

DOI 10.29254/2077-4214-2023-2-169-402-409

UDC 615.361:612.622/.621.5

Nesteruk A. V., Legach E. I.

BIOLOGICAL EFFECTS OF THE LOW-MOLECULAR FRACTION OF THE DORSAL ROOT GANGLIA CRYOEXTRACT ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF FEMALE RATS

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine (Kharkiv, Ukraine)

nesterukhanna@gmail.com

One of the modern approaches to correcting the reproductive system's function is the use of neurotrophic factors, the source of which can be a fraction of the cryoextract of spinal ganglia. The paper assesses the effect of the low-molecular-weight fraction of the cryoextract of spinal ganglia (<30 kDa) on the ovaries' follicular composition and the rat uterus' contractile activity. The experiments were carried out on white outbred female rats of 6 and 14 months, which corresponds to the reproductive and late reproductive age for this species of animals. The cryoextract was obtained from the spinal ganglia of neonatal piglets. The cryoextract fraction with a molecular weight of up to 30 kDa was obtained by the method of ultrafiltration using a polyethersulfone membrane. The total cryoextract and its low molecular weight fraction were administered intraperitoneally to rats for 9 days. After the end of the experiment, a histological examination of the ovarian follicles and a study of the contractile activity of the uterus by the organ bath method were performed. It was established that the total cryoextract of spinal ganglia and its low-molecular fraction differ in their biological effect on the reproductive system of female rats of different ages. The fraction of cryoextract of spinal ganglia exerts an activating effect on the follicular profile of the ovaries of rats of reproductive age, which is expressed in a decrease in the number of follicles of hormone-independent stages of development. At the same time, introducing the fraction decreases the force of isometric contraction of the uterus in rats, which may be associated with physiological changes in its innervation.

Key words: neurotrophic factors, dorsal root ganglia cryoextract, ovary, uterus, contractile activity.

Connection of the publication with planned research works.

The study was carried out as a part of the research work "Morphofunctional characteristics, cryopreservation and therapeutic potential of 2D and 3D cell cultures obtained from neural crest derivatives", state registration number 0121U109133.

Introduction.

The prospect of using neurotrophic factors (NF) and other regulatory substances originating from central and peripheral nervous system organs has already been proven in clinical trials to treat several neurodegenerative diseases [1-4]. However, only some results were satisfactory, so searching for alternative sources of NF and new biological substances with neurotrophic activity is currently relevant.

The NF family consists of nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin 3 (NT-3), neurotrophin 4/5 (NT-4/5, also known as NT-4, NT-5), neurotrophin 6 (NT-6), glial neurotrophic factor (GDNF). All NFs share some common characteristics, including similar monomer molecular weights (13.2–15.9 kDa), isoelectric points in the range of 9–10, and approximately 50% identity of the primary structure [5-7]. In solution, all factors exist as non-covalently bound dimers [8, 9].

As it turned out in recent years, NFs have a huge impact on the development and formation of the female reproductive system [10] and also play a certain role in the induction of its pathology [11]. The cryoextract of spinal ganglia is a source of NF [12] and other regulatory substances, which makes it a possible candidate for obtaining drugs with a neurotrophic effect.

The histological structure of the spinal ganglia includes bodies of sensitive neurons surrounded by satellite glial cells, nerve fibers, Schwann cells, connective tissue cells, vascular endothelium, and resident immune cells [13]. Moreover, spinal ganglia are a source of neural stem cells that can differentiate into neurons and neuroglia cells [14]. Therefore, the total cryoextract of spinal ganglia (tCSG) should contain derivatives of all these cell groups. However, high-molecular protein compounds have an increased ability to cause an immunological response, so there is a need for preliminary fractionation of the cryoextract. Considering the data on the molecular weights of NF, obtaining a fraction of cryoextract of spinal ganglia (fCSG) up to 30 kDa and investigating its biological activity was reasonable.

The aim of the study.

Determination of the influence of the low-molecular fraction of the cryoextract of spinal ganglia on the histological features of the ovaries and the contractile activity of the rat's uterus.

Object and research methods.

All experiments on animals were performed following the regulations of the Law of Ukraine "On the Protection of Animals from Cruelty" (No. 3447-IV dated February 21, 2006) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine.

The experiments were conducted on white outbred female rats of 6 and 14 months, which, according to Sengupta P. [15], corresponds to the reproductive age (RE) and late reproductive age (LRE) for this species of animals. The total number of animals is 58.

Total cryoextract of spinal ganglia (tCSG) was prepared as described in [16]. The fraction of the cryoex-

Table 1 – Quantitative histological parameters of the ovaries of rats of different ages after administration of tCSG or its low molecular weight fraction

Indicator	RE			LRE		
	Control	tCSG	fCSG	Control	tCSG	fCSG
Follicles + CL	75,5 (71,3; 82,0)	63,5 (57,3; 65,0)*	60,5 (59,7; 61,2)*	65,5 (57,0; 71,3)*	59,5 (57,0; 66,8)*	61,5 (59,5; 62,0)*
Primordial + primary follicles	23,0 (18,5; 30,5)	23,0 (19,0; 25,5)	13,0 (12,0; 15,5)* #	23,5 (18,3; 26,0)	19,0 (16,7; 22,8)	19,5 (17,5; 20,8)
Antral follicles	9,5 (4,5; 11,5)	8,2 (3,5; 10,8)	8,0 (7,3; 8,8)	8,0 (4,6; 9,5)	7,0 (4,0; 8,0)	8,5 (8,0; 9,0)
Atretic follicles	12,0 (10,3; 14,5)	14,0 (9,7; 16,8)	20,5 (18,3; 23,5)* #	12,5 (9,3; 15,8)	16,5 (12,8; 17,9)	15,0 (15,0; 17,3)
CL	23,0 (19,1; 26,2)	25,0 (23,3; 28,7)	23,5 (23,0; 24,7)	20,5 (13,3; 24,0)	22,0 (17,0; 25,5)	16,5 (16,0; 17,8)*
Bones	0 (0; 1,2)	1,5 (1,3; 1,7)	0 (0; 0,7)	3,0 (2,0; 4,5)	2,0 (1,5; 4,5)	1,0 (1,0; 1,8)

Notes: Each of the indicators are normalized for one ovary; * – the indicator is significantly different in comparison with the indicator of the group of intact RE animals, $p < 0.05$; # – the indicator is significantly different between groups of animals of the same age with the introduction of tCSG or fCSG, $p < 0.05$.

tract of spinal ganglia (fCSG) with a molecular weight of up to 30 kDa was obtained by ultrafiltration using a polyethersulfone membrane (Millipore, Germany). A sterile physiological solution was used as a carrier solution. Experimental drugs were administered intraperitoneally for 9 days at 0.2 ml/animal. On the 28th-29th day, the animals were removed from the experiment.

The ovaries were removed for histological analysis, fixed in 10% neutral formalin, and serial sections (7-8 μ m) were made. Sections were stained according to the standard method with hematoxylin/eosin and examined using an AmScope XYL-403 light microscope (China). Using the AxioVision Rel. 4.8. counted the number of follicles and corpora lutea (LC) at different stages of maturity according to the classification [17].

The horn of the uterus was taken to study the contractile activity of the uterus (CUA) using the organ bath method [18]. For this purpose, insulated strips (IS) of fabric 8x3 mm in size were produced, vertically mounted in a flow cell (37°C), so that one end was connected to a stationary holder and the other to a Grass FT03C mechano-electrical transducer ("Grass Instruments", USA). The transducer was connected to an OWON B41T+ (OWON, PRC) multimeter adapter, which was used to record IS contractile activity curves. Before the experiment, IS was incubated in Krebs solution (pH=7.4) for 60 min in isometric conditions with a load of 1 g.

KCl solution at a final concentration of 70 mM or oxytocin (OT) at a final concentration of 4 nM was used to study induced CUA. The CUA of each sample was recorded for 10 minutes. Contraction frequency (CF) was calculated as the average number of IS contraction-relaxation cycles per minute. Contraction amplitude (CA) was determined as the mean peak height on the contraction curve and expressed in mN. Isometric contraction strength (ICS) was calculated as the area under the IS contraction curve, normalized to the plane of its cross-section and expressed in (g×s)/cm². The IS cross-sectional area was calculated according to the formula:

$$S=m/pl,$$

where m is mass of IS, l is length of IS, p was taken equal to 1.05 g/cm³.

RE groups of animals were used in the experiment: intact (n=14); with the introduction of tCSG (n=8); with fCSG administration (n=8). Groups of PRV animals: intact (n=12); with the introduction of tCSG (n=8); with fCSG administration (n=8).

The Statistica 10 program (StatSoft, USA) was used for statistical data analysis. The results were presented in the form of Me (Q1; Q2) (Me – median, Q1 – 1st quartile; Q3 – 3rd quartile). Statistical significance of differences between groups was assessed using the nonparametric Mann-Whitney test. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$.

Research results and their discussion.

Administration of tCSG and fCSG to RE rats decreased the number of follicle+CL in the ovaries compared to age-matched intact controls (**table 1**). Under the conditions of fCSG administration, there was a statistically significant decrease in the total number of follicles in the hormone-independent stages of development (primordial and primary) and an increase in the number of follicles in the atresia stage. Compared to the control, the number of antral follicles, CL, and follicular cysts did not change with tCSG or fCSG.

Ovaries from LRE animals had a decreased follicle+CL score compared to intact RE controls, reflecting changes in ovarian follicular profile that occur with age. The number of follicles of different stages of development and CL did not change between groups with the introduction of tCSG or its fraction. The number of atretic follicles was similar in intact animals of both age groups and in LRE animals administered general or fractionated CSG.

It is well known that the fertility of rats decreases at the age of 8-10 months and beyond. During the same period, the number of follicular cysts increases [17, 19]. In our experiments, no statistically significant changes in the number of ovarian cysts were observed depending on age or tCSG/fCSG administration.

The CUA scores of the rats are presented in **table 2**. Notably, fCSG administration increased basal CF in rats of both age groups and simultaneously reduced ICS induced by OT or KCl. Administration of tCSG positively affected basal, OT – and KCl-induced ICS in animals of both

Table 2 – CUA indicators of rats of different groups after administration of tCSG or its low molecular weight fraction

Indicator	RE			LRE		
	Control	tCSG	fCSG	Control	tCSG	fCSG
CF basal	0,2 (0,1; 0,2)	0,1 (0,1; 0,1)	0,7 (0,6; 0,7)* #	0,2 (0,2; 0,3)	0,2 (0,2; 0,2)	0,7 (0,5; 0,7)*#
CF OT-induced	0,9 (0,5; 1,1)	0,8 (0,8; 0,9)	0,7 (0,7; 0,9)	0,8 (0,4; 0,9)	0,8 (0,8; 0,8)	1,1 (0,8; 1,2)
CA basal	10,7 (10,3; 11,4)	10,2 (10,1; 10,2)	10,8 (10,7; 10,8)	10,9 (10,8; 11,0)	10,7 (10,3; 10,8)	10,8 (10,7; 11,5)
KCl – induced CA	11,5 (11,0; 12,1)	11,6 (11,2; 12,1)	11,9 (11,7; 12,1)	12,1 (11,5; 12,2)	11,6 (10,6; 12,3)	15,0 (14,5; 15,3)* #
OT – induced CA, mN	11,5 (11,2; 13,1)	12,0 (11,1; 12,5)	11,8 (11,7; 12,0)	11,8 (11,7; 12,5)	12,0 (11,9; 13,4)	13,8 (13,2; 14,9)
Basal CUA	35,2 (25,0; 44,9)	36,1 (30,3; 48,6)	22,5 (20,8; 27,3)	25,8 (21,9; 28,4)	41,5 (38,1; 43,0) ^a	25,1 (24,0; 27,4) #
KCl – induced ICS	35,9 (26,7; 48,2)	41,1 (35,8; 51,1)	23,7 (22,1; 28,8) #	28,8 (23,6; 31,3)	44,2 (43,4; 44,9) ^a	31,2 (29,0; 31,3) #
OT-induced ICS	36,3 (26,7; 45,7)	39,6 (34,0; 49,5)	23,0 (21,3; 29,0) #	27,9 (22,6; 29,8)	42,7 (42,2; 49,1) ^a	28,7 (27,8; 29,9) #

Notes: * – the indicator is significantly different compared to the indicator of the group of intact RE animals, $p < 0.05$; # – the indicator is significantly different between groups of animals of the same age with the introduction of tCSG or fCSG, $p < 0.05$; a – LRE indicator of experimental animals is significantly different compared to the indicator of intact LRE animals, $p < 0.05$.

age groups. At the same time, there was a statistically significant increase in ICS of the uterus of LRE rats and reaching the indicators of intact RE rats. No activating effect of fCSG on uterine ICS of LRE rats was observed. In the group of RE animals, administration of fCSG resulted in the inhibition of uterine ICS.

Previously, it was found that NGF and its receptors are widely expressed in oocytes, theca cells, granulosa cells, ovarian interstitium of various species, including humans, rodents, cattle, sheep, and goats. This NF is an important factor in the primary growth of follicles in the non-gonadotropin-dependent phase [20]. Exogenous administration of NGF to rats resulted in the same effect of reducing the number of small follicles [21].

As a result of our experiments, we also found a decrease in the number of primordial and primary follicles, especially in the ovaries of RE rats, after the introduction of fCSG, which indicates the stimulating effect of fCSG on the exit of follicles from the dormant state. Thus, this effect may be associated with NGF being concentrated in fCSG. In addition, possible candidates for the role of activators of folliculogenesis in fCSG are NT-3 and GDNF, as their ability to activate the transformation of primordial follicles was shown [22, 23]. It should also be noted that fCSG-stimulated folliculogenesis did not end with follicle maturation, as evidenced by a statistically unchanged number of antral follicles/CL and an increased number of follicles in the atresia stage.

It is known that the uterus's neural plasticity and its normal contractile function's implementation depend on NF [24-26]. The nerve fibers of the central and peripheral nervous system provide nerve control of uterine myocytes, creating visceral co-regulation [24]. Under the influence of estrogens and progesterone, cyclic changes of the uterus occur, which also affect peripheral innervation [25]. Against the background of high levels of estrogens, the degeneration of axons of sympathetic

nerves in the uterus occurs [25]. It is believed to be an adaptive adaptation to promote mammalian uterine smooth muscle quiescence in late pregnancy [26]. In addition, nerve fiber density decreases in rats during proestrus and estrus but returns to baseline during metestrus and diestrus [27]. The regulatory mechanisms of uterine de – and reinnervation have not yet been fully elucidated, but it is believed that NFs play a significant role in this. Physiological uterine sympathetic denervation has been suggested to be associated with increased levels of proNGF, which induces neuronal apoptosis [28], as well as BDNF, which inhibits neurite outgrowth in the presence of estrogens [26]. In our experiments, the decrease in the ICS of the rat uterus is possibly related to the decrease in its innervation under the influence of NFs, which are concentrated in the fCSG.

Conclusions.

Total CSG and its low molecular weight fraction (<30 kDa) differ in their biological effects on the reproductive system of female rats of different ages. The CSG fraction exerts an activating effect on the follicular profile of the ovaries of RE rats, which is expressed in a decrease in the number of follicles of hormone-independent stages of development. At the same time, administration of the CSG fraction leads to a decrease in the force of isometric contraction of the uterus in rats, which may be associated with physiological changes in its innervation.

Prospects for further research.

One of the modern approaches to correcting the reproductive system's function is the use of NF, the source of which can be the fraction of CSG with a molecular weight <30 kDa. Experimental studies showed that the obtained fraction has an NF-like biological effect on the female reproductive system. In further studies, it is necessary to analyze the composition of the low-molecular fraction of CSG.

БІОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНОЇ ФРАКЦІЇ КРІОЕКСТРАКТУ СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ НА РЕПРОДУКТИВНУ СИСТЕМУ САМИЦЬ ЩУРІВ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків, Україна)

nesterukhanna@gmail.com

Одним із сучасних підходів до корекції функції репродуктивної системи є застосування нейротрофічних факторів, джерелом яких може бути фракція кріоекстракту спінальних гангліїв. У роботі представлена оцінка впливу низькомолекулярної фракції кріоекстракту спінальних гангліїв (<30 кДа) на фолікулярний склад яєчників та скоротливу активність матки щурів. Експерименти проведені на білих безпородних самицях щурів 6 і 14 місяців, що відповідає репродуктивному та пізньому репродуктивному віку для цього виду тварин. Кріоекстракт отримували зі спінальних гангліїв неонатальних поросят. Фракцію кріоекстракту з молекулярною масою до 30 кДа отримували методом ультрафільтрації з використанням поліетилсульфонової мембрани. Загальний кріоекстракт та його низькомолекулярну фракцію вводили щурам внутрішньочеревно впродовж 9 днів. Після закінчення експерименту проведено гістологічне дослідження фолікулів яєчників та вивчення скоротливої активності матки методом органної бані. Встановлено, що загальний кріоекстракт спінальних гангліїв та його низькомолекулярна фракція відрізняються за своїм біологічним впливом на репродуктивну систему самиць щурів різного віку. Фракція кріоекстракту спінальних гангліїв здійснює активуючу дію на фолікулярний профіль яєчників щурів репродуктивного віку, що виражається у зменшенні кількості фолікулів гормононезалежних стадій розвитку. У той же час введення фракції призводить до зниження сили ізометричного скорочення матки у щурів, що може бути пов'язано із фізіологічними перебудовами її іннервації.

Ключові слова: нейротрофічні фактори, кріоекстракт спінальних гангліїв, яєчник, матка, скоротлива активність.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи «Морфофункціональні характеристики, кріоконсервування та терапевтичний потенціал 2D – і 3D-культур клітин, отриманих з похідних нервового гребеня», № державної реєстрації 0121U109133.

Вступ.

Перспективність використання нейротрофічних факторів (НФ) та інших регуляторних речовин, що походять з органів центральної та периферичної нервової системи, вже доведено у клінічних випробуваннях для лікування низки нейродегенеративних захворювань [1-4]. Однак не всі отримані результати були задовільними, тому пошук альтернативних джерел НФ та нових біологічних субстанцій з нейротрофічною активністю є актуальним на теперішній час.

Сімейство НФ складається з фактору росту нервів (NGF), нейротропного фактора мозку (BDNF), нейротрофіну 3 (NT-3), нейротрофіну 4/5 (NT-4/5, також відомий як NT-4, NT-5), нейротрофіну 6 (NT-6), гліального нейротрофічного фактору (GDNF). Усі НФ мають низку спільних характеристик, включаючи подібну молекулярну масу мономерів (13,2–15,9 кДа), ізоелектричні точки в діапазоні 9–10 і приблизно 50% ідентичності первинної структури [5-7]. У розчині усі фактори існують у вигляді нековалентно зв'язаних димерів [8, 9].

Як з'ясувалося останніми роками, НФ мають величезний вплив на розвиток і формування жіночої репродуктивної системи [10], а також грають певну роль в індукції її патології [11]. Кріоекстракт спінальних гангліїв є джерелом НФ [12] та інших регуляторних речовин, що робить його можливим кандидатом для отримання препаратів нейротрофічної дії.

Гістологічна будова спінальних гангліїв включає тіла чутливих нейронів, оточені сателітними гліальними клітинами, нервові волокна, шваннівські клітини, клітини сполучної тканини та ендотелію судин, а також резидентні імунні клітини [13]. Більш того, спінальні ганглії є джерелом нейральних стовбурових клітин, які здатні диференціюватися у нейрони та клітини нейроглії [14]. Отже загальний кріоекстракт спінальних гангліїв (зКЕСГ) має містити похідні усіх цих груп клітин. Однак високомолекулярні білкові сполуки мають підвищену здібність викликати імунологічну відповідь, тому існує необхідність попереднього фракціонування кріоекстракту. Беручи до уваги дані щодо молекулярних мас НФ, було доцільним отримати фракцію кріоекстракту спінальних гангліїв (фКЕСГ) до 30 кДа та дослідити її біологічну активність.

Мета дослідження.

Визначення впливу низькомолекулярної фракції кріоекстракту спінальних гангліїв на гістологічні особливості яєчників та скоротливу активність матки щурів.

Об'єкт і методи дослідження.

Усі експерименти на тваринах проводили відповідно до нормативів Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) при дотриманні вимог Комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (ІПКіК НАНУ).

Експерименти проведені на білих безпородних самицях щурів 6 і 14 місяців, що за даними Sengupta P. [15] відповідає репродуктивному віку (РВ) та пізньому репродуктивному віку (ПРВ) для цього виду тварин. Загальна кількість тварин – 58.

Загальний кріоекстракт спінальних гангліїв (зКЕСГ) готували, як описано у роботі [16]. Фракцію кріоекстракту спінальних гангліїв (фКЕСГ) з молеку-

Таблиця 1 – Кількісні гістологічні показники яєчників щурів різного віку після введення зКЕСГ або його низькомолекулярної фракції

Показник	РВ			ПРВ		
	Контроль	зКЕСГ	фКЕСГ	Контроль	зКЕСГ	фКЕСГ
Фолікули + ЖТ	75,5 (71,3; 82,0)	63,5 (57,3; 65,0)*	60,5 (59,7; 61,2)*	65,5 (57,0; 71,3)*	59,5 (57,0; 66,8)*	61,5 (59,5; 62,0)*
Примордіальні+первинні фолікули	23,0 (18,5; 30,5)	23,0 (19,0; 25,5)	13,0 (12,0; 15,5)* #	23,5 (18,3; 26,0)	19,0 (16,7; 22,8)	19,5 (17,5; 20,8)
Антральні фолікули	9,5 (4,5; 11,5)	8,2 (3,5; 10,8)	8,0 (7,3; 8,8)	8,0 (4,6; 9,5)	7,0 (4,0; 8,0)	8,5 (8,0; 9,0)
Атретичні фолікули	12,0 (10,3; 14,5)	14,0 (9,7; 16,8)	20,5 (18,3; 23,5)*#	12,5 (9,3; 15,8)	16,5 (12,8; 17,9)	15,0 (15,0; 17,3)
ЖТ	23,0 (19,1; 26,2)	25,0 (23,3; 28,7)	23,5 (23,0; 24,7)	20,5 (13,3; 24,0)	22,0 (17,0; 25,5)	16,5 (16,0; 17,8)*
Кісти	0 (0; 1,2)	1,5 (1,3; 1,7)	0 (0; 0,7)	3,0 (2,0; 4,5)	2,0 (1,5; 4,5)	1,0 (1,0; 1,8)

Примітки: Кожний з показників нормовано на один яєчник; * – показник значуще відрізняється у порівнянні з показником групи інтактних тварин РВ, $p < 0,05$; # – показник значуще відрізняється між групами тварин одного віку з введенням зКЕСГ або фКЕСГ, $p < 0,05$.

лярною масою до 30 кДа отримували методом ультрафільтрації з використанням поліефірсульфонової мембрани («Millipore», Німеччина). У якості розчин-носія використовували стерильний фізіологічний розчин. Експериментальні препарати вводили внутрішньочеревно впродовж 9 днів по 0,2 мл/тварину. На 28-29 добу тварин виводили з експерименту.

Для гістологічного аналізу яєчники видаляли, фіксували їх у 10%-му нейтральному формаліні та виготовляли серійні зрізи (7-8 мкм). Зрізи забарвлювали за стандартним методом гематоксиліном/еозинном, досліджували за допомогою світлового мікроскопа AmScope XYL-403 (KHP). За допомогою програми AxioVision Rel. 4.8. підраховували кількість фолікулів та жовтих тіл (ЖТ) на різних стадіях зрілості за класифікацією [17].

Ріг матки забирали для вивчення скоротливої активності матки (САМ) методом органної бані [18]. Для цього виготовляли ізольовані смужки (ІС) тканини розміром 8x3 мм, вертикально монтували їх у проточному осередку (37°C), так, щоб один кінець був зв'язаний зі стаціонарним тримачем, а другий – з механо-електричним трансдюсером Grass FT03C («Grass Instruments», США). Трансдюсер був з'єднаний з адаптером-мультиметром OWON B41T+ («OWON», КНР), за допомогою якого реєстрували криві скоротливої активності ІС. Перед експериментом ІС інкубували у розчині Кребса (рН=7,4) протягом 60 хв у ізометричних умовах з навантаженням 1 г.

Для вивчення індукованої САМ використовували розчин KCl в кінцевій концентрації 70 мМ або окситоцин (ОТ) у кінцевій концентрації 4 нМ. САМ кожного зразка реєстрували протягом 10 хвилин. Частоту скорочень (ЧС) розраховували як середню кількість циклів скорочення-розслаблення ІС у хвилину. Амплітуду скорочень (АС) визначали як середню висоту піка на кривій скорочення та виражали у мН. Силу ізометричного скорочення (СІС) розраховували як площину під кривою скорочення ІС, нормовану до площини її поперечного перерізу і виражали у (г·с)/см². Площину поперечного перерізу ІС розраховували за формулою:

$$S = m / pl,$$

де m – маса ІС, l – довжина ІС, p приймали рівною 1,05 г/см³.

В експерименті були використані групи тварин РВ: інтактні ($n=14$); з введенням зКЕСГ ($n=8$); з введенням фКЕСГ ($n=8$). Групи тварин ПРВ: інтактні ($n=12$); з введенням зКЕСГ ($n=8$); з введенням фКЕСГ ($n=8$).

Для статистичного аналізу даних використовували програму Statistica 10 («StatSoft», США). Результати представляли у вигляді $Me (Q1; Q2)$ (Me – медіана, $Q1$ – 1-й квантиль; $Q3$ – 3-й квантиль). Статистичну значущість відмінностей між групами оцінювали за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні. Відмінності вважали статистично значущими, якщо $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

Введення зКЕСГ та фКЕСГ щурам РВ призводило до зниження кількості фолікули+ЖТ у яєчниках порівняно з інтактним контролем цього ж віку (**таблиця 1**). За умов введення фКЕСГ відбувалося статистично значуще зменшення сумарної кількості фолікулів гормон-незалежних стадій розвитку (примордіальних та первинних), а також підвищення кількості фолікулів на стадії атрезії. Кількість антральних фолікулів, ЖТ та фолікулярних кіст не змінювалася за введення зКЕСГ або фКЕСГ у порівнянні з контролем.

У яєчниках тварин ПРВ зменшувався показник фолікули+ЖТ порівняно з інтактним контролем РВ, що відображало зміни фолікулярного профілю яєчників, які відбуваються з віком. Кількість фолікулів різних стадій розвитку та ЖТ не змінювалася між групами з введенням зКЕСГ або його фракції. Кількість атретичних фолікулів була схожою у інтактних тварин обох вікових груп, а також у тварин ПРВ з введенням загального або фракціонованого КЕСГ.

Добре відомо, що фертильність щурів знижується у віці від 8-10 місяців та далі. У цей же період підвищується кількість фолікулярних кіст [17, 19]. У наших експериментах не спостерігалося статистично значущих змін у кількості кіст яєчників в залежності від віку або введення зКЕСГ/фКЕСГ.

Показники САМ щурів представлені у **таблиці 2**. Помітно, що введення фКЕСГ підвищувало базальну ЧС у щурів обох вікових груп та водночас зменшувало СІС, індуковану ОТ або KCl. Введення зКЕСГ мало позитивний ефект на базальну, ОТ – та KCl-індуковану СІС у тварин обох вікових груп. При цьому, відбувалося статистично значуще підвищення СІС матки щурів

Таблиця 2 – Показники САМ щурів різних груп після введення зКЕСГ або його низькомолекулярної фракції

Показник	РВ			ПРВ		
	Контроль	зКЕСГ	фКЕСГ	Контроль	зКЕСГ	фКЕСГ
ЧС базальна	0,2 (0,1; 0,2)	0,1 (0,1; 0,1)	0,7 (0,6; 0,7)* #	0,2 (0,2; 0,3)	0,2 (0,2; 0,2)	0,7 (0,5; 0,7)* #
ЧС ОТ – індукована	0,9 (0,5; 1,1)	0,8 (0,8; 0,9)	0,7 (0,7; 0,9)	0,8 (0,4; 0,9)	0,8 (0,8; 0,8)	1,1 (0,8; 1,2)
Базальна АС	10,7 (10,3; 11,4)	10,2 (10,1; 10,2)	10,8 (10,7; 10,8)	10,9 (10,8; 11,0)	10,7 (10,3; 10,8)	10,8 (10,7; 11,5)
КСІ – індукована АС	11,5 (11,0; 12,1)	11,6 (11,2; 12,1)	11,9 (11,7; 12,1)	12,1 (11,5; 12,2)	11,6 (10,6; 12,3)	15,0 (14,5; 15,3)* #
ОТ – індукована АС, мН	11,5 (11,2; 13,1)	12,0 (11,1; 12,5)	11,8 (11,7; 12,0)	11,8 (11,7; 12,5)	12,0 (11,9; 13,4)	13,8 (13,2; 14,9)
Базальна СІС	35,2 (25,0; 44,9)	36,1 (30,3; 48,6)	22,5 (20,8; 27,3)	25,8 (21,9; 28,4)	41,5 (38,1; 43,0) ^a	25,1 (24,0; 27,4) #
КСІ – індукована СІС	35,9 (26,7; 48,2)	41,1 (35,8; 51,1)	23,7 (22,1; 28,8) #	28,8 (23,6; 31,3)	44,2 (43,4; 44,9) ^a	31,2 (29,0; 31,3) #
ОТ – індукована СІС	36,3 (26,7; 45,7)	39,6 (34,0; 49,5)	23,0 (21,3; 29,0) #	27,9 (22,6; 29,8)	42,7 (42,2; 49,1) ^a	28,7 (27,8; 29,9) #

Примітки: * – показник значуще відрізняється у порівнянні з показником групи інтактних тварин РВ, $p < 0,05$; # – показник значуще відрізняється між групами тварин одного віку з введенням зКЕСГ або фКЕСГ, $p < 0,05$; ^a – показник експериментальних тварин ПРВ значуще відрізняється у порівнянні з показником інтактних тварин ПРВ, $p < 0,05$.

ПРВ та досягнення показників інтактних щурів РВ. Активуючого впливу фКЕСГ на СІС матки щурів ПРВ не спостерігалось. У групі тварин РВ введення фКЕСГ призводило до пригнічення СІС матки.

Раніше було виявлено, що NGF і його рецептори широко експресуються в овоцитах, клітинах теки, гранулози, інтерстицію яєчників різних видів, включаючи людину, гризунів, велику рогату худобу, овець, кіз. Цей НФ є важливим фактором первинного росту фолікулів у негонадотропін-залежній фазі [20]. Екзогенне введення NGF щурам приводило до такого ж самого ефекту зменшення кількості малих фолікулів [21].

У результаті проведення наших експериментів теж встановлено зменшення кількості примордіальних та первинних фолікулів, особливо в яєчниках щурів РВ, після введення фКЕСГ, що свідчить про стимулюючий вплив фКЕСГ на вихід фолікулів з дормантного стану. Таким чином, цей ефект може бути асоційованим із NGF, що є зконцентрованими у фКЕСГ. Крім того, можливими кандидатами на роль активаторів фолікулогенезу у складі фКЕСГ є NT-3 та GDNF, оскільки було показано їх здібність до активації трансформації примордіальних фолікулів [22, 23]. Потрібно також відзначити, що стимульований за рахунок фКЕСГ фолікулогенез не завершувався дозріванням фолікулів, про що свідчить статистично незмінна кількість антральних фолікулів/ЖТ та підвищена кількість фолікулів на стадії атрезії.

Відомо, що нейропластичність матки та реалізація її нормальної скоротливої функції залежить від НФ [24-26]. Нервовий контроль міоцитів матки забезпечується нервовими волокнами центральної та периферичної нервової системи, створюючи вісцеральну корегуляцію [24]. Під впливом естрогенів і прогестерону відбуваються циклічні перебудови матки, які зачіпають у тому числі й периферичну іннервацію [25]. На тлі високих рівнів естрогенів від-

бувається дегенерація аксонів симпатичних нервів у матці [25]. Вважається, що це є адаптаційним пристосуванням для сприяння спокою гладкої мускулатури матки ссавців на пізніх термінах вагітності [26]. Крім того, у щурів щільність нервових волокон зменшується під час проєструсу та еструсу, але повертається до вихідного рівня під час метеструсу та дієструсу [27]. Регуляторні механізми де – та реіннервації матки досі до кінця не з'ясовано, але вважається, що НФ відіграють в цьому значну роль. Є припущення, що фізіологічна симпатична денервація матки пов'язана з підвищенням рівню проNGF, який викликає апоптоз нейронів [28], а також BDNF, який пригнічує зростання нейритів у присутності естрогенів [26]. У наших експериментах зменшення СІС матки щурів, можливо, пов'язане зі зниженням її іннервації під впливом НФ, які сконцентровані у фКЕСГ.

Висновки.

Загальний КЕСГ та його низькомолекулярна фракція (<30кДа) відрізняються за своїм біологічним впливом на репродуктивну систему щурів самиць різного віку. Фракція КЕСГ здійснює активуючу дію на фолікулярний профіль яєчників щурів РВ, що виражається у зменшенні кількості фолікулів гормоно-незалежних стадій розвитку. У той же час введення фракції КЕСГ призводить до зниження сили ізометричного скорочення матки у щурів, що може бути пов'язано із фізіологічними перебудовами її іннервації.

Перспективи подальших досліджень.

Один з сучасних підходів до корекції функції репродуктивної системи полягає у застосуванні НФ, джерелом яких може бути фракція КЕСГ з молекулярною масою <30кДа. Проведені експериментальні дослідження показали, що отримана фракція володіє НФ-подібною біологічною дією на жіночу репродуктивну систему. У подальших дослідженнях необхідно провести аналіз складу низькомолекулярної фракції КЕСГ.

References / Література

1. Yanai R, Nishida T, Chikama T, Morishige N, Yamada N, Sonoda KH. Potential New Modes of Treatment of Neurotrophic Keratopathy. Cornea. 2015;34(11):S121-7. DOI: [10.1097/ICO.0000000000000587](https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000587).
2. Bezdzian A, Kraaijenga VJ, Ramekers D, Versnel H, Thomeer HG, Klis SF, et al. Towards Clinical Application of Neurotrophic Factors to the Auditory Nerve: Assessment of Safety and Efficacy by a Systematic Review of Neurotrophic Treatments in Humans. Int J Mol Sci. 2016 Nov 26;17(12):1981. DOI: [10.3390/ijms17121981](https://doi.org/10.3390/ijms17121981).
3. McFarthing K, Prakash N, Simuni T. Clinical trial highlights: 1. Gene therapy for Parkinson's, 2. Phase 3 Study in focus – Intec Pharma's accordion pill 3. Clinical trials resources. J Parkinsons Dis. 2019;9(2):251-264. DOI: [10.3233/JPD-199001](https://doi.org/10.3233/JPD-199001).
4. Meyer AH, Feldsien TM, Mezler M, Untucht C, Venugopalan R, Lefebvre DR. Novel Developments to Enable Treatment of CNS Diseases with Targeted Drug Delivery. Pharmaceutics. 2023 Mar 29;15(4):1100. DOI: [10.3390/pharmaceutics15041100](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041100).
5. Liu Z, Wu H, Huang S. Role of NGF and its receptors in wound healing (Review). Exp Ther Med. 2021 Jun;21(6):599. DOI: [10.3892/etm.2021.10031](https://doi.org/10.3892/etm.2021.10031).
6. Zhang HT, Li LY, Zou XL, Song XB, Hu YL, Feng ZT, et al. Immunohistochemical distribution of NGF, BDNF, NT-3, and NT-4 in adult rhesus monkey brains. J Histochem Cytochem. 2007 Jan;55(1):1-19. DOI: [10.1369/jhc.6A6952.2006](https://doi.org/10.1369/jhc.6A6952.2006).
7. Katoh-Semba R, Ichisaka S, Hata Y, Tsumoto T, Eguchi K, Miyazaki N, et al. NT-4 protein is localized in neuronal cells in the brain stem as well as the dorsal root ganglion of embryonic and adult rats. J Neurochem. 2003 Aug;86(3):660-8. DOI: [10.1046/j.1471-4159.2003.01874.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01874.x).
8. Barker PA, Mantyh P, Arendt-Nielsen L, Viktrup L, Tive L. Nerve Growth Factor Signaling and Its Contribution to Pain. J Pain Res. 2020 May 26;13:1223-1241. DOI: [10.2147/JPR.S247472](https://doi.org/10.2147/JPR.S247472).
9. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, et al. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. J Biol Chem. 2001 Apr 20;276(16):12660-6. DOI: [10.1074/jbc.M008104200](https://doi.org/10.1074/jbc.M008104200).
10. Streiter S, Fisch B, Sabbah B, Ao A, Abir R. The importance of neuronal growth factors in the ovary. Mol Hum Reprod. 2016;22(1):3-17. DOI: [10.1093/molehr/gav057](https://doi.org/10.1093/molehr/gav057).
11. Zhai Y, Yao G, Rao F, Wang Y, Song X, Sun F. Excessive nerve growth factor impairs bidirectional communication between the oocyte and cumulus cells resulting in reduced oocyte competence. Reprod Biol Endocrinol. 2018 Mar 27;16(1):28. DOI: [10.1186/s12958-018-0349-7](https://doi.org/10.1186/s12958-018-0349-7).
12. Obata K, Tsujino H, Yamanaka H, Yi D, Fukuoka T, Hashimoto N, et al. Expression of neurotrophic factors in the dorsal root ganglion in a rat model of lumbar disc herniation. Pain. 2002 Sep;99(1-2):121-32. DOI: [10.1016/s.0304-3959\(02\)00068-4](https://doi.org/10.1016/s.0304-3959(02)00068-4).
13. Feng R, Muraleedharan Saraswathy V, Mokalled MH, Cavalli V. Self-renewing macrophages in dorsal root ganglia contribute to promote nerve regeneration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2023 Feb 14;120(7):e2215906120. DOI: [10.1073/pnas.2215906120](https://doi.org/10.1073/pnas.2215906120).
14. Ogawa R, Fujita K, Ito K. Mouse embryonic dorsal root ganglia contain pluripotent stem cells that show features similar to embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. Biol Open. 2017;6(5):602-18. DOI: [10.1242/bio.021758](https://doi.org/10.1242/bio.021758).
15. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. Int J Prev Med. 2013 Jun;4(6):624-30. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3733029/>.
16. Globa V, Bondarenko T, Bozhok G, Samburg Y, Legach E. Biologically Active Compositions Containing Neurotrophic Factors Change the Contractile Activity of Detrusor of Rats with Infravesical Obstruction. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2020;30(2):188-198. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo30.02.188>.
17. Dixon D, Alison R, Bach U, Colman K, Foley GL, Harleman JH, et al. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. J Toxicol Pathol. 2014;27(3-4):1S-107S. DOI: [10.1293/tox.27.1S](https://doi.org/10.1293/tox.27.1S).
18. Rhee JW, Zhang L, Ducsay CA. Suppression of myometrial contractile responses to oxytocin after different durations of chronic hypoxia in the near-term pregnant rat. Am J Obstet Gynecol. 1997 Sep;177(3):639-44. DOI: [10.1016/s0002-9378\(97\)70158-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(97)70158-3).
19. Cruz G, Fernandois D, Paredes AH. Ovarian function and reproductive senescence in the rat: role of ovarian sympathetic innervation. Reproduction. 2017 Feb;153(2):R59-R68. DOI: [10.1530/REP-16-0117](https://doi.org/10.1530/REP-16-0117).
20. Chaves RN, Alves AMCV, Lima LF, Matos HMT, Rodrigues APR, Figueiredo JR. Role of nerve growth factor (NGF) and its receptors in folliculogenesis. Zygote. 2013;21(2):187-197. DOI: [10.1017/S0967199412000111](https://doi.org/10.1017/S0967199412000111).
21. Fu X, Zheng Q, Zhang N, Ding M, Pan X, Wang W, et al. CUMS Promotes the Development of Premature Ovarian Insufficiency Mediated by Nerve Growth Factor and Its Receptor in Rats. Biomed Res Int. 2020 Jun 30;2020:1946853. DOI: [10.1155/2020/1946853](https://doi.org/10.1155/2020/1946853).
22. Dole G, Nilsson EE, Skinner MK. Glial-derived neurotrophic factor promotes ovarian primordial follicle development and cell-cell interactions during folliculogenesis. Reproduction. 2008 May;135(5):671-82. DOI: [10.1530/REP-07-0405](https://doi.org/10.1530/REP-07-0405).
23. Nilsson E, Dole G, Skinner MK. Neurotrophin NT3 promotes ovarian primordial to primary follicle transition. Reproduction. 2009 Oct;138(4):697-707. DOI: [10.1530/REP-09-0179](https://doi.org/10.1530/REP-09-0179).
24. Español P, Luna R, Soler C, Caruana P, Altés-Arranz A, Rodríguez F, et al. Neural plasticity of the uterus: New targets for endometrial cancer? Womens Health (Lond). 2022 Jan-Dec;18:17455057221095537. DOI: [10.1177/17455057221095537](https://doi.org/10.1177/17455057221095537).
25. Brauer MM. Plasticity in uterine innervation: State of the art. Curr Protein Pept Sci. 2017;18(2):108-19. DOI: [10.2174/1389203717666160322145411](https://doi.org/10.2174/1389203717666160322145411).
26. Brauer MM, Smith PG. Estrogen and female reproductive tract innervation: cellular and molecular mechanisms of autonomic neuroplasticity. Auton Neurosci. 2015 Jan;187:1-17. DOI: [10.1016/j.autneu.2014.11.009](https://doi.org/10.1016/j.autneu.2014.11.009).
27. Latini C, Frontini A, Morroni M, Marziani D, Castellucci M, Smith PG. Remodeling of uterine innervation. Cell Tissue Res. 2008 Oct;334(1):1-6. DOI: [10.1007/s00441-008-0657-x](https://doi.org/10.1007/s00441-008-0657-x).
28. Al-Shawi R, Hafner A, Olsen J, Chun S, Raza S, Thrasivoulou C, et al. Neurotoxic and neurotrophic roles of proNGF and the receptor sortilin in the adult and ageing nervous system. Eur J Neurosci. 2008 Apr;27(8):2103-14. DOI: [10.1111/j.1460-9568.2008.06152.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06152.x).

БІОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНОЇ ФРАКЦІЇ КРІОЕКСТРАКТУ СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ НА РЕПРОДУКТИВНУ СИСТЕМУ САМИЦЬ ЩУРІВ

Нестерук Г. В., Легач Є. І.

Резюме. Нейротрофічні фактори мають величезний вплив на розвиток і формування жіночої репродуктивної системи. Кріоекстракт спінальних гангліїв є джерелом нейротрофічних факторів, однак крім них він містить високомолекулярні сполуки, які володіють підвищеною імуногенністю та можуть викликати алергічні реакції. Оскільки усі нейротрофічні фактори мають подібну молекулярну масу (13-15 кДа), доцільним є отримання низькомолекулярної фракції кріоекстракту. *Мета роботи* – визначення впливу фракції кріоекстракту спінальних гангліїв з молекулярною масою <30 кДа на гістологічні особливості яєчників та скоротливу активність матки щурів різного віку. *Методи.* Експерименти проведені на самицях щурів 6 і 14 місяців, що відповідає репродуктивному та пізньому репродуктивному віку у цього виду тварин. Кріоекстракт виготовляли зі спінальних гангліїв неонатальних поросят. Низькомолекулярну фракцію отримували методом ультрафільтрації з використанням полієфісульфонової мембрани. Отримані біопрепарати вводили щурам внутрішньочеревно. На 28-29 добу тварин виводили з експерименту. Проведено гістологічне дослідження фолікулів яєчників різних стадій розвитку. Скоротливу активність матки вивчали на ізольованих смужках тканини методом органної бані. На експериментальних кривих, отриманих під час реєстрації скорочень, визначали частоту та амплітуду

скорочень, силу ізометричного скорочення матки. Вивчали базальну скоротливу активність матки та активність, індуковану розчинами KCl або окситоцину.

Результати. Загальний кріоекстракт спінальних гангліїв та його низькомолекулярна фракція відрізняються за своїм біологічним впливом на репродуктивну систему щурів самиць різного віку. Фракція кріоекстракту спінальних гангліїв здійснює активуючу дію на фолікулярний профіль яєчників щурів репродуктивного віку, що виражається у зменшенні кількості фолікулів гормононезалежних стадій розвитку. У той же час введення фракції призводить до зниження сили ізометричного скорочення матки у щурів, що може бути пов'язано із фізіологічними перебудовами її іннервації.

Ключові слова: нейротрофічні фактори, кріоекстракт спінальних гангліїв, яєчник, матка, скоротлива активність.

BIOLOGICAL EFFECTS OF THE LOW-MOLECULAR FRACTION OF THE DORSAL ROOT GANGLIA CRYOEXTRACT ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF FEMALE RATS

Nesteruk A. V., Legach E. I.

Abstract. Neurotrophic factors have a huge impact on the development and formation of the female reproductive system. Cryoextract of dorsal root ganglia is a source of neurotrophic factors, but in addition to them, it contains high-molecular compounds that have increased immunogenicity and can cause allergic reactions. Since all neurotrophic factors have a similar molecular weight (13-15 kDa), it is expedient to obtain a low-molecular fraction of the cryoextract. **Goal.** The goal is to study the effect of the dorsal root ganglia cryoextract fraction with a molecular weight <30 kDa on the histological features of the ovaries and the contractile activity of the uterus of various ages rats. **Methods.** The experiments were conducted on female rats aged 6 and 14 months, which corresponds to the reproductive and late reproductive age of this species of animals. The cryoextract was made from the dorsal root ganglia of neonatal piglets. The low-molecular-weight fraction was obtained by ultrafiltration using a polyethersulfone membrane. Obtained biological preparations were administered intraperitoneally to rats. On the 28-29th day, the animals were removed from the experiment. A histological study of ovarian follicles of different stages of development was carried out. The contractile activity of the uterus was studied on isolated strips of tissue using the organ bath method. The frequency and amplitude of uterine contractions as well as the force of isometric contraction were determined on the experimental curves obtained during the registration of contractions. The basal contractile activity of the uterus and its activity induced by solutions of KCl or oxytocin were studied. **Results.** The total cryoextract of dorsal root ganglia and its low-molecular – weight fraction differ in their biological effect on the reproductive system of female rats of different ages. The fraction of cryoextract of dorsal root ganglia exerts an activating effect on the follicular profile of ovaries of rats of reproductive age, which is expressed in a decrease in the number of follicles of hormone-independent stages of development. At the same time, the introduction of the fraction leads to a decrease in the force of isometric contraction of the uterus in rats, which may be associated with physiological changes in its innervation.

Key words: neurotrophic factors, dorsal root ganglia cryoextract, ovary, uterus, contractile activity.

ORCID and contributionship / ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Nesteruk H. V.: [0000-0001-5000-6484](https://orcid.org/0000-0001-5000-6484) ^{ABCD}

Legach E. I.: [0000-0002-0656-4515](https://orcid.org/0000-0002-0656-4515) ^{DE}

Conflict of interest / конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest. / Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Nesteruk Hanna Volodymyrivna / Нестерук Ганна Володимирівна

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine / Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Ukraine, 61016, Kharkiv, 23 Pereyaslavska str / Адреса: Україна, 61016, м. Харків, вул. Переяславська 23

Tel.: 0679911072 / Тел.: 0679911072

E-mail: nesterukhanna@gmail.com

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 23.11.2022 / Стаття надійшла 23.11.2022 року
Accepted 05.05.2023 / Стаття прийнята до друку 05.05.2023 року