг/мл і 50 мкг/мл призводить до значного збільшення числа клітин з фенотипом CD117+ ($p < 0,05$). Застосування ресвератролу в концентрації 50 мкг/мл призводило до збільшення кількості клітин з маркером CD34. Виявлено, що кандесартану цилексетил в концентрації 1,5 мкг/мл у поєднанні з ресвератролом в концентраціях 1 мкг/мл, 5 мкг/мл і 10 мкг/мл не змінює вміст ЕПК в культурі

клітин жирової тканини людини. Використання кандесартану цилексетилу в концентрації 1,5 мкг/мл у поєднанні з ресвератролом в концентраціях 30 мкг/мл і 50 мкг/мл призвело до значного збільшення частки клітин з фенотипом CD117+ порівняно з контрольними значеннями і з кандесартану цилексетилом в концентраціях 3 мкг/мл і 1,5 мкг/мл (табл. 3.3).

В ході виконання роботи встановлено, що кандесартан в концентрації 1,5 мкг/мл з ресвератролом в концентраціях 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 30 мкг/мл і 50 мкг/мл надають стимулюючу дію на утворення клітин з фенотипом CD117+ ($p < 0,05$). При застосуванні кандесартану в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролу в концентраціях 30 мкг/мл і 50 мкг/мл відзначено найбільше збільшення клітин з маркером CD117 в порівнянні з контролем і використанням тільки кандесартану в концентраціях 3 мкг/мл і 1,5 мкг/мл (табл. 3.3).

Таким чином, можна зробити висновок, що використання поверхневого клітинного маркера CD117 є ефективним для реєстрації прямої мобілізації досліджуваних клітин, що дозволяє застосовувати його для подальшого проведення експериментів *in vivo*. При спільному використанні антагоніста рецепторів ангіотензину II в поєднанні з ресвератролом, коли знижена концентрація першого, вперше виявлено стимулюючий потенціал ресвератролу на диференціювання клітин.

Таким чином, встановлено, що кандесартан значно збільшує, а кандесартану цилексетил не змінює кількість клітин з фенотипом CD117+ в культурі клітин жирової тканини людини. Вперше відзначено збільшення числа ЕПК при концентраціях ресвератролу 10 мкг/мл – 50 мкг/мл як моноречовини і в комбінуванні з кандесартаном цилексетилом, а також при концентрації ресвератролу 5 мкг/мл – 50 мкг/мл в поєднанні з кандесартаном. Ефект стимуляції утворення клітин з фенотипом CD117+ при комбінованій дії кандесартану цилексетилу з ресвератролом досягається за рахунок останнього, а при комбінованій дії кандесартану з ресвератролом – за рахунок односпрямованої дії двох досліджуваних речовин на культуру клітин, подібно до того, як це відбувається в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 (табл. 3.1).

Таблиця 3.3.

Вплив кандесартану цилексетилу, кандесартану і ресвератролу на кількість клітин з CD117+, CD34+, CD117+/CD34+ і CD31+ в культурі клітин жирової

тканини людини

Група	Число клітин CD117+, %	Число клітин CD34+, %	Число клітин CD117+/CD34+, %	Число клітин CD31+, %
1	2	3	4	5
1. Контроль	1,78±0,11	8,83±0,14	2,08±0,11	12,18±0,21
2. Канд. цил. 3 мкг/мл	1,35±0,10	9,03±0,30	1,78±0,17	11,70±0,20
3. Канд. цил. 1,5 мкг/мл	1,53±0,14	8,90±0,15	1,83±0,11	11,85±0,19
4. Канд. 3 мкг/мл	2,33±0,09	9,60±0,17	2,28±0,31	12,35±0,18
5. Канд. 1,5 мкг/мл	2,15±0,09	9,20±0,19	2,18±0,15	12,23±0,29
6. Ресв. 1 мкг/мл	1,75±0,16	8,80±0,24	2,00±0,20	12,15±0,37
7. Ресв. 5 мкг/мл	1,88±0,09	8,78±0,28	2,05±0,19	12,20±0,45
8. Ресв. 10 мкг/мл	2,23±0,11	8,93±0,32	2,03±0,29	12,30±0,21
9. Ресв. 30 мкг/мл	2,35±0,10	8,98±0,24	2,13±0,23	12,25±0,19
10. Ресв. 50 мкг/мл	2,95±0,19	9,43±0,13	2,33±0,16	12,38±0,21
11. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв. 1 мкг/мл	1,70±0,09	8,65±0,14	1,95±0,17	11,88±0,32
12. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв. 5 мкг/мл	1,73±0,13	8,95±0,13	1,98±0,16	11,93±0,25
13. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв. 10 мкг/мл	1,98±0,18	9,05±0,32	1,93±0,27	12,10±0,21
14. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв. 30 мкг/мл	2,25±0,13	9,00±0,29	2,20±0,25	12,08±0,24
15. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв. 50 мкг/мл	2,93±0,20	9,10±0,19	2,25±0,14	12,13±0,24
16. Канд. 1,5 мкг/мл і ресв. 1 мкг/мл	2,08±0,11	9,18±0,18	1,93±0,22	12,28±0,52
17. Канд. 1,5 мкг/мл і ресв. 5 мкг/мл	2,30±0,11	9,25±0,20	2,15±0,19	12,30±0,29
18. Канд. 1,5 мкг/мл і ресв. 10 мкг/мл	2,55±0,16	9,33±0,32	2,10±0,18	12,33±0,18
19. Канд. 1,5 мкг/мл і ресв. 30 мкг/мл	2,98±0,19	9,30±0,29	2,23±0,30	12,40±0,39
20. Канд. 1,5 мкг/мл і ресв. 50 мкг/мл	3,23±0,18	9,65±0,30	2,48±0,26	12,43±0,27

1	2	3	4	5
	$p_{1-4} < 0,05$	$p_{1-4} < 0,05$		
	$p_{1-5} < 0,05$	$p_{1-10} < 0,05$		
	$p_{1-8} < 0,05$	$p_{1-20} < 0,05$		
	$p_{1-9} < 0,05$	$p_{4-11} < 0,05$		
	$p_{1-10} < 0,05$	$p_{10-11} < 0,05$		
	$p_{1-14} < 0,05$	$p_{11-20} < 0,05$		
	$p_{1-15} < 0,05$			
	$p_{1-17} < 0,05$			
	$p_{1-18} < 0,05$			
	$p_{1-19} < 0,05$			
	$p_{1-20} < 0,05$			
	$p_{2-4} < 0,05$			
	$p_{2-5} < 0,05$			
	$p_{2-7} < 0,05$			
	$p_{2-8} < 0,05$			
	$p_{2-9} < 0,05$			
	$p_{2-10} < 0,05$			
	$p_{2-14} < 0,05$			
	$p_{2-15} < 0,05$			
	$p_{2-16} < 0,05$			
	$p_{2-17} < 0,05$			
	$p_{2-18} < 0,05$			
	$p_{2-19} < 0,05$			
	$p_{2-20} < 0,05$			
	$p_{3-4} < 0,05$			
	$p_{3-5} < 0,05$			
	$p_{3-8} < 0,05$			
	$p_{3-9} < 0,05$			
	$p_{3-10} < 0,05$			
	$p_{3-14} < 0,05$			
	$p_{3-15} < 0,05$			
	$p_{3-16} < 0,05$			
	$p_{3-17} < 0,05$			
	$p_{3-18} < 0,05$			
	$p_{3-19} < 0,05$			
	$p_{3-20} < 0,05$			
	$p_{4-6} < 0,05$			
	$p_{4-7} < 0,05$			
	$p_{4-10} < 0,05$			
	$p_{4-11} < 0,05$			
	$p_{4-12} < 0,05$			
	$p_{4-15} < 0,05$			

1	2	3	4	5
	$p_{4-19} < 0,05$			
	$p_{4-20} < 0,05$			
	$p_{5-10} < 0,05$			
	$p_{5-11} < 0,05$			
	$p_{5-12} < 0,05$			
	$p_{5-15} < 0,05$			
	$p_{5-19} < 0,05$			
	$p_{5-20} < 0,05$			
	$p_{6-9} < 0,05$			
	$p_{6-10} < 0,05$			
	$p_{6-15} < 0,05$			
	$p_{6-17} < 0,05$			
	$p_{6-18} < 0,05$			
	$p_{6-19} < 0,05$			
	$p_{6-20} < 0,05$			
	$p_{7-9} < 0,05$			
	$p_{7-10} < 0,05$			
	$p_{7-15} < 0,05$			
	$p_{7-17} < 0,05$			
	$p_{7-18} < 0,05$			
	$p_{7-19} < 0,05$			
	$p_{7-20} < 0,05$			
	$p_{8-10} < 0,05$			
	$p_{8-11} < 0,05$			
	$p_{8-12} < 0,05$			
	$p_{8-15} < 0,05$			
	$p_{8-19} < 0,05$			
	$p_{8-20} < 0,05$			
	$p_{9-10} < 0,05$			
	$p_{9-11} < 0,05$			
	$p_{9-12} < 0,05$			
	$p_{9-15} < 0,05$			
	$p_{9-19} < 0,05$			
	$p_{9-20} < 0,05$			
	$p_{10-11} < 0,05$			
	$p_{10-12} < 0,05$			
	$p_{10-13} < 0,05$			
	$p_{10-14} < 0,05$			
	$p_{10-16} < 0,05$			
	$p_{10-17} < 0,05$			
	$p_{11-14} < 0,05$			
	$p_{11-15} < 0,05$			

1	2	3	4	5
	$p_{11-17} < 0,05$ $p_{11-18} < 0,05$ $p_{11-19} < 0,05$ $p_{11-20} < 0,05$ $p_{12-14} < 0,05$ $p_{12-15} < 0,05$ $p_{12-17} < 0,05$ $p_{12-18} < 0,05$ $p_{12-19} < 0,05$ $p_{12-20} < 0,05$ $p_{13-15} < 0,05$ $p_{13-18} < 0,05$ $p_{13-19} < 0,05$ $p_{13-20} < 0,05$ $p_{14-15} < 0,05$ $p_{14-19} < 0,05$ $p_{14-20} < 0,05$ $p_{15-16} < 0,05$ $p_{15-17} < 0,05$ $p_{16-18} < 0,05$ $p_{16-19} < 0,05$ $p_{16-20} < 0,05$ $p_{17-19} < 0,05$ $p_{17-20} < 0,05$			

Примітки:

1. Канд. цил. – кандесартану цилексетил;
2. Канд. – кандесартан;
3. Ресв. – ресвератрол.

Кандесартану цилексетил, кандесартан, ресвератрол і їх комбінації не впливають на кількість ЕПК з маркерами CD117+/CD34+, CD31+ (табл. 3.3).

Таким чином, вперше було виявлено стимулюючий диференціювання клітин потенціал ресвератролу в культурі клітин жирової тканини людини при використанні його з кандесартану цилексетилом і кандесартаном. Доведено ефективність використання поверхневого клітинного маркера CD117 для реєстрації прямої мобілізації досліджуваних клітин, що дозволяє застосовувати його для подальшого проведення експериментів *in vivo*.

3.4 Вплив кандесартану цилексетилу, кандесартану і ресвератролу на цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики в культурі клітин жирової тканини людини

При дослідженні змін цитогенетичних показників і параметрів клітинної кінетики жирової тканини людини при використанні кандесартану цилексетилу, кандесартану і ресвератролу в різних концентраціях і співвідношеннях було встановлено, що ці речовини впливають на клітинний цикл, на зміну кількості клітин з ознаками пошкодження генетичного матеріалу (табл. 3.4).

Встановлено, що кандесартану цилексетил в концентрації 3 мкг/мл призводить до збільшення кількості апоптичних клітин і клітин з мікроядрами порівняно з контролем ($p < 0,05$), при концентрації 1,5 мкг/мл не впливає на зміну числа клітин з ушкодженнями ДНК. Виявлено, що кандесартан в концентраціях 3 мкг/мл і 1,5 мкг/мл суттєво збільшує кількість апоптичних клітин і клітин з мікроядрами в порівнянні з контрольними значеннями, а також використанні кандесартану цилексетилу в концентраціях 3 мкг/мл і 1,5 мкг/мл (табл. 3.4). Показано, що застосування ресвератролу в концентраціях 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 30 мкг/мл чи 50 мкг/мл не впливало на число клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами в культурі клітин жирової тканини людини. Встановлено, що ресвератрол в концентраціях 10 мкг/мл, 30 мкг/мл і 50 мкг/мл призводить до перерозподілу клітин за фазами клітинного циклу: зниження вмісту клітин в G_0/G_1 фазах і збільшення частки клітин в S і G_2/M фазах клітинного циклу ($p < 0,05$). Зазначено, що кандесартану цилексетил в концентрації 1,5 мкг/мл з ресвератролом в концентраціях 10 мкг/мл і 50 мкг/мл призводить до посилення проліферативних процесів *in vitro* в порівнянні з контрольними зразками, а кандесартану цилексетил в концентрації 1,5 мкг/мл з ресвератролом в концентрації 50 мкг/мл зменшує вміст клітин на G_0/G_1 стадіях клітинного циклу і збільшує кількість клітин в S фазі ($p < 0,05$).

Ресвератрол в концентраціях 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 30 мкг/мл і 50 мкг/мл при застосуванні з кандесартаном в концентрації 1,5 мкг/мл нівелює

цитотоксичну дію синтетичної речовини, що проявляється у зниженні кількості клітин з ознаками пошкодження генетичного матеріалу (табл.3.4).

При використанні кандесартану в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролу в концентраціях 1 мкг/мл і 5 мкг/мл спостерігаємо тенденцію до зниження числа клітин з ушкодженнями ДНК (достовірно значущих відмінностей виявлено не було). Виявлено, що при застосуванні кандесартану в концентрації 1,5 мкг/мл та ресвератролу в концентраціях 10 мкг/мл, 30 мкг/мл і 50 мкг/мл знижується частина апоптотичних клітин і клітин з мікроядрами до контрольних значень, що доводить цитопротекторні властивості природного антиоксиданту (табл. 3.4).

Таким чином, дослідження цитогенетичних показників і параметрів клітинної кінетики *in vitro* дозволило виявити, що кандесартану цилексетил в концентрації 3 мкг/мл, кандесартан в концентраціях 1,5 мкг/мл і 3 мкг/мл збільшують число клітин з ознаками апоптозу і мікроядрами в порівнянні з контролем. Кандесартану цилексетил в концентрації 1,5 мкг/мл, ресвератрол як моноречовина в концентраціях 1 мкг/мл – 50 мкг/мл і в комбінації з кандесартану цилексетилом не впливають на число клітин з ознаками апоптозу і мікроядрами. Ресвератрол в концентраціях 1 мкг/мл – 50 мкг/мл в комбінації з кандесартаном в концентрації 1,5 мкг/мл частково компенсує негативний ефект останнього на цитогенетичні показники в культурі клітин жирової тканини людини, при цьому ефект ресвератролу є концентраційно-залежним.

Таблиця 3.4.

Цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики жирової тканини людини *in vitro* при використанні кандесартану цилексетилу, кандесартану і ресвератролу

Група	Число апоптичних клітин, %	Розподіл клітин за фазами клітинного циклу			Число клітин з мікроядрами, %
		G ₀ /G ₁ , %	S, %	G ₂ /M, %	
1	2	3	4	5	6
1. Контроль	7,03±0,27	82,13±2,91	15,22±2,54	2,65±0,37	5,37±0,15
2. Канд. цил.3 мкг/мл	10,30±0,39	92,16±2,12	6,56±2,21	1,78±0,40	8,23±0,71
3. Канд. цил.1,5 мкг/мл	7,33±0,36	83,87±3,38	13,19±2,57	2,94±1,12	5,56±0,17
4. Канд. 3 мкг/мл	13,52±0,45	94,01±2,23	5,03±2,43	1,22±0,31	10,09±0,24
5. Канд. 1,5 мкг/мл	11,81±0,43	91,48±2,11	6,95±1,96	1,58±0,21	8,25±0,38
6. Ресв. 1 мкг/мл	7,21±0,39	81,41±2,86	15,68±2,91	2,91±0,84	5,43±0,16
7. Ресв. 5 мкг/мл	7,11±0,46	80,96±5,64	16,37±5,03	2,68±0,83	5,06±0,55
8. Ресв. 10 мкг/мл	7,07±0,51	71,48±1,65	24,35±1,31	4,18±0,36	5,61±0,35
9. Ресв. 30 мкг/мл	7,05±0,27	68,61±2,91	26,73±3,36	4,16±0,53	5,18±0,29
10. Ресв. 50 мкг/мл	6,99±0,31	62,20±3,91	28,51±3,61	9,30±1,43	5,49±0,36
11. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв.1 мкг/мл	7,24±0,53	81,75±3,84	14,71±2,31	3,54±1,65	5,36±0,27
12. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв.5 мкг/мл	6,94±0,38	81,07±4,56	13,82±4,23	5,11±1,16	5,32±0,19
13. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв.10 мкг/мл	6,96±0,54	68,28±4,24	26,43±3,45	5,29±0,92	5,35±0,34
14. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв.30 мкг/мл	7,37±0,38	69,09±3,52	25,16±2,77	5,75±0,97	5,56±0,45
15. Канд. цил. 1,5 мкг/мл і ресв.50 мкг/мл	7,17±0,25	60,43±2,46	32,86±2,38	6,71±0,60	5,51±0,36
16. Канд.1,5 мкг/мл і ресв.1 мкг/мл	10,65±0,59	90,84±1,50	6,82±1,80	2,35±0,54	8,37±0,56
17. Канд.1,5 мкг/мл і ресв.5 мкг/мл	10,33±0,60	87,64±2,95	8,39±2,33	3,98±0,72	7,90±0,29
18. Канд.1,5 мкг/мл і ресв.10 мкг/мл	8,24±0,84	68,75±2,74	24,09±1,47	7,16±1,69	6,03±0,74
19. Канд.1,5 мкг/мл і ресв.30 мкг/мл	7,68±0,71	67,68±4,68	24,65±2,80	7,42±1,72	5,71±0,83
20. Канд.1,5 мкг/мл і ресв.50 мкг/мл	7,74±0,48	57,86±3,13	31,49±3,91	10,65±2,41	5,59±0,42
	p ₁₋₂ <0,05	p ₁₋₂ <0,05	p ₁₋₅ <0,05	p ₁₋₄ <0,05	p ₁₋₂ <0,05

1	2	3	4	5	6
	$p_{1-4} < 0,05$	$p_{1-4} < 0,05$	$p_{1-8} < 0,05$	$p_{1-10} < 0,05$	$p_{1-4} < 0,05$
	$p_{1-5} < 0,05$	$p_{1-5} < 0,05$	$p_{1-9} < 0,05$	$p_{1-13} < 0,05$	$p_{1-5} < 0,05$
	$p_{1-16} < 0,05$	$p_{1-8} < 0,05$	$p_{1-10} < 0,05$	$p_{1-15} < 0,05$	$p_{1-16} < 0,05$
	$p_{1-17} < 0,05$	$p_{1-9} < 0,05$	$p_{1-15} < 0,05$	$p_{1-19} < 0,05$	$p_{1-17} < 0,05$
	$p_{2-4} < 0,05$	$p_{1-10} < 0,05$	$p_{1-20} < 0,05$	$p_{1-20} < 0,05$	$p_{2-6} < 0,05$
	$p_{2-6} < 0,05$	$p_{1-15} < 0,05$	$p_{2-8} < 0,05$	$p_{2-8} < 0,05$	$p_{2-7} < 0,05$
	$p_{2-7} < 0,05$	$p_{1-16} < 0,05$	$p_{2-9} < 0,05$	$p_{2-9} < 0,05$	$p_{2-8} < 0,05$
	$p_{2-8} < 0,05$	$p_{1-18} < 0,05$	$p_{2-10} < 0,05$	$p_{2-10} < 0,05$	$p_{2-9} < 0,05$
	$p_{2-9} < 0,05$	$p_{1-20} < 0,05$	$p_{2-13} < 0,05$	$p_{2-12} < 0,05$	$p_{2-10} < 0,05$
	$p_{2-10} < 0,05$	$p_{2-8} < 0,05$	$p_{2-14} < 0,05$	$p_{2-13} < 0,05$	$p_{2-11} < 0,05$
	$p_{2-11} < 0,05$	$p_{2-9} < 0,05$	$p_{2-15} < 0,05$	$p_{2-14} < 0,05$	$p_{2-12} < 0,05$
	$p_{2-12} < 0,05$	$p_{2-10} < 0,05$	$p_{2-18} < 0,05$	$p_{2-15} < 0,05$	$p_{2-13} < 0,05$
	$p_{2-13} < 0,05$	$p_{2-13} < 0,05$	$p_{2-19} < 0,05$	$p_{2-17} < 0,05$	$p_{2-14} < 0,05$
	$p_{2-14} < 0,05$	$p_{2-14} < 0,05$	$p_{2-20} < 0,05$	$p_{2-18} < 0,05$	$p_{2-15} < 0,05$
	$p_{2-15} < 0,05$	$p_{2-15} < 0,05$	$p_{3-8} < 0,05$	$p_{2-19} < 0,05$	$p_{2-19} < 0,05$
	$p_{2-19} < 0,05$	$p_{2-18} < 0,05$	$p_{3-9} < 0,05$	$p_{2-20} < 0,05$	$p_{2-20} < 0,05$
	$p_{2-20} < 0,05$	$p_{2-19} < 0,05$	$p_{3-10} < 0,05$	$p_{3-10} < 0,05$	$p_{3-4} < 0,05$
	$p_{3-4} < 0,05$	$p_{2-20} < 0,05$	$p_{3-15} < 0,05$	$p_{3-19} < 0,05$	$p_{3-5} < 0,05$
	$p_{3-5} < 0,05$	$p_{3-10} < 0,05$	$p_{3-18} < 0,05$	$p_{4-8} < 0,05$	$p_{3-16} < 0,05$
	$p_{3-16} < 0,05$	$p_{3-15} < 0,05$	$p_{3-20} < 0,05$	$p_{4-9} < 0,05$	$p_{3-17} < 0,05$
	$p_{3-17} < 0,05$	$p_{3-20} < 0,05$	$p_{4-8} < 0,05$	$p_{4-10} < 0,05$	$p_{4-5} < 0,05$
	$p_{4-6} < 0,05$	$p_{4-8} < 0,05$	$p_{4-9} < 0,05$	$p_{4-12} < 0,05$	$p_{4-6} < 0,05$
	$p_{4-7} < 0,05$	$p_{4-9} < 0,05$	$p_{4-10} < 0,05$	$p_{4-13} < 0,05$	$p_{4-7} < 0,05$
	$p_{4-8} < 0,05$	$p_{4-10} < 0,05$	$p_{4-13} < 0,05$	$p_{4-14} < 0,05$	$p_{4-8} < 0,05$
	$p_{4-9} < 0,05$	$p_{4-13} < 0,05$	$p_{4-14} < 0,05$	$p_{4-15} < 0,05$	$p_{4-9} < 0,05$
	$p_{4-10} < 0,05$	$p_{4-14} < 0,05$	$p_{4-15} < 0,05$	$p_{4-17} < 0,05$	$p_{4-10} < 0,05$

Продовж. табл. 3.4

1	2	3	4	5	6
	$p_{4-11}<0,05$	$p_{4-15}<0,05$	$p_{4-18}<0,05$	$p_{4-18}<0,05$	$p_{4-11}<0,05$
	$p_{4-12}<0,05$	$p_{4-18}<0,05$	$p_{4-19}<0,05$	$p_{4-19}<0,05$	$p_{4-12}<0,05$
	$p_{4-13}<0,05$	$p_{4-19}<0,05$	$p_{4-20}<0,05$	$p_{4-20}<0,05$	$p_{4-13}<0,05$
	$p_{4-14}<0,05$	$p_{4-20}<0,05$	$p_{5-8}<0,05$	$p_{5-8}<0,05$	$p_{4-14}<0,05$
	$p_{4-15}<0,05$	$p_{5-8}<0,05$	$p_{5-9}<0,05$	$p_{5-9}<0,05$	$p_{4-15}<0,05$
	$p_{4-16}<0,05$	$p_{5-9}<0,05$	$p_{5-10}<0,05$	$p_{5-10}<0,05$	$p_{4-17}<0,05$
	$p_{4-17}<0,05$	$p_{5-10}<0,05$	$p_{5-11}<0,05$	$p_{5-12}<0,05$	$p_{4-18}<0,05$
	$p_{4-18}<0,05$	$p_{5-13}<0,05$	$p_{5-13}<0,05$	$p_{5-13}<0,05$	$p_{4-19}<0,05$
	$p_{4-19}<0,05$	$p_{5-14}<0,05$	$p_{5-14}<0,05$	$p_{5-14}<0,05$	$p_{4-20}<0,05$
	$p_{4-20}<0,05$	$p_{5-15}<0,05$	$p_{5-15}<0,05$	$p_{5-15}<0,05$	$p_{5-6}<0,05$
	$p_{5-6}<0,05$	$p_{5-18}<0,05$	$p_{5-18}<0,05$	$p_{5-17}<0,05$	$p_{5-7}<0,05$
	$p_{5-7}<0,05$	$p_{5-19}<0,05$	$p_{5-19}<0,05$	$p_{5-18}<0,05$	$p_{5-8}<0,05$
	$p_{5-8}<0,05$	$p_{5-20}<0,05$	$p_{5-20}<0,05$	$p_{5-19}<0,05$	$p_{5-9}<0,05$
	$p_{5-9}<0,05$	$p_{6-8}<0,05$	$p_{6-8}<0,05$	$p_{5-20}<0,05$	$p_{5-10}<0,05$
	$p_{5-10}<0,05$	$p_{6-9}<0,05$	$p_{6-9}<0,05$	$p_{6-10}<0,05$	$p_{5-11}<0,05$
	$p_{5-11}<0,05$	$p_{6-10}<0,05$	$p_{6-10}<0,05$	$p_{6-15}<0,05$	$p_{5-12}<0,05$
	$p_{5-12}<0,05$	$p_{6-13}<0,05$	$p_{6-15}<0,05$	$p_{6-19}<0,05$	$p_{5-13}<0,05$
	$p_{5-13}<0,05$	$p_{6-14}<0,05$	$p_{6-18}<0,05$	$p_{6-20}<0,05$	$p_{5-14}<0,05$
	$p_{5-14}<0,05$	$p_{6-15}<0,05$	$p_{6-20}<0,05$	$p_{7-10}<0,05$	$p_{5-15}<0,05$
	$p_{5-15}<0,05$	$p_{6-18}<0,05$	$p_{7-15}<0,05$	$p_{7-15}<0,05$	$p_{5-19}<0,05$
	$p_{5-18}<0,05$	$p_{6-19}<0,05$	$p_{8-11}<0,05$	$p_{7-19}<0,05$	$p_{5-20}<0,05$
	$p_{5-19}<0,05$	$p_{6-20}<0,05$	$p_{8-12}<0,05$	$p_{7-20}<0,05$	$p_{6-16}<0,05$
	$p_{5-20}<0,05$	$p_{7-15}<0,05$	$p_{8-15}<0,05$	$p_{8-10}<0,05$	$p_{6-17}<0,05$
	$p_{6-16}<0,05$	$p_{7-20}<0,05$	$p_{8-16}<0,05$	$p_{8-16}<0,05$	$p_{7-16}<0,05$
	$p_{6-17}<0,05$	$p_{8-15}<0,05$	$p_{8-17}<0,05$	$p_{8-19}<0,05$	$p_{7-17}<0,05$

Продовж. табл. 3.4

1	2	3	4	5	6
	$p_{7-16} < 0,05$	$p_{8-16} < 0,05$	$p_{9-11} < 0,05$	$p_{9-10} < 0,05$	$p_{8-16} < 0,05$
	$p_{7-17} < 0,05$	$p_{8-17} < 0,05$	$p_{9-12} < 0,05$	$p_{10-16} < 0,05$	$p_{8-17} < 0,05$
	$p_{8-16} < 0,05$	$p_{8-20} < 0,05$	$p_{9-16} < 0,05$	$p_{10-17} < 0,05$	$p_{9-16} < 0,05$
	$p_{8-17} < 0,05$	$p_{9-16} < 0,05$	$p_{9-17} < 0,05$	$p_{13-16} < 0,05$	$p_{9-17} < 0,05$
	$p_{9-16} < 0,05$	$p_{9-17} < 0,05$	$p_{10-11} < 0,05$	$p_{15-16} < 0,05$	$p_{10-16} < 0,05$
	$p_{9-17} < 0,05$	$p_{10-11} < 0,05$	$p_{10-12} < 0,05$	$p_{16-19} < 0,05$	$p_{10-17} < 0,05$
	$p_{10-16} < 0,05$	$p_{10-12} < 0,05$	$p_{10-16} < 0,05$	$p_{16-20} < 0,05$	$p_{11-16} < 0,05$
	$p_{10-17} < 0,05$	$p_{10-16} < 0,05$	$p_{10-17} < 0,05$	$p_{17-19} < 0,05$	$p_{11-17} < 0,05$
	$p_{11-16} < 0,05$	$p_{10-17} < 0,05$	$p_{11-15} < 0,05$		$p_{12-16} < 0,05$
	$p_{11-17} < 0,05$	$p_{11-15} < 0,05$	$p_{11-20} < 0,05$		$p_{12-17} < 0,05$
	$p_{12-16} < 0,05$	$p_{11-20} < 0,05$	$p_{12-15} < 0,05$		$p_{13-16} < 0,05$
	$p_{12-17} < 0,05$	$p_{12-15} < 0,05$	$p_{12-20} < 0,05$		$p_{13-17} < 0,05$
	$p_{13-16} < 0,05$	$p_{12-20} < 0,05$	$p_{13-16} < 0,05$		$p_{14-16} < 0,05$
	$p_{13-17} < 0,05$	$p_{13-16} < 0,05$	$p_{13-17} < 0,05$		$p_{14-17} < 0,05$
	$p_{14-16} < 0,05$	$p_{13-17} < 0,05$	$p_{14-16} < 0,05$		$p_{15-16} < 0,05$
	$p_{14-17} < 0,05$	$p_{14-16} < 0,05$	$p_{14-17} < 0,05$		$p_{15-17} < 0,05$
	$p_{15-16} < 0,05$	$p_{14-17} < 0,05$	$p_{15-16} < 0,05$		$p_{16-19} < 0,05$
	$p_{15-17} < 0,05$	$p_{15-16} < 0,05$	$p_{15-17} < 0,05$		$p_{16-20} < 0,05$
	$p_{16-19} < 0,05$	$p_{15-17} < 0,05$	$p_{15-18} < 0,05$		$p_{17-19} < 0,05$
	$p_{16-20} < 0,05$	$p_{16-18} < 0,05$	$p_{16-18} < 0,05$		$p_{17-20} < 0,05$
	$p_{17-20} < 0,05$	$p_{16-19} < 0,05$	$p_{16-19} < 0,05$		
		$p_{16-20} < 0,05$	$p_{16-20} < 0,05$		
		$p_{17-18} < 0,05$	$p_{17-18} < 0,05$		
		$p_{17-19} < 0,05$	$p_{17-19} < 0,05$		
		$p_{17-20} < 0,05$	$p_{17-20} < 0,05$		

Примітки:

1. Канд. цил. – кандесартану цилексетил;
2. Канд. – кандесартан;
3. Ресв. – ресвератрол.

Надалі було проведено дослідження клітинної загибелі *in vitro* при використанні ресвератролу в різних концентраціях за допомогою метилтетразолієвого тесту (табл. 3.5). Оптична густина (поглинання формазану) прямо пропорційна кількості життєздатних клітин в культурі.

Таблиця 3.5.

Показники оптичної густини клітин, визначені в МТТ-тесті *in vitro* при використанні ресвератролу

Група	Оптична густина
1. Контроль	0,355±0,003
2. Ресвератрол 50 мкг/мл	0,356±0,006
3. Ресвератрол 100 мкг/мл	0,304±0,006
	$p_{1-3} < 0,05$

Встановлено, що ресвератрол в концентрації 50 мкг/мл не впливає на зміну показника клітинної загибелі *in vitro* в порівнянні з контролем. Використання ресвератролу в концентрації 100 мкг/мл призводить до появи цитотоксичних властивостей, що виражається у зниженні кількості клітин порівнянно з контролем (0,304±0,006 % і 0,355±0,003 %, відповідно) ($p < 0,05$). Це підтверджується літературними даними, що свідчать про те, що ресвератрол в культурі ракових клітин знижує проліферативні і підсилює апоптичні процеси [228]. Разом з тим існують дані про те, що природний антиоксидант ресвератрол зменшує число клітин з ушкодженнями ДНК, впливає на розподіл клітин за фазами клітинного циклу: знижує вміст клітин в G₂/M стадіях і збільшує частину клітин в S фазі [182].

Результати досліджень, які представлені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. Beliaeva A, Garmanchuk L. Candesartan, candesartan cilexetil, resveratrol and their combinations change the amount of endothelial progenitor cells,

cytogenetic and cytokinetic parameters in adipose tissue cell culture. Fundamental and applied researches in practice of leading scientific schools. 2019;36(6):96-9. doi: 10.33531/farplss.2019.6.14.

2. Beliyeva A, Garmanchuk L. Changing in the number of CD117+ stem cells, cytogenetic and cytokinetic parameters under the using of candesartan, candesartan cilexetil and resveratrol *in vitro*. Вісн. Київ. нац. ун-ту імені Тараса Шевченка. Серія. Біологія. 2019;(3):54-7.

3. Beliyeva A. Analysis of the effect of resveratrol on the number of stem cells, cytokinetic and cytogenetic parameters *in vitro*. In: Ninth International Medical Congress of the Southeast European Medical Forum (SEEMF); 2018 Sep 6-9; Teslic, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina. Teslic; 2018. p. 52-3.

4. Beliyeva AV. Investigation of changes of cytokinetic and cytogenetic parameters in the experiment under the influence of candesartan, candesartan cilexetil and resveratrol. In: Eighth International Medical Congress of the Southeast European Medical Forum (SEEMF); 2017 Sep 7-10; Athens, Greece. Athens; 2017. p. 46-7.

5. Beliyeva A. P1813. Candesartan cilexetil and extract of Polygonum sp. influence on the number of stem cells *in vitro*. Eur J Heart Fail. 2016;18(Suppl 1, Abstracts of the Heart Failure 2016 Conference; 2016 May 21-24; Florence, Italy):436.

6. Беляева АВ. Влияние кандесартана цилексетила и ресвератрола на число стволовых клеток с CD117+, CD34+, CD117+/CD34+, CD31+ в исследовании *in vitro*. В: Тез. III Междунар. форума русскоговорящих врачей Новая волна в медицине; 2015 Авг 6-8; Рига – Юрмала, Латвия. Юрмала; 2015. с. 9.

Висновки до Розділу 3

- В експерименті *in vitro* вперше було встановлено, що синтетичний PPARs-регулятор кандесартану цилексетил в концентраціях 1,5 мкг/мл і 3 мкг/мл призводить до зменшення кількості клітин з фенотипом CD117+ в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6, а також відзначена тенденція до зниження числа клітин з CD117+ і CD117+/CD34+ в культурі жирової тканини людини. Вперше показано, що кандесартану цилексетил в концентрації 3 мкг/мл збільшує вміст апоптичних клітин в культурі жирової тканини людини.

- Вперше виявлено, що синтетичний кандесартан в концентраціях 1,5 мкг/мл і 3 мкг/мл стимулює утворення клітин з фенотипом CD117+ як в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6, так і в культурі жирової тканини людини, а в концентрації 3 мкг/мл – клітин з фенотипом CD34+ в культурі жирової тканини людини, однак зазначено, що ця речовина збільшує число апоптичних клітин і клітин з мікроядрами в обох культурах. Використання кандесартану в концентраціях 1,5 мкг/мл і 3 мкг/мл знижує проліферативні процеси, які відбуваються в культурі жирової тканини людини.

- Вперше показано, що ресвератрол в концентраціях 30 мкг/мл і 50 мкг/мл значно підсилює утворення клітин з маркером CD117 в культурах клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6; в концентраціях 10 мкг/мл, 30 мкг/мл і 50 мкг/мл стимулює утворення клітин з фенотипом CD117+ в культурі жирової тканини людини; в концентрації 50 мкг/мл збільшує вміст клітин з фенотипом CD34+ в культурі жирової тканини людини. Також встановлено, що ресвератрол в досліджуваних концентраціях не дає достовірних змін у параметрах клітинної кінетики і цитогенетичних показників і не є цитотоксичним для клітин жирової тканини людини за результатами метилтетразолієвого тесту.

- Вперше в експерименті *in vitro* виявлено, що спільне застосування кандесартану цилексетилу в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролу в концентраціях 30 мкг/мл і 50 мкг/мл призводить до достовірного збільшення кількості клітин з фенотипом CD117+ в культурах клітин кісткового мозку мишей

лінії C57Bl/6/ і жирової тканини людини; впливає на проліферативні процеси в культурі жирової тканини людини, що виражається, зокрема, у збільшенні кількості клітин в S і G₂/M фазах і зниженні числа клітин в G₀/G₁ фазах клітинного циклу.

- Вперше встановлено, що застосування кандесартану в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролу в концентраціях 1 мкг/мл – 50 мкг/мл призводить до достовірного збільшення числа клітин з фенотипом CD117⁺ в культурах клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 і жирової тканини людини, причому найбільший вміст зазначених клітин відзначено при дії кандесартану в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролу в концентрації 50 мкг/мл. Використання кандесартану в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролу в концентрації 50 мкг/мл стимулювало утворення клітин з фенотипом CD34⁺ в культурі жирової тканини людини.

- Дані, отримані *in vitro*, слугують підставою для використання зазначеної комбінації речовин в експериментах *in vivo* з метою вивчення зміни кількості ЕПК, числа клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами, розподілу клітин за фазами клітинного циклу в кістковому мозку і в крові тварин.

РОЗДІЛ 4**ВИВЧЕННЯ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ПОКАЗНИКІВ І ПАРАМЕТРІВ
КЛІТИННОЇ КІНЕТИКИ КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА КРОВІ ТВАРИН ПРИ
ЗАСТОСУВАННІ КАНДЕСАРТАНУ ЦИЛЕКСЕТИЛУ І РЕСВЕРАТРОЛУ****4.1 Вивчення впливу кандесартану цилексетилу і ресвератролу на
число клітин з CD117+ в кістковому мозку і в крові мишей лінії C57Bl/6**

У літературі є дані, що використання кандесартану цилексетилу збільшує кількість клітин з фенотипом CD117+ в серці щурів лінії SHR-SP [9]. Виявлено, що застосування цієї речовини призводить до активації проангіогенного потенціалу клітин, отриманих із спинномозкової рідини щурів лінії Wistar, підсилює експресію VEGF-A і VEGF-B [153].

У ряді досліджень показано, що ресвератрол впливає на зміну числа ЕПК: так, в дозі 2,5 мг/кг ця речовина сприяє посиленню проліферації клітин з фенотипом CD117+, також підвищує виживаність останніх, що сприяє регенерації і покращує роботу серця після ІМ у щурів [229], в дозі 10 мг/кг збільшує в крові кількість ЕПК, тоді як в дозі 50 мг/кг змін на проліферацію та міграцію ЕПК ми не спостерігали [187].

Встановлено на ApoE^{-/-}-мишах, яким вводили ресвератрол протягом 7 днів до проведення операції на артерії, зниження площі ураження, також відзначено збільшення числа клітин з фенотипом CD31+ [185].

Проведені експерименти на щурах Wistar, у яких індукували розвиток ЦД 1 типу показали, що тривале застосування ресвератролу в дозі 2,5 мг/кг сприяє зниженню загибелі ЕПК, збереженню функціональних властивостей стовбурових клітин і клітин серця, зменшення ремоделювання серцевого м'яза [183].

Gu та співавтори в дослідженнях на щурах, встановили, що ресвератрол в дозі 10 мг/кг прискорює процеси реендотелізації, а застосування ресвератролу в дозі 50 мг/кг зменшує ймовірність утворення фіброзної тканини, проте менш ефективні були показники в дозі 10 мг/кг [225].

Виявлено, що прийом червоного вина, яке містить ресвератрол, щодня протягом 3-х тижнів здоровими людьми призводить до збільшення кількості циркулюючих ЕПК з KDR+/CD133+, CD34+/CD133+, CD34+/KDR+, а також покращує функціональну активність цих клітин [230].

Отримані результати дослідження впливу кандесартану цилексетилу і ресвератролу в різних дозуваннях і комбінаціях на зміну числа клітин з поверхневим клітинним маркером CD117 в кістковому мозку і в крові мишей лінії C57Bl/6 представлені в таблиці 4.1.

Виявлено, що ресвератрол в дозі 1 мг/кг не призводить до мобілізації ЕПК в кістковому мозку і збільшення кількості цих клітин в крові тварин порівнянно з контролем. Відзначено, що ресвератрол в дозі 10 мг/кг стимулює утворення ЕПК ($p < 0,05$) (табл. 4.1).

Встановлено, що ресвератрол в дозі 50 мг/кг збільшує число клітин з фенотипом CD117+ в кістковому мозку мишей у порівнянні з контрольним показником ($p < 0,05$). У крові вміст цих клітин було достовірно вищими порівнянно з контролем ($p < 0,05$). Слід зазначити, що найбільший ефект стимуляції утворення ЕПК спостерігався при застосуванні ресвератролу в дозі 50 мг/кг (табл. 4.1).

В ході проведених експериментів з вивчення утворення ЕПК було встановлено, що введення мишам кандесартану цилексетилу у дозі 3 мг/кг призводить до збільшення кількості клітин з фенотипом CD117+ як в кістковому мозку, так і в крові тварин порівнянно з контрольним значенням ($p < 0,05$). У той час ця речовина в меншій дозі 1,5 мг/кг не впливає на зміну числа досліджуваних клітин у кістковому мозку. Кількість клітин з фенотипом CD117+ в крові у мишей, які отримували кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг, було достовірно вищою ($p < 0,05$) (табл. 4.1). Показано, що комбінація кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг, у поєднанні з ресвератролом в дозі 1 мг/кг не впливає на зміну числа клітин в кістковому мозку. Кількість ЕПК клітин в крові у мишей, які отримували кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг і ресвератрол в дозі 1 мг/кг було значно вищою порівнянно з контролем ($p < 0,05$) (табл.4.1).

В ході дослідження було також встановлено, що сумісне введення мишам кандесартану цилексетилю в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 10 мг/кг призводить до значного збільшення числа клітин з CD117+ як в кістковому мозку, так і в крові порівнянно з контролем. Підрахунок числа клітин в крові цих експериментальних тварин показав, що при введенні кандесартану цилексетилю в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 10 мг/кг достовірно збільшується кількість клітин з фенотипом CD117+ в порівнянні з контролем (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Вміст клітин з фенотипом CD117+ в кістковому мозку і в крові мишей лінії C57Bl/6, які отримували кандесартану цилексетил і ресвератрол

Група	Вміст клітин CD117+ в кістковому мозку, %	Вміст клітин CD117+ в крові тварин, %
1	2	3
1. Контрольная група	2,80±0,20	1,38±0,04
2. Група 1 (кандесартан 3 мг/кг)	5,61±0,14	3,28±0,12
3. Група 2 (кандесартан 1,5 мг/кг)	2,57±0,29	1,92±0,13
4. Група 3 (ресвератрол 1 мг/кг)	2,79±0,25	1,39±0,05
5. Група 4 (ресвератрол 10 мг/кг)	3,79±0,24	1,9±0,09
6. Група 5 (ресвератрол 50 мг/кг)	4,39±0,13	2,80±0,14
7. Група 6 (кандесартан 1,5 мг/кг і ресвератрол 1 мг/кг)	2,87±0,33	2,12±0,17
8. Група 7 (кандесартан 1,5 мг/кг і ресвератрол 10 мг/кг)	5,85±0,10	3,44±0,17
9. Група 8 (кандесартан 1,5 мг/кг і ресвератрол 50 мг/кг)	6,16±0,20	4,03±0,25
	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{1-5} < 0,05$ $p_{1-6} < 0,05$ $p_{1-8} < 0,05$ $p_{1-9} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$ $p_{2-5} < 0,05$ $p_{2-6} < 0,05$ $p_{2-7} < 0,05$ $p_{2-9} < 0,05$	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$ $p_{1-5} < 0,05$ $p_{1-6} < 0,05$ $p_{1-7} < 0,05$ $p_{1-8} < 0,05$ $p_{1-9} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$ $p_{2-5} < 0,05$ $p_{2-6} < 0,05$

1	2	3
	$p_{3-5} < 0,05$	$p_{2-7} < 0,05$
	$p_{3-6} < 0,05$	$p_{2-8} < 0,05$
	$p_{3-8} < 0,05$	$p_{2-9} < 0,05$
	$p_{3-9} < 0,05$	$p_{3-4} < 0,05$
	$p_{4-5} < 0,05$	$p_{3-6} < 0,05$
	$p_{4-6} < 0,05$	$p_{3-8} < 0,05$
	$p_{4-8} < 0,05$	$p_{3-9} < 0,05$
	$p_{4-9} < 0,05$	$p_{4-5} < 0,05$
	$p_{5-7} < 0,05$	$p_{4-6} < 0,05$
	$p_{5-8} < 0,05$	$p_{4-7} < 0,05$
	$p_{5-9} < 0,05$	$p_{4-8} < 0,05$
	$p_{6-7} < 0,05$	$p_{4-9} < 0,05$
	$p_{6-8} < 0,05$	$p_{5-6} < 0,05$
	$p_{6-9} < 0,05$	$p_{5-8} < 0,05$
	$p_{7-8} < 0,05$	$p_{5-9} < 0,05$
	$p_{7-9} < 0,05$	$p_{6-7} < 0,05$
		$p_{6-8} < 0,05$
		$p_{6-9} < 0,05$
		$p_{7-8} < 0,05$
		$p_{7-9} < 0,05$

Примітка. кандесартан – кандесартану цилексетил.

Спільне використання кандесартану цилексетилю в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 50 мг/кг впливає на число клітин з поверхневим клітинним маркером CD117 в кістковому мозку і в крові тварин. Проведені дослідження встановили достовірне збільшення кількості досліджуваних клітин порівнянно з контрольною групою ($p < 0,05$). Кількість клітин в крові дослідних тварин була значно вищою ніж у контрольній групі (табл. 4.1).

Таким чином, дослідження вмісту клітин з поверхневим клітинним маркером CD117 в кістковому мозку і в крові мишей лінії C57Bl/6 дозволяє зробити наступні висновки. Вперше виявлено, що застосування кандесартану цилексетилю в дозі 1,5 мг/кг веде до збільшення числа ЕПК в крові тварин, в той час як кандесартану цилексетил у більшій дозі – 3 мг/кг стимулює утворення клітин з CD117+ і в кістковому мозку, і в крові. Вперше показано, що у мишей

лінії C57Bl/6 ресвератрол в дозах 10 мг/кг і 50 мг/кг стимулює утворення ЕПК в кістковому мозку і збільшує їх вміст в крові. Вперше виявлено, що застосування кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 1 мг/кг призводить до збільшення числа ЕПК в крові тварин. Отримані результати можуть пояснюватися тим, що клітини швидко залишають кістковий мозок і дозрівають в крові, тому маркер CD117 детектується тільки в крові. Вперше встановлено, що введення кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 10 мг/кг, а також кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 50 мг/кг призводить до значного збільшення кількості клітин з CD117+ як в кістковому мозку, так і в крові мишей лінії C57Bl/6, причому досліджувані показники відповідають таким групи 1, яка отримувала кандесартану цилексетил в дозі 3 мг/кг.

4.2 Дослідження цитогенетичних показників і параметрів клітинної кінетики кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 при використанні кандесартану цилексетилу і ресвератролу

В роботі були вивчені наступні цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 при введенні тваринам кандесартану цилексетилу і ресвератролу в різних дозах: число клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами, розподіл клітин за стадіями клітинного циклу (кількість клітин, що знаходяться в G_0/G_1 , S, G_2/M фазах клітинного циклу). Було показано, що вибрані для аналізу речовини впливають на зміну значень досліджуваних показників (рис. 4.3, 4.4 і 4.5).

Встановлено, що у мишей, які отримували кандесартану цилексетил в дозі 3 мг/кг, рівень апоптотичних клітин значно вищий порівнянно з контролем ($p < 0,05$) (рис. 4.1). Вивченні зміни клітин з мікроядрами при введенні тваринам кандесартану цилексетилу у дозі 3 мг/кг виявило достовірне збільшення числа клітин з ушкодженнями генетичного матеріалу, що відображено на рис. 4.2.

В ході проведеного аналізу показано, що значних змін в параметрах клітинного циклу кісткового мозку мишей при введенні кандесартану цилексетилу у дозі 3 мг/кг відзначено не було (рис. 4.3).

Введення кандесартану цилексетилу мишам лінії C57Bl/6 в дозі 1,5 мг/кг призвело до змін кількості клітин з мікроядрами в кістковому мозку ($p < 0,05$) (рис. 4.2).

Аналіз розподілу клітин за фазами клітинного циклу дозволило встановити, що при використанні кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг достовірно значущих змін досліджуваних показників у порівнянні з контрольною групою мишей виявлено не було (рис. 4.3).

Показано, що введення мишам ресвератролу в дозах 1 мг/кг, 10 мг/кг і 50 мг/кг значно зменшує число апоптотичних клітин в кістковому мозку мишей лінії C57Bl/6 ($p < 0,05$) (рис. 4.1). При застосуванні досліджуваної речовини в дозі 1 мг/кг спостерігалось дотовірно зниження кількості клітин з мікроядрами в кістковому мозку тварин в порівнянні з контролем ($p < 0,05$) (рис. 4.2). Аналіз розподілу клітин за стадіями клітинного циклу дозволив встановити, що обраний антиоксидант не змінює показники клітинного циклу (рис. 4.3).

Введення кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 1 мг/кг призвело до зниження апоптотичних клітин і клітин з мікроядрами в кістковому мозку мишей лінії C57Bl/6 порівнянно зі значеннями цих показників в групі 1; значення зазначених параметрів в групі 6 мишей наблизилися до контрольних значень (рис. 4.1 і 4.2).

Проведений аналіз розподілу клітин за стадіями клітинного циклу після введення мишам кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 1 мг/кг дозволяє зробити наступні висновки. Число клітин, що знаходяться на G_0/G_1 стадіях, у тварин групи 6 були значно нижчими в порівнянні з групами 1 і 2 мишей, які отримували кандесартану цилексетил в дозах 3 мг/кг і 1,5 мг/кг, відповідно ($p < 0,05$). Відмінність між значеннями цих показників в групі 6 та інших групах залишилися не достовірні (рис. 4.3).

При спільному використанні кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 10 мг/кг число клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами достовірно не відрізнялися від значень таких показників в інших групах (рис. 4.1 і 4.2). Кількість клітин в G_0/G_1 фазах знизилася в порівнянні з групами 1 і 2 ($p < 0,05$). Число клітин в S і G_2/M фазах клітинного циклу в групі 7 достовірно не відрізняється від значень цих параметрів в інших групах мишей (рис. 4.3).

При проведенні дослідження впливу кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 50 мг/кг (група 8) на цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 виявлено, що кількість апоптичних клітин і клітин з мікроядрами достовірно не змінюється в порівнянні з цими показниками в інших групах (рис. 4.1 і 4.2). Аналіз клітинного циклу дозволив встановити, що кількість клітин на G_0/G_1 стадіях відповідала контрольним показникам і була достовірно вища значень груп 6 і 7. Достовірно значущих відмінностей у кількості клітин у S і G_2/M фазах в групі 8 порівнянно з іншими групами тварин виявлено не було (рис. 4.3).

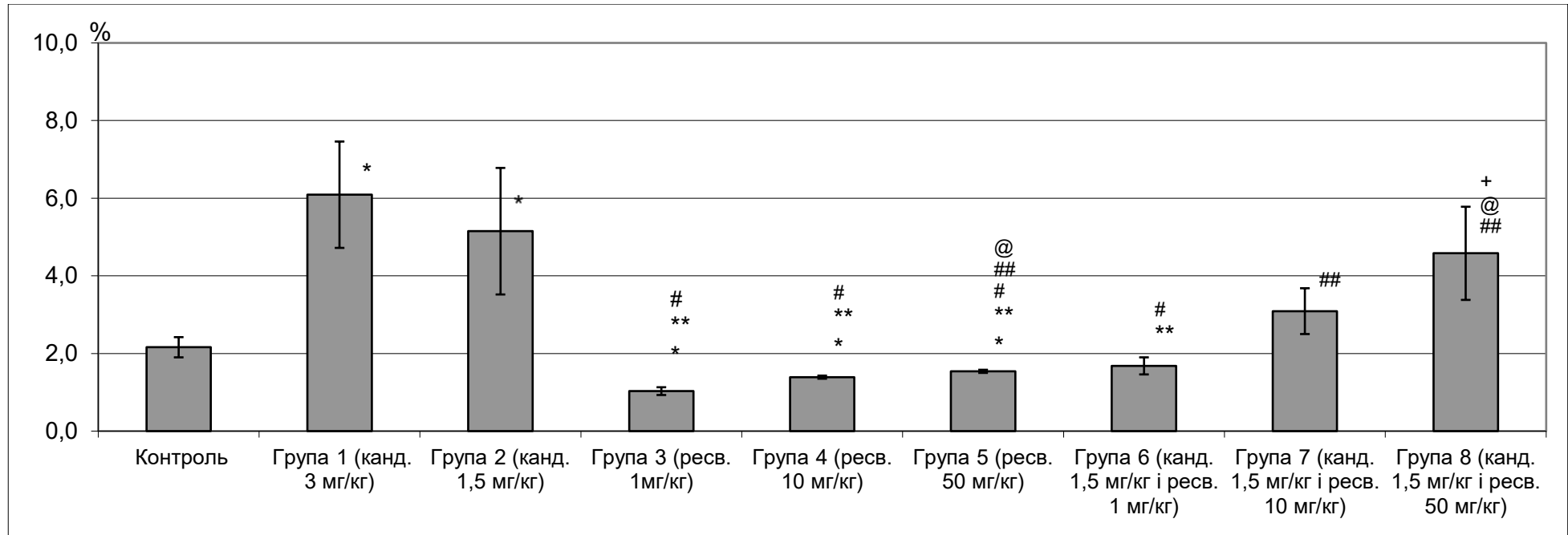


Рис. 4.1. – Вміст апоптичних клітин у кістковому мозку мишей лінії C57Bl/6, які отримували кандесартану цилексетил і ресвератрол.

Примітки:

1. канд. – кандесартану цилексетил;
2. ресв. – ресвератрол;
3. * – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками контролю;
4. ** – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 1;
5. # – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 2;
6. ## – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 3;

7. @ – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 4;
8. + – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 5.

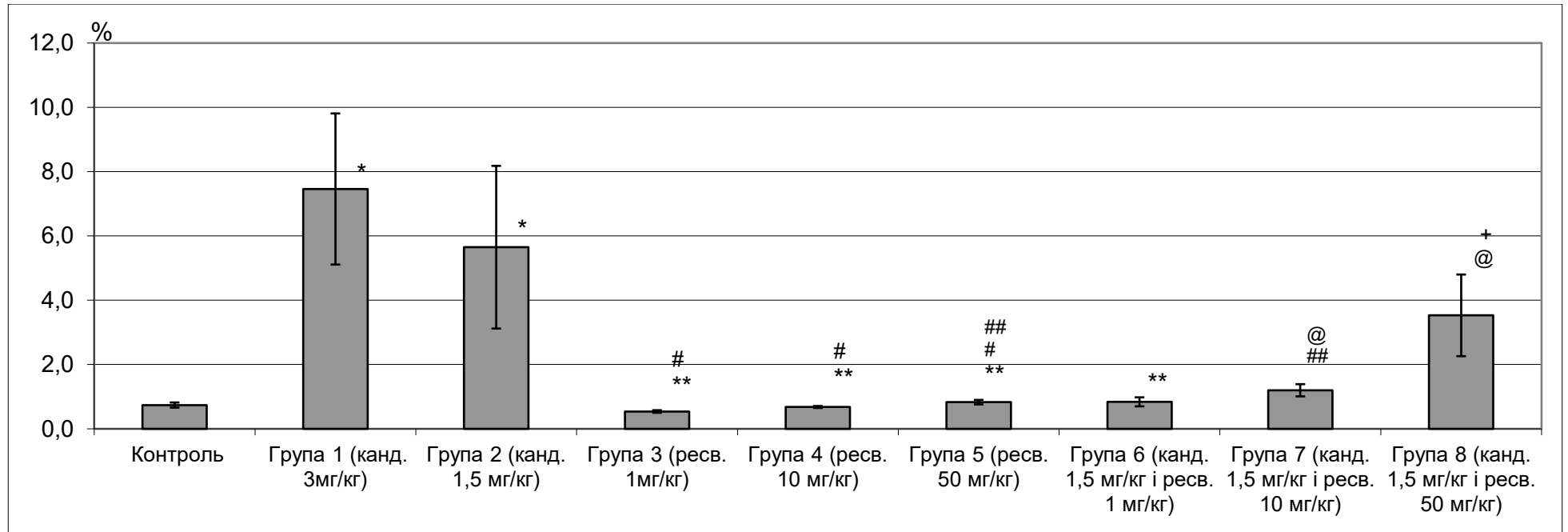


Рис. 4.2. – Вміст клітин з мікроядрами у кістковому мозку мишей лінії C57Bl/6, які отримували кандесартану цилексетил і ресвератрол.

Примітки:

1. канд. – кандесартану цилексетил;
2. ресв. – ресвератрол;
3. * – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками контролю;
4. ** – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 1;
5. # – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 2;
6. ## – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 3;

7. @ – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 4;
8. + – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 5.

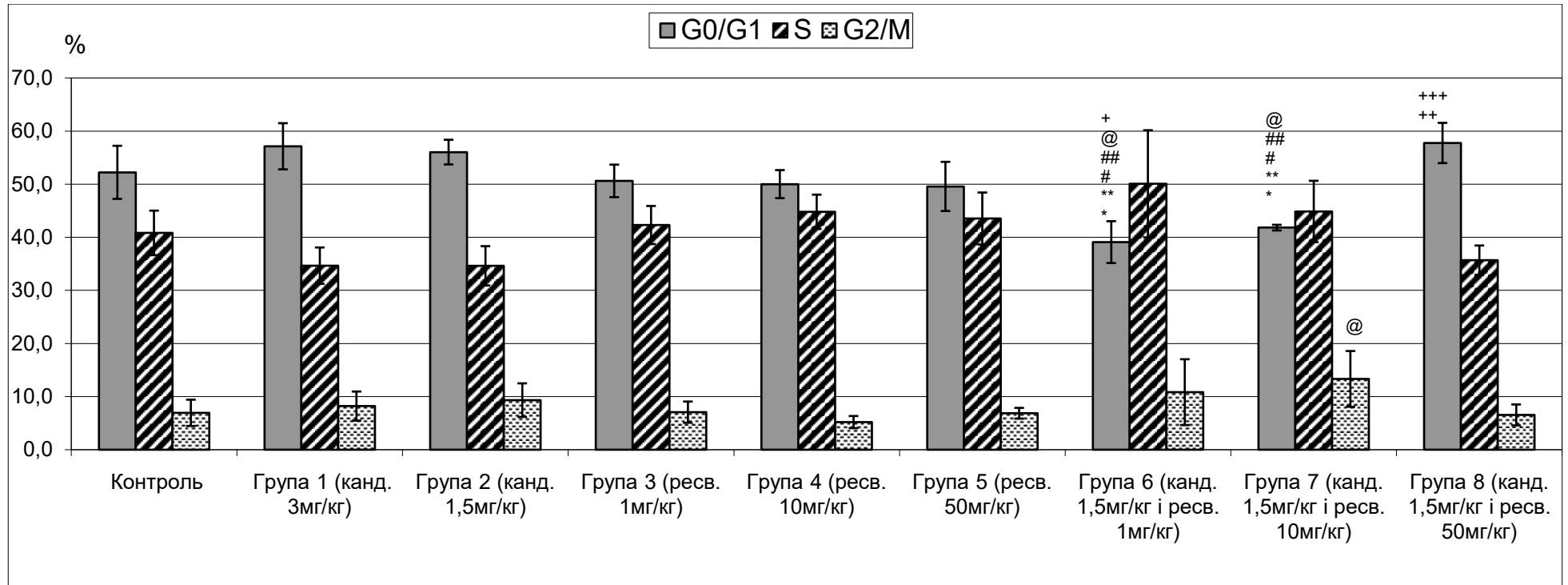


Рис. 4.3. – Розподіл клітин за фазами клітинного циклу в кістковому мозку мишей лінії C57Bl/6, які отримували кандесартану цилексетил і ресвератрол.

Примітки:

1. канд. – кандесартану цилексетил;
2. ресв. – ресвератрол;
3. * – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками контролю;
4. ** – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 1;
5. # – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 2;

6. ## – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 3;
7. @ – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 4;
8. + – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 5;
9. ++ – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 6;
- 10.+++ – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 7.

Існує інформація про те, що кандесартану цилексетил в дозах 0,015 мг/кг і 0,030 мг/кг збільшує кількість клітин з ознаками апоптозу серед міоцитів у щурів [231]. Згідно з літературними даними, кандесартану цилексетил пригнічує утворення окремих субпопуляцій клітин в кістковому мозку у щурів [158], що підтверджується результатами, отриманими в ході дисертаційної роботи. Поряд з цим в літературі є інформація про те, що кандесартану цилексетил знижує частку апоптичних клітин, зменшує фіброз серця, відновлюючи нормальне функціонування останнього [232, 233].

Існує інформація, що природний антиоксидант ресвератрол перешкоджає розвитку ендотеліальної дисфункції, знижує ймовірність виникненню апоптичних процесів [183, 234, 235]. Встановлено, що ресвератрол зменшує частку клітин з ознаками апоптозу в кістковому мозку тварин [236].

На основі отриманих даних можна зробити наступні висновки. Показано, що кандесартану цилексетил має цитотоксичні властивості: призводить до значного збільшення числа клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами в кістковому мозку мишей лінії C57Bl/6. Введення тваринам кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 1 мг/кг знижує кількість клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами. Вперше отримані результати дослідження впливу кандесартану цилексетилу і ресвератролу в різних дозах на основні цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 дозволяють зробити висновок, що в поєднанні з кандесартану цилексетилом, природний антиоксидант ресвератрол нівелює цитотоксичні ефекти кандесартану цилексетилу.

4.3 Дослідження цитогенетичних показників і параметрів клітинної кінетики крові мишей лінії C57Bl/6 при використанні кандесартану цилексетилу і ресвератролу

Результати вивчення числа клітин з ознаками апоптозу, з мікроядрами, кількості клітин в G_0/G_1 , S, G_2/M фазах клітинного циклу в крові мишей лінії

C57Bl/6 при введенні кандесартану цилексетилу і ресвератролу в різних дозах наведені на рисунках 4.4, 4.5 і 4.6.

При використанні кандесартану цилексетилу у дозі 3 мг/кг (група 1) число клітин з ознаками апоптозу достовірно не відрізнялося порівнянно зі значеннями показника інших груп (рис. 4.4). Встановлено, що кількість клітин на G_0/G_1 стадіях було значно вище в порівнянні з контролем ($p < 0,05$), тоді як число клітин в S і G_2/M фазах значуще не відрізнялося від значень інших груп (рис. 4.6).

Застосування кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг (група 2) призводить до зміни розподілу клітин за фазами клітинного циклу. Спостерігалось збільшення кількості клітин на G_0/G_1 стадіях і зниження числа клітин в G_2/M фазах в порівнянні з контролем ($p < 0,05$) (рис. 4.6). Статистично значущих відмінностей в показниках вмісту клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами виявлено не було (рис. 4.4 і 4.5).

Як видно з представлених даних, при введенні кандесартану цилексетилу в дозах 3 мг/кг і 1,5 мг/кг спостерігається цитотоксичний ефект в клітинах крові, що проявляється зниженням частки клітин в S+ G_2/M фазах.

В ході проведення дослідження встановлено, що ресвератрол в дозах 1^oмг/кг, 10 мг/кг і 50 мг/кг не призводить до зміни кількості апоптичних клітин, а також не впливає на вміст клітин з мікроядрами в крові мишей лінії C57Bl/6. Показано, що показники розподілу клітин за фазами клітинного циклу при дії ресвератролу в зазначених дозах наближалися до контрольних значень (рис. 4.4, 4.5 і 4.6).

При введенні кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 1 мг/кг (група б) виявлено цитостатичний ефект в крові. Число клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами значно збільшилася порівнянно з контролем ($p < 0,05$). Достовірна різниця кількості апоптичних клітин було виявлено і з групою, що отримувала кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг (рис. 4.4 і 4.5) ($p < 0,05$).

Вивчення клітинного циклу дозволило встановити зміни, що відбуваються після введення мишам кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в

дозі 1 мг/кг (група 6). Показано, що кількість клітин в G_0/G_1 фазах було нижчі значення цього параметру в групі 2 ($p < 0,05$). Достовірних відмінностей в кількості клітин в S і G_2/M фазах клітинного циклу в групі 6 тварин у порівнянні з значеннями інших груп не було виявлено (рис. 4.6).

Використання кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 10 мг/кг (група 7) призвело до збільшення числа клітин з ознаками апоптозу в крові мишей лінії C57Bl/6 порівнянно з контролем ($p < 0,05$). Показано, що число клітин з мікроядрами достовірно не змінилося (рис. 4.4 і 4.5). Аналіз клітинного циклу показав, що кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг і ресвератрол в дозі 10 мг/кг призводить до збільшення кількості клітин в S фазі, що достовірно вище, ніж в групі, що одержувала тільки кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг ($p < 0,05$). Розподіл клітин в G_0/G_1 і G_2/M фазах не змінилось у порівнянні з іншими групами (рис. 4.6). Спільне використання кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 50 мг/кг (група 8) також вплинуло на зміни числа клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами (достовірно значущих відмінностей з показниками інших груп виявлено не було) (рис. 4.4 і 4.5). Значних змін в кількості клітин за фазами клітинного циклу виявлено не було (рис. 4.6).

У літературі є дані про те, що кандесартану цилексетил здатний як збільшувати число апоптичних клітин, так і зменшувати кількість клітин з ушкодженнями генетичного матеріалу [231 – 233]. Також показано, що кандесартану цилексетил пригнічує утворення окремих субпопуляцій клітин в крові щурів [158]. Для ресвератролу показано зниження кількості клітин з ознаками апоптозу у тварин [234, 235].

Таким чином, можна зробити висновок, що при сумісному застосуванні кандесартану цилексетилу і ресвератролу, відбувається відновлення показників, що характеризують проліферативну здатність, і спостерігається посилення процесів клітинної загибелі, що, можливо, є наслідком протективних властивостей ресвератролу, які проявляються в елімінації клітин з ушкодженнями ДНК, індукованим антигіпертензивним лікарським засобом.

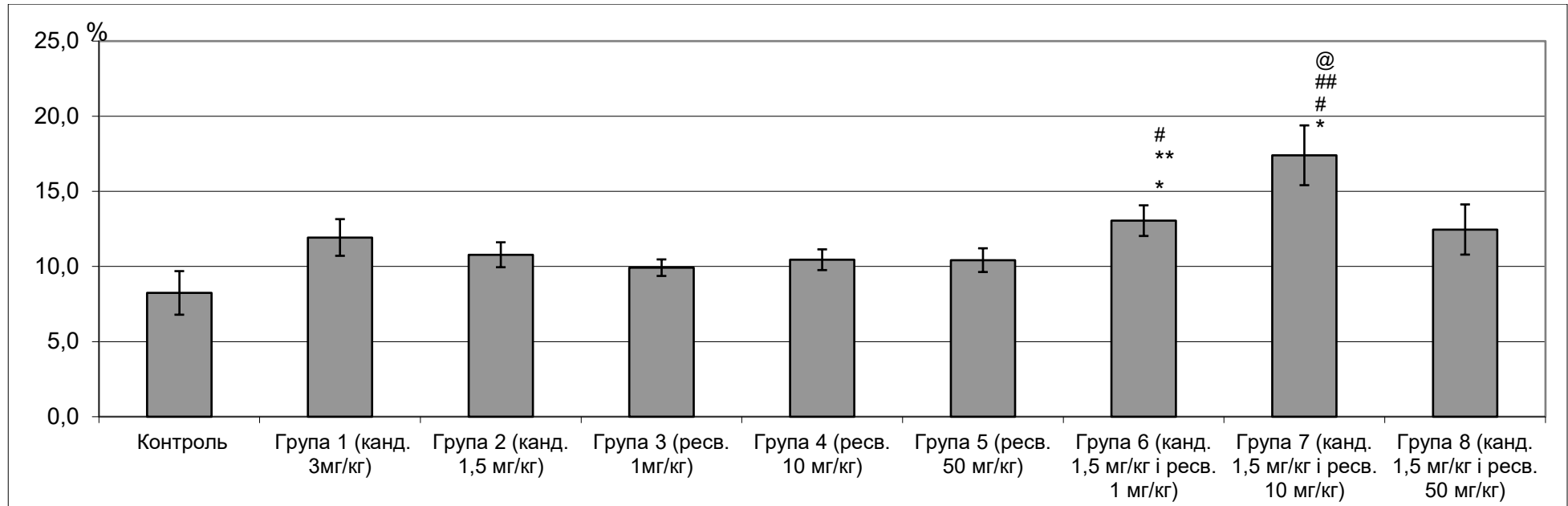


Рис. 4.4. – Вміст апоптотичних клітин у крові мишей лінії C57Bl/6, які отримували кандесартану цилексетил і ресвератрол.

Примітки:

1. канд. – кандесартану цилексетил;
2. ресв. – ресвератрол;
3. * – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками контролю;
4. ** – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 2;
5. # – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 3;
6. ## – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 4;
7. @ – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 5.

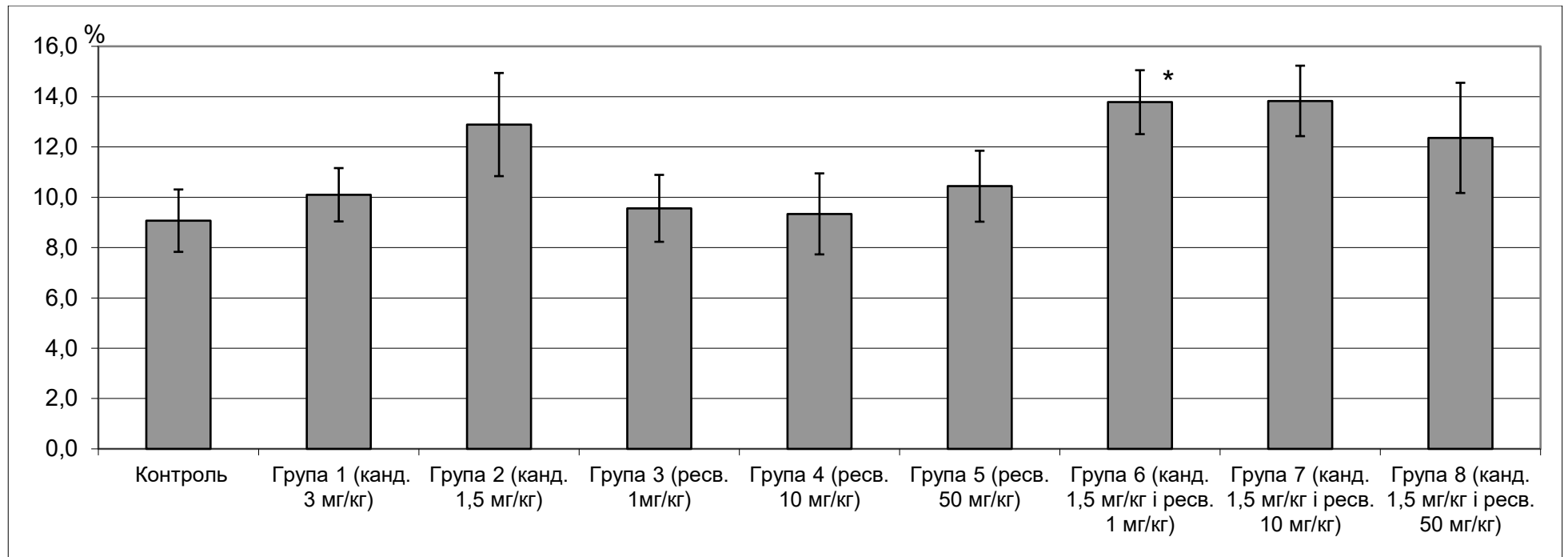


Рис. 4.5. – Вміст клітин з мікроядрами у крові мишей лінії C57Bl/6, які отримували кандесартану цилексетил і ресвератрол.

Примітки:

1. канд. – кандесартану цилексетил;
2. ресв. – ресвератрол;
3. * – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками контролю.

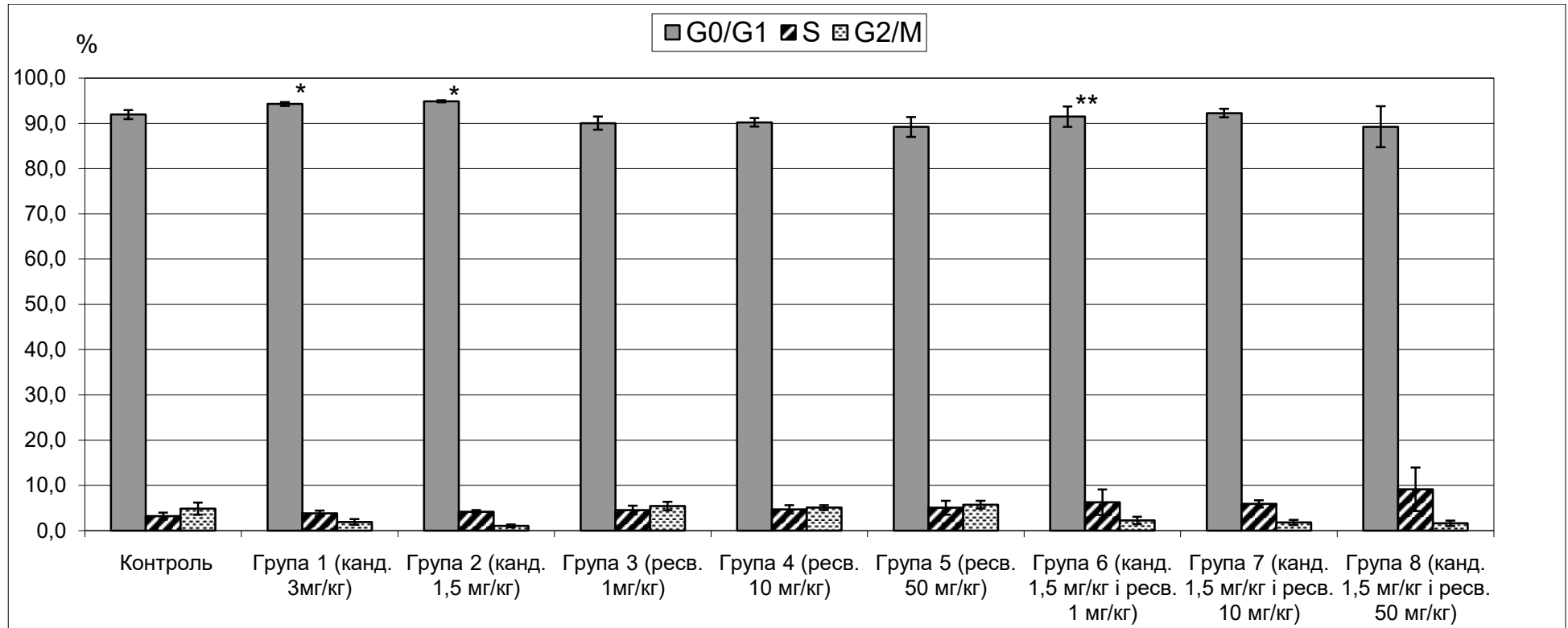


Рис. 4.6. – Розподіл клітин за фазами клітинного циклу в крові мишей лінії C57Bl/6, які отримували кандесартану цилексетил і ресвератрол.

Примітки:

1. канд. – кандесартану цилексетил;
2. ресв. – ресвератрол;
3. * – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками контролю;
4. ** – відмінності статистично достовірні в порівнянні з показниками групи 2.

4.4 Вплив кандесартану цилексетилу і ресвератролу на зміну відносної маси серця мишей лінії C57Bl/6

Відносна маса органів тварин (до маси тіла) є об'єктивним показником, який відображає певну міру фізіологічного стану і функціонування організму. Абсолютні і відносні маси органів тіла часто змінюються під впливом ряду зовнішніх чинників, що може вказувати також і на віддалені патологічні процеси, що відбуваються в організмі. У літературі є інформація, що кандесартану цилексетил покращує роботу серця, зменшує діаметр міоцитів, пригнічує процес розвитку фіброзу серцевого м'язу у щурів, які мають кардіоміопатію або ЦД [232, 233]. Існують дані, що ресвератрол перешкоджає розвитку гіпертрофії і порушенню роботи серця у щурів [237, 238].

У проведеному дослідженні було вивчено зміну ВКМ серця тварин з метою виявлення впливу кандесартану цилексетилу і ресвератролу в різних дозах і комбінаціях на роботу ССС.

На мишах лінії C57Bl/6 встановлено, що введення досліджуваних речовин не призводить до достовірних зміни ВКМ серця у експериментальних тварин (табл. 4.2).

При використанні кандесартану цилексетилу в дозах 3 мг/кг (група 1) і 1,5 мг/кг (група 2) ВКМ серця дорівнював $6,80 \pm 0,46$ і $6,54 \pm 0,27$, відповідно, в той час як в контрольній групі тварин склав $6,55 \pm 0,65$ (вірогідно значущих відмінностей виявлено не було) (табл. 4.2).

Вивчення морфометричних показників дозволило встановити, що ВКМ серця мишей, які отримували ресвератрол в досліджуваних дозах 1 мг/кг, 10 мг/кг і 50 мг/кг ($6,76 \pm 0,32$, $6,62 \pm 0,26$ і $6,53 \pm 0,22$, відповідно), не відрізнявся від ВКМ серця контрольних тварин (табл. 4.2).

ВКМ серця мишей лінії C57Bl/6, які отримували кандесартану цилексетил і ресвератрол

Групи	m тіла (г)	m серця (г)	ВКМ серця
1. Контрольна група	28,72±0,35	0,19±0,02	6,55±0,65
2. Група 1 (кандесартан 3 мг/кг)	30,65±0,29	0,21±0,01	6,80±0,46
3. Група 2 (кандесартан 1,5 мг/кг)	29,46±0,60	0,19±0,01	6,54±0,27
4. Група 3 (ресвератрол 1 мг/кг)	29,73±0,63	0,20±0,01	6,76±0,32
5. Група 4 (ресвератрол 10 мг/кг)	28,92±0,49	0,19±0,01	6,62±0,26
6. Група 5 (ресвератрол 50 мг/кг)	29,12±0,62	0,19±0,01	6,53±0,22
7. Група 6 (кандесартан 1,5 мг/кг і ресвератрол 1 мг/кг)	28,38±0,37	0,18±0,01	6,49±0,30
8. Група 7 (кандесартан 1,5 мг/кг і ресвератрол 10 мг/кг)	29,77±0,30	0,21±0,02	6,91±0,56
9. Група 8 (кандесартан 1,5 мг/кг і ресвератрол 50 мг/кг)	30,28±0,47	0,20±0,10	6,73±0,35

Примітки:

1. кандесартан – кандесартану цилексетил;
2. m – маса.

Сумісне введення кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 1 мг/кг (група 6) також не впливало на зміну маси серця мишей: показник ВКМ серця дорівнював 6,49±0,30. У тварин, які отримували кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг і ресвератрол в дозі 10 мг/кг (група 7), ВКМ серця склав 6,91±0,56. При введенні мишам кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 50 мг/кг (група 8) досліджуваний параметр був на рівні 6,73±0,35 (табл. 4.2).

В ході проведеного аналізу достовірних відмінностей в значеннях ВКМ серця серед досліджуваних груп тварин виявлено не було (табл. 4.2).

Таким чином, застосування кандесартану цилексетилу і ресвератролу в різних дозуваннях і комбінаціях не має впливу на зміну ВКМ серця тварин.

4.5 Дослідження рухової активності мишей лінії C57Bl/6 при короткочасному і тривалому введенні кандесартану цилексетилу і ресвератролу

Вивчення змін рухової активності у тварин при використанні різних препаратів і субстанцій є одним з найважливіших експериментів при розробці нових ліків і їх комбінацій, оскільки дозволяє виявити через поведінкову і емоційну активність вплив досліджуваних речовин на центральну нервову систему. У літературі є дані про те, що кандесартану цилексетил підвищує витривалість людей з АГ при виконанні ними фізичних навантажень [155]. Встановлено, що ресвератрол покращує координацію, нейром'язові функції у тварин [239, 240]. Опубліковані результати, які свідчать про те, що ресвератрол в поєднанні з фізичними навантаженнями у літніх людей збільшує кількість позитивних результатів, які є при здійсненні лише фізичних навантажень. Так, при сумісній терапії не спостерігалось зниження артеріального тиску, зменшення ліпідів в крові, збільшення показників максимального кисневого поглинання в тій мірі, як при фізичних навантаженнях [241].

В ході виконання дисертаційної роботи було вивчено вплив кандесартану цилексетилу і ресвератролу в різних дозах і комбінаціях при короткотривалому і довготривалому введенні на рухову активність лабораторних мишей лінії C57Bl/6. Отримані дані представлені в таблицях 4.3 и 4.4.

Виявлено, що при короткотривалому застосуванні кандесартану цилексетилу у дозі 3 мг/кг відбувається зменшення кількості пересувань у мишей ($p < 0,05$). Також відмено зниження значень показника часу, витраченого на пересування, збільшення значень часу, проведеного тваринам в спокої при використанні кандесартану цилексетилу в дозах 3 мг/кг і 1,5 мг/кг (достовірно значущих змін порівнянно з контрольною групою мишей не виявлено) (табл. 4.3).

При введенні кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозах 1 мг/кг і 50 мг/кг протягом 1 тижня виявлено тенденцію до збільшення відстані пройденого тваринами, часу, витраченого на пересування. У групи, що одержувала кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг і ресвератрол в дозі 50 мг/кг,

відзначено зменшення показника, що характеризує час, проведений в спокої, в порівнянні з такими значеннями інших груп тварин і збільшення параметра, що описує кількість пересувань, в порівнянні зі значеннями таких показників у мишей, які отримували кандесартану цилексетил в дозах 3 мг/кг і 1,5 мг/кг ($p < 0,05$) (табл. 4.3).

При тривалому використанні кандесартану цилексетилу в дозах 3 мг/кг і 1,5 мг/кг відзначена тенденція до скорочення відстані, пройденого тваринами, часу, витраченого на пересування, зменшення кількості пересувань, збільшення значення часу, проведеного в спокої (достовірно значущих відмінностей в порівнянні з контрольною групою мишей не виявлено) (табл. 4.4).

При сумісному введенні кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозах 1 мг/кг і 50 мг/кг основні оцінювані параметри рухової активності відповідали контрольним значенням. При довготривалому сумісному введенні цих речовин, виявлено збільшення відстані пройденого тваринами, збільшення значення часу, витраченого на пересування, зниження значення часу, проведеного в спокої. У груп 3 – 5 мишей спостерігалось відновлення показника, що характеризує кількість пересувань (достовірно значущих відмінностей в порівнянні з контрольною групою мишей не виявлено) (табл. 4.4).

Таким чином, показана тенденція до зниження рухової активності у мишей лінії C57Bl/6 при застосуванні кандесартану цилексетилу в дозах 3 мг/кг і 1,5 мг/кг. При спільному введенні кандесартану цилексетилу, у поєднанні з ресвератролом відзначена тенденція до відновлення основних параметрів, використовуваних для характеристики рухової активності, що дозволяє говорити про можливі захисні властивості ресвератролу на нервову систему, що проявляються у відновленні активної поведінки тварин.

Таблиця 4.3.

Показники рухової активності мишей лінії C57Bl/6 після семиденного введення кандесартану цилексетилу і ресвератролу

Група	DT, %	RT, %	ST, %	AT, %	BSM, %	AC, %
1. Контрольна група	100,00±11,70	100,00±5,29	100,00±3,27	100,00±5,99	100,00±1,69	100,00±7,79
2. Група 1 (кандесартан 3 мг/кг)	94,41±12,31	113,58±4,98	98,61±5,66	90,2±6,66	93,43±3,61	72,69±4,59
3. Група 2 (кандесартан 1,5 мг/кг)	96,16±12,26	110,05±7,50	96,7±3,74	95,27±7,14	96,39±3,58	81,65±5,39
4. Група 3 (кандесартан 1,5 мг/кг і ресвератрол 1 мг/кг)	125,64±19,41	100,04±6,37	90,91±5,70	110,08±8,62	95,67±4,15	94,83±6,62
5. Група 4 (кандесартан 1,5 мг/кг і ресвератрол 10 мг/кг)	97,85±11,22	108,07±7,03	94,93±4,07	98,89±6,91	100,17±3,30	89,17±8,04
6. Група 5 (кандесартан 1,5 мг/кг і ресвератрол 50 мг/кг)	120,61±9,84	79,80±3,41	98±3,57	119,11±5,22	103,18±3,13	117,92±6,96
		p ₁₋₆ <0,05 p ₂₋₆ <0,05 p ₄₋₆ <0,05 p ₅₋₆ <0,05				p ₁₋₂ <0,05 p ₂₋₆ <0,05 p ₃₋₆ <0,05

Примітки:

1. кандесартан – кандесартану цилексетил;
2. за 100 % приймалися контрольні значення;
3. DT – відстань, пройдена тваринами в сантиметрах;
4. RT – час, проведений в спокої в секундах;
5. ST – грумінг в секундах;
6. AT – час, витрачений на пересування в секундах;

7.BSM – кількість актів грумінгу;

8.AC – кількість пересувань.

Таблиця 4.4.

Показники рухової активності мишей лінії C57Bl/6 після введення кандесартану цилексетилу і ресвератролу протягом 7 тижнів

Група	DT, %	RT, %	ST, %	AT, %	BSM, %	AC, %
1. Контрольна група	100,00±10,21	100,00±7,50	100,00±2,92	100,00±6,51	100,00±1,46	100,00±9,44
2. Група 1 (кандесартан 3 мг/кг)	87,40±6,51	108,27±6,42	102,22±2,67	92,77±5,62	100,45±1,15	93,63±6,07
3. Група 2 (кандесартан 1,5 мг/кг)	82,81±9,86	122,70±15,18	100,06±2,75	85,70±8,92	98,91±2,77	84,28±10,19
4. Група 3 (кандесартан 1,5 мг/кг і ресвератрол 1 мг/кг)	115,58±10,90	96,17±10,63	92,96±4,71	108,82±8,02	99,05±2,99	116,56±10,21
5. Група 4 (кандесартан 1,5 мг/кг і ресвератрол 10 мг/кг)	95,50±10,53	105,63±13,47	100,15±3,26	96,32±8,20	101,87±2,07	98,84±10,59
6. Група 5 (кандесартан 1,5 мг/кг і ресвератрол 50 мг/кг)	100,13±7,17	83,63±7,48	107,70±3,94	103,20±4,32	103,86±0,84	101,55±6,41
	$p_{2-4} < 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$	$p_{2-6} < 0,05$				$p_{3-4} < 0,05$

Примітки:

1. кандесартан – кандесартану цилексетил;
2. за 100 % приймалися контрольні значення;
3. DT - відстань, пройдена тваринами в сантиметрах;
4. RT - час, проведений в спокої в секундах;
5. ST - грумінг в секундах;
6. AT - час, витрачений на пересування в секундах;
7. BSM - кількість актів грумінгу;

8. АС - кількість пересувань.

Результати досліджень, представлені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. Beliyeva A, Garmanchuk L. Morphofunctional parameters of bone marrow of mice under using of antihypertensive agent. *Fundamental and applied researches in practice of leading scientific schools*. 2020;42(6):4-6. doi: 10.33531/farplss.2020.6.1.
2. Беляева АВ, Афонин ВЮ. Влияние ресвератрола на изменения количества эндотелиальных прогениторных клеток, цитогенетических показателей и параметров клеточной кинетики в эксперименте. *Новости медико-биол. наук*. 2016;14(4):30-5.
3. Беляева АВ. Влияние ресвератрола и кандесартана на клеточный цикл, апоптоз и мобилизацию клеток CD117. *Новости медико-биол. наук*. 2013;8(3):64-8.
4. Beliyeva A. Candesartan cilexetil and resveratrol stimulate mobilization of CD117+ stem cells in C57Bl/6 mice. В: *Матеріали Міжнар. наук.-практ. конф.-шк. студентів та молодих вчених BIOMED Talks – 2019; 2019 Жовт 15-17. Київ; 2019. с. 13-4.*
5. Beliyeva A. P1983. Influence of candesartan cilexetil and resveratrol on changes in the number of stem cells, cytogenetic and cytokinetic parameters of bone marrow of mice. *Eur J Heart Fail*. 2018;20(Suppl S1, Abstracts of the Heart Failure 2018 and the World Congress on Acute Heart Failure; 2018 May 26-29; Vienna, Austria):517.
6. Beliyeva AV, Darafeyenka IS, Vlasenka AK, Sazanov VB, Afonin VYu. The influence of candesartan and resveratrol on the mobilization of stem cells CD117 in C57Bl/6 mice. In: *Abstracts book of the I International Scientific Conference of Students and PhD Students Cell Technology Week 2013; 2013 May 14-17; Kyiv. Kyiv; 2013. p. 28.*

Висновки до розділу 4

- Вперше показано, що кандесартану цилексетил в дозі 3 мг/кг стимулює утворення в кістковому мозку мишей лінії C57Bl/6 клітини з поверхневим маркером CD117, а в дозах 1,5 мг/кг і 3 мг/кг призводить до збільшення кількості останніх в крові тварин. Вперше встановлено, що кандесартану цилексетил в зазначених дозах має цитотоксичні властивості, що виражаються в індукції апоптозу і накопиченні клітин з мікроядрами в кістковому мозку тварин.

- Вперше виявлено, що ресвератрол в дозах 10 мг/кг і 50 мг/кг призводить до значного збільшення числа клітин з фенотипом CD117+ як в кістковому мозку, так і в крові мишей лінії C57Bl/6, причому найбільший ефект стимуляції мобілізації відзначений для ресвератролу в дозі 50 мг/кг. Також при аналізі цитогенетичних показників і параметрів клітинної кінетики кісткового мозку і крові тварин показано, що дія ресвератролу не є цитотоксичною.

- Вперше встановлено, що сумісне використання кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 1 мг/кг призводить до збільшення кількості клітин з фенотипом CD117+ в крові мишей лінії C57Bl/6, а застосування кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг у поєднанні з ресвератролом в дозах 10 мг/кг і 50 мг/кг – до збільшення кількості зазначених клітин в кістковому мозку і в крові тварин. Ефективність збільшення кількості клітин з CD117+ в крові істотно вища при спільному використанні кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг з ресвератролом в дозах 10 мг/кг і 50 мг/кг у порівнянні з моноречовиною кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг. Ефективність стимуляції утворення клітин з CD117+ в кістковому мозку і збільшення цих клітин в крові порівнянно з дією кандесартану цилексетилу у дозі 3 мг/кг. Ресвератрол в дозах 1 мг/кг і 10 мг/кг при сумісному використанні кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг нівелює цитотоксичний ефект останнього (кістковий мозок) або підсилює цей ефект (кров), що виражає відповідну зміну кількості клітин з ушкодженнями генетичного матеріалу. Можна припустити, що ресвератрол впливає на віддалену загибель клітин в крові.

- Кандесартану цилексетил в дозах 3 мг/кг і 1,5 мг/кг призводить до зниження рухової активності у мишей лінії C57Bl/6. Сумісне введення цієї речовини в дозі 1,5 мг/кг, у поєднанні з ресвератролом в дозах 1 мг/кг і 50 мг/кг відновлює основні параметри рухової активності, що дозволяє говорити про захисні властивості антиоксиданту ресвератролу на нервову систему.

РОЗДІЛ 5**ДОСЛІДЖЕННЯ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ПОКАЗНИКІВ І
ПАРАМЕТРІВ КЛІТИННОЇ КІНЕТИКИ КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА КРОВІ
ТВАРИН ПРИ ФІЗИЧНИХ НАВАНТАЖЕННЯХ, А ТАКОЖ ПРИ
ПОДАЛЬШОМУ ЗАСТОСУВАННІ КАНДЕСАРТАНУ ЦИЛЕКСЕТИЛУ І
РЕСВЕРАТРОЛУ****5.1 Вивчення впливу фізичних навантажень і подальше застосування
кандесартану цилексетилу і ресвератролу на число клітин з CD117+ в
кістковому мозку і в крові мишей лінії Balb/C**

У літературі описані результати, які свідчать про те, що застосування досліджуваних речовин призводить до активації проліферативних процесів, процесів ангиогенезу, збільшення числа клітин з фенотипом CD117+ в крові і серці у тварин [9, 153, 229].

Є дані про те, що фізичні навантаження у тварин призводять до збільшення кількості ЕПК, що циркулюють в крові [242]. При вивченні зміни рівня ЕПК у людей, які мають ССЗ, при фізичних навантаженнях було виявлено, що останні призводять до значного збільшення числа цих клітин в крові [243]. Однак рядом авторів було показано, що фізичні навантаження не призводять до збільшення частки ЕПК у людей [244].

В ході проведення цього дослідження були вивчені зміни кількості клітин з фенотипом CD117+ в кістковому мозку і в крові мишей лінії Balb/C після тривалих фізичних навантажень (плавання з 2-х процентним вантажем від маси тіла протягом 2 місяців), а також подальшого використання кандесартану цилексетилу і ресвератролу в різних дозах. Отримані результати представлені в таблиці 5.1.

Показано, що довготривалі фізичні навантаження (плавання з 2-х процентним вантажем від маси тіла протягом 2 місяців) не впливають на зміну числа клітин з поверхневим маркером CD117.

Встановлено, що введення кандесартану цилексети́лу у дозі 3 мг/кг після циклу фізичних навантажень (група 1) призводить до достовірного збільшення кількості клітин з фенотипом CD117+ в кістковому мозку і в крові порівнянно з контрольними групами тварин. Використання кандесартану цилексети́лу в дозі 1,5 мг/кг після тривалих фізичних навантажень (група 2) не вплинуло на мобілізацію клітин попередників ендотелію в кістковому мозку і не спричинило достовірних змін досліджуваних показників в крові мишей лінії Valb/C (таблиця 5.1).

Використання кандесартану цилексети́лу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 10 мг/кг після циклу фізичних навантажень (група 3) призвело до збільшення числа клітин з CD117+ як в кістковому мозку, так і в крові тварин. Достовірні відмінності спостерігалися при порівнянні зі значеннями в контрольних групах 1 та 2, а також в групі 2, яким вводили кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг після тривалих фізичних навантажень.

Сумісне застосування кандесартану цилексети́лу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 30 мг/кг після циклу фізичних навантажень (група 4) також призвело до значного збільшення кількості ЕПК. Відзначено зміну кількості цих клітин в порівнянні з контрольними групами 1 і 2 та групою тварин, які отримували після тривалих фізичних навантажень лише кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг ($p < 0,05$). При використанні кандесартану цилексети́лу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 50 мг/кг (група 5) після циклу фізичних навантажень спостерігалося найбільше збільшення числа ЕПК (табл. 5.1). У кістковому мозку мишей кількість клітин з CD117+ достовірно відрізнялася в порівнянні з значеннями всіх груп тварин ($p < 0,05$), а в крові зміни були в порівнянні зі значеннями контрольних груп і групою 2 мишей ($p < 0,05$).

Вміст клітин з фенотипом CD117+ в кістковому мозку і в крові мишей лінії Valb/C після фізичних навантажень і подальшого введення кандесартану цилексетилу і ресвератролу

Група	Вміст клітин CD117+ в кістковому мозку, %	Вміст клітин CD117+ в крові, %
1. Контрольна група 1 (інтактна)	11,63±0,55	6,34±1,37
2. Контрольна група 2 (ФН)	12,41±0,94	7,93±0,99
3. Група 1 (ФН, кандесартан 3 мг/кг)	17,47±1,7	14,74±1,16
4. Група 2 (ФН, кандесартан 1,5 мг/кг)	11,03±0,8	9,43±1,28
5. Група 3 (ФН, кандесартан 1,5 мг/кг і ресвератрол 10 мг/кг)	19,08±1,74	17,40±2,13
6. Група 4 (ФН, кандесартан 1,5 мг/кг і ресвератрол 30 мг/кг)	19,32±2,12	19,6±2,80
7. Група 5 (ФН, кандесартан 1,5 мг/кг і ресвератрол 50 мг/кг)	26,98±1,29	25,55±5,14
	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{1-5} < 0,05$ $p_{1-6} < 0,05$ $p_{1-7} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{2-5} < 0,05$ $p_{2-6} < 0,05$ $p_{2-7} < 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$ $p_{3-7} < 0,05$ $p_{4-5} < 0,05$ $p_{4-6} < 0,05$ $p_{4-7} < 0,05$ $p_{5-7} < 0,05$ $p_{6-7} < 0,05$	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{1-5} < 0,05$ $p_{1-6} < 0,05$ $p_{1-7} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{2-5} < 0,05$ $p_{2-6} < 0,05$ $p_{2-7} < 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$ $p_{4-5} < 0,05$ $p_{4-6} < 0,05$ $p_{4-7} < 0,05$

Примітка:

1. ФН – фізичні навантаження;
2. кандесартан – кандесартану цилексетил.

Таким чином, виявлено, що фізичні навантаження (плавання з 2-х відсотковим вантажем від маси тіла протягом 2 місяців) не мають впливу на зміну

числа клітин з фенотипом CD117+. Вперше встановлено, що кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг після тривалих фізичних навантажень сприяє збільшенню кількості ЕПК в крові мишей лінії Balb/C. Вперше показано, що застосування кандесартану цилексетилу у дозі 3 мг/кг після тривалих фізичних навантажень збільшує число клітин з CD117+ в кістковому мозку і в крові мишей лінії Balb/C. Вперше встановлено, що використання кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозах 10 мг/кг, 30 мг/кг чи 50 мг/кг після циклу фізичних навантажень також призводить до значного збільшення числа клітин з CD117+ в кістковому мозку і в крові тварин. Найбільше збільшення досліджуваного показника було у мишей лінії Balb/C, які отримували після тривалих фізичних навантажень кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг і ресвератрол в дозі 50 мг/кг.

5.2 Вивчення впливу фізичних навантажень і подальшого застосування кандесартану цилексетилу і ресвератролу на цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики кісткового мозку мишей лінії Balb/C

Ряд авторів показали, що фізичні навантаження сприяють посиленню процесів проліферації в органах і тканинах тварин [245 – 247]. Для кандесартану цилексетилу властивими є як інгібування проліферативних процесів і збільшення частки клітин з ознаками пошкодження генетичного матеріалу, так і активація проліферації [158, 231, 232]. У літературі існують дані про те, що ресвератрол попереджає ендотеліальну дисфункцію, в кістковому мозку знижує число апоптичних клітин [234 – 236].

В ході проведення роботи були визначені основні цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики кісткового мозку мишей лінії Balb/C (число клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами, розподіл клітин за стадіями клітинного циклу (кількість клітин, що знаходяться в G₀/G₁, S, G₂/M фазах клітинного циклу)) при фізичних навантаженнях і при подальшому прийомі кандесартану цилексетилу і ресвератролу в різних дозуваннях і комбінаціях. Отримані результати представлені на рисунках 5.1, 5.2 и 5.3.

Зміни в кількості клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами у мишей контрольної групи 1 у порівнянні з тваринами контрольної групи відзначено не було. Виявлено зміну розподілу клітин за фазами клітинного циклу в кістковому мозку контрольної групи 1 мишей, що проявлялося в зниженні числа клітин в G_0/G_1 фазах і збільшенні кількості клітин на S стадії порівнянно з контролем ($p < 0,05$). Кількість клітин в G_2/M фазах клітинного циклу контрольної групи 1 відповідало значенню контрольної групи. Було показано, що у групи тварин, що піддавалися інтенсивним фізичним навантаженням (контрольна група 2) без подальшого застосування досліджуваних речовин, відбувалося збільшення числа апоптотичних клітин порівнянно з контрольною групою ($p < 0,05$), і контрольною групою 1 (достовірно значущих відмінностей виявлено не було). Кількість клітин з мікроядрами не відрізнялося достовірно від значень цього параметра в контрольній групі і в контролі 1 (рис. 5.1, 5.2 і 5.3).

В ході проведеного аналізу відзначено перерозподіл клітин за фазами клітинного циклу у мишей контрольної групи 2 (відмінності достовірні в порівнянні з контролем ($p < 0,05$)). Таким чином, виявлено накопичення клітин в S і G_2/M фазах і зниження числа останніх на G_0/G_1 стадіях клітинного циклу (рис. 5.3).

Встановлено, що значення кількості клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами в досліджуваних групах 1 – 5 тварин значно відрізнялися від контрольної групи, результати дослідження якої були отримані на початку проведення експериментальної роботи ($p < 0,05$). Крім того, спостерігалось достовірне зменшення кількості клітин в G_0/G_1 фазах клітинного циклу у мишей груп 1, 2, 3, 5, а також збільшення числа клітин в S фазі у тварин груп 1 – 3 і 5 ($p < 0,05$) (рис. 5.1 – 5.3).

При порівнянні кількості апоптичних клітин і клітин з мікроядрами в зразках контрольної групи 1 і експериментальних груп тварин було виявлено значне збільшення цих показників у мишей груп 1 – 5 ($p < 0,05$). Параметри клітинного циклу не відрізнялися у дослідних тварин порівняно з показниками в контрольній групі 1 (рис. 5.1 – 5.3).

Значні зміни кількості клітин з ознаками апоптозу порівнянно з контрольною групою 2 були відзначені в групах 4 і 5. У мишей груп 1 – 5 число клітин з мікроядрами були вищими порівнянно з контрольною групою 2 ($p < 0,05$). Число подій, що спостерігаються в G2/M фазах клітинного циклу, було менше у мишей, які отримували кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг після тривалих фізичних навантажень (група 2), порівнянно з контрольною групою 2 (рис. 5.1 – 5.3).

Таким чином, встановлено, що інтенсивні фізичні навантаження призводять до збільшення кількості апоптичних клітин в кістковому мозку. Також в ході виконання цього експерименту було вперше виявлено, що введення кандесартану цилексетилу після тривалих фізичних навантажень призводить до додаткового збільшення в кістковому мозку кількості апоптичних клітин (порівнянно з контролем і контролем 1) і клітин з мікроядрами (порівнянно з усіма контрольними групами). Тривале введення кандесартану цилексетилу призводить до селекційних процесів в гетерогенних клітинних популяціях кісткового мозку, які виражаються в накопиченні клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами, що характеризують наявність пошкоджень ДНК.

Вперше показано, що комплексне використання кандесартану цилексетилу, у поєднанні з ресвератролом після циклу фізичних навантажень збільшує рівень апоптичних клітин і клітин з мікроядрами в кістковому мозку мишей лінії Balb/C. Можливо, посилення процесу клітинної загибелі в кістковому мозку можна розцінити як прояв протекторних властивостей ресвератролу, які складаються з елімінації клітин з ушкодженнями ДНК, спричиненими фізичними навантаженнями і дією кандесартану цилексетилу.

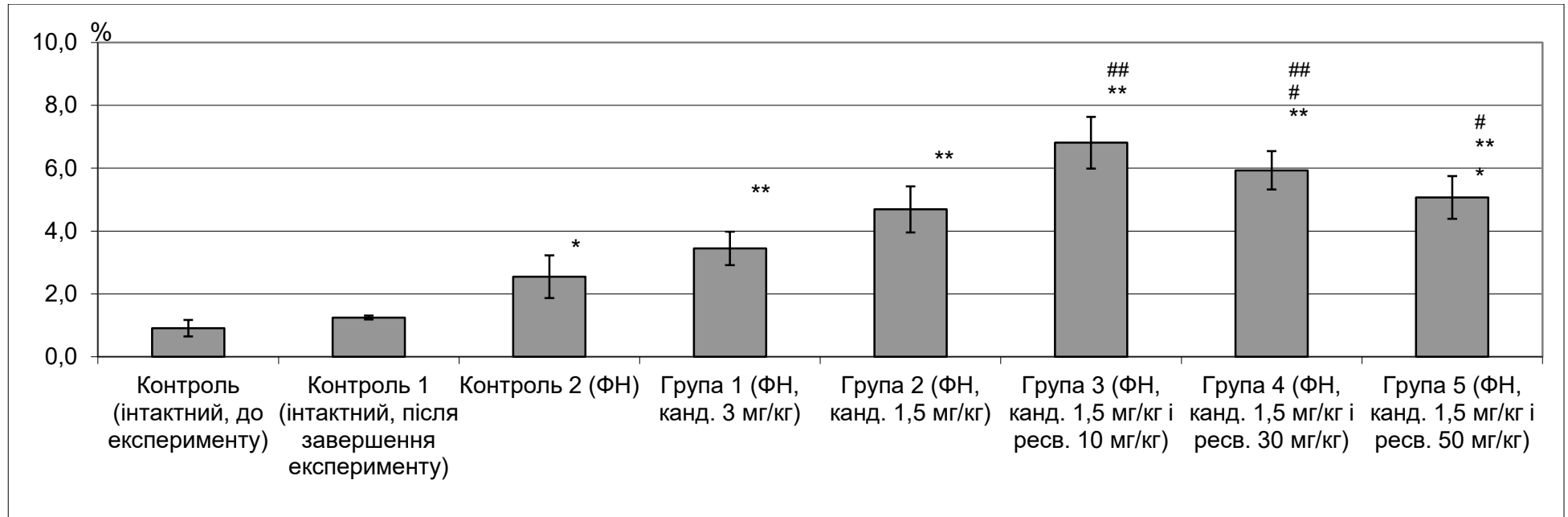


Рис. 5.1. – Вміст апоптичних клітин у кістковому мозку мишей лінії Balb/C після фізичних навантажень і подальшого введення кандесартану цилексетилу та ресвератролу.

Примітки:

1. канд. – кандесартану цилексетил;
2. ресв. – ресвератрол;
3. * – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками контролю (інтактні, до експеримента);
4. ** – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками контролю 1 (інтактні, після завершення експерименту);
5. # – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками контролю 2 (ФН);
6. ## – відмінності статистично достовірні порівнянно з показниками групи 1.

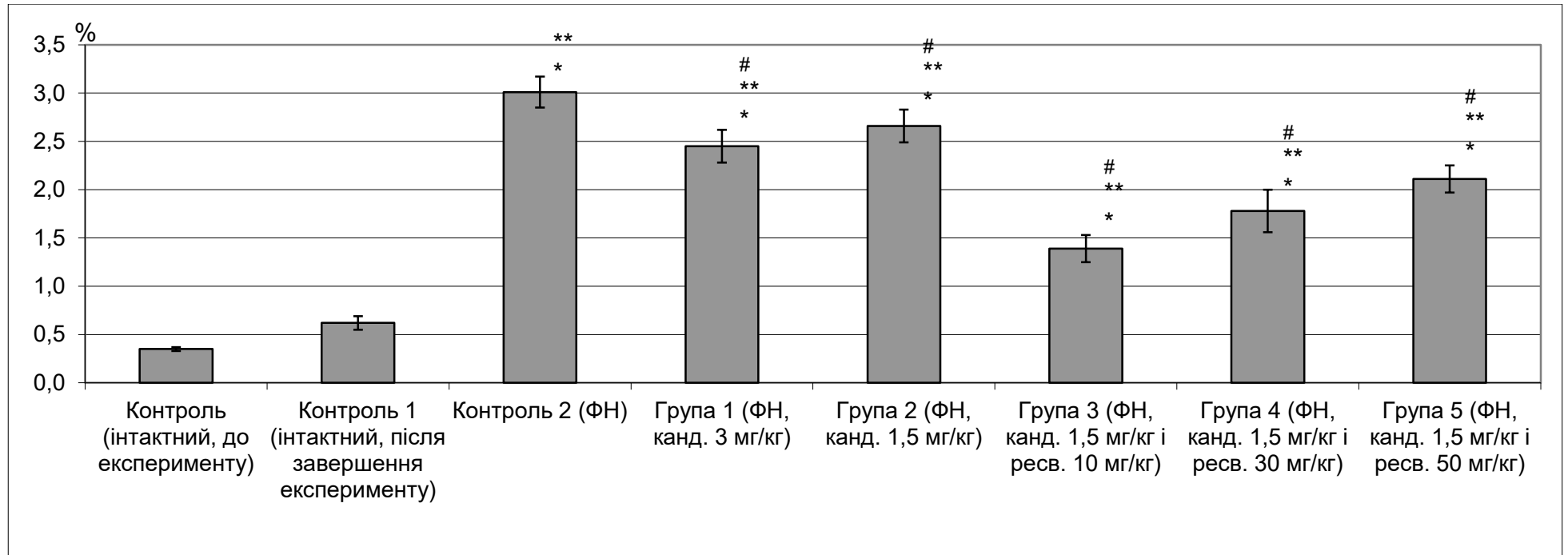


Рис. 5.2. – Вміст клітин з мікроядрами у кістковому мозку мишей лінії Valb/C після фізичних навантажень і подальшого введення кандесартану цилексетилу та ресвератролу.

Примітки:

1. канд. – кандесартану цилексетил;
2. ресв. – ресвератрол;
3. * – статистично достовірні порівнянню з показниками контролю (інтактні, до експерименту);
4. ** – статистично достовірні порівнянню з показниками контролю 1 (інтактні, після завершення експерименту);
5. # – статистично достовірні порівнянню з показниками контролю 2 (ФН).

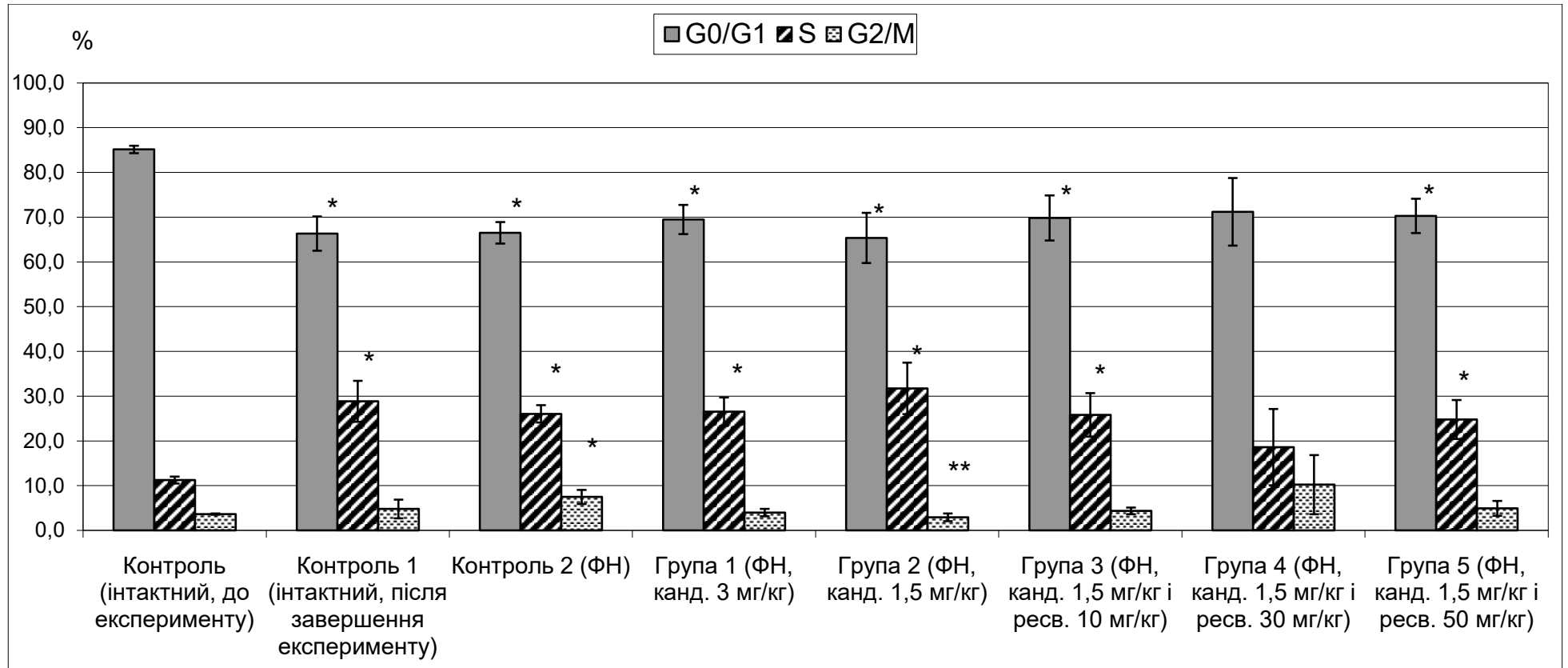


Рис. 5.3. – Розподіл клітин за фазами клітинного циклу в кістковому мозку мишей лінії Valb/C після фізичних навантажень і подальшого введення кандесартану цилексетилу та ресвератролу.

Примітки:

1. канд. – кандесартану цилексетил;
2. ресв. – ресвератрол;
3. * – статистично достовірні порівнянню з показниками контролю (інтактні, до експерименту);
4. ** – статистично достовірні порівнянню з показниками контролю 2 (ФН).

5.3 Вивчення впливу кандесартану цилексетилу і ресвератролу на цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики крові мишей лінії Balb/C при фізичних навантаженнях

Згідно з літературними даними фізичні навантаження активують проліферацію клітин у тварин [245 – 247]. Як було зазначено раніше, кандесартану цилексетил і природний антиоксидант ресвератрол впливають на проліферацію і процеси апоптозу клітин в тканинах і органах тварин [234 – 236].

При проведенні цього дослідження було вивчено вплив тривалих фізичних навантажень і подальшого введення мишам лінії Balb/C кандесартану цилексетилу і ресвератролу в різних дозуваннях і співвідношеннях на цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики крові тварин (рис. 5.4 – 5.6).

Встановлено, що у контрольної групи мишей рівень клітин з ознаками апоптозу і мікроядрами був нижчим у порівнянні зі значеннями контрольної групи 1 тварин ($p < 0,05$). Достовірно значущих відмінностей в розподілі клітин за фазами клітинного циклу контрольної групи і контрольної групи 1 виявлено не було (рис. 5.4 – 5.6).

Показано, що інтенсивні фізичні навантаження призводять до достовірного збільшення кількості клітин з ознаками апоптозу і мікроядрами порівнянно з показниками контрольної групи і контрольної групи 1 (рис. 5.4 і 5.5).

Також спостерігалось накопичення клітин в G_0/G_1 фазах клітинного циклу і зменшення числа клітин на S стадії ($p < 0,05$). Кількість клітин в G_2/M фазах достовірно не відрізнялися від значень контрольної групи і контрольної групи 1 (рис. 5.6).

Встановлено, що після циклу фізичних навантажень кандесартану цилексетил в дозі 3 мг/кг (група 1) призводить до достовірного зниження кількості клітин з ушкодженнями ДНК у порівнянні з контрольною групою 2 ($p < 0,05$) (рис. 5.4 і 5.5).

Число клітин в G_0/G_1 і S фазах клітинного циклу у мишей, які отримали після тривалих фізичних навантажень кандесартану цилексетил в дозі 3 мг/кг,

достовірно відрізнялися від показників контрольної групи 2 ($p < 0,05$). Число клітин в G_2/M фазах в групі 1 мишей достовірно не відрізнялися від контрольних показників (рис. 5.6).

При введенні мишам кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг після фізичних навантажень (група 2) значного зниження клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами порівнянно з аналогічними показниками тварин, які піддавалися фізичним навантаженням без подальшого застосування речовин, відзначено не було. Число клітин в G_0/G_1 і S фазах значно відрізняються від значень у тварин контрольної групи 2, які піддавалися фізичним навантаженням: виявлено перерозподіл клітин за стадіями клітинного циклу ($p < 0,05$). Кількість клітин в G_2/M фазах в групі 2 не змінилося у порівнянні зі значеннями цього показника в інших групах тварин (рис. 5.4 – 5.6).

При введенні мишам кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 10 мг/кг після тривалих фізичних навантажень (група 3) число апоптичних клітин було значно нижчим за показники у тварин контрольної групи 2, а також груп 1 і 2 ($p < 0,05$) та відповідало значенню параметрів мишей контролю 1. Також виявлено зниження вмісту клітин з мікроядрами у тварин, які отримували кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг і ресвератрол в дозі 10 мг/кг (група 3) після фізичних навантажень порівнянно з контрольною групою 2 і групами 1 і 2 мишей ($p < 0,05$) (рис. 5.4 і 5.5).

Встановлено зменшення числа клітин в G_0/G_1 фазах і збільшення їх кількості в S фазі клітинного циклу у групи 3, яка отримувала кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг і ресвератрол в дозі 10 мг/кг після фізичних навантажень порівнянно з тваринами контрольної групи 2 ($p < 0,05$). Кількість клітин на G_2/M стадіях достовірно не змінилося у мишей групи 3 (рис. 5.6).

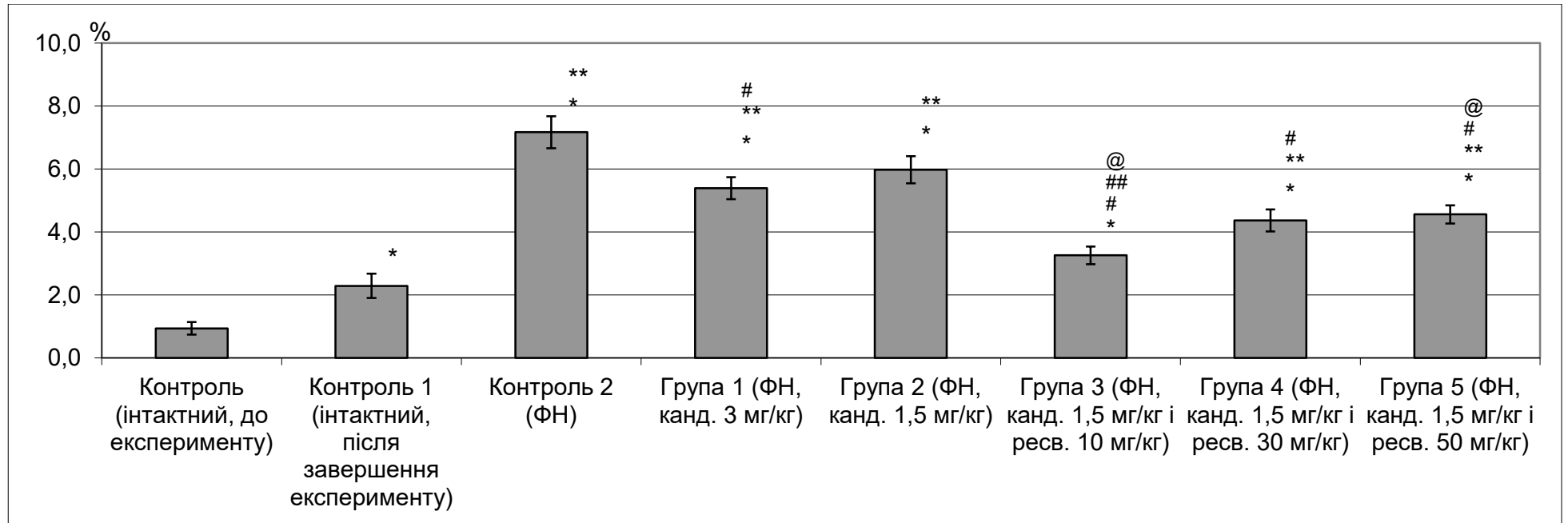


Рис. 5.4. – Вміст апоптичних клітин у крові мишей лінії Balb/C після фізичних навантажень і подальшого введення кандесартану цилексетилу та ресвератролу.

Примітки:

1. канд. – кандесартану цилексетил;

2. ресв. – ресвератрол;

3. * – статистично достовірно порівнянно з показниками контролю (інтактний, до експерименту);

4. ** – статистично достовірно порівнянно з показниками контролю 1 (інтактний, після завершення експерименту);

5. # – статистично достовірно порівнянно з показниками контролю 2 (ФН);

6. ## – статистично достовірно порівнянно з показниками групи 1;
7. @ – статистично достовірно порівнянно з показниками групи 2.

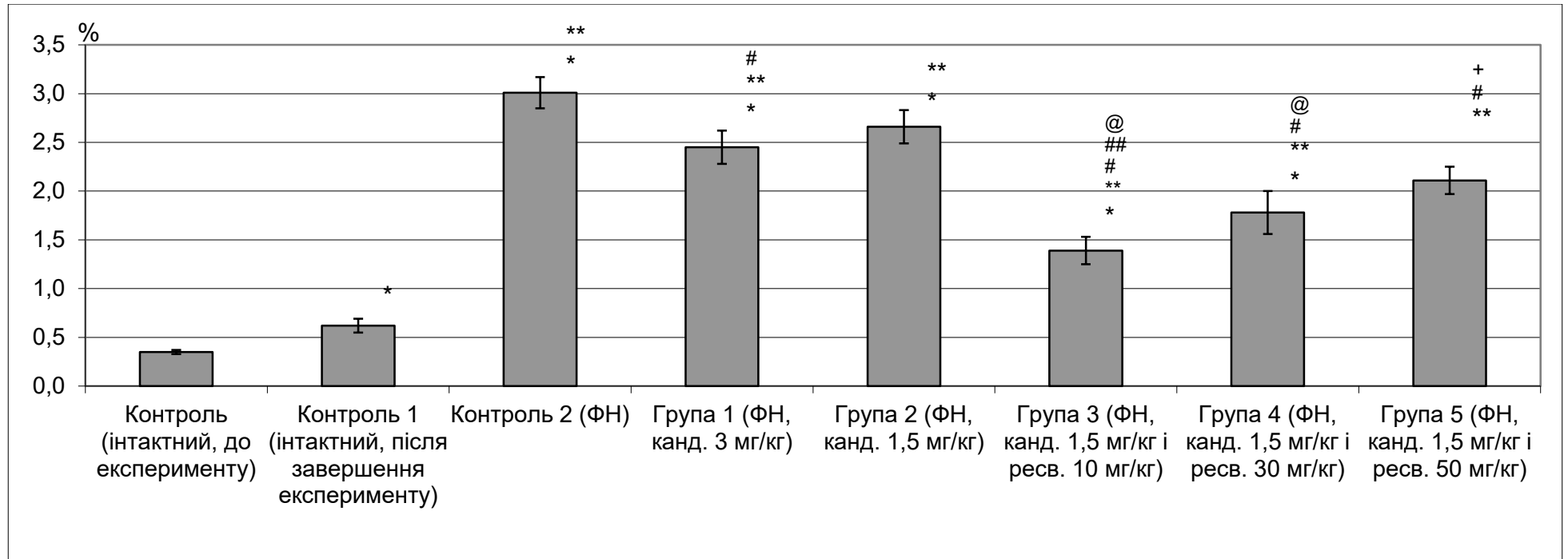


Рис. 5.5. – Вміст клітин з мікроядрами у крові мишей лінії Valb/C після фізичних навантажень і подальшого введення кандесартану цилексетилу та ресвератролу.

Примітки:

1. канд. – кандесартану цилексетил;
2. ресв. – ресвератрол;
3. * – статистично достовірно порівнянно з показниками контролю (інтактні, до експерименту);
4. ** – статистично достовірно порівнянно з показниками контролю 1 (інтактні, після завершення експерименту);
5. # – статистично достовірно порівнянно з показниками контролю 2 (ФН);
6. ## – статистично достовірно порівнянно з показниками групи 1;

7. @ – статистично достовірно порівнянно з показниками групи 2;
+ – статистично достовірні в порівнянні з показниками групи 3.

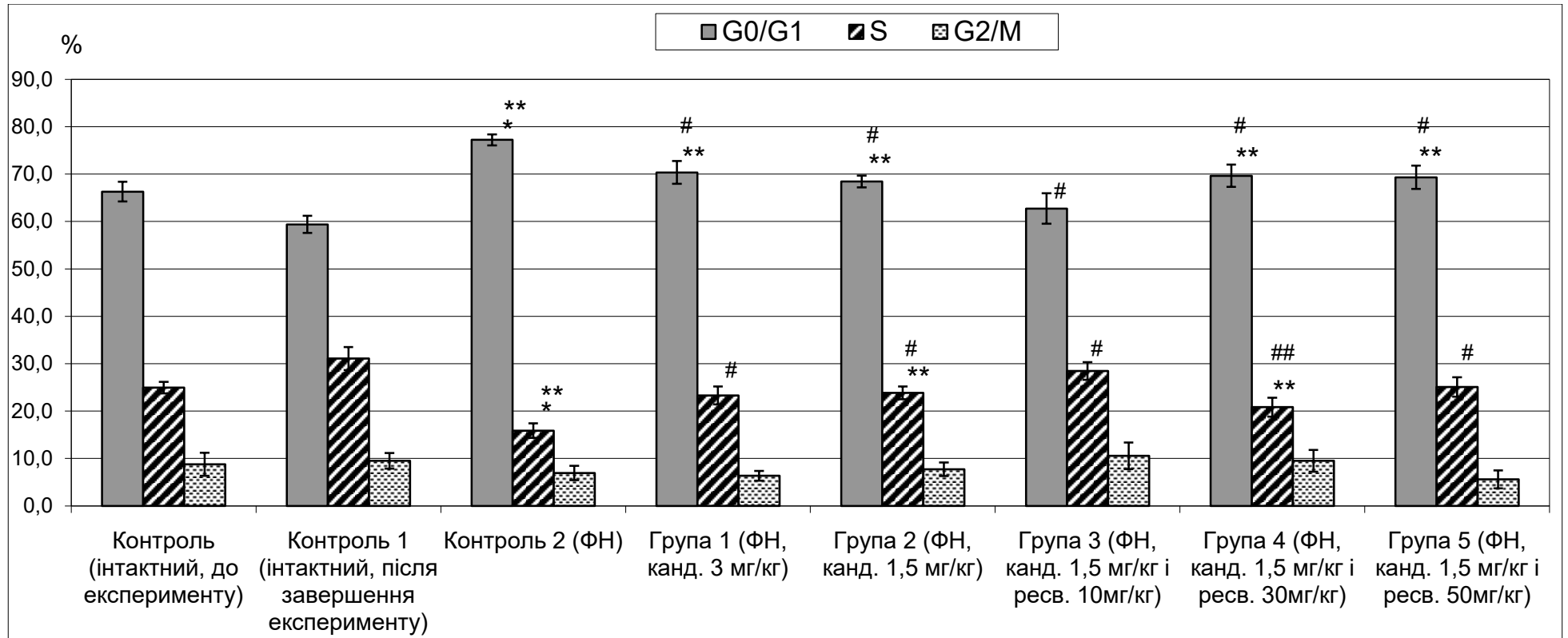


Рис. 5.6. – Розподіл клітин за фазами клітинного циклу в крові мишей лінії Balb/C після фізичних навантажень і подальшого введення кандесартану цилексетилу та ресвератролу.

Примітки:

1. канд. – кандесартану цилексетил;
2. ресв. – ресвератрол;
3. * – статистично достовірно порівнянно з показниками контролю (інтактні, до експерименту);
4. ** – статистично достовірно порівнянно з показниками контролю 1 (інтактні, після завершення експерименту);

5. # – статистично достовірно порівнянно з показниками контролю 2 (ФН);
6. ## – статистично достовірно порівнянно з показниками групи 3.

При спільному використанні кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 30 мг/кг після тривалих фізичних навантажень (група 4) також спостерігалось зниження числа клітин з ознаками апоптозу в порівнянні з таким же показником у тварин контрольної групи 2 ($p < 0,05$). Кількість клітин з мікроядрами були нижчою порівнянно з контролем 2 і групою 2, що одержувала кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг після фізичних навантажень ($p < 0,05$) (рис. 5.4 і 5.5).

Число клітин в G_0/G_1 фазах клітинного циклу у тварин групи 4 були нижчою порівнянно з контрольною групою 2 мишей ($p < 0,05$) (рис. 5.6).

При введенні тваринам кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг з ресвератролом в дозі 50 мг/кг після тривалих фізичних навантажень (група 5) відбувається значне зниження числа клітин з ознаками апоптозу порівнянно з контролем 2 і групою 2 ($p < 0,05$). Також виявлено зменшення кількості клітин з мікроядрами порівнянно з контролем 2 ($p < 0,05$) (рис. 5.4 і 5.5).

При використанні кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 50 мг/кг після фізичних навантажень (група 5) число клітин в G_0/G_1 і S фазах клітинного циклу відрізнялося від контрольної групи 2 мишей ($p < 0,05$). Достовірно змін кількості клітин на G_2/M стадіях у групи 5 мишей порівнянно з іншими групами тварин виявлено не було (рис. 5.6).

Таким чином, встановлено, що інтенсивні фізичні навантаження ведуть до пригнічення процесів проліферації і накопичення клітин з ушкодженнями ДНК в крові. Введення кандесартану цилексетилу і ресвератролу після фізичних навантажень відновлює досліджувані параметри.

Виявлено значне збільшення кількості клітин в S фазі клітинного циклу у всіх групах мишей, які отримували досліджувані речовини (крім тих, яким давали кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг і ресвератрол в дозі 30 мг/кг) порівнянно з тваринами, які піддавалися фізичним навантаженням без подальшого введення речовин.

Вперше встановлено, що при сумісному введенні мишам досліджуваних речовин після фізичних навантажень відбувається достовірне зниження числа

клітин з ушкодженнями ДНК порівнянно з тваринами, яким не вводили досліджувані речовини. Вперше показано, що кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг і ресвератрол в дозі 10 мг/кг після фізичних навантажень знижують кількість клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами порівнянно з введенням тільки кандесартану в дозах 3 мг/кг або 1, 5 мг/кг ($p < 0,05$). Вперше виявлено, що кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг і ресвератрол в дозі 30 мг/кг після тривалих фізичних навантажень зменшують число клітин з мікроядрами порівнянно з використанням кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг. Необхідно відзначити, що мікроядра в цьому випадку мають природні апоптичні походження.

Також при сумісному використанні кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозах 10 мг/кг, 30 мг/кг і 50 мг/кг після фізичних навантажень вперше відзначена здатність ресвератролу нівелювати негативні впливи фізичних навантажень на цитогенетичні показники і параметри клітинної кінетики крові мишей лінії Balb/C.

5.4 Вплив кандесартану цилексетилу і ресвератролу на зміну маси серця мишей лінії Balb/C при фізичних навантаженнях

З літературних джерел відомо, що фізичні навантаження призводять до розвитку гіпертрофії серцевого м'яза, порушення роботи серця у тварин [248]. Було встановлено, що інтенсивні фізичні навантаження призводять до порушень ритму серця у людей [249]. У ряді досліджень виявлено, що кандесартану цилексетил, а також природний антиоксидант ресвератрол сприяє поліпшенню роботи серцевого м'яза, затримує розвиток фіброзу і гіпертрофії серця у щурів з кардіоміопатією або ЦД [232, 233, 237, 238].

В цьому дослідженні надана оцінка ВКМ серця мишей лінії Balb/C, які піддавалися тривалим фізичним навантаженням (плавання з 2-х відсотковим вантажем від маси тіла протягом 2 місяців), оскільки зміна цього показника може вказувати на функціональний стан органу, а також на віддалені патологічні процеси ССС, викликані фізичними навантаженнями. Проведено аналіз впливу

тривалих фізичних навантажень і подальшого використання кандесартану цилексетилу і ресвератролу в різних дозах і співвідношеннях на зміну значень ВКМ серця тварин. Отримані в ході експерименту результати представлені в таблиці 5.2.

Таблиця 5.2.

ВКМ серця мишей лінії Balb/C, які піддавалися фізичним навантаженням і отримували в подальшому кандесартану цилексетил та ресвератрол

Групи	m тіла (г)	m серця (г)	ВКМ серця
1. Контрольна група (до експерименту)	25,62±0,50	0,17±0,01	6,66±0,33
2. Контрольна група 1 (інтактна)	30,68±1,08	1,20±0,01	6,50±0,18
3. Контрольна група 2 (ФН)	27,80±1,05	0,20±0,02	7,16±0,46
4. Група 1 (ФН, кандесартан 3 мг/кг)	30,61±0,97	0,20±0,01	6,42±0,29
5. Група 2 (ФН, кандесартан 1,5 мг/кг)	28,47±0,42	0,24±0,04	8,45±1,26
6. Група 3 (ФН, кандесартан 1,5 мг/кг і ресвератрол 10 мг/кг)	29,97±0,68	0,21±0,01	7,09±0,49
7. Група 4 (ФН, кандесартан 1,5 мг/кг і ресвератрол 30 мг/кг)	27,51±0,34	0,21±0,01	7,62±0,42
8. Група 5 (ФН, кандесартан 1,5 мг/кг і ресвератрол 50 мг/кг)	30,26±0,87	0,24±0,01	8,04±0,37
			$p_{1-8} < 0,05$ $p_{2-8} < 0,05$ $p_{4-7} < 0,05$ $p_{4-8} < 0,05$

Примітки:

1. ФН – фізичні навантаження;
2. кандесартан – кандесартану цилексетил;
3. m – маса;
4. проведений додатковий експеримент по вивченню впливу фізичних навантажень на ВКМ серця мишей лінії Balb/C показав, що тривалі фізичні навантаження (плавання на витривалість з 2% вантажем від маси тіла протягом 2 місяців) призводять до суттєвого збільшення ВКМ серця тварин, оскільки у 5 мишей з 10 відзначалося збільшення досліджуваного

параметра більш ніж у 2 рази (аналіз ВКМ серця проводився відразу після фізичних навантажень).

Було встановлено достовірне збільшення значення ВКМ серця мишей групи^о5, які після фізичних навантажень отримували кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 50 мг/кг, порівнянно з значеннями ВКМ серця мишей контрольної групи та контрольної групи 1. ВКМ серця тварин групи 5 склав $8,04 \pm 0,37$, тоді як в контрольній групі цей показник був $6,66 \pm 0,33$, а в контрольній групі 1 – $6,50 \pm 0,18$ ($p < 0,05$).

Встановлено достовірні відмінності маси серця тварин, які отримували кандесартану цилексетил в дозі 3 мг/кг після фізичних навантажень (група 1), і мишей, яким вводили кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг з ресвератролом в дозах 30 мг/кг і 50 мг/кг після тривалих фізичних навантажень (групи 4 і 5). В експериментальних тварин, яким давали тільки кандесартану цилексетил в дозі 3 мг/кг, ВКМ дорівнював $6,42 \pm 0,29$, що значно менше порівнянно з групами тварин, які отримували комбінації речовин (таблиця 5.2).

В зв'язку з даними, отриманими при дослідженні ВКМ серця мишей лінії C57Bl/6 (глава 4) і мишей лінії Balb/C можна зробити висновок, що основні зміни значення ВКМ серця тварин лежать тривалі фізичні навантаження [248, 249].

Результати досліджень, представлені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. Beliaeva A. Impact of an angiotensin II receptor antagonist and antioxidant on count of stem cells and on morphofunctional parameters in animals. *Fundamental and applied researches in practice of leading scientific schools.* 2020;41(5):100-5. doi: 10.33531/farplss.2020.5.18.

Висновки до розділу 5

- Виявлено, що тривалі та інтенсивні фізичні навантаження не впливають на кількість клітин з фенотипом CD117⁺ в кістковому мозку і в крові

мишей лінії Valb/C. Вперше встановлено, що тривале використання кандесартану цилексетилу у дозі 3 мг/кг, а також кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг, у поєднанні з ресвератролом в дозах 10 мг/кг, 30 мг/кг і 50 мг/кг, що вводяться інтрагастрально після завершення фізичних навантажень, призводить до мобілізації клітин з фенотипом CD117+ в кістковому мозку і збільшення їх кількості в крові тварин, у порівнянні з ефектами, що спостерігаються при застосуванні моноречовини кандесартану цилексетил в дозі 3 мг/кг. Таким чином, використання кандесартану цилексетилу з ресвератролом є більш безпечним для клітин, оскільки дозволяє вдвічі знизити дозу першого без втрати ефекту.

- Встановлено, що тривалі та інтенсивні фізичні навантаження впливають на показники клітинної кінетики і цитогенетичні параметри кісткового мозку та більшою мірою крові мишей лінії Valb/C, про що свідчать збільшення кількості клітин з ознаками апоптозу (кістковий мозок і кров), збільшення числа клітин з мікроядрами і кількості клітин в G_0/G_1 фазах, а також зниження кількості клітин в S фазі клітинного циклу (кров).

- Кандесартану цилексетил як моноречовина і його комбінація з ресвератролом, що вводяться тваринам інтрагастрально після завершення фізичних навантажень, збільшують кількість клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами в кістковому мозку, що, можливо, є наслідком адаптивних процесів.

- Кандесартану цилексетил як моноречовина в дозах 1,5 мг/кг і 3 мг/кг частково нівелює негативний ефект фізичних навантажень на ряд показників клітинної кінетики і цитогенетичних параметрів крові, наближаючи їх до значень, характерних для контрольної групи 1, за рахунок зниження кількості клітин з ознаками апоптозу і числа клітин в G_0/G_1 фазах, а також збільшення вмісту клітин в S фазі клітинного циклу. Сумісне використання кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозах 10 мг/кг, 30 мг/кг і 50 мг/кг значніше нівелює негативний ефект фізичних навантажень на ряд показників крові за рахунок більш вираженого зниження кількості клітин з ознаками апоптозу і мікроядрами.

РОЗДІЛ 6**ВИВЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ТОКСИЧНОСТІ КАНДЕСАРТАНУ
ЦИЛЕКСЕТИЛУ І РЕСВЕРАТРОЛУ**

При розробці та створенні лікарських засобів проводять дослідження як ефективності так і безпеки нових препаратів для тварин і людини [250].

В цій роботі на мишах ICR був проведений аналіз токсичності кандесартану цилексетилу і ресвератролу при сумісному використанні. Отримані в ході експерименту результати представлені на рис. 6.1 і 6.2.

Введення речовин, які досліджуються, тваринам не викликало загибель мишей, через що середня смертельна доза ЛД₅₀ не визначалась. Порушення поведінкової активності в контрольних і дослідних групах мишей протягом усього часу не виявлено. Видимих змін макроскопічної картини при патолого-анатомічному розтині не виявлено.

При дослідженні змін ВКМ внутрішніх органів (серця, селезінки, нирок, легенів, печінки і мозку) самців і самок мишей ICR достовірних відмінностей між контрольними і дослідними групами виявлено не було (рис. 6.1 і 6.2).

Таким чином, вперше встановлено, що досліджуваний комплекс речовин, до складу якого входять кандесартану цилексетил і природний антиоксидант ресвератрол, є нетоксичним.

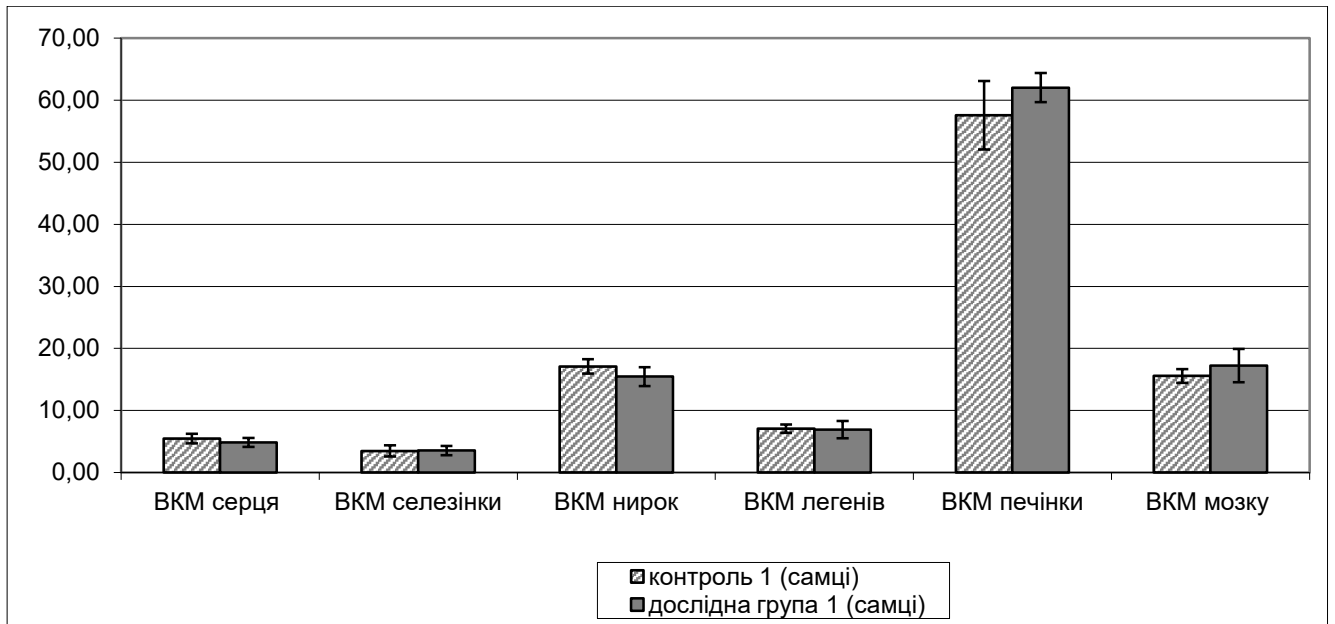


Рис. 6.1. – Результати дослідження токсичності кандесартану цилексетилу і ресвератролу на самцях мишах ICR.

Примітка: ВКМ – відносний коефіцієнт маси.

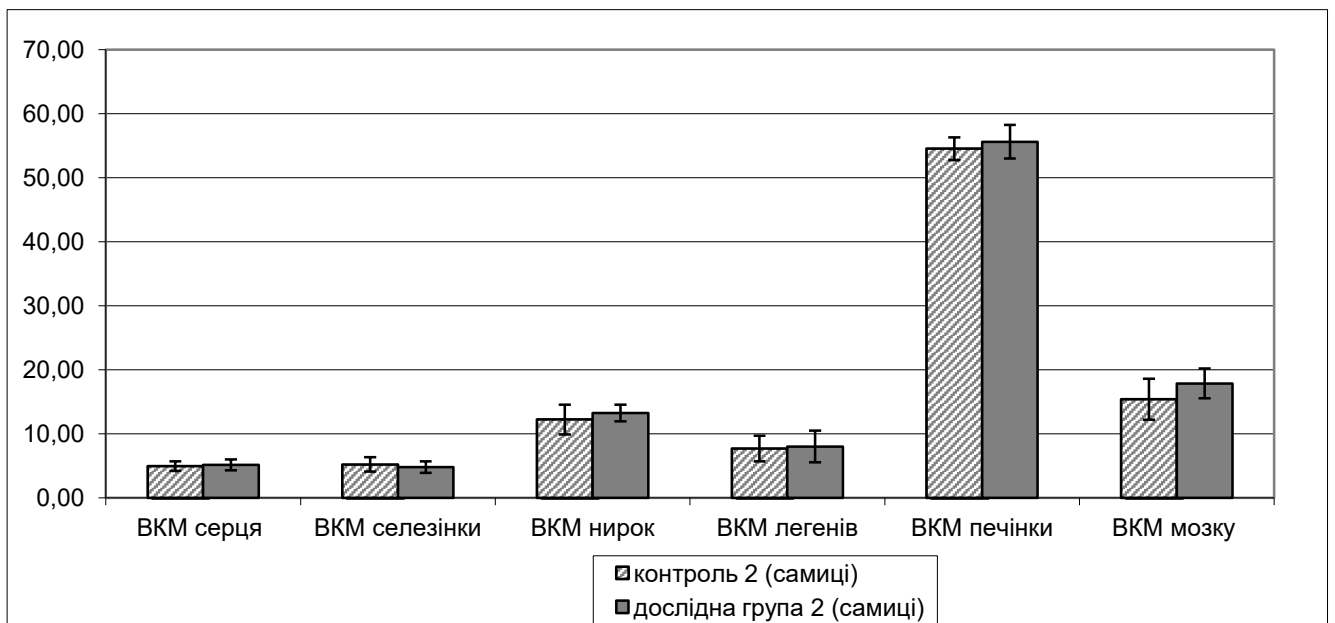


Рис. 6.2. – Результати дослідження токсичності кандесартану цилексетилу і ресвератролу на самках мишах ICR.

Примітка: ВКМ – відносний коефіцієнт маси.

Висновки до розділу 6

Вперше виявлено, що дія розробленого комплексу речовин в дозуваннях терапевтичного діапазону, до складу якого входять кандесартану цилексетил і ресвератрол, є нетоксичною та безпечною при застосуванні у експериментальних тварин.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Сьогодні серцево-судинні захворювання (ССЗ) є найбільш поширеними хворобами у всьому світі. ССЗ стали основною причиною передчасної смертності населення в багатьох країнах [1, 2]. У зв'язку з цим розробка нових ефективних і безпечних методів профілактики, діагностики та лікування даних захворювань, створення нових препаратів і їх комбінацій, а також дослідження наявних речовин за новим призначенням є актуальним. Останнім часом широко застосовуються клітинні технології для лікування різних захворювань, в тому числі і серцево-судинних. ЕПК є пул клітин, який диференціюється в клітини ендотелію судин, беручи участь таким чином в репаративних процесах. Ці клітини характеризуються експресією специфічних для клітин-попередників ендотелію поверхневих клітинних маркерів [17, 71].

При проведенні цієї роботи були вивчені ефекти кандесартану цилексетилу, кандесартану, ресвератролу в різних дозуваннях на стимуляцію утворення ендотеліальних прогеніторних клітин, на кількість клітин з ознаками апоптозу і мікроядрами, на розподіл клітин за фазами клітинного циклу в дослідженнях *in vitro* та *in vivo*.

В ході експериментів *in vitro* було виявлено, що кандесартану цилексетил в досліджуваних концентраціях 1,5 мкг/мл і 3 мкг/мл призводить до зменшення кількості клітин з фенотипом CD117⁺ в культурі кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6, а також відзначена тенденція до зниження числа клітин з маркерами CD117 і CD117/CD34 в культурі жирової тканини людини. Застосування кандесартану цилексетилу в концентрації 3 мкг/мл призводило до збільшення вмісту апоптичних клітин в культурі жирової тканини людини. Вперше встановлено, що кандесартан в концентраціях 1,5 мкг/мл і 3 мкг/мл призводить до збільшення вмісту клітин з фенотипом CD117⁺ в культурі кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 і в культурі жирової тканини людини. Застосування кандесартану в концентрації 3

мкг/мл стимулювало утворення клітин з фенотипом CD34+ в культурі жирової тканини людини. Однак дана речовина також призводить до збільшення кількості клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами в досліджуваних культурах. Показано, що кандесартан в концентраціях 1,5 мкг/мл і 3 мкг/мл знижує проліферативні процеси в культурі жирової тканини людини [257 – 262].

Виявлено, що використання ресвератролу в культурі кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 в концентраціях 30 мкг/мл і 50 мкг/мл призвело до збільшення кількості клітин з фенотипом CD117+. Ресвератрол в концентраціях 10 мкг/мл, 30 мкг/мл і 50 мкг/мл також збільшив частку клітин з маркером CD117 в культурі жирової тканини людини. Встановлено, що застосування ресвератролу в концентрації 50 мкг/мл призвело до збільшення вмісту клітин з фенотипом CD34+ в культурі жирової тканини людини. Також було показано, що дана речовина не є цитотоксичною *in vitro* [257 – 262].

Надалі було вивчено дію кандесартану цилексетилу у поєднанні з ресвератролом і кандесартану у поєднанні з ресвератролом на зміну вмісту ЕПК, апоптичних клітин, клітин з мікроядрами і на зміну проліферативних процесів в культурах кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 і жирової тканини людини. Вперше виявлено, що кандесартану цилексетил в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератрол в концентрації 30 мкг/мл і концентрації 50 мкг/мл призводять до збільшення вмісту клітин з маркером CD117 в обох культурах. Ця комбінація була також ефективна щодо стимуляції проліферації клітин в культурі жирової тканини людини [257 – 262].

Вперше показано в культурах кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 і жирової тканини людини, що комбінація кандесартану в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератролу в концентраціях від 1 мкг/мл до 50 мкг/мл призводить до значного збільшення кількості клітин з CD117+. Встановлено, що кандесартан в концентрації 1,5 мкг/мл і ресвератрол в концентрації 50 мкг/мл

збільшує утворення клітин з маркером CD34+ в культурі жирової тканини людини [257 – 262].

У літературі існують дані, що кандесартан в концентраціях 0,1 мкг/мл, 1,0 мкг/мл і 10,0 мкг/мл *in vitro* призводить до стимуляції експресії VEGF-A і VEGF-B, підсилює процеси ангіогенезу, проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин мозку [152, 153].

Деякими авторами було показано, що ресвератрол підсилює процеси реендотелізації, впливає на процеси «хоумінга» ЕПК. При використанні ресвератролу в концентраціях 5 – 20 μM (тобто від 1,15 мкг/мл до 4,60 мкг/мл) кількість клітин не змінюється. Ресвератрол в концентрації 100 μM (тобто 23,00 мкг/мл) знижує вміст апоптичних клітин, а також цитотоксичність. Встановлено, що ресвератрол в концентрації 20 μM (тобто 4,60 мкг/мл) здатний індукувати утворення ендотеліальних маркерів клітин. При цьому ресвератрол не має суттєвого впливу на процеси проліферації і апоптозу клітин [185]. Існують дослідження дії ресвератролу в діапазоні концентрацій від 1 μM до 50 μM (тобто 0,23 мкг/мл – 11,50 мкг/мл, відповідно), в яких показано, що ця речовина стимулює проліферацію та міграцію ЕПК і є безпечною [185, 222 – 225]. Однак існують дані, що ресвератрол в концентрації 50 μM (тобто 11,50 мкг/мл) має цитотоксичний ефект на ЕПК крові людини *in vitro* [226].

Результати проведених досліджень *in vitro* дозволили відібрати маркер CD117 як ефективний маркер для реєстрації прямої мобілізації ЕПК і використовувати його для подальших експериментів *in vivo*. Також отримані результати стали основою для проведення досліджень з оцінки впливу досліджуваних речовин на зміну числа клітин-попередників ендотелію, вмісту клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами, розподілу клітин за фазами клітинного циклу в кістковому мозку і в крові тварин.

В ході подальших досліджень на мишах лінії C57Bl/6 вперше встановлено, що кандесартану цилексетил в дозі 3 мг/кг збільшує число клітин CD117+ в кістковому мозку. Кандесартану цилексетил в дозах 1,5

мг/кг і 3 мг/кг значно посилив іммобілізацію ЕПК в крові тварин. Однак виявлено, що в досліджуваних дозах кандесартану цилексетил має цитотоксичну дію, що проявляється стимуляцією апоптозу і накопиченні клітин з мікроядрами в кістковому мозку мишей [263 – 267].

При дослідженні дії ресвератролу, було вперше показано, що в дозах 10 мг/кг і 30 мг/кг ця речовина призводить до стимуляції утворення клітин з фенотипом CD117+ в кістковому мозку і в крові мишей лінії C57Bl/6 після тривалого введення. Суттєве збільшення ЕПК було зафіксовано при використанні ресвератролу в дозі 50 мг/кг. Вивчення цитогенетичних показників і параметрів клітинної кінетики кісткового мозку і крові тварин дозволило встановити, що ресвератрол не має цитотоксичного ефекту [268].

Вивчення комбінації двох речовин дозволило вперше встановити, що кандесартану цилексетил в дозі 1,5 мг/кг і ресвератрол в дозі 1 мг/кг призводить до збільшення вмісту клітин з фенотипом CD117+ в крові мишей лінії C57Bl/6. Комбінація кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозах 10 мг/кг і 50 мг/кг збільшила частку зазначених клітин в кістковому мозку і в крові мишей. Показано, що при сумісному використанні кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг, та ресвератролу в дозах 10 мг/кг і 50 мг/кг ефективність стимуляції утворення клітин з маркером CD117 в крові значно вище в порівнянні з застосуванням кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг. Рівень стимуляції утворення клітин з CD117+ в кістковому мозку і в крові був подібний з дією кандесартану цилексетилу у дозі 3 мг/кг. Також було вперше встановлено, що ресвератрол в дозах 1 мг/кг і 10 мг/кг нівелює цитотоксичний ефект кандесартану цилексетилу в кістковому мозку або підсилює цей ефект в крові, що виражається у відповідній зміні вмісту клітин з ознаками ушкодження генетичного матеріалу. Даний факт дозволяє говорити про вплив ресвератролу на віддалену клітинну загибель в крові [263 – 267].

Сьогодні є відомості, що використання кандесартану цилексетилу збільшує вміст клітин з маркером CD117 в серці щурів лінії SHR-SP [9]. Ця

речовина призводить до активації проангіогенного потенціалу клітин, отриманих із спинномозкової рідини щурів лінії Wistar, на що вказує підсилення експресії VEGF-A і VEGF-B [153].

Існує інформація, що ресвератрол в дозі 2,5 мг/кг посилює процеси проліферації клітин з фенотипом CD117+, підвищує їх здатність до виживання, сприяє регенерації серця після ІМ у щурів [229]. Ресвератрол в дозі 10 мг/кг збільшує частку ЕПК в крові, тоді як в дозі 50 мг/кг не впливає на проліферацію та міграцію ЕПК [187].

Результати, отримані на щурах Wistar, у яких індукували розвиток ЦД 1 типу показали, що тривале застосування ресвератролу в дозі 2,5 мг/кг суттєво зменшує загибель ЕПК, зменшує ремоделювання серцевого м'яза [183]. Також рядом дослідників було виявлено, що застосування даної речовини в дозі 10 мг/кг посилює процеси реендотелізації і зменшує утворення фіброзної тканини, тоді як доза 50 мг/кг зменшує ймовірність утворення фіброзної тканини, проте менш ефективна в порівнянні з дозою 10 мг/кг [225].

У літературі існують дані, що кандесартану цилексетил в дозах 0,015 мг/кг і 0,030 мг/кг призводить до збільшення частки апоптотичних клітин серед міоцитів у щурів [231]. Ряд дослідників показали, що застосування кандесартану цилексетилу пригнічує утворення окремих субпопуляцій клітин в кістковому мозку у щурів [158]. Ці дані підтверджують результати, отримані в ході проведення нашої дисертаційної роботи. Також відомо, що кандесартану цилексетил знижує число апоптотичних клітин і зменшує фіброз серця [232, 233]. У літературі є дані, що ресвератрол перешкоджає розвитку ендотеліальної дисфункції, а також знижує ймовірність виникнення апоптозу [183, 234, 235, 236].

При дослідженні впливу обраних речовин на рухову активність мишей лінії C57Bl/6, було виявлено, що синтетичний кандесартану цилексетил призводить до зниження рухової активності, тоді як використання кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг з ресвератролом в дозах 1 мг/кг –

50 мг/кг відновлює основні параметри рухової активності, що вказує на протекторні властивості останнього на нервову систему.

Існує ряд даних, що кандесартану цилексетил підвищує витривалість людей з АГ при виконанні ними фізичних навантажень [155]. Відомо, що ресвератрол покращує координацію і нейром'язові функції у тварин [239, 240]. Ресвератрол в поєднанні з фізичними навантаженнями у людей похилого віку зменшує кількість позитивних результатів, які спостерігаються лише при здійсненні фізичних навантажень: не спостерігалось зниження артеріального тиску, зменшення ліпідів в крові, збільшення показника максимального кисневого поглинання в тій мірі, як при фізичних навантаженнях [241].

В ході проведення дослідження було вивчено вплив тривалих інтенсивних фізичних навантажень і подальшого введення кандесартану цилексетилу і ресвератролу в різних дозуваннях на мишах лінії Balb/C. Встановлено, що тривалі фізичні навантаження не впливають на зміну вмісту клітин з маркером CD117 в кістковому мозку і в крові мишей лінії Balb/C. Наступне введення тваринам кандесартану цилексетилу у дозі 3 мг/кг, а також кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг, сумісно з ресвератролом в дозах 10 мг/кг, 30 мг/кг і 50 мг/кг призводить до збільшення числа клітин з фенотипом CD117+ як в кістковому мозку, так і в крові мишей, причому отримані дані можна порівняти з результатами, які були зафіксовані при використанні тільки моноречовини кандесартану цилексетилу в дозі 3 мг/кг [269].

Існує інформація, що фізичні навантаження призводять до стимуляції утворення ЕПК в крові у тварин [242]. Показано, що у людей, які страждають на ССЗ, фізичні навантаження призводять до збільшення числа ЕПК в крові [243]. Однак рядом авторів виявлено, що фізичні навантаження не збільшують вміст ЕПК у людей [244]. Існують дослідження, в яких виявлено, що фізичні навантаження сприяють посиленню процесів проліферації в органах і тканинах тварин [245 – 247]. Однак ці дані є суперечливими щодо

дії кандесартану цилексетилу на цитогенетичні та цитокінетичні параметри. Так, застосування кандесартану цилексетилу в одних дослідженнях призводило до пригнічення проліферативних процесів і збільшення числа клітин з ознаками пошкодження генетичного матеріалу, а згідно інших експериментальних даних зафіксовано активацію проліферативних процесів [158, 231, 232]. Відомо, що ресвератрол попереджає дисфункцію ендотелію, в кістковому мозку знижує частку апоптичних клітин [234 – 236].

В ході проведення дисертаційної роботи нами виявлено, що тривалі й інтенсивні фізичні навантаження збільшують частку клітин з ознаками апоптозу (кістковий мозок і кров), а також вміст клітин з мікроядрами і кількість клітин в G_0/G_1 фазах. Відзначено зниження кількості клітин в S фазі клітинного циклу (в крові). Таким чином, встановлено, що тривалі й інтенсивні фізичні навантаження змінюють цитокінетичні і цитогенетичні параметри кісткового мозку і крові мишей лінії Balb/C. Застосування кандесартану цилексетилу як моноречовини, а також сумісно з ресвератролом після курсу фізичних навантажень, збільшують вміст клітин з ознаками апоптозу і з мікроядрами в кістковому мозку, що є наслідком адаптивних процесів [269].

Виявлено, що кандесартану цилексетил в дозах 1,5 мг/кг і 3 мг/кг частково нівелює негативний ефект інтенсивних фізичних навантажень на ряд показників клітинної кінетики і цитогенетичних параметрів крові, наближаючи їх до показників контрольної групи інтактних тварин. Відзначено зниження кількості апоптичних клітин і посилення проліферативних процесів. Вперше виявлено, що сумісне використання кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератрола в дозах 10 мг/кг, 30 мг/кг і 50 мг/кг в більшій мірі нівелює негативний ефект тривалих і інтенсивних фізичних навантажень на ряд показників крові за рахунок більш вираженого зниження кількості клітин з ознаками апоптозу і мікроядрами. Можна зробити висновок, що сумісне використання кандесартану цилексетилу і ресвератролу дозволяє знизити дозу синтетичного речовини

без втрати ефекту стимуляції мобілізації ЕПК, тим самим зменшити цитотоксичну дію кандесартану цилексетилю [269]. Вперше виявлено, що дія розробленої комбінації кандесартану цилексетилю і ресвератролу є безпечною при застосуванні.

ВИСНОВКИ

1. В дисертаційній роботі вперше виявлено, що кандесартану цилексетил та кандесартан по-різному діють на вміст прогеніторних ендотеліальних клітин *in vitro*: в концентраціях 1,5 мкг/мл і 3 мкг/мл кандесартану цилексетил знижує вміст ендотеліальних прогеніторних клітин з фенотипом CD117⁺ в культурі клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6, тоді як кандесартан в цих концентраціях збільшує вміст клітин з поверхневим клітинним маркером CD117 в культурах клітин кісткового мозку мишей та жирової тканини людини, однак кандесартану цилексетил в концентрації 3 мкг/мл, а кандесартан в концентраціях 1,5 мкг/мл і 3 мкг/мл призводять до збільшення числа апоптичних клітин та клітин з мікроядрами.

2. Антиоксидант ресвератрол в концентраціях 30 мкг/мл і 50 мкг/мл стимулює утворення клітин з CD117⁺ в культурі кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6; а в концентраціях 10 мкг/мл, 30 мкг/мл і 50 мкг/мл збільшує вміст клітин з фенотипом CD117⁺ в культурі жирової тканини людини, і не є цитотоксичним.

3. Вперше показано, що застосування кандесартану цилексетилу в концентрації 1,5 мкг/мл в комбінації з ресвератролом (30 мкг/мл і 50 мкг/мл), а кандесартану в концентрації 1,5 мкг/мл в комбінації з ресвератролом (1 мкг/мл – 50 мкг/мл) призводить до суттєвого збільшення популяції клітин з фенотипом CD117⁺ *in vitro*, а також зменшення числа клітин з мікроядрами та ознаками апоптозу.

4. За введення кандесартану цилексетилу *in vivo* в дозі 3 мг/кг ваги тварин зафіксовано в кістковому мозку мишей лінії C57Bl/6 збільшення клітин з фенотипом CD117⁺, а в дозах 1,5 мг/кг і 3 мг/кг – збільшення кількості останніх в крові тварин, однак в цих дозах кандесартану цилексетил має цитотоксичні властивості, що виражаються в індукції апоптозу і накопиченні клітин з мікроядрами в кістковому мозку тварин. Введення ресвератролу в дозах 10 мг/кг і 50 мг/кг призводить до збільшення вмісту

клітин з фенотипом CD117⁺ в кістковому мозку і в крові мишей лінії C57Bl/6, і не є цитотоксичним.

5. Вперше встановлено, що сумісне використання кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозі 1 мг/кг призводить до збільшення кількості клітин з фенотипом CD117⁺ в крові мишей лінії C57Bl/6, а застосування кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг і ресвератролу в дозах 10 мг/кг і 50 мг/кг – призводить до збільшення вмісту зазначених клітин як в кістковому мозку, так і в крові тварин. Ефективність комбінації кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг та ресвератролу в дозах 10 мг/кг та 50 мг/кг щодо мобілізації клітин з фенотипом CD117⁺ в кістковому мозку та крові тварин суттєво вища в порівнянні із застосуванням моноречовини кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг та співставна з ефективністю кандесартану цилексетилу в дозі 3 мг/кг.

6. Вперше виявлено, що використання кандесартану цилексетилу в дозі 3 мг/мл після фізичних навантажень у тварин призводить до збільшення кількості клітин з фенотипом CD117⁺ в кістковому мозку та крові мишей лінії Balb/C. Сумісне застосування кандесартану цилексетилу в дозі 1,5 мг/кг та ресвератролу в дозах 10 мг/кг, 30 мг/кг і 50 мг/кг після фізичних навантажень у тварин призводить до збільшення кількості клітин з фенотипом CD117⁺ в кістковому мозку і в крові мишей лінії Balb/C.

7. Встановлено, що тривалі та інтенсивні фізичні навантаження збільшують число клітин з мікроядрами та апоптозом, введення кандесартану цилексетилу в дозі 3 мг/кг збільшує число апоптичних клітин та клітин з мікроядрами, тоді як за комбінації кандесартану цилексетилу з ресвератролом в дозах 10 мг/кг, 30 мг/кг і 50 мг/кг негативний ефект фізичних навантажень нівелюється, що проявляється в зменшенні кількості апоптичних клітин і клітин з мікроядрами в крові мишей лінії Balb/C.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бочков НП, Воронов ДА. Генотерапия в лечении сердечно-сосудистых заболеваний: фундаментальные основы, терапевтический потенциал, современное состояние и перспективы. Кардиология и сердеч.-сосуд. хирургия. 2010;3(3):4-11.
2. Samak M, Hinkel R. Stem cells in cardiovascular medicine: historical overview and future prospects. Cells. 2019 Nov 27;8(12):1530.
3. ВОЗ. Сердечно-сосудистые заболевания [Интернет]. 2017 Май 17 [цитировано 2021 Янв 20]. Доступно: [https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
4. Бокерия ЛА, Махалдиани ЗБ, Сергеев АВ. Современное состояние проблемы клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Литературный обзор. Часть I. Бюл. НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. Сердеч.-сосуд. заболевания. 2006;7(5):4-14.
5. Бокерия ЛА, Бузиашвили ЮИ, Мацкеплишвили СТ, Алемян БГ, Шаноян СА, Сигаев ИЮ, и др. Первый опыт использования аутологичных клеток костного мозга при лечении сердечной недостаточности ишемического генеза и острого инфаркта миокарда. Бюл. НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. Сердеч.-сосуд. заболевания. 2004;5(4):152-9.
6. Ахмедов ШД, Евтушенко АВ, Афанасьев СА, Попов СВ, Карпов РС. Клинико-экспериментальные результаты применения клеточной терапии в кардиологической практике: современная концепция. В: [Сб. тез.] IV Всерос. науч. шк.-конф. Стволовые клетки и регенеративная медицина; 2011 Окт 24-27. М.; 2011. с. 11-3.
7. Shinohara H, Fukuda N, Soeki T, Sakabe K, Onose Y, Tamura Y. Effects of angiotensin II receptor antagonists on [(123)I]metaiodobenzylguanidine myocardial imaging findings and neurohumoral factors in chronic heart failure. Heart Vessels. 2002 Dec;17(2):47-52.
8. Yao EH, Fukuda N, Matsumoto T, Kobayashi N, Katakawa M,

Yamamoto C, et al. Losartan improves the impaired function of endothelial progenitor cells in hypertension via an antioxidant effect. *Hypertens Res.* 2007 Nov;30(11):1119-28.

9. Yu Y, Fukuda N, Yao EH, Matsumoto T, Kobayashi N, Suzuki R, et al. Effects of an ARB on endothelial progenitor cell function and cardiovascular oxidation in hypertension. *Am J Hypertens.* 2008 Jan;21(1):72-7.

10. Burba I, Colombo GI, Staszewsky LI, De Simone M, Devanna P, Nanni S, et al. Histone deacetylase inhibition enhances self renewal and cardioprotection by human cord blood-derived CD34 cells. *PLoS One.* 2011;6(7):e22158.

11. Mahapatra S, Firpo MT, Bacanamwo M. Inhibition of DNA methyltransferases and histone deacetylases induces bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells to differentiate into endothelial cells. *Ethn Dis.* 2010 Winter;20(1 Suppl 1):S1-60-4.

12. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001 Apr 5;410(6829):701-5.

13. Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res.* 2002 Dec 13;91(12):1092-102.

14. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 28;98(18):10344-9.

15. Бузиашвили ЮИ, Picano E, Амбатьелло СГ, Мацкеплишвили СТ. Ангиогенез как антиишемический механизм. *Кардиология.* 2000;40(12):82-6.

16. Кащенко ВА. Теоретическое обоснование оценки ангиогенеза в клинической гепатологии. *Вестн. С.-Петерб. ун-та. Сер. 11. Медицина.* 2008;(Прил к вып 1):83-9.

17. Повещенко ОВ, Повещенко АФ, Коненков ВИ. Физиологические и цитологические основы клеточной регуляции ангиогенеза. *Успехи физиол. наук.* 2012;43(3):48-61.

18. Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol.* 2000 Oct-Nov;50(1-2):139-48.
19. Ameen C. Growth hormone and PPAR α in the regulation of genes involved in hepatic lipid metabolism [dissertation]. Gothenburg: Univ.; 2004. 67 p.
20. Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. *Mol Endocrinol.* 2004 Jun;18(6):1321-32.
21. Planavila A, Laguna JC, Vazquez-Carrera M. Nuclear factor-kappaB activation leads to down-regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy. *J Biol Chem.* 2005 Apr 29;280(17):17464-71.
22. Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Dec 23;100(26):15924-9.
23. Pedersen BK. IL-6 signalling in exercise and disease. *Biochem Soc Trans.* 2007 Nov;35(Pt 5):1295-7.
24. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 1999 Oct;20(5):649-88.
25. Hattori K, Heissig B, Rafii S. The regulation of hematopoietic stem cell and progenitor mobilization by chemokine SDF-1. *Leuk Lymphoma.* 2003 Apr;44(4):575-82.
26. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest.* 2003 Jan;111(2):187-96.
27. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood.* 2001 Jun 1;97(11):3354-60.
28. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M,

Murasawa S, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*. 2003 Mar 11;107(9):1322-8.

29. Musaro A, Giacinti C, Borsellino G, Dobrowolny G, Pelosi L, Cairns L, et al. Stem cell-mediated muscle regeneration is enhanced by local isoform of insulin-like growth factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 3;101(5):1206-10.

30. Kim HJ, Bae SC. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res*. 2011 Feb;3(2):166-79.

31. Gregoretta IV, Lee YM, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol*. 2004 Apr 16;338(1):17-31.

32. Ohtani K, Dimmeler S. Epigenetic regulation of cardiovascular differentiation. *Cardiovasc Res*. 2011 Jun 1;90(3):404-12.

33. Bianco P, Reginacci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001;19(3):180-92.

34. Bhatia R, Hare JM. Mesenchymal stem cells: future source for reparative medicine. *Congest Heart Fail*. 2005 Mar-Apr;11(2):87-91.

35. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.

36. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 2001 Aug;108(3):407-14.

37. Min JY, Yang Y, Converso KL, Liu L, Huang Q, Morgan JP, et al. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol* (1985). 2002 Jan;92(1):288-96.

38. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001 Jun;107(11):1395-402.
39. Muller-Ehmsen J, Peterson KL, Kedes L, Whittaker P, Dow JS, Long TI, et al. Rebuilding a damaged heart: long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. *Circulation*. 2002 Apr 9;105(14):1720-6.
40. Reffelmann T, Dow JS, Dai W, Hale SL, Simkhovich BZ, Kloner RA. Transplantation of neonatal cardiomyocytes after permanent coronary artery occlusion increases regional blood flow of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2003 Jun;35(6):607-13.
41. Yao M, Dieterle T, Hale SL, Dow JS, Kedes LH, Peterson KL, et al. Long-term outcome of fetal cell transplantation on postinfarction ventricular remodeling and function. *J Mol Cell Cardiol*. 2003 Jun;35(6):661-70.
42. Pesce M, Orlandi A, Iachininoto MG, Straino S, Torella AR, Rizzuti V, et al. Myoendothelial differentiation of human umbilical cord blood-derived stem cells in ischemic limb tissues. *Circ Res*. 2003 Sep 5;93(5):e51-62.
43. Murohara T. Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors. *Trends Cardiovasc Med*. 2001 Nov;11(8):303-7.
44. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki Ki, Eguchi H, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 2000 Jun;105(11):1527-36.
45. Leor J, Guetta E, Feinberg MS, Galski H, Bar I, Holbova R, et al. Human umbilical cord blood-derived CD133+ cells enhance function and repair of the infarcted myocardium. *Stem Cells*. 2006 Mar;24(3):772-80.
46. Улумбеков ЭГ, Чельшев ЮА, редакторы. Гистология, эмбриология, цитология: [учеб. для вузов]. 3-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009. 408 с.
47. Chachques JC, Herreros J, Trainini J, Juffe A, Rendal E, Prosper F, et al. Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of

cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *Int J Cardiol.* 2004 Jun;95 Suppl 1:S29-33.

48. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Apr 2;41(7):1078-83.

49. Smits PC, van Geuns RJ, Poldermans D, Bountiukos M, Onderwater EE, Lee CH, et al. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Dec 17;42(12):2063-9.

50. Tambara K, Sakakibara Y, Sakaguchi G, Lu F, Premaratne GU, Lin X, et al. Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers. *Circulation.* 2003 Sep 9;108 Suppl 1:II259-63.

51. Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozwadowska N, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J.* 2004 Sep;148(3):531-7.

52. Bonaros N, Rauf R, Werner E, Schlechta B, Rohde E, Kocher A, et al. Neoangiogenesis after combined transplantation of skeletal myoblasts and angiopoietic progenitors leads to increased cell engraftment and lower apoptosis rates in ischemic heart failure. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2008 Apr;7(2):249-55.

53. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003 Sep 19;114(6):763-76.

54. Yeh ET, Zhang S, Wu HD, Korbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells *in vivo*. *Circulation.* 2003 Oct 28;108(17):2070-3.

55. Arguero R, Careaga-Reyna G, Castano-Guerra R, Garrido-Garduno

MH, Magana-Serrano JA, de Jesus Nambo-Lucio M. Cellular autotransplantation for ischemic and idiopathic dilated cardiomyopathy. Preliminary report. *Arch Med Res.* 2006 Nov;37(8):1010-4.

56. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature.* 2004 Apr 8;428(6983):664-8.

57. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res.* 2004 Jul 9;95(1):9-20.

58. Heeschen C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, et al. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation.* 2004 Apr 6;109(13):1615-22.

59. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001 Apr;7(4):430-6.

60. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg.* 2002 Jun;73(6):1919-25.

61. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation.* 2001 Aug 28;104(9):1046-52.

62. Molina EJ, Palma J, Gupta D, Torres D, Gaughan JP, Houser S, et al. Improvement in hemodynamic performance, exercise capacity, inflammatory profile, and left ventricular reverse remodeling after intracoronary delivery of mesenchymal stem cells in an experimental model of pressure overload hypertrophy. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008 Feb;135(2):292-9, 299.e1.

63. Li N, Wang JA. Brain natriuretic peptide: a potential indicator of cardiomyogenesis after autologous mesenchymal stem cell transplantation? *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006 Sep;7(9):766-8.

64. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006 Sep 21;355(12):1210-21.

65. Шумаков ВИ, Казаков ЭН, Онищенко НА, Гуреев СВ, Остроумов ЕН, Честухин ВВ, и др. Первый опыт клинического применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для восстановления сократительной функции миокарда. *Рос. кардиол. журн*. 2003;8(5):42-50.

66. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*. 2003 May 13;107(18):2294-302.

67. Beeres SL, Bax JJ, Dibbets P, Stokkel MP, Zeppenfeld K, Fibbe WE, et al. Effect of intramyocardial injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells on perfusion, function, and viability in patients with drug-refractory chronic ischemia. *J Nucl Med*. 2006 Apr;47(4):574-80.

68. Fuchs S, Kornowski R, Weisz G, Satler LF, Smits PC, Okubagzi P, et al. Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease. *Am J Cardiol*. 2006 Mar 15;97(6):823-9.

69. Briguori C, Reimers B, Sarais C, Napodano M, Pascotto P, Azzarello G, et al. Direct intramyocardial percutaneous delivery of autologous bone marrow in patients with refractory myocardial angina. *Am Heart J*. 2006 Mar;151(3):674-80.

70. Patel AN, Geffner L, Vina RF, Saslavsky J, Urschel HC Jr, Kormos R, et al. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005

Dec;130(6):1631-8.

71. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. *Trends Cardiovasc Med*. 2003 Jul;13(5):201-6.

72. Katritsis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E, Karabinos I, Korovesis S, Perez SA, et al. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2005 Jul;65(3):321-9.

73. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec;13(12):4279-95.

74. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem*. 2004;14(4-6):311-24.

75. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*. 2005 Apr;129(1):118-29.

76. Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells *in vitro* and improve postnatal neovascularization *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jul 1;332(2):370-9.

77. Di Rocco G, Iachininoto MG, Tritarelli A, Straino S, Zacheo A, Germani A, et al. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci*. 2006 Jul 15;119(Pt 14):2945-52.

78. Rodriguez LV, Alfonso Z, Zhang R, Leung J, Wu B, Ignarro LJ. Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 8;103(32):12167-72.

79. Kanda N, Fukushige S, Murotsu T, Yoshida MC, Tsuchiya M, Asano S, et al. Human gene coding for granulocyte-colony stimulating factor is assigned

to the q21-q22 region of chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet.* 1987 Nov;13(6):679-84.

80. O’Gorman MRG, Donnenberg AD, editors. *Handbook of human immunology.* 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2008. xv, 623 p.

81. Румянцев СА, Владимирская ЕЕ, Румянцев АГ. Механизмы Г-КСФ-индуцированной мобилизации гемопоэтических стволовых клеток. *Вопр. гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* 2003;2(4):5-9.

82. Zohnhofer D, Ott I, Mehilli J, Schomig K, Michalk F, Ibrahim T, et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006 Mar 1;295(9):1003-10.

83. Kroger N, Zeller W, Hassan HT, Dierlamm J, Zander AR. Difference between expression of adhesion molecules on CD34+ cells from bone marrow and G-CSF-stimulated peripheral blood. *Stem Cells.* 1998;16(1):49-53.

84. Wang L, Teng R, Di L, Rogers H, Wu H, Kopp JB, et al. PPAR α and Sirt1 mediate erythropoietin action in increasing metabolic activity and browning of white adipocytes to protect against obesity and metabolic disorders. *Diabetes.* 2013 Dec;62(12):4122-31.

85. Delehanty LL, Bullock GC, Goldfarb AN. Protein kinase D-HDAC5 signaling regulates erythropoiesis and contributes to erythropoietin cross-talk with GATA1. *Blood.* 2012 Nov 15;120(20):4219-28.

86. Осиков МВ, Григорьев ТА, Федосов АА. Современные представления о гемостазиологических эффектах эритропоэтина. *Фундам. исслед.* 2013;(5-1):196-200.

87. Haroon ZA, Amin K, Jiang X, Arcasoy MO. A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. *Am J Pathol.* 2003 Sep;163(3):993-1000.

88. Seong SR, Lee JW, Lee YK, Kim TI, Son DJ, Moon DC, et al. Stimulation of cell growth by erythropoietin in RAW264.7 cells: association with AP-1 activation. *Arch Pharm Res.* 2006 Mar;29(3):218-23.

89. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*. 2003 Aug 15;102(4):1340-6.
90. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*. 2004 Feb 1;103(3):921-6.
91. Bahlmann FH, DeGroot K, Duckert T, Niemczyk E, Bahlmann E, Boehm SM, et al. Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin. *Kidney Int*. 2003 Nov;64(5):1648-52.
92. Ferrario M, Massa M, Rosti V, Campanelli R, Ferlini M, Marinoni B, et al. Early haemoglobin-independent increase of plasma erythropoietin levels in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2007 Aug;28(15):1805-13.
93. Барна ОН. Пиоглитазон: механізми захисту від серцево-судинистих захворювань (частина I). *Ліки України*. 2012;(2):18-23.
94. Ryder REJ. Pioglitazone: an agent which reduces stroke, myocardial infarction and death and is also a key component of the modern paradigm for the optimum management of type 2 diabetes. *Br J Diabetes Vasc Dis*. 2011;11(3):113-20.
95. Gensch C, Clever YP, Werner C, Hanhoun M, Bohm M, Laufs U. The PPAR-gamma agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis*. 2007 May;192(1):67-74.
96. Werner C, Kamani CH, Gensch C, Bohm M, Laufs U. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone increases number and function of endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease and normal glucose tolerance. *Diabetes*. 2007 Oct;56(10):2609-15.
97. Napolitano M, Costa L, Palermo R, Giovenco A, Vacca A, Gulino A. Protective effect of pioglitazone, a PPAR γ ligand, in a 3 nitropropionic acid model of Huntington's disease. *Brain Res Bull*. 2011 May 30;85(3-4):231-7.
98. Wang CH, Ting MK, Verma S, Kuo LT, Yang NI, Hsieh IC, et al. Pioglitazone increases the numbers and improves the functional capacity of

endothelial progenitor cells in patients with diabetes mellitus. *Am Heart J.* 2006 Dec;152(6):1051.e1-8.

99. Esposito K, Maiorino MI, Di Palo C, Gicchino M, Petrizzo M, Bellastella G, et al. Effects of pioglitazone versus metformin on circulating endothelial microparticles and progenitor cells in patients with newly diagnosed type 2 diabetes – a randomized controlled trial. *Diabetes Obes Metab.* 2011 May;13(5):439-45.

100. ClinicalTrials.gov. Efficacy and safety of Pioglitazone in treating subjects with vascular complications associated with type 2 diabetes mellitus. (SPLENDOR) [Internet]. 2018 Oct 10 [cited 2021 Jan 20]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00770835?term=NCT00770835&rank=1>

101. Dicker D. DPP-4 inhibitors: impact on glycemic control and cardiovascular risk factors. *Diabetes Care.* 2011 May;34 Suppl 2(Suppl 2):S276-8.

102. Wei Y, Mojsov S. Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS Lett.* 1995 Jan 30;358(3):219-24.

103. Nauck MA. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: properties, functions, and clinical implications. *Am J Med.* 2011 Jan;124(1 Suppl):S3-18.

104. Lee TI, Kao YH, Chen YC, Huang JH, Hsu MI, Chen YJ. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor-sitagliptin modulates calcium dysregulation, inflammation, and PPARs in hypertensive cardiomyocytes. *Int J Cardiol.* 2013 Oct 15;168(6):5390-5.

105. Bose AK, Mocanu MM, Carr RD, Yellon DM. Glucagon like peptide-1 is protective against myocardial ischemia/reperfusion injury when given either as a preconditioning mimetic or at reperfusion in an isolated rat heart model. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2005 Jan;19(1):9-11.

106. Read PA, Khan FZ, Heck PM, Hoole SP, Dutka DP. DPP-4 inhibition by sitagliptin improves the myocardial response to dobutamine stress and mitigates stunning in a pilot study of patients with coronary artery disease. *Circ Cardiovasc*

Imaging. 2010 Mar;3(2):195-201.

107. Gomez N, Touihri K, Matheussen V, Mendes Da Costa A, Mahmoudabady M, Mathieu M, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition improves cardiorenal function in overpacing-induced heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2012 Jan;14(1):14-21.

108. Mistry GC, Maes AL, Lasseter KC, Davies MJ, Gottesdiener KM, Wagner JA, et al. Effect of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on blood pressure in nondiabetic patients with mild to moderate hypertension. *J Clin Pharmacol.* 2008 May;48(5):592-8.

109. Fadini GP, Boscaro E, Albiero M, Menegazzo L, Frison V, de Kreutzenberg S, et al. The oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin increases circulating endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes: possible role of stromal-derived factor-1alpha. *Diabetes Care.* 2010 Jul;33(7):1607-9.

110. Huang CY, Shih CM, Tsao NW, Lin YW, Huang PH, Wu SC, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor improves neovascularization by increasing circulating endothelial progenitor cells. *Br J Pharmacol.* 2012 Dec;167(7):1506-19.

111. Theiss HD, Brenner C, Engelmann MG, Zaruba MM, Huber B, Henschel V, et al. Safety and efficacy of SITAgliptin plus GRanulocyte-colony-stimulating factor in patients suffering from Acute Myocardial Infarction (SITAGRAMI-Trial) – rationale, design and first interim analysis. *Int J Cardiol.* 2010 Nov 19;145(2):282-4.

112. Чазов ЕИ, Беленков ЮН, редакторы. Рациональная фармакотерапия сердечно-сосудистых заболеваний: рук. для практикующих врачей. М.: Литтерра; 2005. 971 с.

113. Bastiaanse EM, Atsma DE, Kuijpers MM, Van der Laarse A. Simvastatin-sodium delays cell death of anoxic cardiomyocytes by inhibition of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *FEBS Lett.* 1994 Apr 25;343(2):151-4.

114. Bauersachs J, Galuppo P, Fraccarollo D, Christ M, Ertl G. Improvement of left ventricular remodeling and function by hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibition with cerivastatin in rats

with heart failure after myocardial infarction. *Circulation*. 2001 Aug 28;104(9):982-5.

115. Barker CA, Yahalom J. Histone deacetylase inhibition as a mechanism for the therapeutic effect of statins (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors) in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2010 Aug 20;28(24):e426.

116. Pucci A, Formato L, Muscio M, Brscic E, Pizzimenti S, Ferroni F, et al. PPAR γ in coronary atherosclerosis: *in vivo* expression pattern and correlations with hyperlipidemic status and statin treatment. *Atherosclerosis*. 2011 Oct;218(2):479-85.

117. Chonchol M, Cook T, Kjekshus J, Pedersen TR, Lindendorf J. Simvastatin for secondary prevention of all-cause mortality and major coronary events in patients with mild chronic renal insufficiency. *Am J Kidney Dis*. 2007 Mar;49(3):373-82.

118. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, et al. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2004 Apr 8;350(15):1495-504.

119. Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation*. 2002 Feb 12;105(6):739-45.

120. Xu H, Yang YJ, Yang T, Qian HY. Statins and stem cell modulation. *Ageing Res Rev*. 2013 Jan;12(1):1-7.

121. Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, Schaefer A, Wiencke A, Heineke A, et al. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2004 Oct 5;110(14):1933-9.

122. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2002 Jun 25;105(25):3017-24.

123. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*. 2001 Jun 19;103(24):2885-90.
124. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*. 2001 Aug;108(3):391-7.
125. Graaf MR, Beiderbeck AB, Egberts AC, Richel DJ, Guchelaar HJ. The risk of cancer in users of statins. *J Clin Oncol*. 2004 Jun 15;22(12):2388-94.
126. Небиеридзе ДВ, Папова ФС. Применение ингибиторов АПФ в клинической практике. *Лечащий врач*. 2005;(9):54-7.
127. Petroianu GA. Combined treatment with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and angiotensin-receptor blockers (ARB): 'Beating a dead horse' or meaningful mechanism-guided therapy? *Indian J Pharmacol*. 2006;38(5):372-3.
128. Luders S, Schrader J, Berger J, Unger T, Zidek W, Bohm M, et al. The PHARAO study: prevention of hypertension with the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril in patients with high-normal blood pressure: a prospective, randomized, controlled prevention trial of the German Hypertension League. *J Hypertens*. 2008 Jul;26(7):1487-96.
129. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med*. 2000 Jan 20;342(3):145-53.
130. Muller P, Kazakov A, Semenov A, Jagoda P, Friedrich EB, Bohm M, et al. Ramipril and telmisartan exhibit differential effects in cardiac pressure overload-induced hypertrophy without an additional benefit of the combination of both drugs. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2013 Jan;18(1):87-93.
131. Chen J, Xiao X, Chen S, Zhang C, Chen J, Yi D, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 priming enhances the function of endothelial progenitor cells and their therapeutic efficacy. *Hypertension*. 2013 Mar;61(3):681-9.
132. Cangiano E, Marchesini J, Campo G, Francolini G, Fortini C, Carra

G, et al. ACE inhibition modulates endothelial apoptosis and renewal via endothelial progenitor cells in patients with acute coronary syndromes. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2011 Jun 1;11(3):189-98.

133. Cacciatore F, Bruzzese G, Vitale DF, Liguori A, de Nigris F, Fiorito C, et al. Effects of ACE inhibition on circulating endothelial progenitor cells, vascular damage, and oxidative stress in hypertensive patients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2011 Sep;67(9):877-83.

134. Sun JY, Zhai L, Li QL, Ye JX, Kang LN, Xie J, et al. Effects of ACE inhibition on endothelial progenitor cell mobilization and prognosis after acute myocardial infarction in type 2 diabetic patients. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013 May;68(5):665-73.

135. Маянская СД, Малышева ЕВ. Сартаны в практике терапевта. Новые возможности: пособие для врачей. Казань: Казан. гос. мед. акад.; 2011. 48 с.

136. Райд ДжЛ, Рубин ПК, Уолтерс МР. Клиническая фармакология и фармакотерапия: лекц. курс: пер. с англ. М.: Мед. лит.; 2009. 400 с.

137. Yang D, Zhang M, Huang X, Fang F, Chen B, Wang S, et al. Protection of retinal vasculature by losartan against apoptosis and vasculopathy in rats with spontaneous hypertension. *J Hypertens*. 2010 Mar;28(3):510-9.

138. Schupp M, Lee LD, Frost N, Umbreen S, Schmidt B, Unger T, et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by losartan metabolites. *Hypertension*. 2006 Mar;47(3):586-9.

139. Tan H, Li X, Chen W, Chen Y, Wei X, Yang Y, et al. Effects of losartan on the mobilization of endothelial progenitor cells and improvement of endothelial function. *Ann Clin Lab Sci*. 2013 Fall;43(4):402-6.

140. Zhang ZZ, Shang QH, Jin HY, Song B, Oudit GY, Lu L, et al. Cardiac protective effects of irbesartan via the PPAR-gamma signaling pathway in angiotensin-converting enzyme 2-deficient mice. *J Transl Med*. 2013 Sep 25;11:229.

141. Georgescu A, Alexandru N, Nemezc M, Titorencu I, Popov D.

Irbesartan administration therapeutically influences circulating endothelial progenitor cell and microparticle mobilization by involvement of pro-inflammatory cytokines. *Eur J Pharmacol.* 2013 Jul 5;711(1-3):27-35.

142. Bahlmann FH, de Groot K, Mueller O, Hertel B, Haller H, Fliser D. Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. *Hypertension.* 2005 Apr;45(4):526-9.

143. Ma T, Ma ZQ, Du XH, Yu QS, Wang R, Liu L. Effect of valsartan on ACAT-1 and PPAR- γ expression in intima with carotid artery endothelial balloon injury in rabbit. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Apr 15;8(4):5527-33.

144. Xu WP, Yao TQ, Jiang YB, Zhang MZ, Wang YP, Yu Y, et al. Effect of the angiotensin II receptor blocker valsartan on cardiac hypertrophy and myocardial histone deacetylase expression in rats with aortic constriction. *Exp Ther Med.* 2015 Jun;9(6):2225-8.

145. Yoshida Y, Fukuda N, Maeshima A, Yamamoto C, Matsumoto T, Ueno T, et al. Treatment with valsartan stimulates endothelial progenitor cells and renal label-retaining cells in hypertensive rats. *J Hypertens.* 2011 Jan;29(1):91-101.

146. Kobayashi K, Imanishi T, Akasaka T. Endothelial progenitor cell differentiation and senescence in an angiotensin II-infusion rat model. *Hypertens Res.* 2006 Jun;29(6):449-55.

147. Steinmetz M, Brouwers C, Nickenig G, Wassmann S. Synergistic effects of telmisartan and simvastatin on endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med.* 2010 Jun;14(6B):1645-56.

148. Honda A, Matsuura K, Fukushima N, Tsurumi Y, Kasanuki H, Hagiwara N. Telmisartan induces proliferation of human endothelial progenitor cells via PPAR γ -dependent PI3K/Akt pathway. *Atherosclerosis.* 2009 Aug;205(2):376-84.

149. Cao Z, Yang Y, Hua X, Wu R, Wang J, Zhou M, et al. Telmisartan promotes proliferation and differentiation of endothelial progenitor cells via activation of Akt. *Chin Med J (Engl).* 2014;127(1):109-13.

150. Pelliccia F, Pasceri V, Cianfrocca C, Vitale C, Speciale G, Gaudio C,

et al. Angiotensin II receptor antagonism with telmisartan increases number of endothelial progenitor cells in normotensive patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Atherosclerosis*. 2010 Jun;210(2):510-5.

151. Laeis P, Puchler K, Kirch W. The pharmacokinetic and metabolic profile of olmesartan medoxomil limits the risk of clinically relevant drug interaction. *J Hypertens Suppl*. 2001 Jun;19(1):S21-32.

152. Alhusban A, Kozak A, Ergul A, Fagan SC. AT1 receptor antagonism is proangiogenic in the brain: BDNF a novel mediator. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013 Feb;344(2):348-59.

153. Soliman S, Ishrat T, Pillai A, Somanath PR, Ergul A, El-Remessy AB, et al. Candesartan induces a prolonged proangiogenic effect and augments endothelium-mediated neuroprotection after oxygen and glucose deprivation: role of vascular endothelial growth factors A and B. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014 Jun;349(3):444-57.

154. Villapol S, Yaszemski AK, Logan TT, Sanchez-Lemus E, Saavedra JM, Symes AJ. Candesartan, an angiotensin II AT₁-receptor blocker and PPAR- γ agonist, reduces lesion volume and improves motor and memory function after traumatic brain injury in mice. *Neuropsychopharmacology*. 2012 Dec;37(13):2817-29.

155. De Rosa ML, Chiariello M. Candesartan improves maximal exercise capacity in hypertensives: results of a randomized placebo-controlled crossover trial. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2009 Apr;11(4):192-200.

156. Sakamoto T, Ogawa H, Nakao K, Koide S, Yamamoto N, Shimomura H, et al. Rationale, design and baseline characteristics of a study to evaluate effects of candesartan on cardiovascular events after drug-eluting stent implantation in patients with ischemic heart disease. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20(5):472-80.

157. ClinicalTrials.gov. Candesartan for prevention of cardiovascular events after cypher or taxus coronary stenting (4C) trial [Internet]. 2005 Aug 31 [cited 2021 Jan 20]. Available from:

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00139386?term=NCT00139386&rank=1>.

158. Naeshiro I, Sato K, Chatani F, Sato S. Possible mechanism for the anemia induced by candesartan cilexetil (TCV-116), an angiotensin II receptor antagonist, in rats. *Eur J Pharmacol.* 1998 Aug 7;354(2-3):179-87.

159. Medsovet.info. Действующее вещество (МНН) КАНДЕСАРТАН [Интернет]. [цитировано 2021 Янв 20]. Доступно: <https://www.medsovet.info/herb/22146>.

160. Зорикова ОГ, Якименко ЛВ. Химический анализ патринии скабиозолистной. *Тихоокеан. мед. журн.* 2013;(2):61-3.

161. Bachhav SS, Patil SD, Bhutada MS, Surana SJ. Oleanolic acid prevents glucocorticoid-induced hypertension in rats. *Phytother Res.* 2011 Oct;25(10):1435-9.

162. Nakanishi T, Tanaka K, Murata H, Somekawa M, Inada A. Phytochemical studies of seeds of medicinal plants. III. Ursolic acid and oleanolic acid glycosides from seeds of *Patrinia scabiosaefolia* Fischer. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1993 Jan;41(1):183-6.

163. Lee HK, Nam GW, Kim SH, Lee SH. Phytocomponents of triterpenoids, oleanolic acid and ursolic acid, regulated differently the processing of epidermal keratinocytes via PPAR-alpha pathway. *Exp Dermatol.* 2006 Jan;15(1):66-73.

164. Zhou X, Zeng XY, Wang H, Li S, Jo E, Xue CC, et al. Hepatic FoxO1 acetylation is involved in oleanolic acid-induced memory of glycemic control: novel findings from Study 2. *PLoS One.* 2014 Sep 15;9(9):e107231.

165. Lu WZ, Geng GX, Li QW, Li J, Liu FZ, Han ZS. Antitumor activity of polysaccharides isolated from *Patrinia heterophylla*. *Pharm Biol.* 2010 Sep;48(9):1012-7.

166. Zhang M, Sun G, Shen A, Liu L, Ding J, Peng J. *Patrinia scabiosaefolia* inhibits the proliferation of colorectal cancer *in vitro* and *in vivo* via G1/S cell cycle arrest. *Oncol Rep.* 2015 Feb;33(2):856-60.

167. Peng J, Chen Y, Lin J, Zhuang Q, Xu W, Hong Z, et al. *Patrinia*

scabiosaefolia extract suppresses proliferation and promotes apoptosis by inhibiting the STAT3 pathway in human multiple myeloma cells. *Mol Med Rep.* 2011 Mar-Apr;4(2):313-8.

168. Yang B, Wang YQ, Cheng RB, Chen JL, Chen J, Jia LT, et al. Induction of cytotoxicity and apoptosis in human gastric cancer cell SGC-7901 by isovaltrate acetoxhydroin isolated from *Patrinia heterophylla bunge* involves a mitochondrial pathway and G2/M phase cell cycle arrest. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(11):6481-6.

169. Wang H, Peng D, Xie J. Ginseng leaf-stem: bioactive constituents and pharmacological functions. *Chin Med.* 2009 Oct 22;4:20.

170. Chan P, Thomas GN, Tomlinson B. Protective effects of trilinolein extracted from *panax notoginseng* against cardiovascular disease. *Acta Pharmacol Sin.* 2002 Dec;23(12):1157-62.

171. Lim DS, Bae KG, Jung IS, Kim CH, Yun YS, Song JY. Anti-septicaemic effect of polysaccharide from *Panax ginseng* by macrophage activation. *J Infect.* 2002 Jul;45(1):32-8.

172. Mollah ML, Kim GS, Moon HK, Chung SK, Cheon YP, Kim JK, et al. Antiobesity effects of wild ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) mediated by PPAR-gamma, GLUT4 and LPL in ob/ob mice. *Phytother Res.* 2009 Feb;23(2):220-5.

173. Kang KA, Piao MJ, Kim KC, Zheng J, Yao CW, Cha JW, et al. Compound K, a metabolite of ginseng saponin, inhibits colorectal cancer cell growth and induces apoptosis through inhibition of histone deacetylase activity. *Int J Oncol.* 2013 Dec;43(6):1907-14.

174. Lu J, Lu WW, Tian JM, Li LY. [Effect of Rg2 on hemodynamics of hemorrhagic shock and its antioxidation in dogs]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2001 Aug;26(8):556-8. Chinese.

175. Li J, Shao ZH, Xie JT, Wang CZ, Ramachandran S, Yin JJ, et al. The effects of ginsenoside Rb1 on JNK in oxidative injury in cardiomyocytes. *Arch Pharm Res.* 2012 Jul;35(7):1259-67.

176. Vogler BK, Pittler MH, Ernst E. The efficacy of ginseng. A systematic review of randomised clinical trials. *Eur J Clin Pharmacol*. 1999 Oct;55(8):567-75.

177. Hu YH, Wu HQ, Qi X. [Influence of shenfu injection on heart function and bone marrow stem cell mobilization in patients with chronic heart failure of coronary heart disease]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2009 Apr;29(4):309-12. Chinese.

178. Васильев ГВ, Новиков ОО, Кочкаров ВИ, Лукашева ОБ, Киселева ТС, Фадеева ДА. Аналитическая характеристика резвератрола. *Курский науч.-практ. вестн. Человек и его здоровье*. 2007;(3):90-6.

179. Cheng G, Zhang X, Gao D, Jiang X, Dong W. Resveratrol inhibits MMP-9 expression by up-regulating PPAR alpha expression in an oxygen glucose deprivation-exposed neuron model. *Neurosci Lett*. 2009 Feb 20;451(2):105-8.

180. Venturelli S, Berger A, Bocker A, Busch C, Weiland T, Noor S, et al. Resveratrol as a pan-HDAC inhibitor alters the acetylation status of histone [corrected] proteins in human-derived hepatoblastoma cells. *PLoS One*. 2013 Aug 30;8(8):e73097.

181. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Jun;5(6):493-506.

182. Sgambato A, Ardito R, Faraglia B, Boninsegna A, Wolf FI, Cittadini A. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutat Res*. 2001 Sep 20;496(1-2):171-80.

183. Delucchi F, Berni R, Frati C, Cavalli S, Graiani G, Sala R, et al. Resveratrol treatment reduces cardiac progenitor cell dysfunction and prevents morpho-functional ventricular remodeling in type-1 diabetic rats. *PLoS One*. 2012;7(6):e39836.

184. Wu JM, Hsieh TC, Wang Z. Cardioprotection by resveratrol: a review of effects/targets in cultured cells and animal tissues. *Am J Cardiovasc Dis*. 2011;1(1):38-47.

185. Campagnolo P, Hong X, di Bernardini E, Smyrnias I, Hu Y, Xu Q.

Resveratrol-Induced Vascular Progenitor Differentiation towards Endothelial Lineage via MiR-21/Akt/ β -Catenin Is Protective in Vessel Graft Models. PLoS One. 2015 May 11;10(5):e0125122.

186. Karuppagounder SS, Pinto JT, Xu H, Chen HL, Beal MF, Gibson GE. Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. Neurochem Int. 2009 Feb;54(2):111-8.

187. Zheng Y, Liu Y, Ge J, Wang X, Liu L, Bu Z, et al. Resveratrol protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression. Mol Vis. 2010 Aug 4;16:1467-74.

188. Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellierino A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. Curr Biol. 2006 Feb 7;16(3):296-300.

189. Тимошенко ЕЮ, Писарев ДИ, Воронкова ОВ. Разработка состава модельной смеси для получения препарата с гипохолестеринемическим действием. Науч. ведомости Белгород. гос. ун-та. Сер. Медицина. Фармация. 2010;(22 Вып 12/2):32-6.

190. Файтельсон АВ. Фармакологическая коррекция экспериментального остеопороза комбинацией резвератрола с эналаприлом. Науч. ведомости Белгород. гос. ун-та. Сер. Медицина. Фармация. 2012;(4 Вып 17/1):239-44.

191. Корокин МВ, Покровский МВ, Покровская ТГ, Артюшкова ЕБ, Гладченко МП, Толмачев НЕ, и др. К вопросу фармакологической коррекции гипоестроген индуцированной эндотелиальной дисфункции. Курский науч.-практ. вестн. Человек и его здоровье. 2008;(1):31-5.

192. Кочкаров ВИ. Резвератрол и его комбинации с основными антигипертензивными препаратами в фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции [автореферат]. Смоленск: Смолен. гос. мед. акад.; 2009. 42 с.

193. Корнеев ММ. Исследование эндотелиопротективного эффекта

резвератрола и его комбинаций с эналаприлом и лозартаном [автореферат]. Курск: Курский гос. мед. ун-т; 2007. 21 с.

194. Хабриев РУ, редактор. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: учеб. пособие для системы послевуз. проф. образования врачей. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина: Шико; 2005. 827 с.

195. Xu Q. The impact of progenitor cells in atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006 Feb;3(2):94-101.

196. Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Sep;28(9):1584-95.

197. Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res.* 2008 Jun 1;78(3):413-21.

198. Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B. Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J Immunol.* 1992 Jan 1;148(1):267-71.

199. Satterthwaite AB, Burn TC, Le Beau MM, Tenen DG. Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen. *Genomics.* 1992 Apr;12(4):788-94.

200. Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci.* 2008 Nov 15;121(Pt 22):3683-92.

201. Повещенко ОВ, Повещенко АФ, Коненков ВИ. Эндотелиальные прогениторные клетки и неоваскулогенез. *Успехи соврем. биологии.* 2012;132(10):69-76.

202. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells.* 2014 Jun;32(6):1380-9.

203. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 1997 Dec 15;90(12):5002-12.

204. Corbeil D, Fargeas CA, Huttner WB. Rat prominin, like its mouse and human orthologues, is a pentaspan membrane glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Jul 27;285(4):939-44.
205. Horn PA, Tesch H, Staib P, Kube D, Diehl V, Voliotis D. Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells. *Blood.* 1999 Feb 15;93(4):1435-7.
206. Corbeil D, Roper K, Hellwig A, Tavian M, Miraglia S, Watt SM, et al. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem.* 2000 Feb 25;275(8):5512-20.
207. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med.* 2005 Aug 25;353(8):811-22.
208. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003 Sep 15;63(18):5821-8.
209. Mizrak D, Brittan M, Alison M. CD133: molecule of the moment. *J Pathol.* 2008 Jan;214(1):3-9.
210. Shmelkov SV, St Clair R, Lyden D, Rafii S. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Apr;37(4):715-9.
211. Newman PJ. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest.* 1997 Jan 1;99(1):3-8.
212. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Dec;27(12):2514-23.
213. Sen S, McDonald SP, Coates PT, Bonder CS. Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond).* 2011 Apr;120(7):263-83.
214. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med.* 2005 Sep 8;353(10):999-1007.

215. Rossi P. Transcriptional control of KIT gene expression during germ cell development. *Int J Dev Biol.* 2013;57(2-4):179-84.
216. Matsui J, Wakabayashi T, Asada M, Yoshimatsu K, Okada M. Stem cell factor/c-kit signaling promotes the survival, migration, and capillary tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem.* 2004 Apr 30;279(18):18600-7.
217. Adhikari AS, Agarwal N, Wood BM, Porretta C, Ruiz B, Pochampally RR, et al. CD117 and Stro-1 identify osteosarcoma tumor-initiating cells associated with metastasis and drug resistance. *Cancer Res.* 2010 Jun 1;70(11):4602-12.
218. Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A, Miettinen M. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol.* 1998 Aug;11(8):728-34.
219. Luo L, Zeng J, Liang B, Zhao Z, Sun L, Cao D, et al. Ovarian cancer cells with the CD117 phenotype are highly tumorigenic and are related to chemotherapy outcome. *Exp Mol Pathol.* 2011 Oct;91(2):596-602.
220. Wojakowski W, Kucia M, Kazmierski M, Ratajczak MZ, Tendera M. Circulating progenitor cells in stable coronary heart disease and acute coronary syndromes: relevant reparatory mechanism? *Heart.* 2008 Jan;94(1):27-33.
221. Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood.* 2005 Jan 1;105(1):199-206.
222. Botto N, Rizza A, Colombo MG, Mazzone AM, Manfredi S, Masetti S, et al. Evidence for DNA damage in patients with coronary artery disease. *Mutat Res.* 2001 Jun 27;493(1-2):23-30.
223. Martinet W, Knaapen MW, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 2002 Aug 20;106(8):927-32.
224. Corral-Debrinski M, Shoffner JM, Lott MT, Wallace DC. Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart

disease. *Mutat Res.* 1992 Sep;275(3-6):169-80.

225. Ishizuka T, Yoshigae Y, Murayama N, Izumi T. Different hydrolases involved in bioactivation of prodrug-type angiotensin receptor blockers: carboxymethylenebutenolidase and carboxylesterase 1. *Drug Metab Dispos.* 2013 Nov;41(11):1888-95.

226. Imai T. Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006 Jun;21(3):173-85.

227. Xia L, Wang XX, Hu XS, Guo XG, Shang YP, Chen HJ, et al. Resveratrol reduces endothelial progenitor cells senescence through augmentation of telomerase activity by Akt-dependent mechanisms. *Br J Pharmacol.* 2008 Oct;155(3):387-94.

228. Wang XB, Zhu L, Huang J, Yin YG, Kong XQ, Rong QF, et al. Resveratrol-induced augmentation of telomerase activity delays senescence of endothelial progenitor cells. *Chin Med J (Engl).* 2011 Dec;124(24):4310-5.

229. Wang XB, Huang J, Zou JG, Su EB, Shan QJ, Yang ZJ, et al. Effects of resveratrol on number and activity of endothelial progenitor cells from human peripheral blood. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007 Nov;34(11):1109-15.

230. J G, Cq W, Hh F, Hy D, Xl X, Ym X, et al. Effects of resveratrol on endothelial progenitor cells and their contributions to reendothelialization in intima-injured rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006 May;47(5):711-21.

231. Paschalaki KE, Starke RD, Hu Y, Mercado N, Margariti A, Gorgoulis VG, et al. Dysfunction of endothelial progenitor cells from smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients due to increased DNA damage and senescence. *Stem Cells.* 2013 Dec;31(12):2813-26.

232. Lv J, Jia R, Yang D, Zhu J, Ding G. Candesartan attenuates Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis via TLR4/MyD88 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Feb 27;380(1):81-6.

233. Bai Y, Mao QQ, Qin J, Zheng XY, Wang YB, Yang K, et al. Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo*. *Cancer Sci.* 2010 Feb;101(2):488-

93.

234. Benitez DA, Pozo-Guisado E, Alvarez-Barrientos A, Fernandez-Salguero PM, Castellon EA. Mechanisms involved in resveratrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer-derived cell lines. *J Androl*. 2007 Mar-Apr;28(2):282-93.

235. Gurusamy N, Ray D, Lekli I, Das DK. Red wine antioxidant resveratrol-modified cardiac stem cells regenerate infarcted myocardium. *J Cell Mol Med*. 2010 Sep;14(9):2235-9.

236. Huang PH, Chen YH, Tsai HY, Chen JS, Wu TC, Lin FY, et al. Intake of red wine increases the number and functional capacity of circulating endothelial progenitor cells by enhancing nitric oxide bioavailability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Apr;30(4):869-77.

237. Chen M, Hamada M, Hiasa G, Suzuki M, Ikeda S, Hiwada K. An angiotensin II type 1 receptor blocker, candesartan, increases myocardial apoptosis in rats with acute ischemia-reperfusion. *Hypertens Res*. 2001 May;24(3):323-9.

238. Soga M, Kamal FA, Watanabe K, Ma M, Palaniyandi S, Prakash P, et al. Effects of angiotensin II receptor blocker (candesartan) in daunorubicin-induced cardiomyopathic rats. *Int J Cardiol*. 2006 Jun 28;110(3):378-85.

239. Singh VP, Le B, Khode R, Baker KM, Kumar R. Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis. *Diabetes*. 2008 Dec;57(12):3297-306.

240. Kao CL, Chen LK, Chang YL, Yung MC, Hsu CC, Chen YC, et al. Resveratrol protects human endothelium from H₂O₂-induced oxidative stress and senescence via SirT1 activation. *J Atheroscler Thromb*. 2010 Sep 30;17(9):970-9.

241. Imamura G, Bertelli AA, Bertelli A, Otani H, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: an insight with iNOS knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Jun;282(6):H1996-2003.

242. Fu ZD, Cao Y, Wang KF, Xu SF, Han R. [Chemopreventive effect of

resveratrol to cancer]. *Ai Zheng*. 2004 Aug;23(8):869-73. Chinese.

243. Chan AY, Dolinsky VW, Soltys CL, Viollet B, Baksh S, Light PE, et al. Resveratrol inhibits cardiac hypertrophy via AMP-activated protein kinase and Akt. *J Biol Chem*. 2008 Aug 29;283(35):24194-201.

244. Thandapilly SJ, Wojciechowski P, Behbahani J, Louis XL, Yu L, Juric D, et al. Resveratrol prevents the development of pathological cardiac hypertrophy and contractile dysfunction in the SHR without lowering blood pressure. *Am J Hypertens*. 2010 Feb;23(2):192-6.

245. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*. 2006 Dec 15;127(6):1109-22.

246. Menzies KJ, Singh K, Saleem A, Hood DA. Sirtuin 1-mediated effects of exercise and resveratrol on mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem*. 2013 Mar 8;288(10):6968-79.

247. Gliemann L, Schmidt JF, Olesen J, Bienso RS, Peronard SL, Grandjean SU, et al. Resveratrol blunts the positive effects of exercise training on cardiovascular health in aged men. *J Physiol*. 2013 Oct 15;591(20):5047-59.

248. Ferrara N, Rinaldi B, Corbi G, Conti V, Stiuso P, Boccuti S, et al. Exercise training promotes SIRT1 activity in aged rats. *Rejuvenation Res*. 2008 Feb;11(1):139-50.

249. Dela F, von Linstow ME, Mikines KJ, Galbo H. Physical training may enhance beta-cell function in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Nov;287(5):E1024-31.

250. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 1999 Mar;2(3):266-70.

251. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004 Jan 20;109(2):220-6.

252. Steiner S, Niessner A, Ziegler S, Richter B, Seidinger D, Pleiner J, et al. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2005 Aug;181(2):305-10.

253. Thijssen DH, Vos JB, Verseyden C, van Zonneveld AJ, Smits P, Sweep FC, et al. Haematopoietic stem cells and endothelial progenitor cells in healthy men: effect of aging and training. *Aging Cell*. 2006 Dec;5(6):495-503.

254. Evangelista FS, Brum PC, Krieger JE. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Braz J Med Biol Res*. 2003 Dec;36(12):1751-9.

255. Sharma S, Whyte G, Elliott P, Padula M, Kaushal R, Mahon N, et al. Electrocardiographic changes in 1000 highly trained junior elite athletes. *Br J Sports Med*. 1999 Oct;33(5):319-24.

256. ШИЛОВ ГН, Хоменко АИ, Евстигнеев ВВ. Основы разработки новых лекарственных средств. *Мед. новости*. 2009;(2):23-8.

257. Beliyeva A, Garmanchuk L. Candesartan, candesartan cilexetil, resveratrol and their combinations change the amount of endothelial progenitor cells, cytogenetic and cytokinetic parameters in adipose tissue cell culture. *Fundamental and applied researches in practice of leading scientific schools*. 2019;36(6):96-9. doi: 10.33531/farplss.2019.6.14.

258. Beliyeva A, Garmanchuk L. Changing in the number of CD117+ stem cells, cytogenetic and cytokinetic parameters under the using of candesartan, candesartan cilexetil and resveratrol *in vitro*. *Вісн. Київ. нац. ун-ту імені Тараса Шевченка. Серія. Біологія*. 2019;(3):54-7.

259. Beliyeva A. Analysis of the effect of resveratrol on the number of stem cells, cytokinetic and cytogenetic parameters *in vitro*. In: Ninth International Medical Congress of the Southeast European Medical Forum (SEEMF); 2018 Sep 6-9; Teslic, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina. Teslic; 2018. p. 52-3.

260. Beliyeva AV. Investigation of changes of cytokinetic and cytogenetic parameters in the experiment under the influence of candesartan, candesartan

cilexetil and resveratrol. In: Eighth International Medical Congress of the Southeast European Medical Forum (SEEMF); 2017 Sep 7-10; Athens, Greece. Athens; 2017. p. 46-7.

261. Beliaeva A. P1813. Candesartan cilexetil and extract of *Polygonum* sp. influence on the number of stem cells *in vitro*. Eur J Heart Fail. 2016;18(Suppl 1, Abstracts of the Heart Failure 2016 Conference; 2016 May 21-24; Florence, Italy):436.

262. Беляева АВ. Влияние кандесартана цилексетила и ресвератрола на число стволовых клеток с CD117+, CD34+, CD117+/CD34+, CD31+ в исследовании *in vitro*. В: Тез. III Междунар. форума русскоговорящих врачей Новая волна в медицине; 2015 Авг 6-8; Рига – Юрмала, Латвия. Юрмала; 2015. с.

263. Beliaeva A, Garmanchuk L. Morphofunctional parameters of bone marrow of mice under using of antihypertensive agent. Fundamental and applied researches in practice of leading scientific schools. 2020;42(6):4-6. doi: 10.33531/farplss.2020.6.1.

264. Беляева АВ, Афонин ВЮ. Влияние ресвератрола на изменения количества эндотелиальных прогениторных клеток, цитогенетических показателей и параметров клеточной кинетики в эксперименте. Новости медико-биол. наук. 2016;14(4):30-5.

265. Беляева АВ. Влияние ресвератрола и кандесартана на клеточный цикл, апоптоз и мобилизацию клеток CD117. Новости медико-биол. наук. 2013;8(3):64-8.

266. Beliaeva A. Candesartan cilexetil and resveratrol stimulate mobilization of CD117+ stem cells in C57Bl/6 mice. В: Матеріали Міжнар. наук.-практ. конф.-шк. студентів та молодих вчених BIOMED Talks – 2019; 2019 Жовт 15-17. Київ; 2019. с. 13-4.

267. Beliaeva A. P1983. Influence of candesartan cilexetil and resveratrol on changes in the number of stem cells, cytogenetic and cytokinetic parameters of bone marrow of mice. Eur J Heart Fail. 2018;20(Suppl S1, Abstracts of the Heart

Failure 2018 and the World Congress on Acute Heart Failure; 2018 May 26-29; Vienna, Austria):517.

268. Beliyeva AV, Darafeyenka IS, Vlasenka AK, Sazanov VB, Afonin VYu. The influence of candesartan and resveratrol on the mobilization of stem cells CD117 in C57Bl/6 mice. In: Abstracts book of the I International Scientific Conference of Students and PhD Students Cell Technology Week 2013; 2013 May 14-17; Kyiv. Kyiv; 2013. p. 28.

269. Beliyeva A. Impact of an angiotensin II receptor antagonist and antioxidant on count of stem cells and on morphofunctional parameters in animals. Fundamental and applied researches in practice of leading scientific schools. 2020;41(5):100-5. doi: 10.33531/farplss.2020.5.18.

Список публікацій здобувача:

1. Beliyeva A, Garmanchuk L. Morphofunctional parameters of bone marrow of mice under using of antihypertensive agent. *Fundamental and applied researches in practice of leading scientific schools.* 2020;42(6):4-6. doi: 10.33531/farplss.2020.6.1.
2. Beliyeva A. Impact of an angiotensin II receptor antagonist and antioxidant on count of stem cells and on morphofunctional parameters in animals. *Fundamental and applied researches in practice of leading scientific schools.* 2020;41(5):100-5. doi: 10.33531/farplss.2020.5.18.
3. Beliyeva A, Garmanchuk L. Candesartan, candesartan cilexetil, resveratrol and their combinations change the amount of endothelial progenitor cells, cytogenetic and cytokinetic parameters in adipose tissue cell culture. *Fundamental and applied researches in practice of leading scientific schools.* 2019;36(6):96-9. doi: 10.33531/farplss.2019.6.14.
4. Beliyeva A, Garmanchuk L. Changing in the number of CD117+ stem cells, cytogenetic and cytokinetic parameters under the using of candesartan, candesartan cilexetil and resveratrol *in vitro*. *Вісн. Київ. нац. ун-ту імені Тараса Шевченка. Серія. Біологія.* 2019;(3):54-7.
5. Беляева АВ, Афонин ВЮ. Влияние ресвератрола на изменения количества эндотелиальных прогениторных клеток, цитогенетических показателей и параметров клеточной кинетики в эксперименте. *Новости медико-биол. наук.* 2016;14(4):30-5.
6. Беляева АВ. Влияние ресвератрола и кандесартана на клеточный цикл, апоптоз и мобилизацию клеток CD117. *Новости медико-биол. наук.* 2013;8(3):64-8.
7. Beliyeva A. Candesartan cilexetil and resveratrol stimulate mobilization of CD117+ stem cells in C57Bl/6 mice. В: *Матеріали Міжнар.*

наук.-практ. конф.-шк. студентів та молодих вчених BIOMED Talks – 2019; 2019 ЖОВТ 15-17. Київ; 2019. с. 13-4.

8. Beliyeva A. Analysis of the effect of resveratrol on the number of stem cells, cytokinetic and cytogenetic parameters *in vitro*. In: Ninth International Medical Congress of the Southeast European Medical Forum (SEEMF); 2018 Sep 6-9; Teslic, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina. Teslic; 2018. p. 52-3.

9. Beliyeva A. P1983. Influence of candesartan cilexetil and resveratrol on changes in the number of stem cells, cytogenetic and cytokinetic parameters of bone marrow of mice. Eur J Heart Fail. 2018;20(Suppl S1, Abstracts of the Heart Failure 2018 and the World Congress on Acute Heart Failure; 2018 May 26-29; Vienna, Austria):517.

10. Beliyeva AV. Investigation of changes of cytokinetic and cytogenetic parameters in the experiment under the influence of candesartan, candesartan cilexetil and resveratrol. In: Eighth International Medical Congress of the Southeast European Medical Forum (SEEMF); 2017 Sep 7-10; Athens, Greece. Athens; 2017. p. 46-7.

11. Beliyeva A. P1813. Candesartan cilexetil and extract of Polygonum sp. influence on the number of stem cells *in vitro*. Eur J Heart Fail. 2016;18(Suppl 1, Abstracts of the Heart Failure 2016 Conference; 2016 May 21-24; Florence, Italy):436.

12. Беляева АВ. Влияние кандесартана цилексетила и ресвератрола на число стволовых клеток с CD117+, CD34+, CD117+/CD34+, CD31+ в исследовании *in vitro*. В: Тез. III Междунар. форума русскоговорящих врачей Новая волна в медицине; 2015 Авг 6-8; Рига – Юрмала, Латвия. Юрмала; 2015. с. 9.

13. Beliyeva AV, Darafeyenka IS, Vlasenka AK, Sazanov VB, Afonin VYu. The influence of candesartan and resveratrol on the mobilization of stem cells CD117 in C57Bl/6 mice. In: Abstracts book of the I International Scientific Conference of Students and PhD Students Cell Technology Week 2013; 2013 May 14-17; Kyiv. Kyiv; 2013. p. 28.