

На правах рукописи

МОВЕНКО АННА ВАДИМОВНА



**МОРФОГЕНЕЗ СКЕЛЕТА ПРИ ИЗБЫТОЧНОМ
УПОТРЕБЛЕНИИ КОФЕИНА И КОРРЕКЦИИ МЕКСИДОЛОМ
(анатомо-экспериментальное исследование)**

Специальность 14.03.01 –Анатомия человека
(медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Луганск - 2023

Работа выполнена на кафедре анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии ФГБОУ ВО ЛГМУ им. Свт. Луки Минздрава России

Научный руководитель: **Лузин Владислав Игоревич**
доктор медицинских наук, профессор,
ФГБОУ ВО ЛГМУ им. Свт. Луки
Минздрава России, заведующий кафедрой
анатомии человека, оперативной хирургии
и топографической анатомии

Официальные оппоненты: **Климочкина Елена Михайловна**
доктор медицинских наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Луганский государственный
педагогический университет», заведующая
кафедрой лабораторной диагностики,
анатомии и физиологии
(г. Луганск, РФ)

Удочкина Лариса Альбертовна
доктор медицинских наук, доцент, ФГБОУ
ВО Астраханский ГМУ Минздрава России,
заведующая кафедрой анатомии
(г. Астрахань, РФ)

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»
Минобрнауки Российской Федерации
(г. Симферополь, РФ)

Защита диссертации состоится «29» декабря 2023 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.005.01 в ФГБОУ ВО ЛГМУ им. Свт. Луки Минздрава России по адресу: 291045, РФ, ЛНР, г.о. Луганский, г. Луганск, кв. 50-летия обороны Луганска, д. 1г.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО ЛГМУ им. Свт. Луки Минздрава России (291045, РФ, ЛНР, г.о. Луганский, г. Луганск, кв. 50-летия обороны Луганска, д. 1г, библиотека) или на сайте <https://lgmu.ru/nauchnaya-rabota/dissertacionnyj-sovet>

Автореферат разослан «__» ноября 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 001.005.01
кандидат медицинских наук, доцент



И.А. Белик

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Кофеин (1,3,7-триметилксантин) - природный алкалоид, относящийся к семейству метилксантинов (Ekeuku S.O. et al., 2021). Основными источниками кофеина являются чайные листья, орехи колы, а также кофе и какао-бобы (Huang C.-C. et al., 2016).

Кофеин не имеет питательной ценности. Тем не менее, это одно из наиболее часто потребляемых веществ со средним ежедневным потреблением в среднем 120 мг (Magalhães R. et al., 2021). Он присутствует в напитках (например, кофе, чай, безалкогольных напитках и энергетических напитках), продуктах питания (например, какао и шоколаде) (de Sanctis V. et al., 2017; Trapp G. et al., 2020) и некоторых стимуляторах и используется в качестве вспомогательного средства для увеличения всасывания некоторых лекарств (Ekeuku S.O. et al., 2021). Исследования показывают, что кофе (60-75%) и чай (15-30%) являются основными источниками кофеина для взрослых, в то время как среди детей шоколад и безалкогольные напитки являются основными источниками потребления (O'Neill C.E. et al., 2016).

Как только кофеин достигает различных тканей-мишеней, он проявляет свою биологическую активность с помощью различных механизмов. Наиболее важным механизмом является антагонизм аденозиновых рецепторов (Shaposhnikov S. et al., 2018). Однако кофеин также воздействует на другие рецепторы, такие как рецептор эпидермального фактора роста (Ösz V.-E. et al., 2022) и рецепторы витамина D (Shaposhnikov S. et al., 2018). Кофеин также повышает внутриклеточный уровень циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) (Barcelos R.P. et al., 2014). Более того, в некоторых тканях кофеин увеличивает экспрессию мРНК индуцируемого митогеном гена-6 (Shen H. et al., 2016), но снижает экспрессию мРНК TGF- β . Другим важным механизмом действия этого алкалоида является то, что он отрицательно влияет на всасывание железа, но увеличивает выведение Ca^{2+} и некоторых витаминов группы B (Gleason J.L. et al., 2021).

С другой стороны, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что кофеин и даже кофе могут стать вредными в определенной концентрации (Cabral J.P. et al., 2022). Имеются сведения, что для взрослого здорового человека 400 мг/сут составляет порог токсичности кофеина, во время беременности этот показатель уменьшается в 2 раза, для подростков в 4 раза, а для детей составляет 2,5 мг/кг/сут (Czajkowski N., 2021). Хроническое и избыточное употребление кофеина у взрослых, которое превышает 600 мг/сут (равно пяти чашкам кофе) может негативно влиять на организм и вызывать такие симптомы, как

раздражительность, нервозность, бессоницу, повышенный диурез, аритмию, гиперкальциурию, тахипноэ, женское бесплодие, желудочно-кишечные расстройства (Chen J.Q.A. et al., 2020). Также уже имеются сведения с экспериментов, которые проводились *in vitro* и *in vivo*, что избыточное употребление кофеина имеет негативное влияние для опорно-двигательного аппарата, в том числе на гиалиновый хрящ и продольный рост костей (Cui A. et al., 2023).

Степень разработанности проблемы исследования. На данный момент имеются сведения о негативном воздействии высоких доз кофеина на различные системы организма, а также непосредственно на опорно-двигательный аппарат (Del Coso J. et al., 2020; Ekeuku S.O. et al., 2021; Gleason J.L. et al., 2021; Cui A. et al., 2023).

Проведен ряд исследований, в которых описано негативное влияние кофеина на продольный рост костей и структурное состояние гиалинового хряща (Choi H. et al., 2017). Имеется ряд исследований доказывающих, что избыточное употребление кофеина нарушает процессы всасывания кальция в кишечнике (Guss J.D. et al., 2017), индуцирует апоптоз остеобластов (Guillán-Fresco M. et al., 2021) и стимулирует остеокластогенез (Choi H. et al., 2017). Однако, комплексные данные о нарушении морфогенеза скелета при употреблении избыточных доз кофеина биологическими объектами различного возраста и возможностях их коррекции в доступной литературе отсутствуют.

Объект исследования: морфогенез костной системы у беспородных белых крыс-самцов различного возраста при воздействии экзогенных факторов и его коррекции.

Предмет исследования: структурные преобразования костей скелета (большеберцовой, тазовой и второго поясничного позвонка) различного возраста при воздействии избыточных доз кофеина и их коррекции мексидолом на различных сроках наблюдения.

Цель исследования - установить в эксперименте на белых лабораторных крысах-самцах различного возраста влияние избыточных доз кофеина на морфогенез костей скелета и обосновать возможность коррекции выявленных изменений мексидолом.

Задачи исследования:

1. Исследовать в эксперименте возрастные особенности роста, строения и формообразования костей скелета (большеберцовой, тазовой и второго поясничного позвонка) крыс в условиях избыточного употребления кофеина.

2. Изучить в эксперименте особенности химического состава и прочности костей скелета при избыточном употреблении кофеина в различные возрастные периоды.

3. Исследовать возможность коррекции изменений, возникающих в скелете у крыс различного возраста при избыточном употреблении при влиянии избыточных доз кофеина мексидолом.

4. Оценить количественно степень влияния избыточных доз кофеина и подкожного введения мексидола на морфофункциональное состояние костей скелета в зависимости от возраста подопытных животных и длительности эксперимента.

Научная новизна исследования. Впервые на значительном экспериментальном материале предпринято комплексное изучение морфогенеза костной системы у крыс-самцов различного возраста при влиянии избыточных доз кофеина (120 мг/кг/сутки).

Впервые с помощью комплекса современных морфологических методов исследования (остеометрического, гистоморфометрического, биохимического, биомеханического, статистического) получены данные, свидетельствующие о возрастных особенностях изменений роста, структуры, химического состава и прочностных характеристик костей скелета при избыточном употреблении кофеина. Впервые описана морфофункциональная картина изменений в реактивных отделах костей (проксимальном эпифизарном хряще и середина диафиза большеберцовых костей). Впервые доказана целесообразность использования мексидола с целью коррекции неблагоприятных изменений морфогенеза костной системы при избыточном употреблении кофеина.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в анатомо-экспериментальном исследовании результаты, в значительной степени расширяют имеющиеся теоретические представления о влиянии избыточных доз кофеина на морфогенез скелета, а также доказывают эффективность применения корректора мексидола с целью коррекции возникающих при этом изменений. Результаты исследования могут быть использованы в научной деятельности кафедр анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии, гистологии, цитологии и эмбриологии, медицинской биологии, патофизиологии, травматологии и ортопедии и педиатрии, а также в практической деятельности врачей для прогнозирования неблагоприятных изменений в костной системе в условиях избыточного употребления кофеина.

Методология и методы исследования. Методологическую основу диссертационной работы составил принцип системности, явившийся фундаментом для структурно-логической последовательности изучения структурно-функционального состояния костей скелета при избыточном употреблении кофеина. Методология работы заключалась в аналитико-статистической обработке литературных данных по теме диссертационного исследования, постановке эксперимента,

использовании методов научного познания. Были применены общие эмпирические методы (наблюдение, описание, измерение, сравнение), теоретические методы (анализ, синтез, классификация знаний, абстрагирование, индукция, дедукция), комплекс специальных морфологических методов (остеометрический, гистоморфометрический, биохимический методы, биомеханическое исследование), математические и статистические методы, позволившие изучить строение костей скелета на разных уровнях их структурной организации.

Положения, выносимые на защиту:

1. Избыточное употребление кофеина в дозе 120 мг/кг/сутки сопровождается нарушением морфофункциональной активности реактивных отделов исследуемых костей скелета, дестабилизацией их макроэлементного состава, истощением микроэлементного состава и снижением прочности плечевых костей, которые нарастают по мере увеличения длительности эксперимента и зависят от возраста животных.

2. Подкожное введение мексидола в дозе 50 мг/кг/сутки подопытным животным на фоне избыточного употребления кофеина сопровождается сглаживанием негативного влияния условий эксперимента на морфогенез костной системы. У инфантильных крыс применение мексидола более эффективно, чем у ювенильных животных.

3. Избыточное употребление кофеина в дозе 120 мг/кг/сутки как контролируемый фактор оказывает достоверное влияние на изменение исследуемых морфологических показателей костной, а сила влияния нарастает с увеличением длительности эксперимента и в большей степени выражено у инфантильных крыс.

4. Подкожное введение мексидола в дозе 50 мг/кг/сутки на фоне избыточного употребления кофеина как контролируемый фактор оказывает достоверное влияние на исследуемые морфологические показатели костной системы в период с 15 по 90 сутки у животных обеих возрастных групп, а сила его влияния нарастает с увеличением длительности коррекции. Степень влияния введения мексидола у инфантильных крыс выше, чем у ювенильных.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов исследования определяется достаточным объемом и корректным формированием изучаемых групп (144 белых крысы-самца двух возрастных групп – инфантильных и ювенильных), применением комплекса современных морфологических методов исследования (остеометрического, гистологического, гистоморфометрического, биохимического, и биомеханического), адекватностью математических методов обработки данных (вариационная статистика, однофакторный дисперсионный анализ) поставленным задачам. Результаты получены с

применением сертифицированного оборудования. Сформулированные выводы и практические рекомендации соответствуют поставленным задачам, аргументированы и логически вытекают из результатов исследования. Все выводы и рекомендации опубликованы в рецензируемых периодических изданиях, критические замечания отсутствуют.

Основные результаты диссертационного исследования докладывались и обсуждались на VII Всероссийской с международным участием студенческой научно-образовательной конференции «Актуальные вопросы студенческой медицинской науки и образования» (Рязань, 2021); VIII Международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» (Казань, 2021); 21nd World congress on osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases (Лондон, 2021); международной научно-практической конференции «Роль инновационных технологий в медицинском образовательном процессе фундаментальных дисциплин и клинической медицины» (Самарканд, 2021); 95-й Всероссийской научно-практической конференции, посвящённой десятилетию науки и технологий в России «Теоретические и практические аспекты современной медицины» (Симферополь, 2023); 23rd World congress on osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases (Барселона, 2023); XVIII Международной научно-практической конференции «Наука в современном мире: результаты исследований и открытий» (Анапа, 2023).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из которых 5 статей в рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК при МОН ЛНР, 1 публикация – в журналах, сборниках научных трудов и материалов конференций, 6 публикаций – в материалах отечественных и зарубежных конгрессов, съездов и научных конференций. 4 работы опубликовано без соавторов.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 196 странице компьютерного набора, содержит 42 таблицы (41 из них на 60 страницах вынесена в приложения), иллюстрирована 44 рисунками, состоит из введения, обзора литературы, главы описания материалов и методов исследования, двух глав результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, практических рекомендаций, списка литературы и приложений. Список литературы содержит 152 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материал и методы исследования. Исследование было проведено на 144 самцов белых лабораторных крыс, из них 72 ювенильного возраста и соответственно такое же количество самцов инфантильного возраста.

На момент начала проведения эксперимента средняя масса животных ювенильного возраста составляла 130-140 г., и соответственно инфантильного возраста была в пределах 70-75 г., чтобы получить их равномерное распределение. Условия содержания животных были стандартными, на базе вивария Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Исследования, которые проводились над экспериментальными животными в соответствии с «Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Схема исследования была согласована и утверждена комиссией по вопросам биоэтики при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки» Министерства здравоохранения Российской Федерации (выписка из протокола № 2 от 08.06.2023).

Проведение эксперимента составил осенне-зимний период. В пределах каждого из возрастных периодов, все животные были распределены на 3 группы, по 24 крыс-самцов в каждой. 1-ю группу составили контрольные крысы, которые получали обычный рацион вивария. Во 2-ой группе крысам которым внутрижелудочно вводили кофеин (Кофеин-бензоат натрия, «Дарница», раствор для инъекций, № UA/7534/01/01 от 21.03.2018) из расчета 120 мг/кг/сутки без коррекции, что соответствует 1229 мг/сутки для человека массой 65 кг (Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С., 1979). Вводили кофеин внутрижелудочно с помощью зонда для обеспечения полного потребления суточной дозы утром (с 08 до 10 часов утра). В 3-ей группе находились крысы, которым внутрижелудочно вводили кофеин на фоне коррекции мексидолом (производитель ЗиО-ЗДОРОВЬЕ, ЗАО (Россия), рег. №: ЛП-Н (000086)-(РГ-RU) от 30.10.20 – Бессрочно) в дозе 50 мг/кг/сутки массы тела, что соответствует 512 мг/сутки для человека массой 65 кг (Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С., 1979). Мексидол вводили подкожно, с 08 до 10 часов утра).

Через 7, 15, 30 и 90 суток, после начала проведения эксперимента животных выводили из него путем декапитации под эфирным наркозом.

Постановку эксперимента, забор материала, исследование и обработку цифровых значений осуществляли на базе многопрофильных научных лабораторий кафедры анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования

«Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Гистологические срезы проксимальных эпифизов и середины диафизов ПК толщиной 4-6 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Морфометрию зон эпифизарного хряща проводили с учетом морфо-функциональной классификации В.Г. Ковешникова (1980). Морфометрия диафиза проводилась по следующим параметрам: ширина зон наружных и внутренних генеральных пластинок, ширина остеонного слоя, диаметр остеонов и их каналов, площадь диафиза и костномозговой полости. Гистологические препараты исследовали и фотографировали на цифровом морфометрическом комплексе на базе микроскопа Olympus VX 41. Анализ изображений проводили с помощью программы для морфометрических исследований «Morpholog» (Овчаренко В.В., Маврич В.В., 2004).

Химический анализ костей проводили весовым методом, затем 10 мг золь растворяли в 2 мл 0,1 Н химически чистой соляной кислоты, доводили до 25 мл бидистиллированной водой. В полученном растворе определяли содержание натрия, калия, кальция, магния, железа, марганца, цинка и меди на атомно-абсорбционном фотометре типа "Сатурн"-2 в режиме эмиссии в воздушно-пропановом пламени, а также содержание фосфора на электрофотокolorиметре КФК-3 (Полужтков Н.С., 1967; Колб В.Г., 1980; Брицке Э.М., 1982). Биомеханические характеристики ПК определяли при изгибе на универсальной нагрузочной машине Р-0,5 со скоростью нагружения 0,25 мм/мин до разрушения. Использовали трехточечную модель нагружения (Ковешников В.Г., Лузин В.И., 2003).

Все полученные данные были приведены в соответствие с Международной системой единиц (СИ) (Степин Б.Д., 1990) и подвергались обработке методами вариационной статистики с использованием лицензионных программ Microsoft Office Excel и Statistica 5.11 (Лапач С.Н., 2001; Жижин К.С., 2007). Полученные цифровые данные подвергали анализу на нормальность распределения с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. В случае нормального распределения статистическую значимость отклонений полученных результатов оценивали с использованием параметрического метода сравнения двух независимых выборок – критерия Стьюдента. В случае ненормального распределения использовали непараметрический метод сравнения – критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимым при вероятности ошибки менее 5% ($p < 0,05$) (Лапач С.Н., 2001).

С целью выявления силы влияния контролируемого фактора (введение избыточных доз кофеина и введение мексидола) на результирующие признаки, был проведен однофакторный дисперсионный анализ. Рассчитывали коэффициент детерминации (η^2)

(квадрат корреляционного отношения), который при умножении на 100% показывал силу влияния контролируемого фактора на изменение резульативного признака (Макарова Н.В., Трофимец В.А., 2002).

Результаты исследования и их обсуждение. Внутривентрикулярное введение подопытным животным кофеина в дозе 120 мг/кг/сутки сопровождалось отставанием в наборе массы тела в сравнении с контролем. У инфантильных крыс этот показатель был меньше контроля с 7 по 90 сутки эксперимента на 15,53%, 17,26%, 10,99% и 12,12%, а у ювенильных – на 10,98%, 10,52%, 13,71% и 10,76%.

Замедление набора массы тела у подопытных животных при избыточном употреблении кофеина сопровождалось также и угнетением темпов роста всех исследуемых костей, которое проявлялось во все сроки эксперимента, нарастало по мере увеличения его длительности и зависело от возраста. В итоге к 90 суткам эксперимента у инфантильных крыс максимальная длина большеберцовой кости и тазовой кости, а также высота тела второго поясничного позвонка были меньше значений 1-й группы на 7,50%, 7,50% и 9,66%, а у ювенильных животных – на 5,98%, 6,32% и 6,44%.

При избыточном употреблении кофеина инфантильными крысами аппозиционный рост исследуемых костей также тормозился и к 90 суткам эксперимента поперечные размеры большеберцовой кости и тазовой кости, а также тела второго поясничного позвонка у инфантильных крыс отставали от значений 1-й группы на 6,04-10,88%, а у ювенильных животных – на 4,59-7,87%.

Торможение аппозиционного и интерстициального роста исследуемых костей у подопытных животных обеспечивалось снижением костеобразовательной активности эпифизарных хрящей и надкостницы степень которого зависела от возраста крыс.

Внутривентрикулярное введение кофеина в дозе 120 мг/кг/сутки сопровождалось сужением проксимального эпифизарного хряща большеберцовых костей и его зон с преимущественным сужением зон пролиферирующего хряща и остеогенеза, нарастающим по мере увеличения срока избыточного употребления кофеина и более выраженным у инфантильных животных.

В итоге у инфантильных крыс к 90 суткам эксперимента ширина зон пролиферирующего хряща и остеогенеза отставала от значений 1-й группы на 9,63% и 9,09%, а у ювенильных животных – на 7,02% и 7,83% (Рисунок 1). При этом содержание первичной спонгиозы и количество остеобластов в зоне остеогенеза также прогрессивно уменьшались, отставая от значений 1-й группы. К 90 суткам эксперимента отставание этих показателей от контроля составило 8,50%

и 10,66% для инфантильных животных и 5,33% и 7,19% для ювенильных крыс.

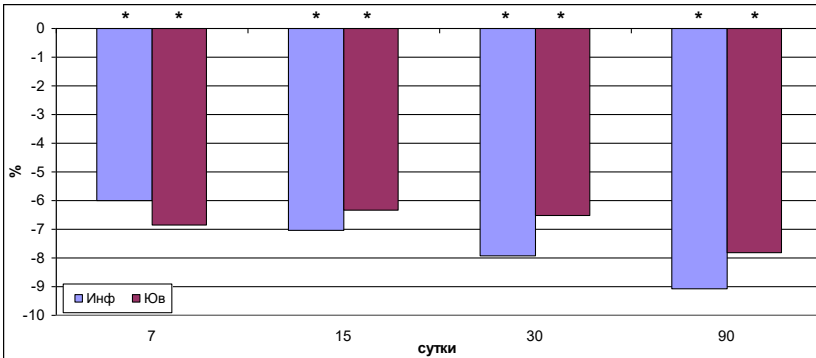


Рисунок 1 – Динамика изменения ширины зоны остеогенеза проксимального эпифизарного хряща большеберцовой кости у подопытных животных с избыточным употреблением кофеина в зависимости от возраста и длительности эксперимента (в % по отношению к контролю)

Примечание: Инф – инфантильные крысы; Юв – ювенильные крысы;

* - обозначает статистически значимое отличие от группы контроля ($p < 0,05$)

На срезах диафиза большеберцовых костей определялись признаки угнетения костеобразовательной функции надкостницы и повышения активности резорбтивных процессов, выраженность которых также нарастала с увеличением длительности эксперимента и зависела от возраста животных (Рисунок 2). К 90 суткам избыточного употребления кофеина у инфантильных крыс ширина остеонного слоя и диаметры остеонных каналов были меньше значений 1-й группы на 11,50% и 8,19%, а площадь костномозговой полости и диаметры каналов остеонных каналов превышали их на 7,66% и 8,01%. Для ювенильных животных аналогичные отклонения составили 8,88%, 6,24%, 6,74% и 6,11%.

Нарушение гистологической структуры и морфо-функциональной активности эпифизарных хрящей и диафиза большеберцовых костей при избыточном употреблении кофеина у подопытных животных отражалось и в изменениях химического состава костей, подвергнутых исследованию, выраженность которых также нарастала с увеличением длительности эксперимента и зависела от возраста животных.

Внутрижелудочное введение кофеина в дозе 120 мг/кг/сутки в ходе всего эксперимента сопровождалось увеличением содержания воды и снижением содержания органических и минеральных веществ в исследуемых костях с пропорциональным дисбалансом

макроэлементного состава и истощением микроэлементного состава.

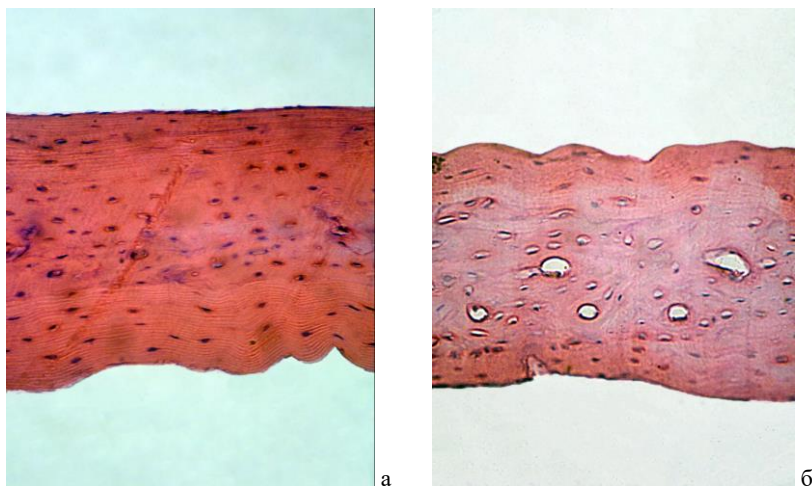


Рисунок 2 - Поперечный срез середины диафиза большеберцовой кости инфантильных белых крыс контрольной группы (а) и получавших кофеин (б). 90 сутки эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 200^x

С увеличением длительности избыточного употребления кофеина изменения химического состава нарастали и к 90 суткам эксперимента у инфантильных крыс содержание минеральных веществ в исследуемых костях отставало от значений 1-й группы на 9,71-10,88%, а соотношение кальций/фосфор и содержание меди, цинка и марганца в золе большеберцовых костей – на 9,15012,32%. Для ювенильных животных аналогичные отклонения составили 4,60-6,24% и 7,39-10,29%.

Дестабилизация химического состава костей находила отражение в снижении их прочности, выраженность которого также нарастала с увеличением длительности эксперимента и зависела от возраста животных. В итоге, к 90 суткам у инфантильных крыс предел прочности, модуль упругости и минимальная работа разрушения кости были меньше значений 1-й группы на 9,19%, 8,00% и 11,63%, а ювенильных животных – на 7,06%, 7,63% и 7,68% соответственно.

Таким образом, внутрижелудочное введение подкопным животным кофеина в дозе 120 мг/кг/сутки сопровождается замедлением прироста массы тела, угнетением темпов роста исследуемых костей, нарушением костеобразовательной функции эпифизарных хрящей и надкостницы большеберцовых костей, повышением уровня резорбтивных процессов в них, дестабилизацией химического и макроэлементного состава исследуемых костей и истощением

микроэлементного состава большеберцовых костей, а также снижением биомеханической прочности плечевых костей. Вышеперечисленные изменения наблюдаются с 7 по 90 сутки, нарастают с увеличением длительности избыточного употребления кофеина и у инфантильных крыс выражены в большей степени, чем у ювенильных животных.

Проведенный однофакторный дисперсионный анализ подтверждает выявленные методами вариационной статистики закономерности.

Было установлено, что избыточное употребление кофеина в дозе 120 мг/кг/сутки оказывало достоверное влияние на исследуемые морфологические показатели костной системы в период с 7 по 90 сутки у животных обеих возрастных групп, а сила влияния нарастала с увеличением длительности эксперимента. Несколько позже, с 15 по 90 сутки контролируемый фактор оказывал достоверное влияние на изменение показателей макроэлементного состава большеберцовых костей у инфантильных крыс и на изменение показателей прочности плечевых костей у ювенильных животных.

У инфантильных крыс максимальная сила влияния была зарегистрирована к 15 суткам на изменение ширины слоя наружных генеральных пластинок ($\eta^2=0,797$), к 30 суткам на изменение диаметров каналов остеонов ($\eta^2=0,818$), соотношения кальций/фосфор ($\eta^2=0,866$) и содержания марганца ($\eta^2=0,733$), и к 90 суткам на изменение ширины дистального эпифиза большеберцовой кости ($\eta^2=0,646$), ширины зоны остеогенеза ($\eta^2=0,820$) и количества первичной спонгиозы в ней ($\eta^2=0,744$), а также минимальной работы разрушения плечевой кости ($\eta^2=0,727$).

У ювенильных крыс максимальная сила влияния была зарегистрирована во всех случаях к 90 суткам эксперимента: на изменение максимальной длины большеберцовых костей ($\eta^2=0,513$), на изменение ширины зоны остеогенеза ($\eta^2=0,795$) и количества остеобластов в ней ($\eta^2=0,587$), на изменение ширины остеонного слоя ($\eta^2=0,844$) и площади костномозговой полости ($\eta^2=0,888$), соотношения кальций/фосфор ($\eta^2=0,812$) и содержания цинка ($\eta^2=0,565$), а также на изменение разрушающего момента плечевой кости ($\eta^2=0,618$).

Из этого следует, что при избыточном употреблении кофеина в дозе 120 мг/кг/сутки у инфантильных крыс степень влияния контролируемого фактора в большинстве случаев является максимальной к 30 и 90 суткам эксперимента, а у ювенильных – к 90 суткам эксперимента. Степень влияния контролируемого фактора у инфантильных крыс выше, чем у ювенильных.

Полученные результаты можно объяснить следующим образом: в первую очередь кофеин замедляет всасывание кальция в кишечнике (Cheng Sh. Et al., 2020) и приводит к увеличению его экскреции с мочой

(Mocetti P. et al., 2000), что ведет к нарушению кальций-фосфорного обмена и потере кальция организмом.

В ряде исследований было показано, в культуре остеобластов в присутствии 10 мМ кофеина внутриклеточное содержание ЛДГ и щелочной фосфатазы значительно снижалось, а также наблюдались явления, характерные для окислительного стресса (Barcelos R.P. et al., 2014). Также, при избыточном употреблении кофеина наблюдаются явления снижения пролиферативной активности остеобластов и индуцирования их апоптоза (Doherty A.H. et al., 2015), а также увеличение активности остеокластов (S. Shaposhnikov et al., 2018).

В таком случае в реактивных отделах исследуемых костей (эпифизарных хрящах и надкостнице) замедляются процессы костеобразования и повышается уровень резорбтивных процессов. Это приводит к угнетению роста костей, дестабилизации их химического состава и снижению их прочности. Более выраженные проявления влияния избыточного употребления кофеина на морфогенез скелета у инфантильных крыс, вероятно, объясняются более высоким, чем у ювенильных крыс уровнем метаболической активности (Guillán-Fresco M. et al., 2020).

Выявленные изменения структурно-функционального состояния костей скелета у подопытных животных при избыточном употреблении кофеина требуют поиска путей их фармакологической коррекции.

В качестве корректора был использован мексидол, который характеризуется весьма широким спектром фармакологической активности (Воронина Т.А. и соавт., 2002). В частности, он является ингибитором свободно-радикальных процессов и перекисного окисления липидов, что может уменьшить и вероятность развития неблагоприятных изменений и со стороны костной системы.

При подкожном введении мексидола в дозе 50 мг/кг/сутки подопытным животным на фоне избыточного употребления кофеина у инфантильных крыс масса тела к 30 и 90 суткам коррекции превышала значения 2-й группы на 13,01% и 7,12%, а у ювенильных крыс с 7 по 90 сутки – на 9,70%, 8,08%, 12,36% и 8,14%.

Введение мексидола на фоне избыточного употребления кофеина сопровождалось восстановлением темпов роста исследуемых костей уже с 7 суток эксперимента у инфантильных животных и преимущественно с 30 суток эксперимента у ювенильных крыс. По мере увеличения длительности коррекции ее эффективность нарастала.

В итоге к 90 суткам коррекции максимальная длина большеберцовой и тазовой костей, а также высота тела второго поясничного позвонка у инфантильных крыс превышали значения 2-й группы на 7,52%, 7,50% и

7,86%, а у ювенильных – на 5,46%, 4,86% и 4,56%.

При коррекции мексидолом у инфантильных крыс темпы аппозиционного роста исследуемых костей также восстанавливались и к 90 суткам эксперимента поперечные размеры большеберцовой кости и тазовой кости, а также тела второго поясничного позвонка у инфантильных крыс превышали значения 2-й группы на 5,55-8,10%, а у ювенильных животных – на 4,69-5,95%.

Восстановление роста исследуемых костей при введении мексидола в дозе 50 мг/кг/сутки на фоне избыточного употребления кофеина обеспечивалось восстановлением костеобразовательной активности эпифизарных хрящей и надкостницы.

Признаки восстановления морфо-функциональной активности проксимального эпифизарного хряща большеберцовых костей в обеих возрастных группах наблюдались с 15 суток эксперимента и нарастали с увеличением длительности коррекции.

В результате у инфантильных крыс к 90 суткам коррекции ширина зон пролиферирующего хряща и остеогенеза превышала значения 2-й группы на 7,55% и 7,91%, а у ювенильных животных – на 4,82% и 5,89%. При этом содержание первичной спонгиозы и количество остеобластов в зоне остеогенеза также постепенно увеличивалось и к 90 суткам эксперимента превышало значения 2-й группы на 7,51% и 9,79% для инфантильных животных и 5,13% и 5,98% для ювенильных крыс.

На поперечных срезах середины диафиза большеберцовых костей с 15 суток определялись признаки восстановления костеобразовательной функции надкостницы и снижения активности резорбтивных процессов, выраженность которых также нарастала с увеличением длительности коррекции. В итоге к 90 суткам у инфантильных крыс ширина остеонного слоя и диаметры остеонов были больше значений 2-й группы на 8,45% и 5,41%, а площадь костномозговой полости и диаметры каналов остеонов превышали их на 5,47% и 6,41%. Для ювенильных животных аналогичные отклонения составили 5,54%, 4,63%, 4,45% и 4,05%.

Восстановление структуры и морфо-функциональной активности эпифизарных хрящей и диафиза большеберцовых костей при введении мексидола на фоне избыточного употребления кофеина отражалось и в восстановлении химического состава костей, подвергнутого исследованию, выраженность которого также нарастала с увеличением длительности эксперимента. У инфантильных крыс признаки восстановления химического состава костей наблюдались с 15 суток коррекции, а у ювенильных – с 30 суток коррекции.

С увеличением длительности применения мексидола признаки восстановления химического состава исследуемых костей нарастали и к

90 суткам эксперимента у инфантильных крыс содержание минеральных веществ в исследуемых костях превышало значения 2-й группы на 5,63-7,51%, а соотношение кальций/фосфор и содержание меди и марганца в золе большеберцовых костей – на 9,78%, 9,09% и 7,49%. Для ювенильных животных аналогичные отклонения составили 4,00-5,96%, 10,09%, 6,08% и 7,71% соответственно.

При введении мексидола на фоне избыточного употребления кофеина восстанавливалась и прочность плечевых костей: у инфантильных крыс признаки восстановления прочности плечевых костей наблюдались с 15 суток, а у ювенильных – с 30 суток коррекции.

В итоге, к 90 суткам эксперимента у инфантильных крыс предел прочности, модуль упругости и минимальная работа разрушения кости были больше значений 2-й группы на 10,39%, 8,65% и 11,92%, а ювенильных животных – на 6,15%, 7,45% и 7,05% соответственно.

Таким образом, подкожное введение мексидола в дозе 50 мг/кг/сутки подопытным животным на фоне избыточного употребления кофеина в дозе 120 мг/кг/сутки сопровождается восстановлением исследуемых морфологических показателей, выраженность которого зависит от возраста.

У инфантильных крыс признаки восстановления темпов прироста массы тела наблюдались с 30 суток коррекции, восстановление темпов роста костей с 7 суток, восстановление костеобразовательной функции эпифизарных хрящей и надкостницы большеберцовых костей, химического состава исследуемых костей, а также биомеханической прочности плечевых костей с 15 суток эксперимента. У ювенильных крыс признаки восстановления исследуемых показателей наблюдались в целом несколько позже: для восстановления темпов прироста массы тела - с 7 суток коррекции, для восстановления костеобразовательной функции эпифизарных хрящей и надкостницы большеберцовых костей - с 15 суток, и для восстановления темпов роста исследуемых костей, их химического состава и прочности плечевых костей - с 30 суток.

Проведенный однофакторный дисперсионный анализ подтверждает выявленные методами вариационной статистики после применения мексидола закономерности.

Было установлено, что подкожное введение мексидола в дозе 50 мг/кг/сутки на фоне избыточного употребления кофеина оказывало достоверное влияние на исследуемые морфологические показатели костной системы в период с 15 по 90 сутки у животных обеих возрастных групп, а сила влияния нарастала с увеличением длительности коррекции. Лишь на изменение показателей прочности плечевых костей у ювенильных животных достоверное влияние контролируемого фактора

регистрировалось только к 90 суткам коррекции.

У инфантильных крыс максимальная сила влияния была зарегистрирована к 15 суткам на изменение ширины слоя наружных генеральных пластинок ($\eta^2=0,696$), к 30 суткам на изменение диаметров каналов остеонов ($\eta^2=0,699$), соотношения кальций/фосфор ($\eta^2=0,880$) и содержания марганца ($\eta^2=0,599$), и к 90 суткам на изменение ширины дистального эпифиза большеберцовой кости ($\eta^2=0,599$), ширины зоны остеогенеза ($\eta^2=0,743$) и количества остеобластов в ней ($\eta^2=0,784$), а также минимальной работы разрушения кости ($\eta^2=0,681$).

У ювенильных крыс максимальная сила влияния была зарегистрирована к 90 суткам на изменение максимальной длины большеберцовых костей ($\eta^2=0,519$), ширины зоны остеогенеза ($\eta^2=0,547$) и количества остеобластов в ней ($\eta^2=0,568$), ширины слоя внутренних генеральных пластинок ($\eta^2=0,568$), соотношения кальций/фосфор ($\eta^2=0,685$) и содержания меди ($\eta^2=0,422$), и к 90 суткам на изменение ширины дистального эпифиза большеберцовой кости ($\eta^2=0,599$), а также модуля упругости плечевой кости ($\eta^2=0,529$).

Из этого следует, что при подкожном введении мексидола в дозе 50 мг/кг/сутки на фоне избыточного употребления кофеина у инфантильных крыс степень влияния контролируемого фактора в большинстве случаев является максимальной к 30 и 90 суткам эксперимента, а у ювенильных – к 90 суткам эксперимента. Степень влияния контролируемого фактора у инфантильных крыс выше, чем у ювенильных.

Следует полагать, что мексидол благодаря своему широкому фармакологическому действию благоприятно влияет на регенерацию и восстановление костной ткани. В первую очередь этому способствует антиоксидантное действие мексидола, которое проявляется в ингибировании как ферментативного, так и неферментативного процессов перекисного окисления липидов, способствует увеличению активности антиоксидантных ферментов (Воронина Т.А., 2001).

Помимо этого, мексидол обладает антигипоксическим действием. Препарат усиливает компенсаторную активацию аэробного гликолиза, способствует угнетению окислительных процессов в цикле Кребса при гипоксии, увеличивая содержание креатинфосфата, молекул АТФ (Воронина Т.А., 2001).

Следует отметить также еще мембранопротекторное действие мексидола. Препарат воздействует на ГАМК, ацетилхолинового и бензодиазепинового рецепторных комплексов, способствуя к усиленному связыванию с лигандами, благоприятно воздействуя на сохранение структурно-функциональной организации биомембран (Воронина Т.А. и др., 1990).

Исходя, из этого следует полагать, что мексидол при подкожном введении подопытным животным в дозе 50 мг/кг/сутки положительно влияет на регуляцию костной ткани. Благодаря своему широкому механизму действия мексидол благоприятно влияет на регенерацию костей скелета, а также на микроэлементный состав, тем самым увеличивая прочность костной ткани при длительном применении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе решена актуальная научная задача – установлены возрастные особенности роста, строения и формообразования костей скелета крыс при избыточном употреблении кофеина и обосновано применение мексидола в качестве корректора возникающих при этом изменений. Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Избыточное употребление кофеина в дозе 120 мг/кг/сутки сопровождается замедлением прироста массы тела, угнетением темпов роста исследуемых костей, нарушением костеобразовательной функции эпифизарных хрящей и надкостницы большеберцовых костей, которые нарастают по мере увеличения длительности эксперимента и зависят от возраста животных. К 90 суткам у инфантильных крыс ширина зоны остеогенеза, доля первичной спонгиозы и количество остеобластов в ней, а ширина остеонного слоя были меньше контрольных значений на 9,09%, 8,50%, 10,66% и 11,50%, а диаметры каналов остеонов увеличивались на 8,01%. Для ювенильных животных аналогичные отклонения составили соответственно 7,83%, 5,33%, 7,19%, 8,88% и 6,11%.

2. Угнетение морфофункциональной активности реактивных отделов костей скелета сопровождается дестабилизацией их макроэлементного состава, истощением микроэлементного состава и снижением прочности плечевых костей, которые нарастают по мере увеличения длительности избыточного употребления кофеина. К 90 суткам у инфантильных крыс соотношение кальций/фосфор и содержание меди в большеберцовых костях, а также минимальная работа разрушения плечевых костей были меньше контрольных значений на 12,32%, 11,21% и 11,63%, а у ювенильных животных – на 10,29%, 7,39% и 7,68% соответственно.

3. Подкожное введение мексидола в дозе 50 мг/кг/сутки подопытным животным на фоне избыточного употребления кофеина сопровождается сглаживанием негативного влияния условий эксперимента на морфогенез костной системы преимущественно с 7 суток исследования у инфантильных крыс и с 15 суток у ювенильных животных. Это проявляется в сравнении с группой без применения мексидола

признаками восстановления массы тела, костеобразовательной функции эпифизарных хрящей и надкостницы, восстановлением темпов роста исследуемых костей, их макро- и микроэлементного состава, а также восстановлением прочности плечевой кости.

4. Избыточное употребление кофеина в дозе 120 мг/кг/сутки как контролируемый фактор оказывало достоверное влияние на исследуемые морфологические показатели костной системы в период с 7 по 90 сутки у животных обеих возрастных групп, а сила влияния нарастала с увеличением длительности эксперимента. Несколько позже, с 15 по 90 сутки контролируемый фактор оказывал достоверное влияние на изменение показателей макроэлементного состава большеберцовых костей у инфантильных крыс и на изменение показателей прочности плечевых костей у ювенильных животных.

5. К 90 суткам у инфантильных крыс максимальная сила влияния была зарегистрирована на изменение ширины зоны остеогенеза ($\eta^2=0,820$) и количества первичной спонгиозы в ней ($\eta^2=0,744$), а также минимальной работы разрушения плечевой кости ($\eta^2=0,727$). У ювенильных крыс к этому сроку максимальная сила влияния была зарегистрирована на изменение ширины зоны остеогенеза ($\eta^2=0,795$) и количества остеобластов в ней ($\eta^2=0,587$), на изменение ширины остеонного слоя ($\eta^2=0,844$) и площади костномозговой полости ($\eta^2=0,888$), соотношения кальция/фосфор ($\eta^2=0,812$) и содержания цинка ($\eta^2=0,565$), а также на изменение разрушающего момента плечевой кости ($\eta^2=0,618$).

6. Подкожное введение мексидола в дозе 50 мг/кг/сутки на фоне избыточного употребления кофеина как контролируемый фактор оказывало достоверное влияние на исследуемые морфологические показатели костной системы в период с 15 по 90 сутки у животных обеих возрастных групп, а сила влияния нарастала с увеличением длительности коррекции. У инфантильных крыс степень влияния контролируемого фактора в большинстве случаев являлась максимальной к 30 и 90 суткам эксперимента, а у ювенильных – к 90 суткам эксперимента. Степень влияния введения мексидола у инфантильных крыс была выше, чем у ювенильных.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Сведения о морфофункциональных и адаптационных изменениях в исследуемых костях у инфантильных и ювенильных белых крыс в условиях избыточного употребления кофеина расширяют и углубляют представления о реакции костной системы на влияние экзогенных факторов и позволяют оценить общую направленность компенсаторно-

приспособительных изменений в скелете в этих условиях. Полученные результаты дополняют соответствующие разделы учебного материала на кафедрах анатомии человека, гистологии, цитологии и эмбриологии, травматологии и ортопедии, педиатрии, а также внутренней медицины.

2. Поскольку избыточное употребление кофеина в дозе 120 мг/кг/сутки у подопытных животных сопровождается негативными изменениями структурно-функционального состояния эпифизарных хрящей и надкостницы, а также дисбалансом их химического состава и снижением прочности, следует рассмотреть возможность применения мексидола для профилактики и коррекции данных изменений у лиц, злоупотребляющих кофеином.

Основные научные публикации по теме диссертационного исследования

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при МОН ЛНР для публикации основных результатов диссертационных исследований

1. Мовенко, А.В. Особенности прочности плечевой кости у белых крыс различного возраста при избыточном употреблении кофеина и введении мексидола / А.В. Мовенко, В.И. Лузин, Л.Д. Савенко // Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова. – 2022. – Т. 20, №3. – С. 74–79.

2. Мовенко, А.В. Химический состав костей скелета у белых крыс различного возраста при избыточном употреблении кофеина и введении мексидола / А.В. Мовенко, И.А. Ладыш // Проблемы экологической и медицинской генетики и клинической иммунологии – 2022. – Вып. 6 (174). – С. 25–35.

3. Мовенко, А.В. Структура середины диафиза большеберцовых костей у белых крыс различного возраста при избыточном употреблении кофеина и введении мексидола / А.В. Мовенко // Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова. – 2022. – Т. 20, №4. – С. 107–112.

4. Мовенко, А.В. Структура проксимального эпифизарного хряща большеберцовых костей у белых крыс различного возраста при избыточном употреблении кофеина и введении мексидола / А.В. Мовенко // Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова. – 2023. – Т. 21, №1. – С. 3–9.

5. Мовенко, А.В. Оценка влияния избыточного употребления кофеина и введения мексидола на изменение структурно-функционального состояния костной системы у белых крыс / А.В. Мовенко // Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова. – 2023. – Т. 21, №2. – С. 16–21.

Статьи в журналах, сборниках научных трудов и материалов конференций

6. Мовенко, А.В. Особенности химического состава костей скелета у белых крыс инфантильного возраста при избыточном употреблении кофеина и введении мексидола / А.В. Мовенко // Сборник научных трудов по материалам XVIII Международной научно-практической конференции «Наука в современном мире: результаты исследований и открытий». – Анапа, 08 сентября 2023. – С. 170–177.

Доклады на научных конференциях

7. Мовенко, А.В. Формообразование костей скелета ювенильных крыс при избыточном употреблении кофеина на протяжении 90 суток / Мовенко А.В., В.С. Назаренко, Д.И. Лебедь // Сборник тезисов VIII Международный молодежный научный форум «Белые цветы», посвященный 120-летию студенческого научного общества имени Ирины Андреевны Студенцовой. – Казань, 14-16 апреля 2021. – С. 1123-1124.

8. Мовенко, А.В. Формообразование костей скелета инфантильных крыс при избыточном употреблении кофеина на протяжении 90 суток / А.В. Мовенко, В.Р. Богаченко, Н.С. Кононенко // Сборник тезисов международной конференции. Роль инновационных технологий в медицинском образовательном процессе фундаментальных дисциплин и клинической медицины. – Самарканд, 6-7 мая 2021. – С. 106-107.

9. Ткаченко, А.В. Динамика показателей костного метаболизма у крыс различных возрастных групп на фоне приема высоких доз кофеина и мексидола / А.В. Ткаченко, А.В. Мовенко // Материалы VII Всероссийской с международным участием студенческой научно-образовательной конференции «Актуальные вопросы студенческой медицинской науки и образования». – Рязань, 14 мая 2021. – С. 226–228.

10. Formation of the skeletal bones in infantile rats after 90-day excessive caffeine intake / A. Movenko, V. Bogachenko, N. Kononenko, V. Nazarenko // Osteoporosis International. – 2021. - Vol. 32, Suppl. 1. – P. P698.

11. Мовенко, А.В. Морфогенез скелета инфантильных белых крыс при употреблении избыточных доз кофеина на протяжении 90 суток с коррекцией мексидолом / А.В. Мовенко, В.Р. Богаченко, Н.С. Кононенко // Сборник материалов 95-й Всероссийской научно-практической конференции, посвящённой десятилетию науки и технологий в России «Теоретические и практические аспекты современной медицины». – Симферополь, 2023. – С. 315-317.

12. Formation of the skeletal bones in juvenile rats after 90-day excessive caffeine intake / A. Movenko, V. Bogachenko, N. Kononenko, V. Nazarenko // Abstract Book WCO-IOF-ESCEO. Barcelona, Spain. May 4-7, 2023. – P921.

АННОТАЦИЯ

Мовенко А.В. «Морфогенез скелета при избыточном употреблении кофеина и коррекции мексидолом (анатомо-экспериментальное исследование)». – Рукопись.

Диссертация на соискания ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.01 – Анатомия человека (медицинские науки). – ФГБОУ ВО ЛГМУ им. Свт. Луки Минздрава России, Луганск, 2023.

Установлено, что избыточное употребление кофеина в дозе 120 мг/кг/сутки сопровождается угнетением темпов роста исследуемых костей, нарушением структуры эпифизарных хрящей и диафиза большеберцовых костей, дестабилизацией их химического состава и нарушением прочности, которые в большей степени проявляются у инфантильных животных. Подкожное введение мексидола в дозе 50 мг/кг/сутки на фоне избыточного употребления кофеина сопровождается сглаживанием негативного влияния условий эксперимента на морфогенез костной системы преимущественно с 7 суток исследования у инфантильных крыс и с 15 суток у ювенильных животных.

Ключевые слова: костная система, морфогенез, возрастные особенности, кофеин, мексидол.

SUMMARY

Movenko A.V. Morphogenesis of the skeleton after excessive caffeine intake and administration of mexidol (anatomical experimental study). - Manuscript.

Dissertation for the degree of Candidate of Medical Sciences in specialty 14.03.01 – Human anatomy (medical sciences). - FSBEI HI ST. LUKA LSMU of MOH of Russia.

In the study we found out that excessive caffeine intake in dosage of 120 mg/per/kg of body weight a day results in inhibition of bone growth rate, derangement of structure of growth plates and shafts of the tibiae, instability of chemical composition, and strength decrease. These alterations reach a maximum point in young animals. Subcutaneous injections of mexidol in dosage of 50 mg/per/kg of body weight reduce negative effects of the experiment on bone morphogenesis beginning from the 7th day in young animals and from the 15th day in juvenile animals.

Key words: bone system, morphogenesis, age features, caffeine, mexidol.

Подписано в печать __ __ 2023 г.
Формат 60x84/16. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,0.
Тираж 100 экз. Заказ № .
Цена договорная.

Отпечатано в
типографии издательства «Шико»
на цифровом издательском комплексе Rank Xerox DocuTech 135.
291490, г. Луганск, пос. Тепличное, ул. Совхозная, д. 4а, кв. 6,
тел. +7 959-874-16-76.