

О. В. Ганчева, Ю. М. Колесник, Ю. І. Воробецьва

Вплив пренатальної хронічної гіперглікемії на патерн експресії ізоформ NOS у міокарді лівого шлуночка серця щурів-самців препаубертатного віку

Запорізький державний медичний університет, Україна

Ключові слова: синтази оксиду азоту, гестаційний діабет, експресія.

Мета роботи – встановити особливості патерну експресії ізоформ NOS у поздовжньому та поперечному шарах міокарда лівого шлуночка серця щурів-самців (вік – 3 місяці), нащадків самиць із експериментальним гестаційним діабетом (ЕГД).

Матеріали та методи. Дослідження здійснили на 10 самцях щурів, нащадків самиць із нормальною вагітністю, та 10 нащадків самиць з ЕГД. Для аналізу стану системи монооксиду азоту в гістологічних зрізах міокарда окремо в поздовжньому та поперечному шарах досліджували експресію нейрональної, індукційної та ендотеліальної ізоформ синтази оксиду азоту (NOS). Для аналізу патерну експресії ізоформ ферменту NOS у 5 мкм гістологічних зрізах міокарда лівого шлуночка серця виконали комплекс імуноцитохімічних досліджень. Гістологічні зрізи розподіляли на 3 групи: першу групу зрізів інкубували з кролячими IgG до нейрональної синтази оксиду азоту (nNos) (Santa Cruz Biotechnology, USA) у розведенні 1:200; другу групу зрізів інкубували з кролячими IgG до ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNos) (Santa Cruz Biotechnology, USA) у розведенні 1:200; третю групу зрізів інкубували з мишачими IgG до індукційної синтази оксиду азоту (iNos), кон'югованої з FITC (Santa Cruz Biotechnology, USA), у розведенні 1:200. Аналіз зображення здійснили за допомогою пакета прикладних програм VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, ФРН). Мікробіографії міокарда лівого шлуночка, які отримано на мікроскопі AXIOSKOP, через високочутливу відеокамеру COHU 4922 (COHU Inc., США) вводилося в комп'ютерну систему цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Elektronik, ФРН).

Результати. Під час дослідження встановлено, що пренатальна гіперглікемія призводить до суттєвих змін експресії ізоформ NOS у міокарді лівого шлуночка у 3-місячних нащадків самок з ЕГД, при цьому вміст і розподіл ензимів залежить від типу ферменту та його локалізації в м'язових шарах. Для eNOS притаманно підвищення експресії та розподілу в обох шарах міокарда лівого шлуночка, для nNOS та iNOS навпаки характерним є зниження експресії ферменту в поперечних м'язах міокарда із підвищенням її в поздовжньому шарі.

Висновки. Порушення гомеостазу глюкози у плода в останньому триместрі вагітності змінює співвідношення патернів експресії ізоформ NOS у міокарді лівого шлуночка та порушує їхній баланс в окремих шарах, що, ймовірно, може стати причиною формування серцево-судинної патології у зрілому віці.

Патологія. – 2016. – №3 (38). – С. 14–19

Влияние пренатальной хронической гипергликемии на паттерн экспрессии изоформ NOS в миокарде левого желудочка сердца крыс-самцов препаубертатного возраста

О. В. Ганчева, Ю. М. Колесник, Ю. И. Воробецьва

Цель работы – установить особенности паттерна экспрессии изоформ NOS в продольном и поперечном слоях миокарда левого желудочка сердца крыс-самцов (возраст – 3 месяца), потомков самок с экспериментальным гестационным диабетом (ЭГД).

Материалы и методы. Исследования были проведены на 10 самцах крыс, потомков самок с нормальной беременностью и 10 потомках самок с ЭГД. Для анализа состояния системы монооксида азота в гистологических срезах миокарда отдельно в продольном и поперечном слоях исследовали экспрессию нейрональной, индуцибельной и эндотелиальной изоформ синтазы оксида азота (NOS). Для анализа паттерна экспрессии изоформ фермента NOS в 5 мкм гистологических срезах миокарда левого желудочка сердца проводили комплекс иммуноцитохимических исследований. Гистологические срезы распределяли на 3 группы: первую группу срезов инкубировали с кроличьими IgG к нейрональной синтазе оксида азота (nNos) (Santa Cruz Biotechnology, USA) в разведении 1:200; вторую группу срезов инкубировали с кроличьими IgG антителами к эндотелиальной синтазе оксида азота (eNos) (Santa Cruz Biotechnology, USA) в разведении 1:200; третью группу срезов инкубировали с мышиными IgG к индуцибельной синтазе оксида азота (iNos), конъюгированной с FITC (Santa Cruz Biotechnology, USA) в разведении 1:200. Микроизображение миокарда левого желудочка, которое было получено на микроскопе AXIOSKOP, через высокочувствительную видеокамеру COHU 4922 (COHU Inc., США) вводилось в компьютерную систему цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elektronik, ФРН).

Результаты. В ходе исследования установлено, что пренатальная гипергликемия приводит к существенным изменениям экспрессии изоформ NOS в миокарде левого желудочка у 3-месячных потомков самок с ЭГД, при этом содержание и распределение энзимов зависит от типа фермента и его локализации в мышечных слоях. Для eNOS характерно повышение экспрессии и распределения в обоих слоях миокарда левого желудочка, для nNOS и iNOS, наоборот, характерно снижение экспрессии фермента в поперечных мышцах миокарда с повышением её в продольном слое.

Выводы. Нарушение гомеостазу глюкозы у плода в последнем триместре беременности изменяет соотношение паттернов экспрессии изоформ NOS в миокарде левого желудочка и нарушает их баланс в отдельных слоях, что, вероятно, может стать причиной формирования сердечно-сосудистой патологии в зрелом возрасте.

Ключевые слова: синтазы оксида азота, гестационный диабет, экспрессия.

Патологія. – 2016. – №3 (38). – С. 14–19

The influence of the perinatal chronic hyperglycaemia on the pattern of NOS isoforms expression in left ventricle myocardium in male rats of pre-pubertal age

O. V. Gancheva, Yu. M. Kolesnyk, Yu. I. Vorodeeva

The aim of our study was to find out the features of the nitric oxide synthase (NOS) isoforms expression in longitudinal and transversal layers of the myocardium of the left ventricle in male rats of 3 months, which are descendants of female rats with experimental gestational diabetes (EGD).

Materials and methods. Study was carried out on 10 male rats descendants of female rats with normal course of pregnancy and 10 descendants of female rats with EGD. We evaluated the expression of neuronal, endothelial and inducible isoforms of NOS in histological sections both of transversal and longitudinal layers of the myocardium of left ventricle. With the aim to analyze the pattern of the NOS isoforms expression in 5 μ m histological slices of left ventricle myocardium we have carried out a complex of histochemical assays. Slices were allocated to 3 groups: 1st one was incubated with rabbit IgG to neuronal NOS (Santa Cruz Biotechnology, USA) in dilution of 1:200; 2nd group underwent the incubation with rabbit IgG to endothelial NOS (eNos) (Santa Cruz Biotechnology, USA) in dilution 1:200; 3rd group was incubated with mice IgG to inducible NOS (iNos) conjugated with FITC (Santa Cruz Biotechnology, USA) in dilution of 1:200. The analysis of images was carried out with VIDAS-2.5 application package (Kontron Elektronik, Germany). Microimages of the left ventricle myocardium obtained with AxioScope (Carl Zeiss, Germany) and COHU 4922 (COHU Inc., USA) camera were processed in the system of digital image analysis VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Germany).

Results. In the study we have found that prenatal hyperglycaemia leads to the significant changes of the expression of NOS isoforms in the myocardium of left ventricle in male rats descendants of females with EGD, and the contain and the allocation of these enzymes are dependent both on type of the enzyme and its location in muscular layers. For eNOS the increase of the expression and the allocation in both transversal and longitudinal layers was typical, and for nNOS and iNOS we have found the significant decrease of the expression in transversal layers and the significant increase in longitudinal layers.

Conclusion. We believe, the glucose homeostasis violation in foetus during the last trimester of the pregnancy changes the ratio of the NOS isoforms expression in the left ventricle myocardium and affects the balance of them in different layers, which could be a reason of the cardiovascular pathology development in adulthood.

Key words: Nitric Oxide Synthase, Gestational Diabetes, Expression.

Pathologia 2016; №3 (38): 14–19

Зміни в роботі серцево-судинної системи дуже тісно пов'язані з особливостями мікроциркуляції та іннервації кардіоміоцитів. Для адекватного функціонування судин міокарда, скоротливості кардіоміоцитів і генерації електричного імпульсу пейсмейкерними клітинами при фізіологічних або патологічних станах важливу роль приділяють локальному утворенню NO та спроможності механізмів трансдукції його сигналів безпосередньо клітинам [1,2].

Однак слід зауважити: функціональна значущість NO, що продукується різними ізоформами NOS, істотно відрізняється. Так, під час дослідження особливостей ефектів NO залежно від типу ізоформи ферменту, який індукує його утворення, встановлено, що в мишей, які позбавлені nNOS, через 1–3 дні після оклюзії серединної церебральної артерії розмір зони некрозу та виразність неврологічних порушень були значно меншими, ніж у тварин із нормальною експресією цієї ізоформи. Водночас уведення їм інгібітора eNOS збільшувало область пошкодження. Дослідники зробили припущення, що NO, котрий продукується за участю nNOS, посилює тяжкість ураження при ішемії мозку, тоді як синтезований оксид азоту eNOS зменшує ступінь пошкодження клітин [3].

Сьогодні достатньо фактів про роль NO в розвитку багатьох патологій. Так, встановлено, що з порушенням його біосинтезу та метаболізму пов'язані такі захворювання, як ішемічна хвороба серця, інфаркт міокарда, артеріальна гіпертензія, бронхіальна астма, нейродегенеративні захворювання (хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона), цукровий діабет, метаболічний X-синдром [4,5]. Той незаперечний факт, що при цілому ряді захворювань, у патогенезі розвитку яких лежать порушення

вуглеводного та жирового обмінів, виявлені зміни в системі монооксиду азоту [6], слугує вагомим підґрунтям можливого зв'язку пренатальної гіперглікемії із порушенням у системі монооксиду азоту та формуванням захворювань у зрілому віці.

Велика кількість накопичених фактів про різноспрямованість ефектів монооксиду азоту при різних механізмах його утворення [3], залежність клінічних проявів від типу ізоформи ферменту [7], який відіграє головну роль у механізмах синтезу NO, дали змогу припустити як одну з можливих причин формування патології серцево-судинної системи в нащадків самок з експериментальним гестаційним діабетом (ЕГД) [8] порушення співвідношення експресії ізоформ NOS у серцевому м'язі.

Мета роботи

Встановити особливості патерну експресії ізоформ NOS у поздовжньому та поперечному шарах міокарда лівого шлуночка серця щурів-самців – нащадків самиць з експериментальним гестаційним діабетом.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконали на 20 самцях щурах лінії Wistar у 3-місячному віці, яких поділили на дві групи. До першої ввійшли 10 самців-щурів, нащадків самиць із нормальною вагітністю, до другої – 10 нащадків самиць з ЕГД [9].

Експериментальну частину дослідження виконували в суворій відповідності до національних «Спільних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), що узгоджуються з директивою Ради 2010/63EU Європейського парламенту й Ради від 22 вересня

2010 року щодо захисту тварин, яких використовують для наукових цілей (Council Directive 2010/63EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes).

Для аналізу патерну експресії ізоформ ферменту NOS у 5 мкм гістологічних зрізах міокарда лівого шлуночка серця здійснили комплекс імуноцитохімічних досліджень. Гістологічні зрізи розподіляли на 3 групи: першу групу зрізів інкубували з кролячими IgG до нейрональної синтази оксиду азоту (nNos) (Santa Cruz Biotechnology, USA) у розведенні 1:200; другу групу зрізів інкубували з кролячими IgG до ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNos) (Santa Cruz Biotechnology, USA) у розведенні 1:200; третю групу зрізів інкубували з мишачими IgG до індукційної синтази оксиду азоту (iNos), кон'югованої з FITC (Santa Cruz Biotechnology, USA) у розведенні 1:200.

Скельця з нанесеними первинними антитілами тримали в полімерних фіксаторах при (T= +4 °C, 24 години). Потім тричі по 10 хв відмивали фосфатним буфером 0,1 М (рН 7,2). На другому етапі на скельця першої та другої групи наносили вторинні мишачі IgG до повної молекули IgG кроля, кон'юговані з FITC (Santa Cruz Biotechnology, USA) у розведенні 1:200 і тримали при (T= +37 °C, 45 хв), промивали тричі по 10 хв фосфатним буфером та укладали в суміш гліцерин/фосфатний буфер (9:1). Скельця з третьої групи після триразового промивання у фосфатному буфері укладали в суміш гліцерин/фосфатний буфер (9:1).

Мікрозображення міокарда лівого шлуночка, які отримали на мікроскопі AXIOSKOP, через високочутливу відеокамеру COHU 4922 (COHU Inc., США) вводилося в комп'ютерну систему цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Elektronik, ФРН) із використанням високоемісійного світлофільтра 38 HE (Zeiss, ФРН) при спектрі збудження 450–490 нм, спектрі емісії – 500–550 нм. При цьому виключався ефект «вигоряння» препарату, що пов'язаний із поступовим руйнуванням молекули FITC під впливом тривалого ультрафіолетово

опромінення. Введене зображення з імунофлуоресценцією оцифровували за денситометричною шкалою з 256 градаціями сірого кольору. Аналіз зображення здійснювали за допомогою пакета прикладних програм VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, ФРН).

Зображення, що отримали під час дослідження міокарда лівого шлуночка, оцифровували в автоматичному режимі, в ході якого визначали: площу матеріалу, імунореактивного (ІМ) до одної з ізоформ NOS (мкм²), концентрацію та вміст ферменту в площі, яку займав імунореактивний матеріал до відповідної ізоформи NOS (Од_{ІФ}). Аналіз експресії ізоформ ферменту в міокарді здійснювали пошарово, окремо в поперечному та поздовжньому шарах (рис. 1).

Результати статистично опрацювали методом варіаційної статистики “Statistica 11.0” (StatSoft Inc., США) за загальноприйнятою методикою. Характер розподілу показників перевіряли з використанням критерію Шапіро-Уїлка. Для порівняння груп із нормальним розподілом даних використовували t-критерій Стюдента. Дані наведені у вигляді середнього арифметичного та стандартної похибки репрезентативності середнього значення. Статистично значущими вважали відмінності при $p_{st} < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Дослідження експресії ізоформ ферменту NOS у щурів контрольної групи дало можливість встановити деякі особливості патерну ензимів в окремих шарах міокарда лівого шлуночка. Так, довели, що показники вмісту ІМ до всіх трьох ізоформ у поздовжніх волокнах були на 7–8 % ($p_{st} < 0,05$) нижчими, ніж у поперечних. Площа ІМ до eNOS вірогідно не відрізнялась в обох шарах міокарда, тоді як до nNOS та iNOS була вірогідно на 15 % ($p_{st} < 0,05$) і 13 % ($p_{st} < 0,05$) нижчою в поперечному шарі міокарда (табл. 1).

У щурів-самців, нащадків самиць з ЕГД, аналіз цифрових даних експресії ізоформ NOS у шарах міокарда показав порушення встановленої залежності патернів ферментів, що була притаманна контрольній групі.

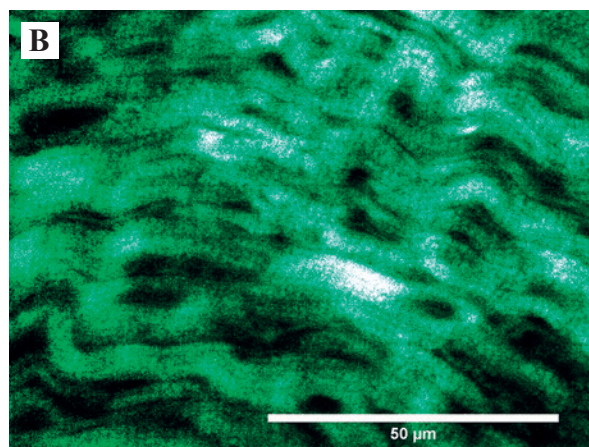
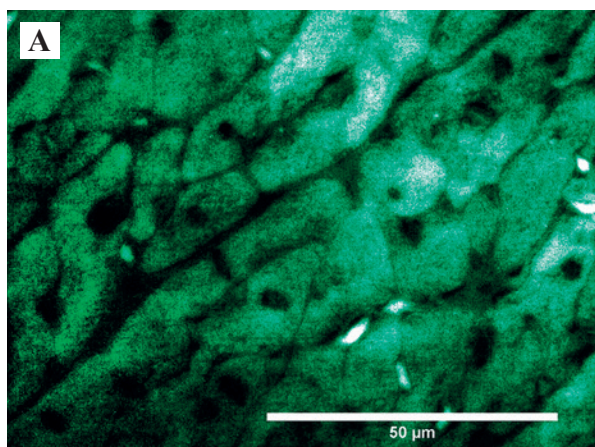


Рис. 1. Поперечний (А) та поздовжній (В) шари міокарда лівого шлуночка серця щура. Реакція непрямой імунофлуоресценції з антитілами до eNOS. Ок. х40.

Експресія eNOS, nNOS та iNOS у поперечних та поздовжніх волокнах шарів міокарда лівого шлуночка серця у 3-місячних щурів-самців експериментальних груп (M±m)

Експериментальна група/ шари міокарда	eNOS		nNOS		iNOS	
	Відносна площа IPM, %	Вміст IPM, Од. _ф	Відносна площа IPM, %	Вміст IPM, Од. _ф	Відносна площа IPM, %	Вміст IPM, Од. _ф
Контроль, n=15; поперечні волокна міокарда	243,17±5,47	60,75±0,64	373,15±7,04	60,33±0,61	404,50±11,66	64,01±0,84
Контроль, n=15; поздовжні волокна міокарда	229,9±4,98	56,12±0,44 ¹	315,84±9,73 ¹	55,46±0,73 ¹	352,08±8,10 ¹	59,36±0,69 ¹
Самці ЕГД, n=15; поперечні волокна міокарда	374,61±9,44 ²	80,14±0,74 ²	265,47±5,79 ²	59,88±0,98 ²	258,04±6,29 ²	58,42±0,85 ²
Самці ЕГД, n=15; поздовжні волокна міокарда	327,8±4,3 ^{1,2}	67,72±1,01 ^{1,2}	404,39±12,54 ^{1,2}	69,28±0,87 ^{1,2}	374,07±12,39	62,91±0,92 ^{1,2}

Примітки: ¹ – вірогідні відмінності параметрів ($p_{St} < 0,05$) усередині експериментальної групи; ² – вірогідні відмінності параметрів ($p_{St} < 0,05$) щодо відповідних показників контрольної групи.

Так, якщо до показників експресії eNOS відзначалось збереження тенденції – вміст IPM був нижчим у поздовжньому шарі міокарда, однак площа IPM була більшою в поперечних волокнах. На цьому подібність експресії eNOS значенням контролю завершилась. Встановлено, що відносна площа IPM до eNOS у поперечних волокнах міокарда на 54 % ($p_{St} < 0,05$) і поздовжніх на 42,6 % ($p_{St} < 0,05$), перевищували показники контролю, вміст ферменту на 32 % ($p_{St} < 0,05$) у поперечних і на 20,6 % ($p_{St} < 0,05$) у поздовжніх був вищим, ніж у контролі (табл. 1).

Щодо експресії nNOS та iNOS нами також відзначено збереження деяких закономірностей: якщо порівнювати особливості експресії цих ферментів у шарах міокарда, як і в контролі, встановлено більш високу площу розподілу ферментів у поздовжньому шарі, однак при цьому вміст ферментів був, навпаки, нижчим у поперечному м'язі, а не в поздовжньому. При цьому відносна площа IPM до nNOS та iNOS у поздовжніх волокнах була на 15,4 % ($p_{St} < 0,05$) та 56 % ($p_{St} < 0,05$), вміст на 8,2 % ($p_{St} < 0,05$) і 9 % ($p_{St} < 0,05$) нижчими, ніж у поперечному шарі (табл. 1).

Порівнюючи показники експресії відповідного ферменту із показниками контрольної групи, встановили, що відносна площа IPM до nNOS у поздовжньому шарі перевищувала значення контролю на 28 % ($p_{St} < 0,05$), а вміст – на 25 % ($p_{St} < 0,05$), тоді як у поперечному – спостерігалось зниження експресії nNOS на 29 % ($p_{St} < 0,05$) та 8,1 % ($p_{St} < 0,05$) площі IPM і вмісту ферменту.

Експресія iNOS у шарах міокарда нащадків самиць з ЕГД також мала свої відмінності: так, встановлено вірогідне зниження патерну експресії ферменту в поперечних м'язах міокарда, при цьому відносна площа IPM знижувалась вірогідно на 56 % ($p_{St} < 0,05$), а вміст iNOS – на 9 % ($p_{St} < 0,05$). При цьому в поздовжніх волокнах спостерігалось зворотна залежність, відзначений вірогідно вищий показник вмісту на 6 % ($p_{St} < 0,05$) IPM до iNOS (табл. 1).

Дуже інформативним для нас став розрахунковий коефіцієнт співвідношення показників експресії ферментів

в окремих шарах міокарда. При цьому доведено, що в щурів контрольної групи співвідношення вмісту IPM до всіх трьох ізоформ становило 1:0,92 у поперечних і поздовжніх шарах, площа IPM – 1:1 до eNOS, 1:0,85 до nNOS та 1:0,87 до iNOS, що, на нашу думку, свідчить про баланс розподілу ензимів, необхідний для адекватної відповіді ферментної системи на фізіологічний або патологічний стимул. Однак у щурів-самців, нащадків самиць з ЕГД, які перенесли пренатальну хронічну гіперглікемію, встановлено порушення цих співвідношень, особливо для показників експресії nNOS та iNOS. Так, у шарах міокарда співвідношення вмісту IPM відповідно до eNOS, nNOS та iNOS становило 1:0,84; 1:1,22 та 1:1,08, площі IPM – 1:0,87; 1:1,52 та 1:1,45.

Можна припустити, що одним із можливих механізмів реалізації внутрішньоутробного впливу високого рівня глюкози на плід, який у нашому дослідженні призвів до порушення експресії ізоформ NOS, була епімутація [10]. Епігенетична мінливість – це оборотні та не оборотні зміни експресії генів, які не пов'язані із перебудовою структури самого генетичного матеріалу. Сьогодні хронічну пренатальну гіперглікемію розглядають як важливу епігенетичну подію, що відбулась на ранніх етапах життя організму, яка здатна впливати на функцію його клітин і надалі шляхом реалізації фенотипічних програм [11]. При цьому індуковані зміни епігенетичної інформації впливають на активацію тих чи інших генів у клітинах і призводять до зміни експресії білків і ферментів у подальшому житті.

У 2004 році П. Глюкман і М. Хансон [12] запропонували «Гіпотезу невідповідності» («Mismatch hypothesis»), згідно з якою в організмі, що розвивається в умовах змінених констант метаболізму або балансу гормонів, на епігенетичному рівні відбувається прогностична адаптація до майбутніх умов проживання, котрі очікуються після народження. Якщо прогноз підтверджується – це збільшує шанси організму на виживання у світі, де йому доведеться жити, якщо ні – адаптація стає дезадаптацією, тобто хворобою. Враховуючи важливий та доказаний факт, що в лабораторних тварин в експерименті

репродуктивні та метаболічні порушення найчастіше виникають та передаються за епігенетичним механізмом [13,14], можна припустити, що встановлені нами в нащадків самиць з ЕГД зміни в системі монооксиду азоту, зокрема балансу розподілу її ізоформ ферменту NOS в міокарді, – не єдине порушення, тобто передбачає наявність цілого симптомокомплексу розладів.

Висновки

1. Пренатальна гіперглікемія призводить до суттєвих змін експресії ізоформ NOS у міокарді лівого шлуночка, при цьому вміст і розподіл ензимів залежить від типу ферменту та його локалізації в м'язових шарах.

2. Для eNOS притаманно підвищення експресії та

розподілу в обох шарах міокарда лівого шлуночка, для nNOS та iNOS, навпаки, характерно зниження експресії ферменту в поперечних м'язах міокарда із підвищенням її в поздовжньому шарі.

Перспективи подальших досліджень полягають в тому, що встановлений взаємозв'язок дисбалансу експресії ізоформ синтази монооксиду азоту в окремих шарах міокарда лівого шлуночка серця в препубертатному віці із пренатальною гіперглікемією вимагає подальшого вивчення особливостей експресії ферменту в більш віддалені вікові періоди та на тлі сформованої ендокринної патології.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Список літератури

1. Inducible NO synthase is constitutively expressed in porcine myocardium and its level decreases along with tachycardia-induced heart failure / U. Paslawska, L. Kiczak, J. Bania et al. // *Cardiovasc Pathol.* – 2016. – Vol. 25. – № 1. – P. 3-11.
2. Modulatory role of nitric oxide in cardiac performance / S. Smiljić, V. Nestorović, S. Savić // *Med Pregl.* – 2014. – Vol. 67. – № 9–10. – P. 345–352.
3. Nitric oxide production during cerebral ischemia and reperfusion in eNOS- and nNOS-knockout mice / Y. Ito, T. Ohkubo, Y. Asano et al. // *Curr Neurovasc Res.* – 2010. – Vol. 7. – №1. – P. 23–31.
4. Effects of simvastatin on the expression of inducible nitric oxide synthase and brain-derived neurotrophic factor in a lipopolysaccharide-induced rat model of Parkinson disease / W. Tan, C. Xue-bin, Z. Tian et al. // *Int J Neurosci.* – 2016. – Vol. 126. – №3. – P. 278–286.
5. Oxidative Stress Induced Mitochondrial Failure and Vascular Hypoperfusion as a Key Initiator for the Development of Alzheimer Disease / G. Aliev, H.H. Palacios, E. Gasimov et al. // *Pharmaceuticals (Basel).* – 2010. – Vol. 3. – №1. – P. 158–187.
6. Oxidative stress and nitric oxide are increased in obese children and correlate with cardiometabolic risk and renal function / L. Correia-Costa, T. Sousa, M. Morato et al. // *Br J Nutr.* – 2016. – Vol. 116. – №5. – P. 805–815.
7. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins / C.T. Tran, M.F. Fox, P. Vallance et al. // *Genomics.* – 2000. – Vol. 68. – №1. – P. 101–105.
8. Особливості варіабельності серцевого ритма у крыс препубертатного візраста, перенесших внутрітробну гіперглікемію / О.В. Ганчева, О.В. Мельникова, Ю.І. Воробєєва і др. // *Клінічна та експериментальна патологія.* – 2012. – Т. 9. – №3(41). – Ч. 1. – С. 30–32.
9. Пат. 17281 Україна, МПК G09 №23/28. Спосіб моделювання гестаційного діабету у щурів лінії Вістар для вивчення його наслідків для нащадків / Ю.М. Колесник, І.Ф. Белнічев, А.В. Абрамов та ін. – №и 2006 03504; заявл. 31.03.06; опубл. 15.09.06 // *Бюлетень.* – №9.
10. Phenotypic spectrum and extent of DNA methylation defects associated with multilocus imprinting disturbances / S. Bens, J. Kolarova, J. Beygo et al. // *Epigenomics.* – 2016. – Vol. 8. – №6. – P. 801–816.
11. Yan J. Gestational diabetes mellitus, programing and epigenetics / J. Yan, H. Yang // *J Matern Fetal Neonatal Med.* – 2014. – Vol. 27. – №12. – P. 1266–1269.
12. Gluckman P.D. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease / P.D. Gluckman, M.A. Hanson // *Science.* – 2004. – Vol. 305. – P. 1733–1736.

13. Fetal programming of metabolic disorders / M.R. Varadinova, R. Metodieva, N. Boyadzheva // *Akush Ginekol (Sofia).* – 2015. – Vol. 54. – №8. – P. 32–36.
14. Prenatal synthetic glucocorticoid treatment changes DNA methylation states in male organ systems: multigenerational effects / A. Crudo, S. Petropoulos, V.G. Moisiadis et al. // *Endocrinology.* – 2012. – Vol. 153. – №7. – P. 3269–3283.

References

1. Paslawska, U., Kiczak, L., Bania, J., Paslawski, R., Janiszewski, A., Dziegiel, P. et al. (2016). Inducible NO synthase is constitutively expressed in porcine myocardium and its level decreases along with tachycardia-induced heart failure. *Cardiovascular Pathology*, 25(1), 3–11. doi: 10.1016/j.carpath.2015.08.003.
2. Smiljić, S., Nestorović, V., & Savić, S. (2014). Modulatory role of nitric oxide in cardiac performance. *Med Pregl.*, 67(9–10), 345–52.
3. Ito, Y., Ohkubo, T., Asano, Y., Hattori, K., Shimazu, T., Yamazato, M. et al. (2010). Nitric Oxide Production during Cerebral Ischemia and Reperfusion in eNOS- and nNOS-Knockout Mice. *CNR*, 7(1), 23–31.
4. Tan, W., Xue-bin, C., Tian, Z., Xiao-wu, C., Pei-pei, H., Zhibin, C., & Bei-sha, T. (2016). Effects of simvastatin on the expression of inducible nitric oxide synthase and brain-derived neurotrophic factor in a lipopolysaccharide-induced rat model of Parkinson disease. *International Journal Of Neuroscience*, 126(3), 278–286. doi: 10.3109/00207454.2015.1012758.
5. Aliev, G., Palacios, H., Gasimov, E., Obrenovich, M., Morales, L., Leszek, J. et al. (2010). Oxidative Stress Induced Mitochondrial Failure and Vascular Hypoperfusion as a Key Initiator for the Development of Alzheimer Disease. *Pharmaceuticals*, 3(1), 158–187. doi: 10.3390/ph3010158.
6. Correia-Costa, L., Sousa, T., Morato, M., Cosme, D., Afonso, J., Areias, J. et al. (2016). Oxidative stress and nitric oxide are increased in obese children and correlate with cardiometabolic risk and renal function. *British Journal Of Nutrition*, 116(05), 805–815. doi: 10.1017/S0007114516002804.
7. Tran, C., Fox, M., Vallance, P., & Leiper, J. (2000). Chromosomal Localization, Gene Structure, and Expression Pattern of DDAH1: Comparison with DDAH2 and Implications for Evolutionary Origins. *Genomics*, 68(1), 101–105. doi: 10.1006/geno.2000.6262.
8. Gancheva, O., Melnikova, O., Vorobeeva, Y., et al. (2012). Osobennosti variabel'nosti serdechnogo ritma u krysv prepupertatnogo vozrasta, perenesshykh vnutritrobnuyu giperglikemiyu [Features of the heart rate variability in rats of pubertal age, which were undergone intrauterine hyperglycaemia]. *Klinichna ta eksperymentalna patolohiia*, 9, 3(41), 30–32. [in Ukrainian].

9. Kolesnyk, Y., Belienichev, I., Abramov, A., Hancheva, O., Kamyshnyi, O., & Hrekova, T. (patentee) (2006). Pat. 17281 Ukraine, MPK G09 №23/28. Sposib modeliuvannia hestatsiinoho diabetu u shchuriv linii Vistar dlia vyvchennia yoho naslidkiv dlia nashchadkiv [Patent 17281 of Ukraine MPK G09 №23/28. Method of the modelling of gestational diabetis in Wistar rats with aim to study its consequences in descendants]. *Biuletен*, 9. [in Ukrainian].
10. Bens, S., Kolarova, J., Beygo, J., Buiting, K., Caliebe, A., Eggermann, T. et al. (2016). Phenotypic spectrum and extent of DNA methylation defects associated with multilocus imprinting disturbances. *Epigenomics*, 8(6), 801–816. doi: 10.2217/epi-2016-0007.
11. Yan, J. & Yang, H. (2013). Gestational diabetes mellitus, programing and epigenetics. *The Journal Of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 27(12), 1266–1269. doi: 10.3109/14767058.2013.853733.
12. Gluckman, P., & Hanson, M. A. (2004). Living with the Past: Evolution, Development, and Patterns of Disease. *Science*, 305(5691), 1733–1736. doi: 10.1126/science.1095292.
13. Varadinova, M., Metodieva, R., & Boyadzhieva, N. (2015). Fetal programming of metabolic disorders. *Akush Ginekol (Sofia)*, 54(8), 32–36.
14. Crudo, A., Petropoulos, S., Moisiadis, V., Iqbal, M., Kostaki, A., Machnes, Z. et al. (2012). Prenatal Synthetic Glucocorticoid Treatment Changes DNA Methylation States in Male Organ Systems: Multigenerational Effects. *Endocrinology*, 153(7), 3269–3283. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2011-2160>. doi: 10.1210/en.2011-2160.

Відомості про авторів:

Ганчева О. В., д-р мед. наук, професор каф. патологічної фізіології, Запорізький державний медичний університет, Україна, E-mail: gancheva_olga@mail.ru.

Колесник Ю. М., д-р мед. наук, професор, зав. каф. патологічної фізіології, ректор Запорізького державного медичного університету, Україна.

Вородеева Ю. І., асистент каф. терапевтичної, ортопедичної та дитячої стоматології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Сведения об авторах:

Ганчева О. В., д-р мед. наук, профессор каф. патологической физиологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина, E-mail: gancheva_olga@mail.ru.

Колесник Ю. М., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. патологической физиологии, ректор Запорожского государственного медицинского университета, Украина.

Вородеева Ю. И., ассистент каф. терапевтической, ортопедической и детской стоматологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Information about authors:

Gancheva O. V., MD, PhD, DSci, Professor of the Department of Pathological Physiology of Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine, E-mail: gancheva_olga@mail.ru.

Kolesnyk Yu. M., MD, PhD, DSci, Professor, Rector of Zaporizhzhia State Medical University, Head of the Department of Pathological Physiology of Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Vorodeeva Yu. I., Assistant of the Department of Therapeutic, Orthopedic and Pediatric Dentistry of Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Надійшла в редакцію 17.10.2016 р.