

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

Кваліфікаційна наукова
праця правах рукопису

КОРОТКИЙ ОЛЕКСАНДР ГРИГОРОВИЧ

УДК 616.72-018.3:615.2/3:577.121

ДИСЕРТАЦІЯ

**БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ РЕМОДЕЛЮВАННЯ ХРЯЦОВОЇ
ТКАНИНИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ОСТЕОАРТРИТІ**

03.00.04 – біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

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

_____ О.Г. Короткий

Науковий консультант: **Остапченко Людмила Іванівна**, д.б.н., проф.

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Короткий О.Г. Біохімічні механізми ремоделювання хрящової тканини при експериментальному остеоартриті. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Міністерство освіти і науки. Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена з'ясуванню біохімічних механізмів ремоделювання хрящової тканини за експериментального моноіодацетат-індукованого остеоартриту (ОА) при введенні хондроїтину сульфату (ХС) і пробіотика (ПБ).

Встановлено, що в щурів за умов експериментального ОА виникає дисбіотичний стан товстої кишки та дегенеративно-дистрофічні зміни у хрящовій тканині колінних суглобів. Аналіз видового та кількісного складу фекальної мікробіоти в щурів з експериментальним ОА показав зниження кількості *Bifidobacterium* та *Lactobacillus*, підвищення кількості *Clostridium spp.*, лактозо-негативної *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, умовно патогенних ентеробатерій та дріжджоподібних грибів роду *Candida*. Гістологічний аналіз виявив запальні, гіперпластичні та деструктивно-дистрофічні зміни в хрящовій та субхондральній кістковій тканинах суглобу: хрящ втрачав волокнисту структуру, кількість і розмір хондроцитів зменшувалися, спостерігалися скупчення запального інфільтрату, фіброзні зміни синовіальної тканини. Введення ХС та ПБ тваринам з експериментальним ОА зменшувало вираженість дистрофічно-дегенеративних змін хрящової та субхондральної кісткової тканин суглоба, а також сприяло відновленню мікробіоти товстої кишки: збільшувалися кількості *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* та зменшувалися кількості *Clostridium spp.*, лактозо-негативної *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, умовно патогенних ентеробатерій та дріжджоподібних

грибів роду *Candida*. Показано загальний синергічний позитивний ефект комбінованого застосування ХС та ПБ за умов експериментального ОА.

Важливими маркерами метаболічних змін ремоделювання хрящової тканини, зокрема на ранніх стадіях розвитку захворювання, є рівні компонентів хрящового матриксу, які відіграють ключову роль у процесах деградації та відновлення хряща. За умов експериментального ОА встановлено підвищення концентрації ключових біохімічних маркерів метаболізму хряща: олігомерного матричного білка (COMP), агрекану (ACAN), катепсину К (CTSK), хрящового глікопротеїну-39 (CHI3L1) у сироватці крові; зниження рівня експресії генів основних компонентів хрящового матриксу (*Col2a1*, *Acan*, *Comp*) у хрящовій тканині; збільшення вмісту протеолітичних ферментів – матриксних металопротеїназ (ММП-1,-2,-3,-8) у сироватці крові та хрящовій тканині, що може свідчити про деградацію нативного фібрилярного колагену, хрящового матриксу та порушення ремоделювання хрящової тканини. Введення ХС і ПБ тваринам з експериментальним ОА, особливо їх комбінація, сприяло активації анаболічних процесів при ремоделюванні хряща, з відновленням вищезазначених знижених концентрацій біохімічних маркерів метаболізму хрящової тканини, рівнів експресії генів основних компонентів хрящового матриксу та підвищених вмістів ММП.

Інформативними показниками ступеню запалення та патогенетичних змін у організмі є рівень цитокінів. Серед цитокінів, які беруть участь у метаболізмі хряща, нами було досліджено вміст катаболічних маркерів запалення, до яких належать інтерлейкіни-1 β , -6, -8 (ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8), фактор некрозу пухлин- α (ФНП- α), інтерферон- γ (ІФН- γ), та анаболічних протизапальних цитокінів – ІЛ-4, ІЛ-10, трансформуючий фактор росту- β (ТФР- β), інсуліно-подібний фактор росту (ІФР-1). За експериментального ОА зростає вміст катаболічних показників прозапального цитокінового профілю (ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-8, ІФН- γ) та ТФР- β при одночасному зниженні вмісту анаболічних протизапальних

цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10) та ІФР-1, як у сироватці крові, так і хрящовій тканині щурів. Крім того, показано в сироватці крові підвищення концентрації простагландину E₂, а в хрящовій тканині збільшення рівнів експресії залучених до розвитку запалення генів (*Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*). Виявлені зміни цитокінового профілю можуть свідчити про розвиток запалення як на системному, так і на місцевому рівнях, з активацією компенсаторних імунних механізмів, оскільки цитокіни здатні регулювати захисні реакції організму, в тому числі, впливаючи на метаболізм хрящової тканини. Введення ХС і ПБ за експериментального ОА частково відновлювало вміст модулюючих запальну відповідь катаболічних й анаболічних цитокінів у сироватці крові та хрящі. Виявлений ефект був найбільш виражений при їх сумісному застосуванні та супроводжувався зменшенням не лише інтенсивності запалення в суглобі та організмі, а й пригніченням деструктивних процесів у хрящовій тканині.

Провідну роль у виникненні та прогресуванні ОА відіграє інтенсифікація реакцій вільнорадикального окиснення, що призводить до структурних та функціональних змін у хондроцитах і позаклітинному матриксі, запальних і дегенеративних змін хряща й оточуючих тканин. У ході проведених експериментів встановлено, що у сироватці крові та хрящовій тканині щурів з експериментальним ОА зростає вміст супероксидного радикалу та пероксиду водню, продуктів перекисного окиснення ліпідів та білків. Відбувалося порушення функціонування антиоксидантної системи: знижувалася супероксиддисмутаза (СОД) і підвищувалася каталазна активності в сироватці крові, зростали СОД і каталазна активності в хрящовій тканині, на фоні виснаження глутатіон-залежних ферментів і порушення співвідношення окисненої та відновленої форм глутатіону в сироватці крові та хрящовій тканині щурів з експериментальним ОА, що свідчило про розвиток окисного стресу як на локальному, так і на системному рівнях. Застосування ХС та ПБ тваринам з експериментальною патологією сприяло відновленню порушеної окисно-антиоксидантної

рівноваги як у суглобі (місцево), так і в крові (на системному рівні), сприяючи пригніченню утворення надлишку кисневих радикалів, зниженню інтенсивності процесів ліпідної і білкової пероксидації, нормалізації функціонування ферментативної та неферментативної ланок антиоксидантної системи.

Регуляція синтезу та деградації суглобового хряща здійснюється комплексом гуморальних механізмів, із залученням складних шляхів сигнальної трансдукції, які активуються різноманітними біологічно активними молекулами. Хондроцити реалізують свій катаболічний вплив на хрящ шляхом активації Toll-подібних рецепторів TLR-2 та TLR-4, в тому числі патернами мікробного походження. Приєднання Toll-подібними рецепторами адаптерних молекул, приводить до запуску внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, результатом яких стає активація ряду транскрипційних факторів, зокрема NF-κB. З метою оцінки прозапальних змін та ланок, які здатні ініціювати запуск імунної відповіді та катаболічного каскаду в тканинах суглоба при експериментальному ОА та за умов введення ХС і ПБ, проведено дослідження імуногістохімічної (ІГХ) експресії TLR-2, TLR-4, NF-κB і рівнів експресії генів *Tlr2*, *Tlr4*, *Nfkb1* в хрящовій тканині, а також вмісту розчинних форм TLR-2, TLR-4 в сироватці крові. ІГХ дослідження показало, що деструктивні зміни, ознаки загибелі хондроцитів та деградації матриксу в щурів з експериментальним ОА асоційовані з виразною активацією експресії всіх оцінюваних біомаркерів: TLR-2, TLR-4 та NF-κB. За умов введення ХС і ПБ тваринам з експериментальним ОА спостерігалось зниження надекспресії у хрящі, найбільш виражене за комбінованого введення: зафіксовано відсутність ІГХ експресії TLR-2, TLR-4 та значне зниження експресії NF-κB, відносно тварин з експериментальною патологією. Зміни рівня експресії Toll-подібних рецепторів TLR-2 та TLR-4 у хрящі за умов експериментальної патології суглоба та при введенні ХС і ПБ корелювали зі встановленими змінами вмісту їх розчинних форм у сироватці крові, що може свідчити не лише про

асоціацію розвитку патологічного процесу з індукцією надекспресією патернрозпізнавальних рецепторів у хрящовій тканині, а й бути наслідком їх шедінгу. Крім того, за експериментального ОА в хрящі нами встановлено підвищення рівнів експресії генів *Tlr2*, *Tlr4*, *Nfkb1*, які кодують відповідні Toll-подібні рецептори – TLR-2, TLR-4 та транскрипційний ядерний фактор NF-κB і залучені в шляхи сигнальної трансдукції, модуляції імунної відповіді та ремоделювання хрящової тканини. ХС та ПБ зрушували надекспресію вищезазначених генів, сприяючи активації анаболічних процесів, зменшенню ураження та відновленню структури хряща, а також сповільненню прогресування ОА, більш виражено при їх сумісній дії, ймовірно, шляхом як прямого, так і опосередкованого впливів на мікробіоту товстої кишки, перебіг запального процесу, оксидантно-антиоксидантну рівновагу та метаболізм хряща. За результатами експериментальних досліджень запропоновано концептуальну схему залучення мікробіоти товстої кишки до біохімічних механізмів ремоделювання хрящової тканини суглобів при експериментальному ОА через TLR-2/4-опосередкований NF-κB-залежний запальний шлях.

Таким чином, мікробіота товстої кишки бере активну участь у фізіології та патології господаря завдяки діяльності мікробіома та продуктів його метаболізму, зокрема й за розвитку ОА, який характеризується руйнуванням суглобового хряща, місцевими/системними запаленнями і порушенням оксидантно-антиоксидантної рівноваги. Сучасні уявлення щодо впливу мікробіоти травного тракту на розвиток ОА та отримані нами експериментальні дані дають підстави стверджувати, що дисбіоз може бути одним із основних об'єднуючих механізмів всіх етіологічних факторів, які задіяні в патогенез ОА (вік, стать, ожиріння, цукровий діабет, травми, надмірні фізичні навантаження, аутоімунні та інфекційні процеси). Експериментальне обґрунтування біологічної дії ХС та ПБ на стан мікробіоти товстої кишки та хрящовий метаболізм за умов розвитку ОА завдяки здатності впливати на TLR-2/4-опосередкований NF-κB запальний

шлях відкриває перспективи їх сумісного використання в якості засобів додаткової комплексної терапії та профілактики патології суглобів різного генезу.

Ключові слова: остеоартрит, ремоделювання хрящової тканини, хондроїтину сульфат, пробіотик, запалення, оксидативний стрес, антиоксидантна система, регуляторні механізми.

SUMMARY

Korotkyi O.H. Biochemical mechanisms of cartilage remodeling in experimental osteoarthritis. – Manuscript.

Thesis for Doctor of Sciences degree in Biology, specialty 03.00.04 – biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, 2021.

This work is devoted to the investigation of biochemical mechanisms of cartilage remodeling in experimental osteoarthritis (OA) upon the administration of chondroitin sulfate (CS) and probiotic (PB).

It was found that experimental OA causes dysbiosis of rat colon accompanied by degenerative and dystrophic changes in cartilage of knee joints. The qualitative and quantitative analysis of fecal microbiota showed that experimental OA leads to decrease in amounts of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, while amounts of *Clostridium spp.*, lactose-negative *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, as well as representatives of opportunistic Enterobacteriaceae and yeast-like *Candida* genus rose significantly. Histological examination revealed inflammatory, hyperplastic, degenerative and dystrophic changes in cartilage and subchondral bone tissue of knee joints: we found loss of fibrous components in cartilage, reduce in number and size of chondrocytes, emergence of pro-inflammatory infiltrations, and fibrous changes of synovial tissue. Administration of CS and PB to the animals with experimental OA alleviated the propagation of degenerative and dystrophic changes in cartilage and subchondral bone tissue of knee joints, as well as restored the colon microbiota: numbers of *Lactobacillus*

and *Bifidobacterium* increased, with simultaneous decrease in amounts of *Clostridium spp.*, lactose-negative *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, as well as representatives of opportunistic *Enterobacteriaceae* and yeast-like *Candida* genus. We found a general synergic positive effect of combined administration of CS and PB in experimental OA.

The levels of cartilage matrix components, which play an important role in cartilage degradation and recovery, can be used as markers of metabolic changes in cartilage remodeling, especially at the onset of pathogenic process. The experimental OA resulted in elevated concentration of key biochemical markers of cartilage metabolism: increased concentration of cartilage oligomeric matrix protein (COMP), aggrecan (ACAN), cathepsin K (CTSK), cartilage glycoprotein-39 (CHI3L1) in blood serum; downregulated expression of main cartilage matrix genes (*Col2a1*, *Acan*, *Comp*) in cartilage; and increased accumulation of proteolytic matrix metalloproteinases-1, 2, 3, 8 both in blood serum and cartilaginous tissue. The described changes may indicate the degradation of cartilage matrix and distorted cartilage remodeling. Administration of CS and PB to the animals with experimental OA restored the concentration of abovementioned biochemical markers of cartilage metabolism, stimulated the expression of main cartilage matrix genes and caused decrease in amounts of matrix metalloproteinases.

Pathogenetic changes and inflammatory processes can also be assessed through the measurement of cytokines' levels. We estimated the level of such cytokines that take part in cartilage metabolism as interleukins-1 β , -6, -8 (IL-1 β , IL-6, IL-8), tumor necrosis factor α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ). Additionally, we investigated levels of anabolic anti-inflammatory cytokines: IL-4, IL-10, transforming growth factor β (TGF- β) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1). Propagation of experimental OA resulted in elevated levels of catabolic pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IFN- γ) and TGF- β with simultaneous decrease in level of anabolic anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10) and IGF-1 both in blood serum and cartilage. Additionally,

we detected increase in prostaglandin E₂ concentration in blood serum and upregulated transcription of pro-inflammatory genes (*Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*) in cartilage. The changes in cytokine profile may indicate the propagation of inflammatory processes both at systemic and local levels with co-activation of compensatory immune mechanisms, due to ability of cytokines to influence the systemic defensive mechanisms, including the influence on the cartilage metabolism. Administration of CS and PB in experimental OA model partially restored blood and cartilage tissue concentration of catabolic and anabolic cytokines involved in regulation of inflammatory processes. The combined administration resulted in the maximum propagation of the positive effects, which was represented not only by the de-intensification of systemic and local inflammation, but also by the inhibition of destructive processes in cartilage.

The leading role in emergence and propagation of OA belongs to free-radical oxidative reactions, which cause structural and functional changes in chondrocytes and extracellular matrix, inflammatory and degenerative changes in cartilage and surrounding tissues. Investigation of blood serum and cartilage of rats with experimental OA showed increase in the amount of superoxide anion, hydrogen peroxide and products of lipid and protein oxidation. We also detected development of functional disorders of antioxidative defense in the experimental OA model: decreased activity of superoxide dismutase (SOD) and increased – of catalase (CAT) in blood serum; elevation of both SOD and CAT activities in cartilage, accompanied by the exhaust of glutathione-dependent enzymes and misbalanced proportion between reduced and oxidized glutathione in blood serum and cartilage. These changes may indicate the development of oxidative stress both on systemic and local levels. The use of CS and PB on the animals with experimental pathology stimulated restoration of prooxidant-antioxidant balance both in knee joint (locally) and in blood serum (systemically), through the inhibition of reactive-oxygen species overproduction, downregulation of lipid and protein peroxidation and functional normalization of enzymatic and non-enzymatic parts of antioxidant defense.

Cartilage synthesis and degradation is regulated by a complex of humoral mechanisms with involvement of complex signal transduction pathways, which are activated by versatile biologically active molecules. The cartilage-specific catabolic activity of chondrocytes is maintained through the activation of Toll-like receptors TLR-2 and TLR-4, including the influence of activating patterns of microorganisms. The binding of adapter molecules to Toll-like receptors initiates activation of intracellular signaling cascades, which result in upregulation of several transcription factors, like NF- κ B. To assess the pro-inflammatory changes and stimulation of immune response and catabolic cascades in knee joint tissue in the experimental OA model and upon the administration of CS and PB, we conducted an immunohistochemical (IHC) investigation expression of TLR-2, TLR-4, NF- κ B and expression of genes *Tlr2*, *Tlr4*, *Nfkb1* in cartilage, as well as TLR-2 and TLR-4 levels in blood serum. IHC investigation showed that death of chondrocytes, matrix degradation and destructive changes in experimental OA model are associated with prominent overexpression of all the investigated markers: TLR-2, TLR-4 and NF- κ B. Administration of CS and PB to the animals with experimental OA resulted in inhibition of cartilage overexpression, with combined use to be the most effective: we detected no IHC expression of TLR-2 and TLR-4, as well as significant decrease in expression of NF- κ B in animals with experimental pathology. The changes in Toll-like receptors TLR-2 and TLR-4 expression in cartilage upon the administration of CS and PB in the experimental OA model correlated with changes in blood serum concentration of soluble TLR forms. These results may be the evidence not only for the association between the propagation of pathologic process and inducible overexpression of pattern-recognition receptors in cartilage, but also for the shedding of these molecules. We also found that cartilage expression of *Tlr2*, *Tlr4* and *Nfkb1* was upregulated in the experimental OA. These genes encode Toll-like receptors TLR-2, TLR-4 and nuclear transcription factor NF- κ B correspondingly. All of these molecules are involved in the intracellular signal transduction, immune response modulation and cartilage remodeling. Application of CS and PB shifted the overexpression of

abovementioned genes, leading to activation of anabolic processes, restore of cartilage structure, reduction of lesions and slowing down the OA progression. The combined administration of these compounds resulted in more pronounced changes. The possible mechanisms for such effects may include direct and indirect influence on gut microbiota, inflammation propagation, prooxidant-antioxidant balance and cartilage metabolism. The results of our experimental study are summarized in a conceptual framework describing the role of gut microbiota in biochemical regulation of articular cartilage remodeling upon the experimental OA through the TLR2/4-mediated NF- κ B inflammatory pathway.

To summarize, gut microbiota plays an active role in normal and pathologic physiology of host organism through both the activity of microbiome and its metabolic products. This is particularly applied to the development of OA, which is described by the destruction of articular cartilage, local and systemic inflammation and distortion of prooxidant-antioxidant balance. Modern ideas about gut microbiota influence on the propagation of OA combined with our experimental data lead to a conclusion that dysbiosis may act as one of the main unifying mechanisms for all the etiological factors involved in OA pathogenesis (age, sex, obesity, diabetes, injuries, excessive physical activity, autoimmune and infectious processes). Experimental justification of biological activity of CS and PB on the gut microbiota and cartilage metabolism through the ability to influence on TLR2/4-mediated NF- κ B-dependent inflammatory pathways in experimental OA enables the perspectives for their combined application in supportive complex therapy and for prophylactics of articular joint pathologies of different genesis.

Key words: osteoarthritis, cartilage remodeling, chondroitin sulfate, probiotic, inflammation, oxidative stress, antioxidant system, regulatory mechanisms.

Список публікацій здобувача

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. **Короткий ОГ**, Воєйков АІ, Фалалєєва ТМ, Берегова ТВ. Дослідження підгострої токсичності хондроїтин сульфату натрію за показниками морфо-функціонального стану печінки у щурів та кролів. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2016;74(2):66-72.
2. **Короткий ОГ**, Воєйков АІ, Фалалєєва ТМ, Берегова ТВ, Остапченко ЛІ. Дослідження підгострої токсичності хондроїтинпротектора «Драстоп» за показниками аналізу та лейкоцитарної формули крові у щурів. Вісник проблем біології і медицини. 2016;126(1):84-87.
3. Тіхова ЄВ, Дворщенко КО, **Короткий ОГ**, Фалалєєва ТМ, Берегова ТВ. Стан суглобових хрящів при артрозі та після введення тест-зразка «Драстоп». Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. 2017;1:99-105.
4. Тіхова ЄВ, Дворщенко КО, **Короткий ОГ**, Верещака ВВ. Дія хондроїтинсульфату натрію на вільнорадикальні процеси у хрящовій тканині щурів при остеоартрозі. Scientific Journal «ScienceRise: Biological Science». 2017;7(4):26-30.
5. Драницина АС, Блохіна ОГ, **Короткий ОГ**, Дворщенко КО, Остапченко ЛІ. Експресія гена *PTGS2* у клітинах хрящової тканини колінного суглоба щурів за умов остеоартрозу та при введенні біологічно-активних речовин. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2018;24(1):36-42.
6. Вовк А, **Короткий О**, Янковський Д, Торгалю Є, Дворщенко К. Вміст ТБК-активних сполук і активність антиоксидантних ферментів у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартрозу і тривалого введення мультипробіотика. Вісник Київського національного університету імені

Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2018;25(2):46-49.

7. Вовк А, **Короткий О**, Кот Л, Дворщенко К. Окисна модифікація білків у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартрозу та тривалого введення мультипробіотика. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2019;26(1):50-54.

8. **Короткий О**, Кот Л, Дворщенко К. Перекисне окиснення ліпідів у хрящовій тканині щурів за умов експериментального остеоартриту та при введенні мультипробіотика. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. 2020;80(1):41-44.

9. **Короткий О**, Кот Л, Дворщенко К, Остапченко Л. Окисна модифікація білків у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту та сумісного введення хондропротектора та мультипробіотика. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. 2020;81(2):64-68.

Статті у наукових фахових виданнях України,

які входять до міжнародних наукометричних баз даних:

10. Dranitsina AS, Dvorshchenko KO, **Korotkiy AH**, Grebinyk DM, Ostapchenko L.I. Expression of Ptgs2 and Tgfb1 genes in rat cartilage cells of the knee under conditions of osteoarthritis. Cytol Genet. 2018;52(3):192-197. (**Q4 – JCR; Web of Science; Q4 – CJR; Scopus**).

11. **Korotkiy O**, Dvorschenko KO, Vovk A, Dranitsina A, Tymoshenko M, Kot L, Ostapchenko L. Effect of probiotic composition on oxidative/antioxidant balance in blood of rats under experimental osteoarthritis. Ukr Biochem J. 2019;91(6):49-58. (**Q4 – CJR; Scopus**).

12. Dranitsina AS, Dvorschenko KO, **Korotkiy OH**, Vovk AA, Falalyeyeva TM, Grebinyk DM, Ostapchenko LI. Expression of Nos2 and Acan genes in rat knee articular cartilage in osteoarthritis. Cytol Genet. 2019;53(6):481-488. (**Q4 – JCR; Web of Science; Q4 – CJR; Scopus**).

13. **Korotkyi OH**, Vovk AA, Galenova TI, Vovk TB, Dvorschenko KO, Falalyeyeva TM, Ostapchenko LI. Cytokine profile in knee cartilage of rats during monoiodoacetate-induced osteoarthritis and administration of probiotic. *Biopolym Cell*. 2020;36(1):23-35. (**Q4 – CJR; Scopus**).

14. **Korotkyi OH**, Luhovska TV, Serhiychuk TM, Dvorschenko KO, Falalyeyeva TM, Ostapchenko LI. The gut microbiota of rats under experimental osteoarthritis and administration of chondroitin sulfate and probiotic. *Microbiol. Zh.* 2020;82(6):64-73. (**Scopus**).

15. **Korotkyi O**, Dvorshchenko K, Kot L, Vovk T, Tymoshenko M, Ostapchenko L. Oxidative/antioxidant balance and matrix metalloproteinases level in the knee cartilage of rats under experimental osteoarthritis and probiotic administration. *Ukr Biochem J*. 2020;92(6):126-136. (**Q4 – CJR; Scopus**).

Статті в іноземних виданнях:

16. Tikhova YV, Dvorshchenko KO, Dranitsina AS, Grebinyk DM, **Korotkyi OH**, Ostapchenko LI. Prooxidant-antioxidant status and *Ptgs2*, *Nos2* genes expression in rat cartilage with osteoarthritis and after the treatment of chondroitin sulphate. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Science*. 2017;8(4):994-1001. (**Q3 – JCR; Web of Science**).

17. **Korotkyi O**, Vovk A, Kuryk O, Dvorschenko K, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Co-administration of live pro-biotics with chondroprotector in management of experimental knee osteoarthritis. *Georgian Med News*. 2018;279:191-196. (**Q4 – CJR; Scopus**).

18. **Korotkyi O**, Vovk A, Blokhina O, Dvorschenko K, Falalyeyeva T, Abenavoli L, Ostapchenko L. Effect of chondroitin sulfate on blood serum cytokine profile during carrageenan-induced edema and monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *Rev Recent clin Trials*. 2019;14(1):50-55. (**Web of Science; Q3 – CJR; Scopus**).

19. **Korotkyi OH**, Vovk AA, Dranitsina AS, Falalyeyeva TM, Dvorschenko KO, Fagoonee S, Ostapchenko LI. The influence of probiotic diet and chondroitin sulfate administration on *Ptgs2*, *Tgfb1* and *Col2a1* expression in rat

knee cartilage during monoiodoacetate-induced osteoarthritis. *Minerva Med.* 2019;110(5):419-424. (**Q1 – JCR; Web of Science; Q3 – CJR; Scopus**).

20. **Korotkyi O**, Vovk A, Galenova T, Vovk T, Dvorschenko K, Lizza F, Abenavoli L, Kobyliak N, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Effects of probiotic on serum cytokines and matrix metalloproteinases profiles during monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *Minerva Biotechnol.* 2019;31(2):68-73. (**Q4 – JCR; Web of Science; Q4 – CJR; Scopus**).

21. **Korotkyi O**, Kyriachenko Y, Kobyliak N, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Crosstalk between gut microbiota and osteoarthritis: A critical view. *J Funct Foods.* 2020;68:103904. (**Q1 – JCR; Web of Science; Q1 – CJR; Scopus**) (*оглядова стаття*).

22. **Korotkyi O**, Dvorshchenko K, Falalyeyeva T, Sulaieva O, Kobyliak N, Abenavoli L, Fagoonee S, Pellicano R, Ostapchenko L. Combined effects of probiotic and chondroprotector during osteoarthritis in rats. *Panminerva Med.* 2020;62(2):93-101. (**Q1 – JCR; Web of Science; Q3 – CJR; Scopus**).

23. **Korotkyi O**, Huet A, Dvorschenko K, Kobyliak N, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Probiotic composition and chondroitin sulfate regulate TLR-2/4-mediater NF-kB inflammatory pathway and cartilage metabolism in experimental osteoarthritis. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2021; <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09735-7>. (**Q2 – JCR; Web of Science; Q3 – CJR; Scopus**).

Методичні рекомендації:

24. Остапченко ЛІ, Дворщенко КО, **Короткий ОГ**, Фалалєєва ТМ, Кот ЛІ, Драницина АС. Методичні рекомендації «Використання хондропротекторів та мультипробіотиків для корекції патології суглобів» [Затверджено на засіданні Вченої ради Навчально-накового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол №6 від 14 грудня 2020 року], К:ТОВ «Kh&Sh НМ», 2020. 30 с.

Тези наукових доповідей:

25. Тіхова ЄВ, Ашпін МК, **Короткий ОГ**, Тимошенко МО. Дія хондропротекторного препарату на стан глутатионової системи у сироватці крові щурів з експериментальним артрозом. *IV Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих вчених «Інновації та перспективи сучасної медицини», ВІМСО 2017. 5-7 квітня 2017 року; Чернівці, Україна. Всеукраїнський медичний журнал студентів і молодих вчених «Хист». 2017;19:57.*

26. Tikhova Y, **Korotkyi O**, Kovelska Y, Dvorshchenko K. Positive effect of chondroitin sulfate on prooxidant-antioxidant balance in rat cartilage tissue in the treatment of osteoarthritis. *XIII міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 25-27 квітня 2017 року; Львів, Україна. Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка; 2017. С.73.*

27. **Korotkyi O**, Falalyuyeyeva T, Dvorshchenko K, Savchuk O, Beregova T, Ostapchenko L. Chondroprotector “Drastop” suppression of inflammatory responses in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats. *51th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, 17-20 May 2017; Genoa, Italy. European Journal of Clinical Investigation. 2017;47(1):167. (Q2 – JCR; Web of Science).*

28. Вовк АА, **Короткий ОГ**, Блохіна ОГ, Фалалєєва ТМ, Дворщенко КО, Берегова ТВ, Остапченко ЛІ. Показники вільно радикального окислення ліпідів та білків у хрящовій тканині щурів за умов експериментального остеоартриту. *Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання медицини і біології», 1 червня 2017 року; Полтава, Україна. Полтава: Астроя; 2017. С.6-7.*

29. Vovk A, **Korotkyi O**, Tikhova Ye, Dranitsina A, Dvorshchenko K. Effect of chodroprotector on cartilage tissue repairing during experimental osteoarthritis in rats. *Third Kyiv International Symposium Smooth Muscles*

Physiology, Biophysics & Pharmacology: from genes and molecules to functions, disorders and their novel treatment opportunities. 18-22 september 2017; Kyiv - Lutsk, Ukraine. Taras Shevchenko National University of Kyiv, 2017. P.74.

30. Вовк АА, **Короткий ОГ**, Хілько ВВ, Дворщенко КО, Остапченко ЛІ. Стан антиоксидантних ферментативних ферментів в хрящовій тканині суглобів щурів за умов експериментального остеоартриту. *VIII Міжнародна наукова конференція «Психофізіологічні та функції в нормі і патології», присвячена 175-річчю кафедри фізіології та анатомії людини та тварин Київського національного університету імені Тараса Шевченка*, 17-20 жовтня 2017 року; Київ, Україна. Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка; 2017. С.28.

31. Nehrai D, Blokhina O, **Korotkyi O**, Dranitsina A, Dvorshchenko K. The effect of chondroitin sulfate on levels of IL-1 β , TGF- α and Ptgs2 in the serum of rats during MIA-induced osteoarthritis. *XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine*, 16-18 May 2018; Kyiv, Ukraine. *Biopolymers and Cell*. 2018;34(2):158.

32. **Korotkyi O**, Vovk A, Dranitsina A, Dvorshchenko K, Grebinyk D, Falalyeyeva T, Beregova T, Ostapchenko L. The combined effect of probiotic and chondroprotector on genes expression Ptgs2, Tgfb1 and Col2a1 in the cartilage of rats with monoiodoacetate-induced osteoarthritis. *The 43rd FEBS Congress*, 7-12 july 2018; Prague, Czech Republic. *FEBS OPEN BIO*. 2018;8(1):249. (Q2 – JCR; Web of Science).

33. **Korotkyi O**, Vovk A, Halenova T, Dvorshchenko K, Savchuk O, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. The combined effect of probiotic and chondroitin sulfate on the levels of cytokines and matrix metalloproteinases in the serum of rats with monoiodoacetate-induced osteoarthritis. *The 5th European Congress of Immunology, ECI 2018*, 2-5 september 2018; Amsterdam, The Netherlands. 2018. P.435.

34. Vovk A, Tymoshenko M, **Korotkyi O**, Dvorshchenko K, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Effect of probiotic on parameters of glutathione system and lipid

oxidation in serum of rats with monoiodoacetate-induced osteoarthritis. *FEBS3+ Meeting XI International Parnas Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”*, 3-5 September 2018; Kyiv, Ukraine. *The Ukr Biochem J.* 2018;90:118.

35. Вовк А, Янковський Д, **Короткий О**, Дворщенко К. Дія пробіотику на вільнорадикальні процеси у хрящовій тканині щурів за умов експериментального остеоартриту. *XVII Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience Advances»*, 23-25 квітня 2019 року; Київ. Україна. Київ: СПОЛОМ; 2019. С.53-54.

36. Yurchenko O, Vovk A, **Korotkyi O**, Dvorschenko K. The effect of probiotic composition and chondroitin sulfate on the process of lipid peroxidation in blood serum of rats with experimental osteoarthritis. *XIV Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття»*, 20 травня 2020 року; Київ. Україна. Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, вид-во «Політехніка»; 2020. С.102.

37. Івасишина МТ, Сергійчук ТМ, **Короткий ОГ**. Мікробіота товстої кишки щурів за модельованого остеоартрозу. *VII Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень»*, 12-13 листопада 2020 року; Київ. Україна. Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка; 2020. С.131-134.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	23
ВСТУП.....	26
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	35
1.1 Основні етіопатогенетичні фактори розвитку остеоартритів.....	35
1.2 Участь мікробіоти травного тракту в патогенезі захворювань опорно-рухового апарату.....	41
1.3 Біохімічні механізми розвитку остеоартриту.....	46
1.3.1 Маркери метаболічних змін у суглобі за остеоартриту.....	52
1.4 Терапевтичні та профілактичні фармакологічні стратегії при захворюваннях суглобів.....	61
1.4.1 Особливості застосування хондропротекторів за остеоартриту...62	
1.4.2 Перспективи застосування препаратів коригувального впливу на мікробіоту за остеоартриту.....	69
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	80
2.1 Використані реактиви та матеріали.....	80
2.2 Прилади та обладнання.....	82
2.3 Умови проведення експерименту.....	83
2.4 Отримання сироватки крові щурів.....	86
2.5 Отримання гомогенату хрящової тканини.....	86
2.6 Дослідження підгострої токсичності хондроїтину сульфату за показниками загального аналізу, лейкоцитарної формули крові та морфо-функціонального стану печінки.....	86
2.7 Визначення видового та кількісного складу фекальної мікробіоти.....	88
2.8 Гістологічний аналіз зрізів колінних суглобів.....	88
2.9 Визначення концентрації біохімічних маркерів метаболізму хрящової тканини, простагландину E ₂ , вмісту матриксних металопротеїназ, цитокінів, факторів росту та розчинних форм Toll-подібних рецепторів.....	89

2.10	Визначення вмісту супероксидного радикалу	90
2.11	Визначення вмісту гідрогену пероксиду.....	91
2.12	Визначення вмісту дієнових кон'югатів та шиффових основ ненасичених жирних кислот.....	92
2.13	Визначення вмісту ТБК-активних продуктів.....	93
2.14	Визначення вмісту продуктів окисної модифікації білків.....	94
2.15	Визначення супероксиддисмутазної активності.....	95
2.16	Визначення каталазної активності.....	96
2.17	Визначення глутатіонпероксидазної активності.....	96
2.18	Визначення глутатіонтрансферазної активності.....	97
2.19	Визначення глутатіонредуктазної активності.....	97
2.20	Визначення вмісту відновленого та окисненого глутатіону.....	98
2.21	Визначення концентрації білка.....	99
2.22	Імуногістохімічний аналіз зрізів колінних суглобів.....	99
2.23	Аналіз експресії генів за допомогою ПЛР у реальному часі.....	100
2.23.1	Виділення загальної РНК.....	101
2.23.2	Оцінка експресії генів.....	101
2.24	Статистична обробка отриманих результатів.....	103
РОЗДІЛ 3 ВИДОВИЙ ТА КІЛЬКІСНИЙ СКЛАД МІКРОБІОТИ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРИТУ ПРИ ВВЕДЕННІ ХОНДРОЇТИНУ СУЛЬФАТУ ТА ПРОБІОТИКА.....		
		104
РОЗДІЛ 4 ГІСТОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ ДИСТРОФІЧНО- ДЕГЕНЕРАТИВНИХ ЗМІН КОЛІННОГО СУГЛОБА ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРИТУ ПРИ ВВЕДЕННІ ХОНДРОЇТИНУ СУЛЬФАТУ ТА ПРОБІОТИКА.....		
		112
РОЗДІЛ 5 БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ МЕТАБОЛІЗМУ ХРЯЦОВОЇ ТКАНИНИ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРИТУ ПРИ ВВЕДЕННІ ХОНДРОЇТИНУ СУЛЬФАТУ ТА ПРОБІОТИКА.....		
		123
5.1	Концентрація основних біохімічних показників метаболізму хрящової тканини в сироватці крові щурів.....	123

5.2	Вміст матриксних металопротеїназ у сироватці крові та хрящовій тканині суглоба щурів.....	131
5.3	Експресія структурних генів <i>Col2a1</i> , <i>Acan</i> та <i>Comp</i> у хрящовій тканині суглоба щурів.....	138
РОЗДІЛ 6 ОЦІНКА СТАНУ ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРИТУ ПРИ ВВЕДЕННІ ХОНДРОЇТИНУ СУЛЬФАТУ ТА ПРОБІОТИКА.....		
6.1	Вміст катаболічних медіаторів запалення в сироватці крові та суглобовому хрящі щурів.....	147
6.2	Вміст анаболічних протизапальних цитокінів і факторів росту в сироватці крові та суглобовому хрящі щурів.....	155
6.3	Концентрація простагландину E ₂ в сироватці крові щурів.....	160
6.4	Рівень експресії генів <i>Ptgs2</i> , <i>Nos2</i> , <i>Tgfb1</i> у хрящовій тканині та сироватці крові щурів.....	163
РОЗДІЛ 7 ОКИСНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ ГОМЕОСТАЗ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ТА ХРЯЩОВІЙ ТКАНИНІ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРИТУ ПРИ ВВЕДЕННІ ХОНДРОЇТИНУ СУЛЬФАТУ ТА ПРОБІОТИКА.....		
7.1	Вміст активних форм кисню в сироватці крові та хрящовій тканині щурів.....	177
7.2	Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у сироватці крові та хрящовій тканині щурів.....	181
7.3	Вміст продуктів окисної модифікації білків у сироватці крові та хрящовій тканині щурів.....	185
7.4	Стан антиоксидантної системи у сироватці крові та хрящовій тканині щурів.....	190
7.4.1	Антирадикальні супероксиддисмутазна та каталазна ферментативні активності.....	190
7.4.2	Вміст глутатіону та глутатіонзалежна ферментативна активність.....	195

РОЗДІЛ 8 МЕХАНІЗМИ СИГНАЛЬНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ РЕМОДЕЛЮВАННЯ ХРЯЦОВОЇ ТКАНИНИ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРИТУ ПРИ ВВЕДЕННІ ХОНДРОЇТИНУ СУЛЬФАТУ ТА ПРОБІОТИКА.....	205
8.1 Експресія Toll-подібних рецепторів TLR-2, TLR-4 та ядерного фактора NF-κB у тканинах колінного суглоба щурів.....	205
8.2 Вміст розчинних форм TLR-2 та TLR-4 у сироватці крові щурів.....	216
8.3 Рівень експресії генів <i>Tlr2</i> , <i>Tlr4</i> та <i>Nfkb1</i> у хрящовій тканині колінного суглоба щурів.....	219
РОЗДІЛ 9 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	229
ВИСНОВКИ.....	243
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	246
Додаток А	

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АОС	антиоксидантна система
АФК	активні форми кисню
ГА	глюкозамін
ГАГ	глікозаміноглікани
ГАС	глюкозамінсульфат
ГАХ	глікозамінгідрохлорид
ГК	гіалуронова кислота
ГП	глутатіонпероксидаза
ГР	глутатіонредуктаза
ГТ	глутатіонтрансфераза
ДК	дієнові кон'югати
ДНФГ	динітрофенілгідрозин
ДТНБК	5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойна кислота
ЕІ	ендогенна інтоксикація
ІІ	інтерлейкін
ІФА	імуно-ферментний аналіз
ІФН- γ	інтерферон γ
ІФР-1	інсуліноподібний фактор росту 1
КАТ	каталаза
КС	кератансульфат
ЛПС	ліпополісахариди
МЙА	монойодацетат натрію
МКА	молекули клітинної адгезії
ММП	матриксні металопротеїнази
МНСММ	молекули низької та середньої молекулярної маси
НАД ⁺	нікотинамідаденіндинуклеотид окиснений
НАДН	нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений
НАДФН	нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений

НПЗП	нестероїдні протизапальні препарати
НСТ	нітросиній тетразолій
ОА	остеоартрит
ОМБ	окисна модифікація білків
ОП	олігопептиди
ОРА	опорно-руховий апарат
ОС	оксидативний стрес
ПБ	пробіотик
ПГ	протеоглікан
ПГЕ ₂	простагландин Е ₂
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
ПОЛ	пероксидне окиснення ліпідів
РА	ревматоїдний артрит
РФ	ревматоїдний фактор
СОД	супероксиддисмутаза
ТБК	тіобарбітурова кислота
ТНФА	тіонітрофенільний аніон
ТФР-β	трансформуючий фактор росту β
ФНП-α	фактор некрозу пухлин α
ХС	хондроїтина сульфат
ЦОГ	циклооксигеназа
ШКТ	шлунково-кишковий тракт
ШО	шиффові основи
ШОЕ	швидкість осідання еритроцитів
АСАН	агрекан
А-ССР	антитіла до циклічного цитрулінового пептиду
СНІЗL1	хітиназа-3-подібний білок 1
Col II	колаген II типу
СОМР	олігомерний матриксний білок хряща
СР-II	С-пропептид колагену II типу

CTSK	катепсин К
CTX-II	С-телопептид колагену II типу
DAMP	молекулярний патерн, асоційований з пошкодженням
GSH	глутатіон відновлений
GSSG	глутатіон окиснений
HCl	гідрохлоридна кислота
H ₂ O ₂	гідроген пероксид
iNOS	індуцибельна синтаза оксиду азоту
MAPK	мітоген-активована протеїнкіназа
NF-κB	ядерний фактор NF-κB
NO	оксид азоту
NOS	синтаза оксиду азоту
O ₂ ⁻	супероксид аніон-радикал
PAMP	патоген-асоційований молекулярний патерн
SNP	однонуклеотидний поліморфізм
SYSADOA	препарати сповільненої дії, що застосовують при ОА
TLR	Toll-подібний рецептор
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

ВСТУП

Актуальність теми. Захворювання опорно-рухового апарату (ОРА) є актуальною медико-соціальною проблемою в усьому світі, а їх лікування та профілактика має першочергове значення для збереження фізичної активності та працездатності населення. Серед патологій ОРА провідне місце займають остеоартрити (ОА) – гетерогенна група захворювань різної етіології з подібними біологічними та клінічними проявами й наслідками. В умовах ОА відбуваються патологічні зміни в усіх компонентах суглоба: переважно у хрящі, субхондральній кістці, синовіальній оболонці, зв'язках, капсулі та навколосуглобових м'язах. Розвиток ОА безпосередньо пов'язаний з неконтрольованими запальними процесами та порушеннями метаболізму, наслідком яких є біль та інвалідність [1].

На ОА хворіє 10-20% населення планети, і з його старінням та збільшенням кількості ожиріння поширеність даної патології стрімко зростає та набуває все більшої актуальності. За оцінками, 22% дорослого населення має принаймні один суглоб, уражений ОА, і ця поширеність зростає до 49% у осіб старше 65 років [2]. ОА є найпоширенішою причиною хронічного болю в Європі (34%), що обумовлює значні економічні та соціальні витрати для суспільства [3]. Незважаючи на певні успіхи у лікуванні патологій ОРА, клінічні та фінансові наслідки, в даний час не існує затверджених ефективних препаратів, які усувають/запобігають розвитку ОА та знижують показники інвалідності внаслідок ОА [4]. Медикаментозне лікування переважно складається із симптоматичних лікарських засобів швидкої дії (анальгетики, нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП), внутрішньосуглобові глюкокортикостероїди) та симптоматичних лікарських засобів повільної дії, які застосовують з метою зменшення болю, поліпшення функції суглобів і уповільнення прогресування ОА. Незважаючи на те, що одними з найпоширеніших серед даної групи засобів є препарати, що містять хондроїтину сульфат (ХС), який є природнім компонентом міжклітинної

речовини хряща та підтримує його пружність і щільність, механізми дії та ефективність його застосування залишаються остаточно нез'ясованими та суперечливими [5]. Саме зі зниженням вмісту ХС, який виконує не тільки структурну функцію в суглобі, а й виявляє антиоксидантні та протизапальні властивості [6], пов'язані дистрофічні зміни хрящової тканини. Тому дослідження препаратів, основу яких складає ХС, є актуальними та перспективними для профілактики й лікування захворювань суглобів.

Всі метазої, від безхребетних до хребетних, мають мікробіоту кишечника. Мікробіота кишечника тісно пов'язана з різними аспектами фізіології метазоїв, такими як розвиток, метаболізм та імунітет. Вплив мікробіоти кишечника на фізіологічні функції господаря та патогенез захворювань може бути результатом діяльності мікробіома та продуктів його метаболізму [7]. Незважаючи на те, що в останні роки значно розширилися уявлення щодо участі дисбіозу кишкової мікробіоти в ревматоїдному артриті [8], роль кишкової мікробіоти або продуктів її метаболізму в патогенезі ОА залишається не відомою. Лише серед поодиноких досліджень останніх років з'являються дані про потенційний взаємозв'язок між розвитком ОА та станом мікробіоти кишечника [2, 9]. Оскільки дисбіоз травної системи тісно пов'язаний з патогенезом багатьох різних метаболічних та запальних захворювань, відповідно, він може бути задіяний у розвиток ОА. Тому актуальним питанням є дослідження участі в розвитку ОА мікробіоти травного тракту та пробіотиків (ПБ) – продуцентів фізіологічно активних метаболітів (вітамінів, коротколанцюгових жирних кислот, антиоксидантів та імуномодуляторів), здатних зменшувати розвиток запальних процесів в організмі, виявляти антиоксидантні властивості, підтримувати та відновлювати нормобіоз шлунково-кишкового тракту [10, 11].

Виходячи з вище викладеного, стає цілком очевидним, що з'ясування біохімічних механізмів ремоделювання хрящової тканини за розвитку ОА на сьогодні є актуальним завданням сучасних напрямів біохімії та медицини.

Вирішення питання щодо зв'язку між станом мікробіоти травного тракту та функціонуванням ОРА надасть серйозну мотивацію для пошуку нових ефективних стратегій лікування та профілактики захворювань суглобів різного генезу, а також дозволить більш глибоко зрозуміти принципи системного функціонування та метаболічних порушень при супутніх патологічних станах.

Нами запропоновано концепцію, яка полягає в тому, що ремоделювання хрящової тканини за розвитку експериментального ОА пов'язане не лише зі зміщенням рівноваги між катаболічними й анаболічними процесами із залученням місцевих і системних запальних процесів та оксидантно-антиоксидантних порушень, а й з розвитком дисбіотичних змін мікробіоти товстої кишки за безпосередньої участі TLR-2/4-опосередкованого сигнального NF-κB запального каскаду.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка в рамках бюджетних науково-дослідних тем №16БФ036-01 «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527 2016-2018 рр.) та №18БП036-02 «Розробка методичних рекомендацій використання хондропротекторів та мультипробіотиків для корекції патології суглобів» (№ д/р 0118U000243 2018-2020 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідження біохімічних механізмів ремоделювання хрящової тканини за експериментального остеоартриту. Для досягнення мети поставлено наступні завдання:

1. Встановити видовий та кількісний склад мікробіоти товстої кишки щурів з експериментальним остеоартритом за введення хондроїтину сульфату та пробіотика.

2. Провести гістологічний аналіз колінних суглобів щурів з експериментальним остеоартритом за введення хондроїтину сульфату та пробіотика.

3. Визначити рівень біохімічних маркерів метаболізму хрящової тканини при експериментальному остеоартриті за введення хондроїтину сульфату та пробіотика.

4. Оцінити ступінь системного та локального запалення в щурів із експериментальним остеоартритом за введення хондроїтину сульфату та пробіотика.

5. Визначити інтенсивність вільнорадикальних процесів у сироватці крові та хрящовій тканині при експериментальному остеоартриті за введення хондроїтину сульфату та пробіотика.

6. Оцінити стан антиоксидантної системи в сироватці крові та хрящовій тканині при експериментальному остеоартриті за введення хондроїтину сульфату та пробіотика.

7. З'ясувати регуляторні механізми ремоделюючої дії хондроїтину сульфату та пробіотика в хрящовій тканині суглоба при експериментальному остеоартриті.

Об'єкт дослідження: біохімічні механізми деструкції та відновлення структурно-функціональних характеристик хрящової тканини при моноіодацетат-індукованому остеоартриті.

Предмет дослідження: видовий та кількісний склад мікробіоти товстої кишки, параметри морфо-гістологічного стану суглобів, маркери запалення, показники окисно-антиоксидантної рівноваги, біохімічні маркери метаболізму хрящової тканини, рівень експресії генів, залучених у ремоделювання хряща, за експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату і пробіотика.

Методи дослідження: мікробіологічні (визначення видового та кількісного складу мікробіоти товстої кишки); морфологічні, гістологічні (дослідження дегенеративно-дистрофічних змін і регенеративних

процесів хрящової тканини колінного суглоба); біохімічні: спектрофотометричні (визначення вмісту супероксидного аніон-радикалу, пероксиду водню, дієнових кон'югатів (ДК), ТБК-активних продуктів, продуктів окисної модифікації білків (ОМБ), ферментативної активності антиоксидантної системи (АОС), ферментативної активності глутатіонової системи, концентрації білка) та флуориметричні (визначення вмісту шифових основ (ШО), окисненого та відновленого глутатіону); молекулярно-біологічні: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) (оцінка рівня експресії генів *Nos2*, *Ptgs2*, *Tgfb1*, *Comp*, *Col2a1*, *Acan*, *Tlr2*, *Tlr4*, *Nfkb*); імуноферментний аналіз (визначення вмісту цитокінів, факторів росту, матриксних металопротеїназ (ММП), розчинних форм Toll-подібних рецепторів, концентрації простагландину E₂ та маркерів метаболізму хрящової тканини (COMP, ACAN, CTSK, CH3L1)); імуногістохімічні (оцінка експресії біомаркерів прозапальної та катаболічної активації хондроцитів); методи статистичної обробки даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше на основі отриманих доказових результатів досліджень запропонована концепція біохімічних механізмів залучення кишкової мікробіоти в ремоделювання хрящової тканини суглобу за умов експериментального ОА. Вперше показано розвиток дисбіозу в товстій кишці щурів із експериментальним ОА. Виявлено, що комбіноване введення ХС та ПБ за експериментального ОА не лише найбільш виражено усувало дисбіотичні зміни в товстій кишці, а й супроводжувалося найменш вираженими дегенеративно-дистрофічними змінами хрящової тканини в колінному суглобі. Вперше комплексно досліджено біохімічні показники місцевого та системного запалення з процесами вільнорадикального окиснення, функціонуванням системи антиоксидантного захисту, зроблено аналіз експресії генів та маркерів метаболізму хрящової тканини колінного суглоба щурів за умов моноодацетат-індукованого ОА при дії ХС та ПБ композиції. Вперше встановлено, що в біохімічних механізмах ремоделювання хрящової тканини

за умов експериментального ОА важлива роль належить кишковій мікробіоті, яка залучається в регуляцію TLR-2/4-опосередкованим запальним шляхом NF-κB, який активує катаболічні процеси, зі збільшенням прозапальних медіаторів і ММП, а також призводить до оксидативного стресу (ОС) і деструкції хряща. Розширено наукові дані про особливості біологічної дії ХС та ПБ (імуномодулюючі, антизапальні та антиоксидантні властивості) на організм щурів за умов експериментального ОА. Розроблено концептуальну схему щодо ролі мікробіоти товстої кишки та TLR-2/4-опосередкованого NF-κB-залежного запального шляху в ремоделюванні хрящової тканини за монойодацетат-індукованого ОА, а також запропоновано методичні рекомендації на основі доведеної експериментальної ефективності комбінованої дії ХС та ПБ для корекції патології суглобів.

Практичне значення одержаних результатів. Результати наукового дослідження мають фундаментальне значення та розширюють уявлення щодо розуміння молекулярно-біохімічних механізмів ремоделювання хрящової тканини за експериментального ОА.

Отримані дані експериментально обґрунтовують перспективність комбінованого застосування ХС та ПБ в комплексному лікуванні та профілактиці захворювань суглобів, що сприятиме зниженню ступеню інвалідизації населення та соціально-економічного навантаження на систему охорони здоров'я. На основі науково-обґрунтованих результатів роботи розроблено методичні рекомендації, які можуть бути використані у практичній медицині та в навчальному процесі під час підготовки студентів біологічних і медичних спеціальностей.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота – завершене дослідження, самостійно виконане автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих, проведених і узагальнених протягом 2015-2021 рр. Дисертантом обґрунтовано мету та завдання роботи, розроблено методологію експериментальних досліджень, здійснено пошук

та аналіз даних літератури, проведена наукова оцінка одержаних експериментальних даних та їх статистична обробка, сформульовано основні теоретичні положення і висновки. Автор зробив основний особистий внесок у дисертаційну роботу на всіх етапах її практичного виконання, обговорення результатів дослідження, формулювання висновків та написання статей. Планування напряму експериментальних досліджень, аналіз та обговорення отриманих результатів проведено спільно з науковим консультантом, доктором біологічних наук, професором Остапченко Л.І. Здобувач висловлює глибоку вдячність колегам за допомогу в проведенні досліджень, співучасть яких відмічена в спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Результати наукових досліджень, основні положення, висновки та практичні рекомендації, які включені до дисертації, було представлено на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях і з'їздах: 51th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation (Genoa, Italy, 2017), Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання медицини і біології» (Полтава, 2017), XIII міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2017), VIII Міжнародній науковій конференції «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології» (Київ, 2017), IV Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих вчених «Інновації та перспективи сучасної медицини», (Чернівці, 2017), Third Kyiv International Symposium Smooth Muscles Physiology, Biophysics & Pharmacology: from genes and molecules to functions, disorders and their novel treatment opportunities (Kyiv - Lutsk, 2017), 43rd Federation of European Biochemical Societies Congress, (Prague, Czech Republic, 2018), XII Annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine (Kyiv, 2018), 5th European Congress of Immunology, ECI (Amsterdam, 2018), FEBS3+ Meeting XI International Parnas Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine” (Kyiv, 2018),

XVIII Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience Advances» (Київ, 2019), VII Всеукраїнській науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень» (Київ, 2020), XIV Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 2020).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 37 наукових праць, серед них 14 статей у виданнях, що включені до міжнародних наукометричних баз даних Web of Science та Scopus, 9 статей у фахових періодичних виданнях, затверджених переліком МОН України, 13 матеріалів і тез доповідей на міжнародних та всеукраїнських наукових конференціях, методичні рекомендації.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, опису результатів власних досліджень з їх обговоренням, розділу з узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних літературних джерел (565 посилань) та додатку. Дисертаційна робота викладена на 303 сторінках, ілюстрована 57 рисунками та містить 13 таблиць.

Висновок біоетичної експертизи. Згідно висновку комісії з питань біоетики Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 1 від 14 січня 2020 р.) експериментальні дослідження відповідають загальноприйнятим біоетичним нормам, виконані з дотриманням відповідних міжнародних положень стосовно проведення експериментальних робіт, і можуть бути використані в матеріалах дисертації. Всі маніпуляції з тваринами проведено відповідно до положень Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» №3447-IV від 21.02.2006, Загальних етичних принципів експериментів на тваринах,

ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001) та у відповідності з етичними нормами і правилами роботи з лабораторними тваринами (Керівництво по догляду та використанню лабораторних тварин, National Academy Press, Washington DC, 1996).

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Основні етіопатогенетичні фактори розвитку остеоартритів

Захворювання ОРА сьогодні є однією з найбільш актуальних медико-соціальних проблем в усьому світі [12]. Серед найпоширеніших патологій кістково-м'язевої системи, переважно серед людей середньої (44-60 років) та старшої (60-75 років) вікових груп, провідне місце займають ОА – гетерогенна група захворювань різної етіології з подібними біологічними та клінічними проявами й наслідками. За даними ВООЗ на остеоартрит страждає 302 млн. людей у світі. Згідно статистики, в Європі ОА виявляють у близько 70% хворих на усі ревматичні патології. Навіть за умови успішної фармакотерапії у більшості пацієнтів зберігаються залишкові ознаки захворювання: деструкція хряща, запалення синовіальної оболонки, деформація кісток та утворення остеофітів. Найчастіше при ОА уражуються опорні суглоби: колінні, кульшові, суглоби стопи, кисті, а також суглоби шийного та попереково-крижового відділів хребта. Однак, за тяжкістю порушення функцій ОРА провідне місце займають кульшовий, колінний, надп'яtkово-гомiлковий та плечовий суглоби [13].

Термінологічні визначення – «остеоартрит», «остеоартроз», «артроз», «деформуючий артроз» – в даний час у X Міжнародній класифікації хвороб представлені як синоніми. Термін «остеоартрит» у повній мірі відображає сутність захворювання, в генезі якого має місце порушення рівноваги між дегенеративним та репаративним процесом з локалізацією в хрящі та субхондральній кістці, поєднано з синовіальним запаленням [13, 14].

Прогресування ОА досить часто відбувається у поєднанні з іншими захворюваннями кістково-м'язової системи, серед яких остеопороз, подагра, а також супутніми патологіями: серцево-судинними, цукровим діабетом,

гіпоталамічним синдромом, легеневою патологією, метаболічним синдромом, ожирінням та ін., які можуть впливати на перебіг ОА [15, 16, 17]. Однак, небезпека захворювань у значній мірі пов'язана з їх тенденцією до хронізації, що значно погіршує якість життя хворого та часто призводить до інвалідизації [18].

Незважаючи на багаточисельні дослідження патологій ОРА, етіопатогенетичні аспекти ОА залишаються не достатньо з'ясованими, окремі механізми розвитку та прогресування захворювання потребують ретельнішого вивчення, а також не існує ефективних препаратів, які б усували/запобігали розвитку ОА та знижували показники інвалідності населення [4]. Відомо, що виникнення та прогресування патології суглобів пов'язані з цілою низкою факторів ризику, що можуть поєднуватися, виникати послідовно або впливати ізольовано [19].

Відповідно до сучасних уявлень ОА виникає у результаті взаємодії численних генетичних, ендогенних та екзогенних факторів. Серед таких ендогенних факторів ризику ОА є похилий вік, стать, спадковість, дефекти розвитку кісток і суглобів, м'язева слабкість. Існує спостереження, що жінки більше схильні до розвитку ОА, зокрема колінних, стегнових суглобів, кистей рук, ніж чоловіки, особливо підвищує ризик розвитку захворювання менопауза. Приблизно 13% жінок та 10% чоловіків старше 60 років мають симптоматичний артрит колінного суглоба [20]. Серед осіб, старших 70 років поширеність ОА зростає до 40%. До екзогенних факторів розвитку ОА належать травми суглобів, професійна діяльність, спортивна активність, надмірна маса тіла, нераціональне харчування, метаболічний синдром та ожиріння, яке збільшує ризик розвитку хвороби вдвічі. Важливими факторами, які сприяють розвитку ОА є цукровий діабет, хвороби шлунково-кишкового тракту (ШКТ), зниження рівня статевих гормонів, інфекційні захворювання (рис.1.1) [21].



Рис.1.1 Етіологічні фактори розвитку остеоартритів [22]

Розрізняють первинний і вторинний ОА. Первинний ОА є найбільш поширеною формою захворювання, розвивається у хрящі при надмірному механічному навантаженні на суглоб. При вторинному ОА виникають патологічні дегенеративні процеси в суглобовому хрящі [19]. ОА можна також класифікувати за кількістю уражених суглобів, зокрема виокремлюють моноартикулярну форму ураження, коли пошкоджується один суглоб, та поліартикулярну форму захворювання суглобів, коли піддаються ураженню декілька суглобів. Важливим для діагностики ОА є вираженість запалення синовіальної оболонки (синовіту) або його відсутність [23].

Тривалий час ОА вважали патологією, яка зумовлена так званим «зношуванням» суглобів, яке у кінцевому результаті призводить до прогресуючої втрати хряща [24]. Загальні клінічні симптоми ОА включають біль у колінному суглобі, скутість, набряк, відзначається гіпотрофія м'язів; на рентгенограмі хворих виявляють звуження суглобової щілини та субхондральний остеосклероз. Поряд із зумовленою ОА деградацією хряща відбуваються зміни субхондральної кістки з утворенням остеофітів та ремоделювання кісткової тканини. Типовими є синовіт, зміна рівнів

запальних медіаторів у синовіальній рідині, а також дегенерація зв'язок, ураження менісків, гіпертрофія суглобової капсули [25].

На сьогодні, вважають, що в основі розвитку ОА лежить ціла низка різних взаємопов'язаних патологічних чинників і механізмів [26]. Одночасно спостерігаються зміни в периартекулярних тканинах (м'язах, нервах, зв'язках, жировій тканині), які викликають формування характерних симптомів ОА. Хоча розвиток ОА асоціюється з деградацією хряща, беззаперечною участю у прогресуванні захворювання усіх тканин суглоба. Зокрема, вважається, що взаємодія (перехресні зв'язки) між хрящем та субхондральною кісткою є важливою для остеоартричного процесу, що пов'язано з їх суміжним зональним розташуванням: під суглобовим хрящем знаходиться кальцифікований хрящ, який вбудовується в субхондральну кісткову пластинку, під якою знаходиться трабекулярна кістка. Показано, що деструктивні зміни суглобового хряща за ОА, супроводжуються змінами у прилеглий кістці [27]. Тому взаємовплив хрящової тканини та інших компонентів суглоба свідчить про можливість вторинного виникнення процесів деградації у хрящі, зумовленого ОА змінами у прилеглих тканинах [25].

Показано, що зміна кровопостачання субхондральної кістки, розвиток гіпертензії, набряку, мікрофрактур із подальшим склерозуванням і порушенням ремоделювання, які призводять до зміни умов навантаження на суглобовий хрящ та розвитку ОА, лежать в основі судинної генези дегенеративних захворювань суглобів. [28].

Серед досліджень останніх років з'являються дані про потенційний взаємозв'язок між розвитком ОА та станом мікробіоти кишечника [2, 9]. Оскільки дисбіоз травної системи тісно пов'язаний з патогенезом багатьох метаболічних та запальних захворювань, відповідно, він може бути задіяний у розвиток ОА.

Біль є одним з найбільш поширених симптомів ОА. Встановлено, що у хворих на ОА наявний хронічний больовий синдром із різним ступенем

інтенсивності: у 60% осіб біль помірної інтенсивності, 25% – сильної, 15% – слабкої [29]. Часом біль спостерігається практично за відсутності набряку суглобів і за показників лабораторних тестів, які не виявляють відхилення від норми. Вираженість больового синдрому при запальних захворюваннях суглобів за даними рентгенографії не відповідає ступеню органічних змін ОРА, активності захворювання, але корелює із тривалістю хвороби, терапевтичних заходів, частотою тривожно-депресивних розладів. Існує гіпотеза виникнення больового синдрому в межах біопсихосоціальної системи, в якій зазначено, що всі біологічні, психологічні та соціальні фактори відіграють значну роль у виникненні болю при ОА [30].

Визначені сьогодні біомаркери болю, пов'язаного з ОА, класифікують як варіативні (такі, що змінюються протягом перебігу хвороби та є зазвичай біохімічними молекулами), та інваріативні (генетичні поліморфізми). Біомаркерами болю при ОА часто виступають метаболіти тканин суглоба та запальні молекули. Так, варіативні біомаркери є складовими синовіальної оболонки – позаклітинної матриці хряща чи тканини суглоба [31]. Навідміну від інших тканин суглоба, хрящ не має ноцирецепторів, отже позбавлений нервової чутливості, тому больовий синдром, який виникає під час захворювання, не пов'язаний безпосередньо з його деградацією, а спричинений ураженням інших структур суглоба [32]. Однак, є потреба в більш широкому розумінні походження та механізмів виникнення болю в суглобах при ОА, оскільки дане питання не достатньо вивчене.

Розвиток ОА – це метаболічно активний, динамічний процес, який залучає всі тканини суглоба (суглобовий хрящ, субхондральну кістку, синовіальну оболонку, капсулу, зв'язки і навколосуглобові м'язи). Порушення структури, функцій та метаболізму матриксу суглобового хряща, який забезпечує адаптацію суглоба до механічного навантаження та вільний рух поверхонь суглоба, є основним патологічним проявом ОА [33].

Розвиток ОА у суглобі призводить до хрящової та кісткової недостатності за умов:

- постійного підвищеного механічного впливу на суглобовий хрящ, що має наслідком руйнування колагенової сітки та дифузії протеогліканів крізь пошкоджену тканину;
- порушення синтезу протеогліканів хондроцитами;
- підвищення активності лізосомальних протеолітичних ферментів, прозапальних цитокінів ІЛ-1, ІЛ-6, ФНП- α ;
- порушення функцій імунної системи, зокрема зумовлене ранньою активацією Т-лімфоцитів та появою аутоантитіл до хрящових компонентів;
- активації перекисного окиснення ліпідів і пригнічення антиоксидантної системи захисту;
- місцевої капіляротрофічної недостатності як результат порушень мікроциркуляції;
- гормональних змін (надлишок естрогенів на тлі недостатності прогестерону та андрогенів) [34].

Діагностика ОА включає в себе клінічну картину, дані інструментальних методів дослідження (рентгенологічні дослідження, магніто-резонансну томографію, комп'ютерну томографію), лабораторні показники (дослідження вмісту С-реактивного пептиду, визначення біомаркерів дегградації хрящової тканини). Однак, можливості ранньої діагностики ОА є обмеженими, тому діагноз зазвичай встановлюється досить пізно, коли хвороба вже прогресує. Незважаючи на значні успіхи сучасної медицини, запобігти розвитку ОА неможливо, але його можна сповільнити шляхом застосування препаратів, що впливають на метаболізм суглобового хряща. Тому терапія ОА передусім зосереджена на попередженні прогресування хвороби, зменшенні або усуненні больового синдрому, уповільненні дегенерації хряща та відновленні (поліпшенні) функцій суглоба [35].

Таким чином, в основі патогенезу ОА є порушення рівноваги між дегградацією та відновленням хряща, що є наслідком нездатності хондроцитів підтримувати гомеостаз хрящового матриксу, інтенсифікація вільнорадикальних реакцій окиснення ліпідів і білків, розвиток запалення та

деструкція субхондральної кістки. Значна кількість етіологічних факторів та складний патогенез ОА за участю різних медіаторів, зумовлюють необхідність застосування у лікуванні патології суглобів тривалих та комплексних терапевтичних заходів з використанням препаратів, які мають різну патогенетичну дію, враховуючи коморбідні стани.

1.2 Участь мікробіоти травного тракту в патогенезі захворювань опорно-рухового апарату

Стан мікробіоти травної системи є актуальною темою сучасних наукових досліджень. Сьогодні зростає кількість даних щодо важливої участі мікробіому людини як у здоровому стані, так і за умов розвитку різних патологій. Будь-які патологічні процеси в організмі людини відбуваються на тлі серйозних змін у складі й функціональній активності кишкової мікробіоти. На зміни у видовому та кількісному складі мікробіоти кишечника може впливати значна кількість факторів, серед яких вік, стать, спосіб життя, режим харчування, наявність захворювань і т.п. [36].

Дисбіоз сприяє проникненню в організм патогенних мікроорганізмів та збільшує його сприйнятливість до інфекції. Людина з дисбіозом ШКТ характеризується більшою вразливістю до хвороб, причому не тільки інфекційного, але і соматичного характеру [10]. Порушення балансу в мікробіомі асоціюється з розвитком численних шлунково-кишкових та системних порушень, включаючи запальні хвороби кишечника, ожиріння, метаболічний синдром, серцево-судинні патології, неврологічні, аутоімунні, деякі захворювання ОРА та ін. [16]. Унікальне різноманіття людської мікробіоти пояснює специфічну метаболічну діяльність та функції мікроорганізмів у кожній структурній частині організму. Тому можна припустити, що за допомогою складних взаємодій з метаболічною та імунною системами людини мікробіом безпосередньо бере участь у патогенезі захворювань [37].

Не викликає сумніву, що мікробіом людини – це фактично метаболічний «орган», який не тільки бере участь у перетравленні їжі, а й продукує різноманітні біологічно активні речовини, стимулює функції вродженого і набутого імунітету, запобігає інвазії патогенних мікроорганізмів, виконує детоксикаційну, антиканцерогенну та синтетичну функції [38].

Мікробіом є дуже складною системою, частини якої тісно взаємопов'язані з організмом, а також реагують на фактори навколишнього середовища, у тому числі на зміну раціону харчування та лікарські засоби. Взаємодія мікробіому з організмом господаря відбувається не тільки на рівні систем та органів, а й на клітинному рівні. Зокрема мікробіота кишечника бере участь в утворенні слизу келихоподібними ентероцитами, стимулює клітини Панета до виділення секреторних молекул, регулює проліферацію епітеліальних клітин ШКТ, впливає на експресію генів та активацію клітин імунної системи [39, 40].

Згідно сучасних даних нормальна мікробіота, яка має коменсальні стосунки з господарем, визначається як кількісне та якісне співвідношення популяцій мікроорганізмів, які забезпечують баланс в метаболічних, біохімічних та імунних функціях організму, що є необхідним для підтримання здорового стану людини. Нормальна мікробіота включає різноманітні популяції мікроорганізмів, серед яких не тільки бактерії, а й інші мікробні представники, такі як гриби, археї, віруси і найпростіші. У ШКТ людини (переважно в товстому кишечнику) виявлено понад 500-1000 видів мікроорганізмів. У здорової людини лише 15% з них мають характеристики патогенних чи умовно-патогенних. У кишковій популяції домінують переважно роди *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* [41].

Мікробіота виконує ряд важливих функцій: міжмікробний антагонізм (синтез органічних кислот, перекису водню, біологічно-активних речовин з антагоністичними властивостями); активація імунної системи, детоксикація, синтетична, травна (посилення активності ферментів, травної та моторної функції ШКТ) [41, 42]. За умов дії патологічних чинників, які

негативно впливають на організм, мікробіоценози виходять зі стану рівноваги, домінуючими стають умовно-патогенні мікроорганізми, які викликають мікроекологічні та імунні порушення [43].

Серед досліджень останніх років з'являються дані про взаємозв'язок між розвитком захворювань ОРА і станом мікробіоти травної системи [44, 45]. Встановлено роль кишкової мікробіоти в кістковому гомеостазі, перебігу ревматоїдного артриту (РА). [46, 47]. Показано, що зміни у складі мікробіому кишечника прямо або опосередковано можуть впливати на дерегуляцію ремоделювання кісток за умов ожиріння, діабету, запальних захворювань кишечника, РА, та можуть слугувати біомаркером метаболізму кісткової тканини [48]. Одним із патогенетичних факторів вищезазначених захворювань є хронічне місцеве й системне запалення. Доведено [49], що кишкова мікробіота бере участь у запальному процесі шляхом індукування синтезу прозапальних цитокінів імунними клітинами організму, та завдяки продукуванню запальних метаболітів бактерій [50].

Існує чітка асоціація ОА, що включає запальний компонент, з ожирінням та проявами метаболічного синдрому – гіперглікемією, гіперліпідемією, в патогенезі яких вже показано залучення мікробіоти ШКТ [51]. Слід зазначити, що у хворих на ОА при ожирінні збільшується кількість умовно-патогенних бактерій на фоні зменшення вмісту бактероїдів; також у таких хворих зі збільшенням ступеня ожиріння підвищується частота виділення ентерококів при зниженні їх абсолютної кількості у складі мікробіому [49]. В експерименті показано [16], що застосування пребіотика у тварин з ожирінням за ОА призводило до нормалізації кишкової мікробіоти, зменшення мікрозапалення (у тому числі синовіальної оболонки) і вираженості ураження суглобів.

Можливий механізм впливу мікроорганізмів ШКТ на суглоби може полягати в тому, що грамнегативна кишкова мікробіота здатна виділяти везикули, що містять ліпополісахариди (ЛПС), які виявляють патофізіологічні, імунологічні та фармакологічні ефекти. Везикули, особливо

за підвищеної кишкової проникності, здатні всмоктуватися в кров і поширюватися по всьому організму, зокрема проникати у синовіальну рідину та порожнину суглоба. Залежно від свого складу такі везикули можуть обумовлювати як про-, так і протизапальну дію. Прозапальний ефект ЛПС значною мірою обумовлений ліпідом А, сполученим із ліпідзв'язуючим протеїном. Подібний прозапальний комплекс активує нейтрофіли і макрофаги. Активовані клітини запускають сигнальний каскад, що включає синтез прозапальних цитокінів, таких як інтерлейкіни (ІЛ)-1 β , -6, ФНП- α , ММП, вільні радикали, які мають несприятливий вплив на суглобові структури [52]. Він, у свою чергу, стимулює інгібітор активатора плазміногену-1, що в подальшому призводить до розвитку запалення [53]. Добре відоме значення Toll-подібних рецепторів (TLR), зокрема TLR-4 і їх корецептора MD-2 в активації як макрофагів, так і синовіоцитів [54]. Особливо значущою є роль цього механізму при вживанні в їжу великої кількості тваринних жирів. У фізіологічних умовах мікробні ЛПС інактивуються печінкою, однак, при їх надлишку відбувається накопичення таких продуктів в гепатоцитах із розвитком неалкогольної жирової хвороби печінки зі зниженням її знешкоджуючої здатності. У товстому кишечнику за таких умов спостерігається дисбіоз, що супроводжується зменшенням кількості грампозитивних біфідобактерій і збільшенням грамнегативних мікроорганізмів. Концентрація ЛПС корелює з тяжкістю ураження суглобів, вираженістю болювого синдрому і ступенем звуження суглобової щілини [55, 56].

Ще одним фактором ризику ОА є низька фізична активність, яка супроводжується зниженням рівня ліпопротеїдів високої щільності, які здатні зменшувати рівень ЛПС і запобігати пошкодженню не тільки печінки, а й суглобів [56].

Досить детально вивчено роль мікробіоти ШКТ в патогенезі аутоімунних захворювань, зокрема РА, анкілозуючого спондилоартриту і псоріатичного артрити [57, 58]. Важливе значення в активації запального

процесу у хворих на РА мають кишкові мікроорганізми роду *Prevotella*, зокрема *P. copri*, які можуть активувати Т-клітинну імунну відповідь [46] за участі стимуляції Toll-подібного рецептора TLR-2 з наступним підвищенням синтезу ІЛ-1, -6 та -8 та ІЛ-23. Подібну активацію пов'язують з розвитком РА, індукованого мікробіотою травної системи [59]. У дослідженнях, проведених Alipour і співав., зазначено, що в пацієнтів з РА, які отримували пробіотики, знижувався у крові рівень С-реактивного білку, прозапальних інтерлейкінів і зменшувався набряк суглобів [60].

У наших експериментальних дослідженнях запропонована концепція біохімічних механізмів залучення кишкової мікробіоти в ремоделювання хрящової тканини суглобу за умов експериментального ОА. Вперше показано розвиток дисбіозу в товстій кишці щурів із експериментальним ОА [61], встановлено, що в біохімічних механізмах ремоделювання хрящової тканини за умов експериментального ОА важлива роль належить кишковій мікробіоті, яка залучається у регуляцію TLR-2/4-опосередкованим запальним шляхом NF-κB, що активує катаболічні процеси, зі збільшенням прозапальних медіаторів і металопротеїназ, а також призводить до ОС і деструкції хряща [62].

Таким чином, мікробіота ШКТ може відігравати ключову роль у нормальному і злагодженому функціонуванні всіх систем організму, є незамінною ланкою в ланцюзі біохімічних реакцій, що постійно відбуваються на всіх мікро- і макрорівнях організму, створюючи тим самим надійний захист, і забезпечуючи баланс для всієї макросистеми – організму господаря. Вивчення стану мікробіоти травної системи за умов розвитку ОА може мати важливе значення для розуміння механізмів дегенеративних змін у гіаліновому хрящі суглоба, що супроводжуються запальним процесом, та сприятиме розробці і удосконаленню схем лікування захворювань ОРА.

1.3 Біохімічні механізми розвитку остеоартриту

Розвиток ОА характеризується значними біохімічними змінами в суглобових тканинах: хрящі, в якому відбуваються процеси деградації; кістковій тканині, в якій відбувається ремоделювання, що призводить до субхондрального склерозу, утворення остеофітів і розширення кісткового епіфізарного відділу; синовіумі, який схильний до потовщення та запалення; суглобовій капсулі і зв'язках [63].

Макромолекули колагену різних типів (переважно II типу), що утворюють міцний волокнистий каркас, та протеоглікани (ПГ), які забезпечують пружно-еластичні властивості матриксу, є основними компонентами сполучнотканинного матриксу, з якого на 98% складається гіаліновий хрящ. Агрекани становлять 90% усіх ПГ хряща. Молекула агрекану складається з білкового ядра, до якого приєднані ланцюги глікозаміногліканів (ГАГ) – хондроїтин сульфату (ХС), кератан сульфату (КС) та гіалуронової кислоти (ГК) [64]. Структура агрекану забезпечує дуже високу гідрофобність і низьку в'язкість. Хондроцити та хондробласти – основні клітини хряща, які відповідають за функціональний стан хрящового матриксу та синтезують практично всі його компоненти, складають лише 1-5% маси хряща. Метаболізм хрящової тканини, тобто синтез (анаболізм) і деградацію (катаболізм) агреканів, а також інших компонентів хрящового матриксу резулюють хондроцити [65]. Зокрема, синтез із глюкози в присутності глютаміну глюкозаміну, похідними якого є ХС та КС, забезпечується хондроцитами [66]. Метаболічні процеси в нормі перебувають у стані рівноваги. За розвитку патології відбувається порушення метаболізму хрящової тканини, що полягає в пригніченні біосинтетичної анаболічної активності хондроцитів із переважанням катаболічних процесів, які призводять до дегенеративних змін тканин суглоба [67].

Втрата матриксом ГАГ – ХС, КС, ГК на рівні поверхневої, проміжної та глибокої зон є характерною ознакою деструкції хряща при ОА.

Спостерігається зменшення молекул ПГ, які набувають здатності до виходу з матриксу хряща. ПГ здатні поглинати воду, але не можуть її втримувати. Поглинання колагеном надлишкової води призводить до його набрякання та розволокнення, і, як наслідок, до зниження резистентності хряща [68]. Все це призводить до того, що хондроцити замість нормального продукують колагени IX, X типів, які не утворюють фібрил, та синтезують ПГ, які не здатні до агрегації [69].

Відомо, що деструктивним ферментам: лізосомальним протеазам (катепсинам) та нейтральним ММП (стромелізину, колагенази, агреканолам, желатиназам), які зумовлюють деградацію усіх компонентів позаклітинного матриксу, в тому числі колагену та ПГ хряща, належить основна роль у розвитку катаболічних процесів у хрящовій тканині за ОА [70]. Більшість ММП синтезуються як зимогени, тоді як серинові протеїнази є фізіологічними активаторами про-ММП: зв'язуючись з рецептором активатора плазміногену на клітинній поверхні, перетворюють плазміноген у плазмін (протеїназу широкого спектру дії), який, в свою чергу, деградує компоненти хрящового матриксу та може бути залучений в активацію латентних форм ММП [71]. Синтез ММП активується під впливом прозапальних цитокінів. Інгібітори ММП і тканинного активатора плазміногену, які перешкоджають активації протеолітичних ферментів та інгібують деградацію хрящового матриксу, також синтезуються хондроцитами [72]. Сьогодні досить активно досліджується роль ММП в метаболізмі хрящової тканини як в нормі, так і при ОА. Показано, що виявлені в синовіальній рідині здорових людей ММП та продукти деградації агреканів беруть участь не тільки в деградації хрящової тканини, а й у підтримці гомеостазу нормального хряща [73]. У деструктивних змінах хряща при ОА важливе значення має гіперпродукція хондроцитами та іншими клітинами ММП, включаючи колагенази (ММП-1, -8, -13), агреканолази (ADAM-TS4 і -TS5), стромелізин-1 (ММП-3) та желатинази (ММП-2, -9). В хрящовій тканині суглобів виявлено постійну

експресію матричної РНК ММП-1, -3 та -13 [70]. Саме ММП-13, відіграє важливу роль у деградації колагену II типу, що показано в дослідженнях при застосуванні інгібіторів різних ММП [74]. Припускають, що за умов ОА початковий етап розвитку незворотніх дегенеративних процесів із зміщенням метаболізму хондроцитів у бік катаболізму може бути пов'язаний саме з активацією ММП-13 колагеновими молекулами, яка здійснюється через DDR-2 рецептор, стимуляція якого запускає внутрішньоклітинні шляхи сигнальної трансдукції за участю мітоген-активованої протеїнкінази p38 (MAPK p38) та ядерного фактора NF- κ B [75].

Основним чинником розвитку та прогресування симптомів ОА вважається запалення [76, 77]. З поширенням запального процесу пов'язаний патогенез майже всіх захворювань суглобів (РА, реактивний артрит, інфекційний артрит, ідіопатичний анкілозуючий спондиліт, подагричний артрит та ОА). Синовіт може бути не тільки одним із факторів пошкодження хряща, але й показником швидкого прогресування ОА. Однак, причини запалення при ОА залишаються досі не з'ясованими у повній мірі. Прозапальні цитокіни, зокрема ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-15, ІЛ-17, ІЛ-18 та ФНП- α відіграють значну роль в ушкодженні хряща [25, 76]. Вже на ранніх стадіях запалення активовані хондроцити, синовіальні клітини та остеоцити здатні синтезувати та секретувати запальні цитокіни. Головними медіаторами деструкції суглобового хряща вважають ІЛ-1 β і ФНП- α [78]. Під їх впливом відбувається посилення прозапальної сигнальної трансдукції, пригнічення синтезу протеогліканів, пошкодження та деградацію колагену суглобового хряща ММП [79]. У синовіальній рідині та суглобовому хрящі хворих на ОА виявлено підвищення концентрацій цих цитокінів, які зростають із подальшим пошкодженням та деструкцією суглобового хряща [80]. Клітини синовіальної оболонки також залучені до підвищеної продукції кількості молекул судинної та міжклітинної адгезії, ІЛ-6, ІЛ-10 і гранулоцитарного колонієстимулюючого фактору [81]. Крім того, показано, що уповільнення прогресування ОА та зниження ферментативної деградації хрящової та

кісткової тканин суглоба відбувається внаслідок модуляції запальної відповіді клітин за участі ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-11 та ІЛ-13, які володіють протизапальними анаболічними ефектами (рис. 1.2) [82, 83].

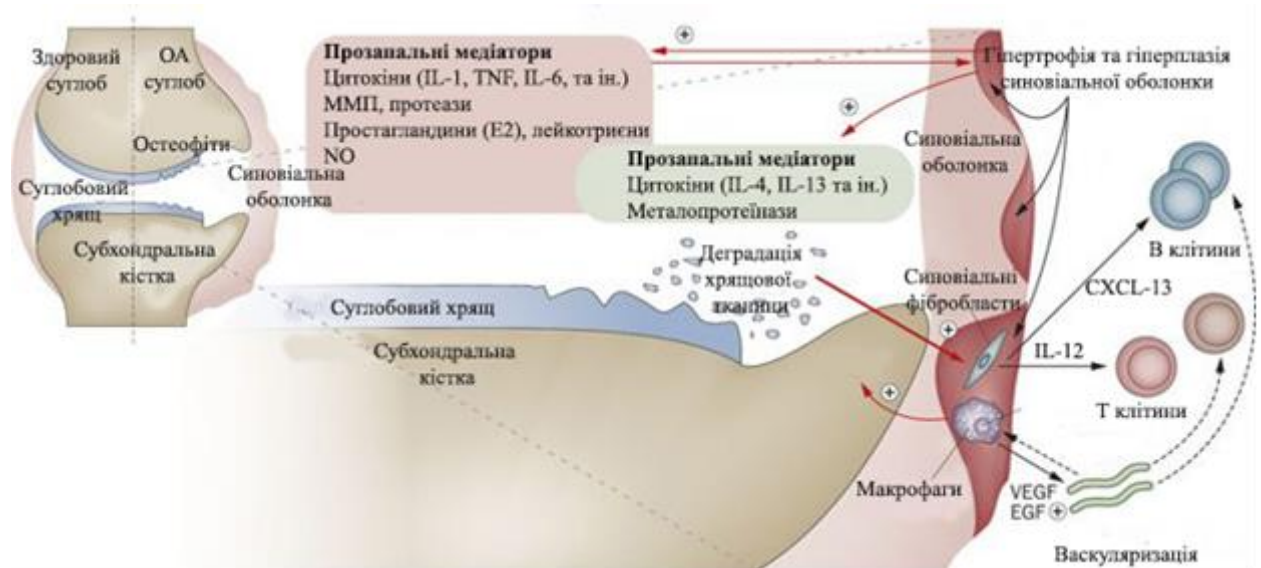


Рис. 1.2 Роль запального процесу в патогенезі ОА [83]

За ОА хондроцити характеризуються гіперекспресією двох ізоформ циклооксигенази (ЦОГ), яка є ключовим ферментом метаболізму арахідонової кислоти та регулює синтез простагландинів. Забезпечення нормальної функціональної активності клітин здійснює ЦОГ-1, яка постійно присутня в клітинах і регулює синтез простагландинів. Ініціацію запалення, мітогенезу, клітинної проліферації та деструкції викликає ЦОГ-2, яка обумовлює синтез простагландинів. Прискорення процесів деградації хряща за ОА асоціюється з активацією ЦОГ-2 в хондроцитах, в наслідок чого посилюється синтез простагландину E_2 ($ПГЕ_2$) і колагенази. Саме $ПГЕ_2$ за таких умов відповідає за вазодилатацію та больові сигнали, а також підвищує синтез стромелізину, а лейкотриєни чинять хемотаксичний ефект, залучаючи лейкоцити до порожнини суглоба. Отже, до патогенезу ОА, як на місцевому, так і на системному рівнях залучені медіатори запалення, включаючи цитокіни, фактори росту та простагландини [84, 85].

Показано, що індукція апоптозу хондроцитів, розвиток резистентності цих клітин до дії факторів росту та пригнічення синтезу компонентів хрящового матриксу може відбуватися внаслідок підвищення рівня NO через активацію його продукції в хондроцитах індукційною формою синтази оксиду азоту (iNOS) під впливом ІЛ-1 [86]. За умов експериментального артриту використання інгібіторів NOS супроводжувалось зменшенням запального процесу в синовіальній оболонці, деструкції хряща та кістки, оскільки NO здатний ушкоджувати позаклітинний матрикс хряща, а також знижувати рівень інгібітора ІЛ-1 та антагоніста рецептора ІЛ-1, що може призводити до підвищення біологічної активності цього цитокіну [87].

Надмірна активація процесів вільнорадикального окиснення на тлі дезадаптації ферментативних та неферментативних ланок антиоксидантної системи захисту організму є важливою складовою патогенезу ОА. Вільні радикали здатні викликати окисну модифікацію мембранних компонентів, порушувати функціонування внутрішньоклітинних та зовнішньоклітинних білків у складі хрящового матриксу, що може бути одним із факторів ініціації патологічного запального процесу, та сприяти подальшому руйнуванню хряща і субхондральної кістки [88].

Оксидативний стрес (ОС), який виникає внаслідок постійної генерації вільних радикалів активованими фагоцитами, та за рахунок гіпоксичних процесів при роботі суглобів, призводить до пошкодження синовіальних клітин та розвитку реактивного синовіту, і як наслідок, деструкції хрящової тканини, ерозії кісток та суглобових поверхонь [89]. У рідинних пунктатах з суглобів хворих на ОА виявлено підвищений вміст фібронектинових фрагментів, що містили карбонільні групи, які утворились внаслідок перетворення карбоксильних груп під дією вільних радикалів з нормального (інтактного) фібронектину [90]. Вільні радикали безпосередньо та через цитокін-індуковане підвищення концентрації та активності ММП стимулюють хондро- та остеорезорбцію, викликають фрагментацію ГК та ХС [91]. Внаслідок дії прозапальних цитокінів та активації сигнальних каскадів у

клітинах синтезується надлишки пероксиду водню, супероксидного аніону та оксиду азоту, які активують колагеназу та пригнічують інгібітори протеаз, викликають ПОЛ мембран, пошкоджують ферменти, структурні білки та руйнують нуклеїнові кислоти. Зниження антиоксидантного захисту клітин індукує розвиток патології суглобів [92].

У підтримці окисно-антиоксидантної рівноваги важливу роль виконує глутатіонова система, яка бере участь у метаболічних реакціях, спрямованих на підтримку клітинного гомеостазу та захист компонентів клітин від окисного стресу. Ключовою ланкою антиоксидантного захисту є відновлена форма глутатіону, який є донором атомів водню в окисно-відновних реакціях, взаємодіючи з активними формами кисню (АФК) знешкоджує вільні радикали та підтримує функції клітинних мембран [93]. В якості кофактора він входить до складу ферментів глутатіонової системи, які знешкоджують пероксид водню (глутатіонпероксидази), ліпоперекиси мембран та ксенобіотики (глутатіонтрансферази), підтримують пул відновленого глутатіону (глутатіонредуктази), забезпечуючи комплексний антиоксидантний захист [94].

Відомо, що значну роль в патогенезі ОА відіграють виявлені в синовіальній рідині кристали пірофосфату кальцію та гідроксиапатиту кальцію, наявність яких корелює з розвитком реактивного синовііту та рентгенологічними змінами в суглобах. Дана роль кристалів гідроксиапатиту може бути обумовлена їх здатністю стимулювати мітогенез і синтез простагландинів у хондроцитах, а також продукцію і секрецію ММП [95].

Крім того, слід зазначити, що суглобовий хрящ позбавлений кровоносних судин, лімфатичних вузлів та інервації та має обмежену здатність до відновлення. Тому питанням репаративних можливостей суглобового хряща при пошкодженні залишається актуальним. Анаеробний характер метаболізму хрящової тканини обумовлює низьку інтенсивність процесів обміну речовин у зрілій тканині. Дифузія речовин із синовіальної рідини обумовлює перебіг трофічних процесів у хрящі. При розвитку ОА

порушується трофіка хондроцитів, що зумовлює припинення ремоделювання хрящової тканини [73]. Клітини проміжної зони відновлюють фізіологічну втрату суглобового хряща. Оновлення близько 50% всіх ПГ у суглобових хрящах дорослої людини відбувається упродовж року [96, 97]. Відомо, що остеогенний протеїн-1, який експресується хондроцитами середньої та глибокої зони хряща впливає на фізіологічне ремоделювання суглобового хряща. Слід відмітити, що під час старіння людини спостерігається зниження рівня остеогенного протеїну-1, яке сприяє розвитку ОА [98, 99].

Отже, з'ясування біохімічних механізмів ремоделювання хрящової тканини за розвитку ОА на сьогодні потребує детального вивчення та є актуальним завданням сучасних біохімії та медицини.

1.3.1 Маркери метаболічних змін у суглобі за остеоартриту

Незважаючи на те, що в останні десятиріччя чимало наукових досліджень зосереджено на вивченні метаболічних змін в організмі за умов розвитку захворювання суглобів та виявленні біохімічних маркерів ОА, значна кількість питань залишається не з'ясованою [33, 100].

Діагностика ОА на ранніх стадіях розвитку має велике значення для розуміння процесів прогресування захворювання та вибору тактики лікування. Сьогодні використання рентгенівського дослідження з класифікацією стадії захворювання є найпоширенішим методом діагностики ОА [101]. Проте, використання даного методу не є найбільш чутливим діагностичним тестом, оскільки передбачає вже наявні значні зміни в суглобовому хрящі. Оцінити розвиток артричних порушень у суглобі можливо також, використовуючи магнітно-резонансну томографію (МРТ) та ультразвукову діагностику (УЗД). Проте, ці методи не завжди фіксують зміни архітекtonіки кістки, що може свідчити про раннє прогресування ОА, а також їх діагностичний прогноз цілком залежить від спеціаліста, який проводить діагностику, і його висновків [102].

Альтернативою до наведених методів виявлення патології суглобів є визначення чутливих біохімічних маркерів, – молекул або їх фрагментів, які утворюються в процесах метаболізму тканин суглоба (продуктів обміну ПГ і колагенів, ГК, цитокіни, специфічні білки та ферменти хрящового матриксу і т.п.), зміни показників яких можуть відображати ранні (доклінічні) кількісні та динамічні патобіохімічні прояви захворювання [103].

Сьогодні значна кількість наукових досліджень переважно зосереджені на розробці таких маркерів ОА та впровадженні їх у клінічну практику. Для діагностики і моніторингу розвитку ОА створено VIPEDS-класифікацію маркерів обміну кісткової, хрящової тканин та синовію. Згідно даної класифікації всі біохімічні маркери поділено на 6 груп залежно від потенційного використання їх у клінічній практиці для: В (burden of disease) – оцінка захворюваності; І (investigative) – дослідницькі цілі; Р (prognostic) – прогноз; Е (efficacy of intervention) – оцінка ефективності лікування; D (diagnostic) – діагностика ОА та S (safety) – безпека [104].

Метаболічні зміни в суглобовому хрящі, синовіальних оболонках та субхондральній кістці є найбільш ранніми предикторами розвитку ОА. До таких біомаркерів, які відображають патофізіологічні порушення в тканинах суглоба, відносяться зміни показників метаболізму кісткової і хрящової тканин (С-кінцевий телопептид, колаген II типу, олігомерний матриксний білок хряща, агрекан, ММП), та маркери запалення (ІЛ-6, ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-10, ІЛ-13, ІЛ-4) – білки гострої фази, які відображають стан запального процесу в організмі на різних стадіях захворювання (табл. 1.1) [105, 106].

Незважаючи на те, що біохімічні маркери є досить специфічними параметрами захворювання, однак, використання лише одного показника не є інформативним, що пов'язано з гетерогенністю патогенезу ОА. Тому для виявлення патології суглобів на ранніх стадіях та для контролю ефективності терапії необхідне визначення декількох маркерів, що надасть більш достовірну інформацію про ступінь деградації хряща, субхондральної кістки та інших компонентів суглоба, залучених у патогенез ОА [107].

Таблиця 1.1

**Основні біохімічні маркери метаболічних змін у тканинах суглоба
за остеоартриту [106]**

Маркери деградації кісткового матриксу	N-кінцевий телопептид колагену I типу (NTX-I); С-кінцевий телопептид колагену I типу (CTX-I); Піридинолін (PYR); Катепсин К; Остеопротегерин (OPG); Дезоксипіридинолін (DPYR); Ізоформа тартрат-резистентної кислоти фосфатази 5b (TRACP-5b);
Маркери синтезу кісткового матриксу	Остеокальцин (N-MID); Кістковий сіалопроєїн (BSP);
Маркери деградації хрящового матриксу	С-кінцевий телопептид колагену II типу (CTX-II); $\alpha 1$ -ланцюг колагену II типу (HELIX-II); Нонапептид колагену II типу (Coll 2-1); NO ₂ – форма нонапептиду колагену II типу (Coll 2-1 NO ₂); фрагменти колагену II типу C2C, C1, 2C епітопи; Олігомерний матриксний білок хряща (COMP); Пентозидин (маркер глікозилювання); Матриксні металопротеїнази -1, -3, -9, -13; Тканевий інгібітор металопротеїназ TIMP;
Маркери синтезу хрящового матриксу	N-пропептид ІІА колагену II типу (PIIANP); С-пропептид колагену II типу (PIICP); Агрекан, епітоп 846 (CS846);
Маркери розпаду біополімерів синовію	Glc-Gal-піридинолін (Glc-Gal-PYD);
Біополімери синовію	Хрящовий глікопротеїн-39 (YKL-40); Гіалуронова кислота;
Прозапальні цитокіни; Протизапальні цитокіни; Хемокіни та ангіогенні фактори росту	ІЛ-6, ІЛ-1, ФНП- α , ІЛ-15, ІЛ-18; ІЛ-10, ІЛ-2; Судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF), ІЛ-7.

Встановлено, що при ОА концентрація ПГ суглобового хряща зменшується за рахунок ХС та КС [108, 109], порушуються процеси агрегації ПГ: зменшується їх кількість та скорочується середній розмір одного агрегату, що є одним з ранніх біохімічних симптомів розвитку ОА [110]. На початкових стадіях захворювання відбувається активація біосинтезу ГАГ хондроцитами, що, можна вважати як компенсаторний механізм у відповідь на стресові чинники. Втрата матриксом суглобового хряща ПГ супроводжується значним підвищенням вмісту води та набряканням тканин, що, як припускають, може сприяти збільшенню гідрофільності колагенових волокон [111].

У відповідь на зміну гомеостазу позаклітинного матриксу на початковій стадії після альтерації відбувається активація проліферації хондроцитів з утворенням кластерів, що призводить до зміни клітинної конфігурації та складу позаклітинного матриксу, здебільшого за рахунок продукції агрекану [112].

За відсутності патології у гіаліновому хрящі хондроцити синтезують переважно колаген II типу, а також пов'язані з ним колагени IX і XI типів. При ОА підвищується метаболічна активність хондроцитів, які починають синтезувати колаген I та III типів, при цьому підвищується вміст неколагенових білків [113, 114]. На відміну від колагену II типу, колаген I типу в своєму складі має залишки глюкозили та галактозили, які перешкоджають взаємодії з ПГ. Така метаболічна активність хондроцитів не тільки призводить до стимуляції біосинтезу ПГ, колагену та неколагенових білків, які мають значення у процесах ремоделювання хряща, але й лежить в основі його катаболічних можливостей. Крім того, активність кислих лізосомальних гідролаз за таких умов різко зростає [115]. Показано, що за ОА в осередках деструкції суглобового хряща виявляється значна активація катепсину, який розщеплює стрижневий білок ПГ та призводить до втрати хрящовим матриксом ГАГ. Гіперпродукція колагену компенсує посилений колагеноліз [116].

Отже, зміна складу колагенової сітки у поєднанні з втратою агрекану призводить до зменшення загальної пружності та міцності позаклітинного матриксу і, як результат, до стоншення хрящового шару зі збільшенням навантаження на субхондральну кістку, та утворення ушкоджень на поверхні суглобового хряща [117].

Слід зазначити, що деградація ІІГ та утворення продуктів розпаду агрекану можуть бути інформативними для ранньої діагностики ОА. Зокрема, в результаті руйнування агрекану агреканазою віділяється ARGS неопітоп, який можна визначити за допомогою методу імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням ВС3-С2 антитіл у плазмі крові та синовіальній рідині хворих на ОА. При цьому продукти розпаду агрекану AGG1 та AGG2 можуть використовуватися разом з СТХ-ІІ як маркер дегенеративних змін хрящової тканини при ОА колінного суглоба [118, 119].

Сьогодні у клінічних дослідженнях ОА доцільним є визначення синтетичної активності колагену ІІ типу (Col ІІ), як маркера патологічних змін метаболізму хряща, оскільки колаген ІІ типу синтезується у формі проколагену з аміновмісною N-кінцевою групою (PIINP, PIIANP) та карбоксильною C-кінцевою групою (PIICP або CPII), відщеплення яких відбувається при утворенні фібрилярної форми колагену. Серед маркерів, що виявляють руйнування колагену ІІ типу є СТХ-ІІ, який є специфічним показником структурних змін хряща, зростання вмісту якого асоціюється з синовіїтом та зниженням мінералізації. Однак, є припущення, що СТХ-ІІ може утворюватись не тільки в тканині хрящового матриксу. Тому зміни у складі СТХ-ІІ можуть бути використані для діагностики ОА у поєднанні з іншими біомаркерами, зокрема, з маркерами синтезу (PIIANP) та розпаду колагену ІІ типу [120].

До маркерів деградації хрящової тканини також слід віднести ферменти, які руйнують тканини матриксу: протеолітичні ферменти – ММП, зокрема, ізоформи ММП-1, ММП-3 та ММП-13; агрекани, в тому числі дезінтегрин і металопротеїназа з тромбоспондинподібними фрагментами – ADAMTS-4 або

ADAMTS-5 [121].

Синтез хрящового матриксу опосередковується анаболічними медіаторами, серед яких важливе значення надається інсуліноподібному фактору росту (ІФР)-1, трансформуючому фактору росту (ТФР)- β , ІЛ-4, а також COMP. COMP також відомий як тромбоспондин 5 (TSP5), є одним з неколагенових протеїнів родини тромбоспондинів, який утворює дисульфід-зв'язаний гомопентамер із молекулярною масою близько 524 кДа, і виявляється переважно в тканинах хряща, в значно меншій кількості присутній у зв'язках, менісках та синовіальних оболонках. Молекули COMP пов'язують між собою колагенові волокна, стабілізуючи колагенову сітку в хрящовій тканині. При станах, що супроводжуються пошкодженням хряща, матриксні протеїни потрапляють у синовіальну рідину та кров. Дослідження показали, що виявлення підвищених концентрацій COMP є чутливим методом діагностики деструкції хряща [122].

Поряд із дегенерацією суглобового хряща в патологічний процес при ОА залучається прилегла кісткова тканина. Донедавна вважали, що рентгенологічні зміни, які визначаються в губчастій речовині субхондральної кістки, такі, як склероз або утворення кіст у хворих на ОА мають вторинний характер. Однак, результати клінічних і експериментальних досліджень свідчать про можливу ініціюючу роль субхондральної кістки в патогенезі ОА. Одним із можливих механізмів є різке підвищення градієнта жорсткості субхондральної кістки [123].

Кісткові клітини синтезують білки і цитокіни, які здійснюють ендокринну регуляцію та передачу сигналу. Синтезовані остеобластами протеїни включають білки кісткового матриксу, такі як колаген, остеопонтин, остеокальцин, кісткові сіалопротеїни. Крім того, ці клітини вивільняють ММП як в активній, так і в латентній формі, які беруть участь у процесі ремоделювання кісткової тканини, та компоненти системи активатора плазміну [124]. За умов ОА остеобласти субхондральної кістки характеризуються надмірною продукцією лужної фосфатази, остеокальцину

і, особливо, ІФР-1 та урокінази. У сучасних наукових дослідженнях доведено, що зрілі склерозовані остеобласти відрізняються підвищеним синтезом остеокальцину, ІЛ-6, ІЛ-8, С-телопептиду колагену І типу та накопиченням остеоїдних речовин [125].

Дослідження маркерів резорбції та синтезу кістково-хрящової тканини (фракцій гідроксипроліну) у хворих на ОА показало підвищення концентрації вільного гідроксипроліну (маркера резорбції) відносно рівня у здорових людей більше ніж удвічі. Разом з тим, показник синтезу кісткової тканини – білок-зв'язана фракція гідроксипроліну, був зниженим відносно норми. Такі зміни цих параметрів свідчать про те, що у хворих на ОА в метаболізмі колагену переважає катаболічна фаза над синтетичною [126].

Незважаючи на те, що біохімічні маркери кісткового метаболізму в меншій мірі показові при захворюваннях суглобів, ніж за умов остеопорозу, до важливих маркерів остеогенезу слід віднести остеокальцин, кісткову лужну фосфатазу, які визначають у сироватці хворих на ОА, а також пропептиди колагену І типу (N-кінцевий пропептид проколагену І типу (PINP) та C-кінцевий пропептид проколагену І типу (PICP)). Серед маркерів кісткової резорбції, які використовуються для діагностики ОА, є різноманітні фрагменти колагену І типу (CTX-1), N-телопептиду колагену І типу (NTX-1) та C-кінцевого пропептиду проколагену І типу (ICTP) [127].

Запалення все частіше розглядається як невід'ємний компонент ОА. Запальний процес може відбуватися місцево, у синовіальній оболонці, та системно, що включає запальні агенти, які циркулюють у кров'яному руслі [128]. Між запальним процесом у тканинах суглоба та дегенеративними змінами суглобового хряща існує тісний взаємозв'язок. Структурні зміни матриксу хряща із залученням протеолітичних ензимів, мають результатом вивільнення значної кількості макромолекулярних фрагментів та неоантигенів у синовіальну рідину, та розвиток синовіїту. У свою чергу, синовіальна оболонка експресує медіатори, які сприяють деструктивним змінам хряща, що призводить до ще більш вираженого запалення суглобових

тканин [129].

Запальні процеси у суглобі перш за все асоціюються рівнем показників цитокінового профілю, які виявляють в синовіальній рідині хворих на ОА. За умов патології у тканинах суглоба утворюється надлишок прозапальних цитокінів макрофагального походження (ФНП- α , ІЛ-1, ІЛ-6, гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора та ін.) при зниженій концентрації протизапальних цитокінів (ІЛ-2, ІЛ-3, ІЛ-4, ІЛ-10) [106]. Згідно сучасних уявлень, саме цитотоксичними ефектами прозапальних цитокінів, перш за все ФНП- α , обумовлені основні прояви захворювання, в тому числі хронічний синовіт, деструктивні ураження хряща та кістки. Прозапальні цитокіни запускають шляхи сигнальної трансдукції, які активують ядерні транскрипційні фактори, зокрема NF- κ B, AP-1, які, в свою чергу, регулюють активність генів, що кодують синтез медіаторів запалення та індукують апоптоз. ІЛ-1 β , експресія якого значно зростає в хрящових тканинах за умов ОА, стимулює утворення ММП, інгібує синтез колагену та ПГ, індукує синтез активатора плазміногену та стимулює синтез і вивільнення певних ейкозаноїдів, включаючи простагландини і лейкотриєни. Даний цитокін не тільки визначає рівень катаболічних процесів при ОА, а й стимулює продукцію інших прозапальних цитокінів. Так, ІЛ-1 β та фактор некрозу пухлин індукують синтез ІЛ-6, який інгібує утворення колагену II типу, сприяє вивільненню із хрящової тканини ПГ та індукує синтез інгібіторів ММП, ІЛ-1Ra та розчинного рецептора ТФР. Показано, що вміст ІЛ-6 у сироватці крові корелює з клінічними проявами захворювання та показниками лабораторних досліджень запального процесу [130]. У дослідженнях [131] встановлено, що ІЛ-6 може виконувати важливу роль у дегенеративних змінах хряща на ранніх стадіях ОА, що дає підстави віднести даний цитокін до діагностичних біомаркерів захворювання, однак, необхідні подальші дослідження.

У клінічній практиці визначення маркерів запалення за умов ОА в значній мірі корелює з наявністю вираженого синовііту. В активній фазі

розвитку патології суглобів зростають усі показники, характерні для гострого запалення. До таких біохімічних маркерів належать: сироватковий С-реактивний білок та швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ); запальні медіатори: фермент біосинтезу простаноїдів – ЦОГ, ПГЕ₂, ПГD₂, ПГF_{2a}, тромбоксан та простациклін; циркуляція локальних цитокінів: ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-17, ІЛ-18, ФНП-α та хемокінів, зокрема, хемокінів СС (CCL5) й ІЛ-8; оксид азоту та продуктів розпаду синовіальної оболонки, серед яких ГК. За умов запалення при ОА у сироватці крові та синовіальній рідині фіксується підвищення вмісту глікопротеїнів, сіалових кислот, концентрації ХС [132].

Дослідження стану імунного гомеостазу у хворих на ОА дозволило визначити в Т-клітинній ланці імунітету зниження кількості Т-загальних лімфоцитів, яке відбувалось за рахунок Т-хелперів, та активації В-клітинної ланки – підвищення кількості В-лімфоцитів, а також метаболічної активності фагоцитуючих клітин, зокрема фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів [133]. Встановлено значну активацію процесів ендотоксикозу у хворих на ОА, що виражалось у підвищеній концентрації в плазмі крові середньомолекулярних пептидів, та збільшені їх сумарного токсичного впливу на мембрани еритроцитів [134].

При вивченні біохімічних факторів за умов ОА, встановлено характерні зміни показників, що свідчать про оксидативний стрес: підвищення інтенсивності вільнорадикальних окисних реакцій на фоні значного пригнічення активності ферментів антиоксидантної системи захисту, що залежать від поширеності патологічного процесу та стадії захворювання [135].

Таким чином, певні сполуки, які задіяні у метаболічних процесах тканин суглоба, можуть бути біохімічними маркерами, які відображають патофізіологічні порушення, які відбуваються в суглобових тканинах при виникненні та прогресуванні ОА на різних його стадіях. Сьогодні не існує біомаркерів, які б у повній мірі відображали розвиток ОА, тому ефективний контроль метаболізму хряща може забезпечити тільки поєднання декількох

параметрів, які залучено в процеси синтезу та деградації матричних молекул. Дослідження біохімічних змін в організмі при ОА, вивчення ролі маркерів ОА сприятиме виявленню захворювання на більш ранніх етапах розвитку, попередженню його прогресування та розширенню й оптимізації протоколів лікування хворих на ОА.

1.4 Терапевтичні та профілактичні фармакологічні стратегії при захворюваннях суглобів

На сьогодні, актуальною проблемою сучасної медицини залишається профілактика та лікування захворювань суглобів. Це пов'язано як з цілою низкою різних етіологічних факторів розвитку даної патології, так і з наявністю лише симптоматичних терапевтичних стратегій, які застосовуються для її лікування. Профілактика та лікування ОА включають в себе лише застосування нутрицевтичних і симптоматичних препаратів, зміну способу життя, корекцію раціону харчування, зменшення надлишкової маси тіла, раціональну рухову активність, фізіотерапію та хірургічні методи, базовими принципами яких є запобігання прогресуванню хвороби, зменшення запального процесу та інтенсивності больового синдрому, уповільнення дегенерації хряща й відновлення (поліпшення) функції суглоба [136, 137].

Для лікування ОА рекомендації ВООЗ, Міжнародного наукового дослідницького товариства з питань ОА (OARSI) та Європейського товариства з клінічних та економічних аспектів остеопорозу та ОА (ESCEO) включають застосування швидкодіючих симптом-модифікуючих засобів: НПЗП, глюкокортикостероїдів, анальгетиків, а також препаратів сповільненої дії, що модифікують структуру хряща (symptomatic slow acting drugs in osteoarthritis – SYSADOA) [137, 138].

Відсутність ефективних фармакологічних стратегій лікування та профілактики ОА, які б достовірно позитивно впливали на біохімічні,

імунозапальні та біомеханічні чинники, що лежать в основі розвитку даного захворювання, залишають надзвичайно актуальним завданням пошук і оцінку ефективності нових методів та засобів лікування ОА, які не лише володітимуть протизапальними властивостями, а й матимуть комплексний вплив на суглобові тканини, особливо на ранніх стадіях захворювання, та запобігатимуть прогресуванню дегенерації суглобового хряща з мінімальними побічними ефектами [139, 140].

Слід зазначити, що практично всі препарати, що застосовуються для лікування ОА мають симптоматичний ефект, який характеризується різною швидкістю настання. Однак, безперечним є той факт, що ці препарати мають також і патогенетичний вплив на певні ланки патогенезу ОА.

НПЗП чинять симптоматичну дію, пригнічують больовий синдром та знижують інтенсивність запального процесу в суглобі. НПЗП, імуносупресивні засоби, тощо проявляють свої ефекти шляхом селективного інгібування ЦОГ [141] – ключового ферменту метаболізму арахідонової кислоти, що призводить до зменшення синтезу простагландинів, насамперед ПГЕ₂, тромбоксану А₂, та має наслідком зменшення проникності судинної стінки для формених елементів крові і плазмових білків. Однак, НПЗП становлять групу лікарських препаратів відносно небезпечних щодо розвитку побічних реакцій, особливо з боку травної системи, що пов'язано з виникненням НПЗП-гастропатій, виразки шлунка, збільшення проникності кишечника, порушень серцево-судинної системи, деякі з них негативно впливають на метаболізм суглобового хряща та функціонування організму вцілому [142, 1423].

1.4.1 Особливості застосування хондропротекторів за остеоартриту

Відомо, що на початку захворювання в хондроцитах активуються вільно-радикальні процеси, збільшується утворення АФК, значно посилюються процеси окиснення, що призводить до розвитку ОС.

Відбувається порушення метаболізму клітин [144], ушкодження ферментативних систем і структурних білків хрящової тканини, і як результат – загибель хондроцитів і синовіоцитів [145]. ПГ є основними структурними білками хрящової тканини, які модифікуються в окисних реакціях. Застосування лікарських засобів на основі хондроїтину, які містять у своєму складі структурні компоненти ПГ, сприяє відновленню структури хрящової тканини, гальмуванню процесів деградації й ПОЛ, та пригнічує запалення [146].

У експериментальних клінічних дослідженнях з використанням морфогістологічних методів встановлено можливість спрямованої корекції ремоделювання хряща за допомогою розробленого комплексу фармакологічного лікування препаратами хондромодифікуючої та антиоксидантної дії [147]. Показано, що при свіжому трансхондральному пошкодженні суглобового хряща, за умови збереження конгруентності суглобових поверхонь, фармакологічна корекція сприяла утворенню в області дефекту хрящового регенарату, який, згідно гістологічного аналізу, за будовою був подібний до гіалінового хряща [148].

Розробка хондропротекторів стала важливим напрямком патогенетичних досліджень. Термін «препарати-хондропротектори» був запропонований ще в 1960 році при оцінці дії румалона і артепарона, препаратів цілеспрямованої дії на метаболізм хрящової тканини, які стимулюють в хондроцитах біосинтез і підвищують стійкість хряща до дії катаболічних ферментів [149]. Основними механізмами дії таких лікарських засобів є збільшення синтезу макромолекул хондроцитами, продукції гіалурону синовіоцитами, інгібування ферментів, що руйнують макромолекули хряща, редукція синовіту та зменшення болю в суглобі [136].

Тривалий час в терапії запально-деструктивних захворювань суглобів існувала думка, що хондропротектори, як і НПЗП, здійснюють при цих патологічних станах лише симптоматичну дію. Однак, дослідження останніх років, виконані з урахуванням сучасних вимог доказової медицини, показали,

що хондропротектори здатні впливати на перебіг захворювання, та мають, так звану, модифікуючу дію [150].

До препаратів класу сповільненої дії, що структурно модифікують хрящ, в першу чергу відносяться структурні аналоги хрящової тканини: ХС, глюкозамінсульфат (ГАС), препарати ГК, діациреїн, комплексні та комбіновані препарати [151]. Сучасні хондропротектори включають в себе біопрепарати, які містять структурні елементи натуральної хрящової тканини і використовуються для оновлення та побудови внутрішньосуглобової рідини і хряща. Сировиною для них є продукти тваринного (морські безхребетні, деякі види лососевих риб та ін.) і рослинного походження (виділені компоненти деяких видів бобів, сої та авокадо) [152].

В даний час хондропротектори є найбільш поширеними фармакологічними засобами у лікуванні хворих на ОА. Препарати цієї групи здатні не тільки знижувати основні клінічні прояви ОА, але й чинять патогенетичний вплив на його перебіг, перешкоджаючи деструкції тканин суглобового хряща та сприяють їх регенерації [153].

На сьогодні, незважаючи на існування великої кількості паралельних міжнародних принципів і рекомендацій на основі доказів експериментальних і клінічних досліджень щодо корекції ОА, відсутня згода щодо різних способів лікування запальних захворювань суглобів. Найбільш вираженою залишається відсутність єдності фахівців щодо застосування симптоматичних препаратів повільної дії за ОА. Розбіжності між такими настановами в основному пов'язані з неоднотайністю залучених експертних груп, географічними відмінностями, доступністю фармакотерапії та неоднорідністю проведених досліджень [154]. Відмінності в лікувальних ефектах можна пояснити відмінностями в якості сполук, відповідно до торгових марок. Ці відмінності в якості призводять до різної терапевтичної активності препаратів ХС. Встановлено, що препарати ХС фармацевтичного класу, які мають високу та стандартизовану чистоту й властивості, на відміну від нутрецивтичних продуктів, виявляють менше варіацій клінічних ефектів.

Саме тому ESCEO рекомендує лише запатентовані фармацевтичні препарати кристалічних ХС і ГК для забезпечення клінічної користі, високого ступеня безпеки та переносимості пацієнтам з ОА [154, 155].

Хондропротекторні лікарські засоби використовуються в медичній практиці вже протягом тривалого часу. Найчастіше серед препаратів SYSADOA використовують ХС та ГА, які є природними хондропротекторами, що утворюються в організмі людини, однак, одним із дискусійних є питання всмоктування і біодоступності цих препаратів [156].

ХС – головний компонент екстрацелюлярного матриксу багатьох тканин, включаючи хрящ, суглобову рідину, кістки, шкіру, зв'язки і сухожилля – за хімічною структурою є гідрофільним сульфатованим ГАГ з молекулярною масою від 10000 до 40000 Да [157]. Його молекула складається з довгого нерозгалуженого ланцюга полісахариду з альтернативними одиницями N-ацетилгалактозаміну та глюкуронової кислоти. Більшість залишків N-ацетилгалактозаміну моносульфатовані в 4-му (хондроїтин-4-сульфат) і 6-му (хондроїтин-6-сульфат) положеннях (рис. 1.3). Біохімічна варіабельність будови дозволяє молекулам мати різну молекулярну масу та щільність заряду на своїй поверхні, що визначає властивості ХС. Саме сульфатні та карбоксильні групи ХС мають вирішальне значення у взаємодії агрекану з різноманітними лігандами, а їх висока щільність у агрекані дозволяє поглинати воду та забезпечувати гідратацію тканин, надає еластичності хрящу та сприяє його нормальному функціонуванню. Саме ХС інгібує специфічні ферменти, що руйнують сполучну тканину, чинить протизапальну і знеболювальну дію [149, 158].

Протизапальні ефекти ХС здійснюються на хондральному та синовіальному рівнях [159]. ХС та його дисахариди зменшують ядерну транслокацію NF-κB, ймовірно, пригнічуючи сигнальну регуляцію за участю мітоген активуючої протеїнкінази p38MAPK та N-кінцевої кінази c-Jun. ХС дозозалежно зменшує гіпоксію клітин, яка може бути зумовлена окисним

стресом, та інгібує апоптоз хондроцитів, як одну з причин зменшення секреції компонентів матриксу, на генетичному рівні [139].

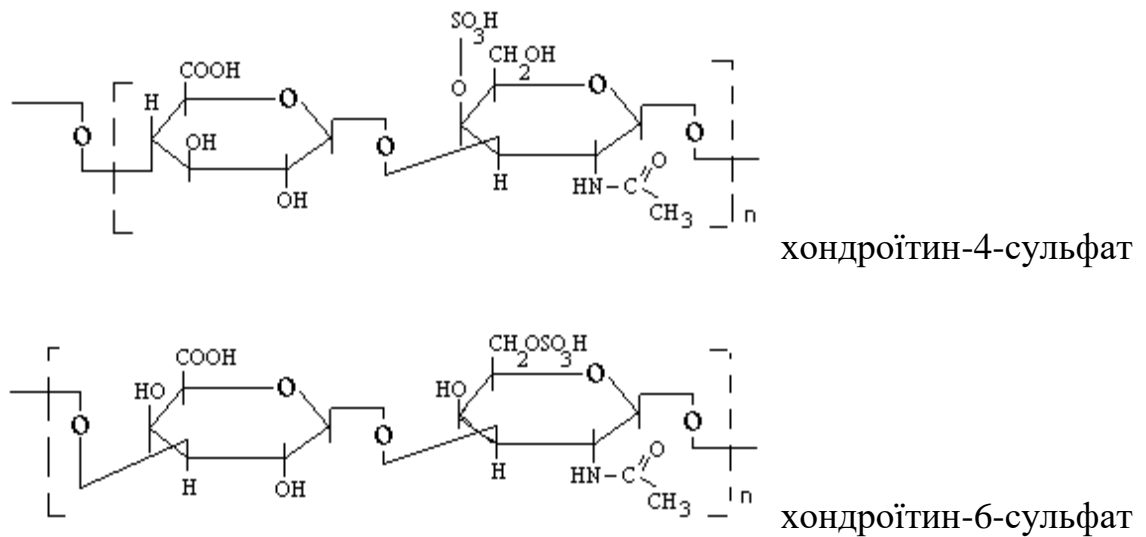


Рис. 1.3 Полімерні сульфатовані глюкозамінглікани: хондроїтин-4-сульфат та хондроїтин-6-сульфат [160]

Структурно-модифікуючий ефект препарату обумовлений підвищенням синтезу ендогенної ГК, збільшенням в'язкості синовіальної рідини, стимуляцією синтезу ПГ, пригніченням активності ЦОГ та ММП, гальмуванням апоптозу та процесів вільнорадикального окиснення [161].

Встановлено важливі ланки механізму дії ХС, а саме [162]:

- запобігання апоптозу хондроцитів через пригнічення активності p38MAPK, яка регулює експресію прозапальних цитокінів та є ключовою ланкою в запальних сигнальних каскадах;
- підвищення синтезу ПГ і зниження синтезу ПГЕ₂;
- інгібування ММП, зокрема колагенази та стромелізину, та модуляція протеолітичної активності;
- протизапальний вплив шляхом інгібування різноманітних запальних медіаторів: ІЛ-1β, NF-κB, ІЛ-6, ІЛ-8, і ММП, пригнічення активності iNOS, ЦОГ-2, зниження вмісту ПГЕ₂;

- антиоксидантна дія (зменшення пероксидації ліпідів, фрагментації ДНК, окиснення білків, гідроксильних радикалів кисню і супероксидних аніонів);
- структурно-модифікуюча дія на субхондральну кістку за участю шляхів регуляції остеопротегерину/RANKL в остеобластах.

Таким чином, ХС є сигнальною молекулою для хондроцитів та інших клітин суглобових тканин, яка зв'язується з мембранними рецепторами, регулює біосинтетичну функцію тканин та підтримує гомеостаз. В умовах вираженого запалення ХС здатен модулювати гіперактивність хондроцитів, конкуруючи з ендогенними субстратами за одні центри зв'язування клітинних рецепторів (протизапальна та антиапоптична дія) [163].

У терапії ОА досить широко використовують глюкозамін (ГА), який на відміну від ХС є невеликою компактною молекулою з молекулярною масою 179 Да. Даний амінополісахарид майже не перебуває у вільній формі, при потраплянні до організму він включається до складу глікопротеїнів печінки, частково перетворюючись на глікоген. ГА, як попередник, необхідний для синтезу багатьох ГАГ: ХС, ГК, гепарин сульфату, КС, а також він входить до складу клітинної мембрани. ГА підвищує проникність суглобової капсули, відновлює ферментативні процеси у клітинах синовіальної оболонки та суглобового хряща. Він сприяє фіксації сірки під час синтезу хондроїтину сірчаної кислоти та нормальному відкладенню Ca^{2+} у кістковій тканині, поліпшує стан сполучної тканини, збільшуючи її міцність та еластичність, сприяє оптимізації кровопостачання, відновлює функції суглобів [164].

У медичній практиці ГА застосовують у вигляді двох солей – глюкозаміну гідрохлориду (ГАХ) або ГАС. Солі ГА легко всмоктуються і долають гематоцелюлярний бар'єр. При застосуванні внутрішньо ГА виявляє достатню біодоступність та тропність до суглобового хряща [165]. Фармакокінетичними дослідженнями було виявлено, що рівноважна концентрація і ступінь біодоступності ГА вище після прийому ГАС при порівнянні з ГАХ [136]. Невеликий розмір молекул ГАС дозволяє йому

вбудовуватися у хрящову тканину та стимулювати синтез ПГ і ГК у синовіальній рідині. Так, суглобовим хрящем абсорбується близько 30% ГАС [139]. Встановлено, що застосування ГАС дозволяє зменшити використання НПЗП або знизити дози останніх на 36% [166].

ГА може виявляти протизапальні властивості, що реалізуються шляхом пригнічення активності процесів вільно-радикального окиснення й зменшення утворення супероксидних радикалів, зниження активності лізосомальних ензимів, що руйнують сполучну тканину при ОА, ІЛ-1-стимульованої генної експресії ЦОГ-2, пригнічення синтезу NO, прозапальних цитокінів, ММП і протеїнази С [167].

Одним з головних компонентів матриксу, що також входять до складу сполучної, епітеліальної і нервової тканин, є ГК – полісахарид групи нессульфурованих ГАГ, що являє собою повторення дисахаридних з'єднань N-ацетилглюкозаміну та глюкуронової кислоти. Особливо висока концентрація ГК виявляється у синовіальній рідині (відповідає за її в'язкість та еластичність) та суглобовому хрящі (відповідає за пружність хряща і стійкість до компресії) [161]. У синовіальній рідині ГК виконує роль лібриканта, а при досить високій концентрації в суглобовій порожнині здатна зменшувати прояви вторинного синовіїту за рахунок адсорбції на своїх великих молекулах ряду медіаторів запалення [152]. Доведено, що вона може взаємодіяти з клітинним рецепторами CD-44, S-CAM, RHAMM та здійснювати модулюючий вплив на запальні медіатори у синовіальній рідині, пригнічує активність ферментів, що руйнують суглобовий хрящ [168]. Введення ГК стимулює утворення її ендогенної форми та синтез компонентів хрящового матриксу, зменшує втрату ПГ та знижує апоптоз хондроцитів [169].

Незважаючи на високу хондропротекторну активність похідних ГА і ХС, а також безумовну патогенетичну обґрунтованість їх застосування в терапії ОА, слід відзначити недостатню ефективність препаратів цієї групи за протизапальною та анальгетичною дією, що дещо обмежує можливості їх

застосування у хворих з ОА [170]. У зв'язку з цим, науковий пошук у галузі розробки нових хондропротекторів спрямований на створення комбінованих препаратів. У сучасній клінічній практиці надається перевага препаратам третього покоління, використання яких дозволяє, з одного боку, досягти адитивного ефекту в лікуванні, а з іншого – підвищити комплаєнс лікування, оскільки комбінований препарат чинить вплив на декілька патогенетичних ланок деструктивно-дистрофічного ураження хрящових тканин за різними механізмами дії [171].

Експериментальні дослідження показали більш високу ефективність комбінованих препаратів у порівнянні з монопрепаратами ХС та ГА [172]. Доцільність комбінації препаратів пояснюється їх синергетичними властивостями та можливістю потенціювання позитивного ефекту кожного з них, що пов'язано з особливостями фармакологічної дії ГА і ХС [139]. При застосуванні комбінованих препаратів продукція ГАГ хондроцитами збільшується на 96,6% порівняно з 32% при монотерапії. Також доведено, що хондроїтин і глюкозамін мають позитивний вплив на метаболізм хондроцитів і синовіоцитів, збільшують продукцію колагену II типу і синтез ПГ хондроцитами, та здатні пригнічувати синтез прозапальних медіаторів і протеаз, унаслідок чого знижується ризик апоптозу, а також покращується баланс анаболічних та катаболічних процесів у позаклітинному матриксі хряща [173].

1.4.2 Перспективи застосування препаратів коригувального впливу на мікробіоту за остеоартритом

Одним із механізмів впливу мікроорганізмів ШКТ на перебіг захворювань ОРА може бути зміна метаболізму різних лікарських засобів під впливом останніх. Дані, наведені в дослідженнях [174], показали, що деградація хондроїтину в кишечнику залежить, з одного боку, від співвідношення мікроорганізмів, які секретують сульфатазу, та

сульфатредуючих бактерій, з іншого – їх антагоніста – *Akkermansia muciniphila*. Обидві ці групи мікроорганізмів конкурують за субстрат, що містить сульфгидрильні групи, в даному випадку – хондроїтин. Тому препарат ефективний тільки в присутності *A.muciniphila*, що захищає ХС від розпаду [174]. Визначено значну роль кишкових *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides ovatus* та *Clostridium hathewayi* в деградації ХС у здорових людей [175].

Важливим є те, що при лікуванні ОА НПЗП, незалежно від того, чи це селективні чи неселективні лікарські засоби, є великий ризик виникнення побічних ефектів, зокрема НПЗП-асоційованих уражень ШКТ. Добре відомий потенціуючий вплив *Helicobacter pylori* на розвиток НПЗП/аспірин-асоційованої гастропатії [176]. Варто зазначити, що відбувається посилення пошкоджуючого впливу НПЗП на слизову оболонку тонкої кишки, як наслідок стимуляції глюкокортикоїдних рецепторів, в умовах стресу, що призводить до зміни кишкової проникності та збільшення вмісту грамнегативної мікробіоти [177].

Оскільки існує взаємозв'язок між мікробіотою ШКТ та запальними захворюваннями, вивчення впливу препаратів із хондропротекторними властивостями, які широко застосовуються в комплексному лікуванні ОА, на стан мікробіоти кишечника, є перспективним напрямком сучасних наукових досліджень, що дозволить більш глибоко зрозуміти принципи системного функціонування та метаболічних порушень при супутніх патологічних станах, та сприятиме пошуку нових ефективних методів лікування та профілактики захворювань суглобів різного генезу.

Відомо, що ГА і ХС чинять протизапальний, знеболювальний, антиапоптотичний, структурно-модифікуючий ефекти на суглобовий хрящ та кістку [167, 178]. Проте, лише 10-12% молекул ГА та 5-15% ХС абсорбується з ШКТ та метаболізується кишковою мікробіотою [178]. Слід зазначити, що хондроїтину сульфат і глюкозамін, які мають хондропротекторні властивості, можуть впливати на зміни у мікробіомі. Існує припущення [16], що позитивні

результати клінічних досліджень з використанням ГА та ХС у лікуванні ОА можуть бути обумовлені їх пребіотичними властивостями та впливом на мікробіоту кишечника. Оскільки ГА і ХС використовуються бактеріями кишечника, їх терапевтичний вплив може реалізовуватися через мікробіоту [174, 175]. Наприклад, ГА і хондроїтин є субстратами для відновлення сульфатовідновних бактерій, які беруть участь у синтезі протизапальних сполук [179]. Також ГА і ХС входять до складу кишкового муцину, який виконує бар'єрну функцію, та, можливо, забезпечують проникність кишкового епітелію, зв'язок з мікробіотою, мукозний імунітет [180].

Останнім часом з'являється дедалі більше доказів, що ГА і ХС позитивно впливають на стан мікробіоти ШКТ. У експериментальних дослідженнях, проведених на людях, показано збільшення відносної чисельності роду *Bacteroides*, представники якого є найпоширенішими в мікробіомі на тлі прийому цих хондропротекторних препаратів [175]. Дослідження впливу ГА на якісний і кількісний стан мікробіоти кишечника не виявило суттєвих відмінностей у загальному різноманітті мікробіоти після прийому вказаної сполуки, проте встановлено зменшення кількісного складу мікроорганізмів, що належать до родів *Staphylococcus*, *Enterococcus* і *Clostridium* [178].

Отже, хондропротектори при пероральному використанні можуть чинити сприятливі ефекти на стан суглобів та сповільнювати прогресування патологічних змін при розвитку захворювання, зокрема шляхом модуляції мікробіоти кишечника [1].

Порушення стану мікробіома спостерігається при розвитку багатьох захворювань організму, в тому числі, й при патологіях опорно-рухової системи [1]. Тому питанню збереження повноцінного мікробіому сьогодні приділяється все більше уваги. Зокрема, застосовуються методи відновлення мікробіому за допомогою препаратів, які використовуються для оптимізації стану кишкового мікробіоценозу, серед яких виділяють пребіотики,

пробіотики, синбіотики, препарати на основі інактивованих мікроорганізмів, продукти функціонального харчування, нутрицевтики [181, 182].

ПБ – це препарати на основі живих мікроорганізмів та речовин мікробного походження, які зумовлюють позитивний ефект на всі системи організму, за рахунок оптимізації та стабілізації його мікробіоти [183]. На ринку України присутні понад 50 пробіотичних препаратів. У сучасній клінічній практиці пробіотики широко використовуються для профілактики та лікування значної кількості патологій, серед яких інфекційні захворювання, алергічні, запальні захворювання ШКТ, та ін. Доцільність включення цих унікальних за своїми властивостями препаратів у стандартні терапевтичні схеми зумовлена їх гастропротекторною, протизапальною, антиапоптичною, вазодилататорною та імуномодулюючою дією [184].

Широкий спектр антагоністичної активності щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів забезпечує переваги пробіотиків, які на відміну від антимікробних препаратів, не викликають утворення стійких до них форм бактерій [185], та стимулюють вироблення антитіл і неспецифічних факторів імунного захисту [186]. Також пробіотики здатні знижувати проникність тканинних бар'єрів для токсинів, забезпечувати детоксикацію сполук, які утворюються в організмі в результаті дії патогенів [185]. Продукуючи біологічні речовини, вони сприяють виробленню організмом медіаторів, які мають позитивний вплив на функції ШКТ, печінки, серцево-судинної системи, метаболічні процеси в організмі господаря, беруть участь у синтезі вітамінів [187]. Відомо, що використання пробіотиків на основі молочно-кислих бактерій, індукує продукцію γ -інтерферонів. Лактобактерії також впливають на імунний статус організму, підвищуючи рівень його неспецифічної резистентності, та посилюючи клітинний і гуморальний імунітет [188].

В багаточисельних експериментальних та клінічних дослідженнях доведено, що використання штамів біфідо- та лактобактерій призводить до відновлення мікробіоценозу кишечника при дисбіозах різної етіології. Разом

з тим, існує достатньо свідчень про пробіотичні властивості мккроорганізмів родів *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Leuconostoc*, *Aerococcus*, *Lactobacillus*, а також *E.coli* та дріжджів – *Saccharomyces boulardii* та *Saccharomyces cerevisiae*, які є представниками резидентної мікробіоти [43].

Сьогодні одним з найбільш перспективних напрямків, який викликає значну зацікавленість вчених усього світу, є розробка багатоштамових симбіотичних композицій – мультипробіотиків. Дані субстанції є резистентні до шлункового соку, травних ферментів, лізоциму, жовчних кислот, вступають в асоціативний зв'язок з епітелієм кишечника, таким чином запобігають його колонізації транзиторною мікробіотою. Висока концентрація в мультипробіотиках бактеріальних екзополісахаридів і живих клітин-продуцентів збільшує їх захисні властивості за рахунок підвищення активності адгезивних і імуномодулюючих властивостей та селективної проліферації лактомікрофлори в товстому кишечнику. Мультипробіотики завдяки значному вмісту ферментів метаболізують білки, жири, вуглеводи, нуклеїнові кислоти, а також розщеплюють окремі харчові й бактеріальні алергени [189].

До таких багатокомпонентних композицій належить Симбітер[®], розроблений вітчизняною науково-виробничою компанією. Він включає від 14 до 24 штамів фізіологічно цінних бактерій, переважно родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* і *Propionibacterium*, яким притаманний широкий спектр пробіотичної активності [10].

Різноманітні механізми дії пробіотиків, ймовірно, визначають їх користь для здоров'я господаря. У деяких випадках, таких як утворення антимікробних продуктів та перехресне живлення з іншими резидентними мікроорганізмами, механізми дії пробіотиків зумовлені безпосередньою взаємодією з резидентною мікробіотою. В інших випадках, таких як пряма взаємодія з імунними клітинами, ефекти пробіотиків можуть бути опосередковані через взаємодію з клітинами господаря. Загалом, клінічні

переваги використання пробіотиків можуть бути результатом дії кількох механізмів (табл 1.2) [190].

Таблиця 1.2

Механізм дії пробіотиків [190]

Модуляція імунної системи	зниження запалення; активація природних кілерних клітин; пригнічення проліферації лімфоцитів; вплив на дозрівання та активацію дендритних клітин (ДК); стимуляція продукції імуноглобуліну (Ig) А; стимуляція фагоцитозу
Взаємодія з мікробіотою кишечника	антимікробна активність; перехресне живлення та субстратна трансформація; збалансована стабільність мікробіоти
Утворення органічних кислот	лактат, пропіонат та ацетат; зниження рН товстого кишечника; підвищення вмісту бутирату
Колонізаційна резистентність	конкурування за поживні речовини з патогенами
Поліпшення бар'єрної функції кишечника	стимуляція утворення слизу; підтримання гомеостазу епітеліальних клітин
Взаємодія господар за участю поверхневих клітинних структур	Асоційовані з поверхневим шаром білки, пілі, білки, що містять локус розпізнавання С-кінцевої сортази (LPХТG), муцин-зв'язуючі білки, ліганди Toll-подібних рецепторів, ліпотейхойова кислота та екзополісахариди
Синтез молекул із системними ефектами	нейромедіатори (кортизол, серотонін і ГАМК); похідні триптофану і гістаміну; гормони насичення; кон'югована лінолева кислота
Синтез ферментів	гідролаза жовчних солей; лактаза

Слід відмітити, що одним із механізмів дії пробіотиків є зміна продукції імунорегуляторних цитокінів, особливо інтерферонів, які залучені у формування клітинної ланки імунітету, а отже, відповідають за розвиток імунної відповіді при інфекційних, запальних та інших патологіях. Інтерферони, яким властива противірусна, імуномодуюча, протизапальна, антибактеріальна та антипроліферативна активність виконують регуляторну функцію у підтриманні гомеостазу організму [191]. Протизапальна дія пробіотиків може бути зумовлена зниженням концентрацію прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β та ІЛ-12В р40) у сироватці крові, яка зростає за умов ушкоджень слизової оболонки шлунка, та підвищення концентрації протизапальних цитокінів ІЛ-4 та ІЛ-10; зниження інтенсивності процесів ПОЛ, яке зростає за умов розвитку запалення у шлунку. Крім того пробіотики запобігають деградації фукопротеїнів сполучної тканини слизово-епітеліального бар'єру шлунка та ефективно захищають слизову оболонку шлунка від деградації ГАГ [192].

Незважаючи на те, що в патогенезі захворювань ОРА залучено значну кількість факторів, автори сучасних наукових досліджень показують, що стан мікробіому кишечника є важливим патогенним чинником у порушенні кісткового гомеостазу, та передбачають його роль на початкових етапах та під час прогресування ОА [1]. Цілком закономірно, що отримані дані про взаємозв'язок дисбіозу ШКТ та виникнення ОА можуть бути підставою для застосування різних методів корекції мікробіоти з метою лікування патології суглобів. Опубліковано результати наукових робіт, які присвячені терапії ОА колінних суглобів за допомогою пробіотика [192]. Одним із перших досліджень було застосування у 2013 році для лікування ОА екстракту новозеландської зеленої мідії, який мав пребіотичну активність. Було показано, що через 12 тижнів лікування спостерігалось збільшення вмісту *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* та зменшення кількості дріжджових грибів. При цьому відзначалося вірогідне поліпшення симптоматики ОА, підтвержене зниженням показників за шкалою

WOMAC [193]. При застосуванні *Lactobacillus casei* протягом 6 місяців відзначалося вірогідне зменшення вираженості симптоматики ОА за шкалою WOMAC та візуальною аналоговою шкалою, що супроводжувалося вірогідним зниженням рівня С-реактивного білку, як маркера мікрозапалення [192]. Також встановлено, що за умов експериментального артриту, застосування *Lactobacillus casei* та *Lactobacillus acidophilus* супроводжувалося зменшенням набряку колінного суглоба, інфільтрації лімфоцитів синовіальної оболонки та деструкції хрящової тканини [194], зниженням концентрації прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-12, ІЛ-17, ІФН- γ , ФНП- α і ЦОГ-2) на фоні зростання вмісту протизапальних цитокінів ІЛ-10 і ІЛ-4, а також мало антиоксидантний та імуномодуючий ефекти [195].

У дослідженнях [196] показано, що застосування штамів *Lactobacillus* у мишей після оваріектомії призводило до збільшення вмісту мінеральних речовин у кістках та експресії остеопротегерину – фактора інгібування остеокластогенезу, та пригнічення синтезу запальних цитокінів ФНП- α і ІЛ-1 β .

Незважаючи на те, що мікробіота ШКТ чинить регуляторний вплив на кістковий метаболізм, особливості його регуляції та механізми дії пробіотиків, які сприяють поліпшенню стану здоров'я, досі не встановлено. Однак, припускають, що регуляція кісткового гомеостазу відбувається за участю імунної системи, ендокринної системи та кальцієвого обміну [197].

За відсутності захворювань вплив мікроорганізмів на імунну систему обмежується фізичним бар'єром, яким є кишковий епітелій та слиз, а також імунні реакції контролюються через толерогенність мікросередовища слизової оболонки, яка включає дендритні клітини, макрофаги, та високий рівень медіаторів запалення. У підтримці функції кишкового бар'єра також відіграють важливу роль клітини Панета, які продукують антимікробні пептиди та секреторний ІgА (sIgA), який зв'язує і нейтралізує токсини та патогени в просвіті кишечника. Застосування пробіотиків посилює

стимуляцію утворення sIgA [198].

Активация імунної системи за участю мікробіоти відбувається завдяки синтезу молекул з імуномодулюючими та протизапальними властивостями, які здатні стимулювати імунні клітини. Ці імуномодулюючі ефекти зумовлені взаємодією пробіотичних бактерій з дендритними клітинами, моноцитами, лімфоцитами та макрофагами [199]. Імунні клітини через трансмембранні патерн-розпізнавальні TLR, здатні розпізнавати певні молекулярні структури мікроорганізмів. Наприклад, TLR-4 зв'язує ЛПС – складову грамнегативних бактерій, TLR-2 розпізнають ліпотейхоеві кислоти та ліпопротеїни бактеріальних клітинних стінок. Їх зв'язування призводить до активації шляхів сигнальної трансдукції за участю ядерного фактора NF-κB та прозапальної реакції [200].

Слід зазначити, що зміни у складі мікробіоти можуть призводити до збільшення транслокації, асоційованих з мікробними організмами, молекулярних патернів через ендотелій кишечника в системний кровообіг та запускати прозапальні сигнальні ланки шляхом стимуляції імунних рецепторів в резидентних імунних клітинах кісток, хрящів та синовіальної оболонки. Існує гіпотеза, що бактеріальні антигени первинних кишкових Т-клітин і макрофагів переміщуються до суглобів, можливо, через аберантну експресію адгезивних молекул, аномальну неоваскуляризацію або локальні фактори всередині синовію. Лейкоцити кишечника мають здатність взаємодіяти з синовіальними судинами і потрапляти до суглоба. У суглобових лімфоцитах може бути повторно активоване перехресне реагування з самопептидами [201].

Пробіотики знижують рівень експресії TLR, секрецію метаболітів, які можуть інгібувати потрапляння ФНП-α в мононуклеарні клітини крові, та інгібують внутрішньоклітинний сигнальний шлях NF-κB в ентероцитах, тим самим пригнічують запальний процес у кишечнику [189].

Вирішальне значення в протидії запальним реакціям у відповідь на коменсальні бактерії відіграють Т-регуляторні клітини (Tregs) кишечника.

Tregs пригнічують запалення шляхом синтезу ІЛ-10, перетворення тромбоцитарного фактора росту- β та експресії цитотоксичного Т-лімфоцитарного антигену-4 (CTLA-4). Вони також індуюють В-клітини до продукування ІgА-антитіл проти коменсальних мікроорганізмів [202].

Використання структурно-модифікуючих препаратів у лікуванні патології суглобів має кумулятивний ефект, однак, не має тривалої дії. Тому є зацікавленість в синергетичному ефекті хондропротекторів і пробіотиків та ефективності їх спільного використання при лікуванні ОА (рис.1.4).

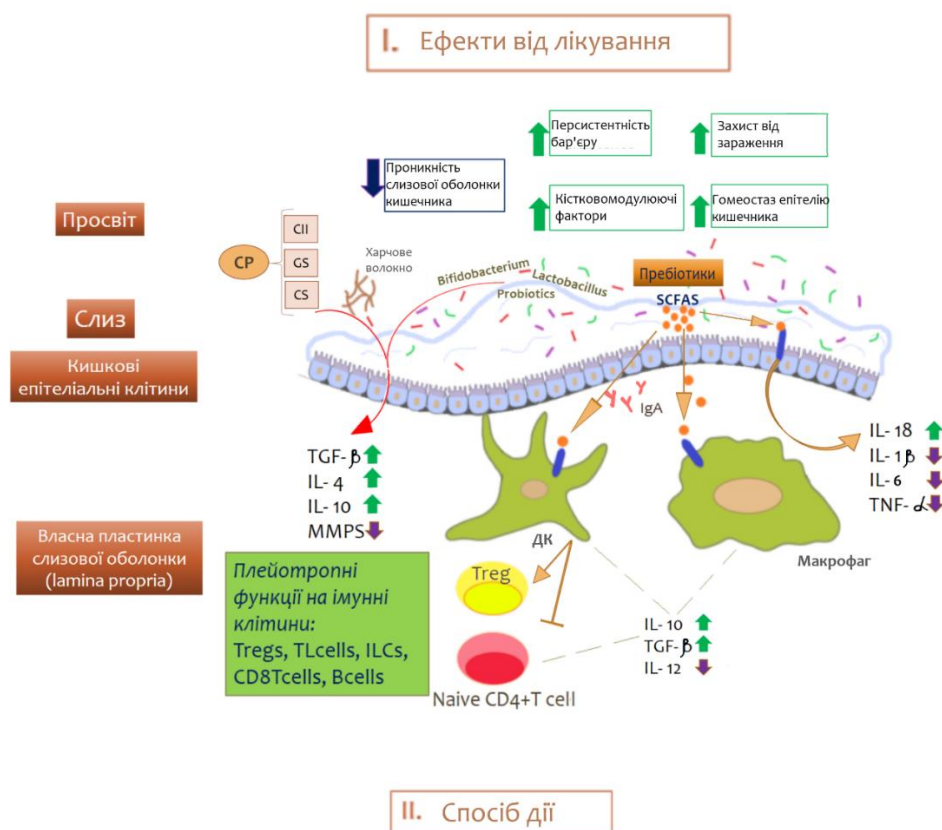


Рис. 1.4 Біологічні механізми впливу пробіотиків (пребіотиків) та хондропротекторів на розвиток запалення при захворюваннях опорно-рухового апарату [203]

Існує ряд досліджень, у яких показано переваги такого лікування. В експериментах на тваринах встановлено, що застосування *Lactobacillus casei* разом з колагеном II типу та глюкозаміном у щурів з артритом

демонструвало їх синергетичну дію, відбувалось значне інгібування експресії прозапальних цитокінів та ММП, зменшувались інфільтрація лімфоцитів та руйнування хряща [204, 205]. Також виявлено, що комбіноване введення ХС та ПБ за експериментального ОА не лише усуває дисбіотичні зміни в товстій кишці, а й зменшує виражені дегенеративно-дистрофічні зміни у хрящовій тканині колінного суглоба, зменшує локальне та системне запалення, пригнічує процеси вільнорадикального окиснення, активує систему антиоксидантного захисту. На основі доведеної експериментальної ефективності запропоновано методичні рекомендації комбінованої дії ХС та ПБ для корекції патології суглобів [22].

Таким чином, не дивлячись на різноманітність лікарських препаратів в арсеналі сучасної медицини, які мають модифікуючий вплив на структурні елементи суглоба при ОА та дозволяють дещо поліпшити стан хворих, залишаються суперечливими питання щодо їх впливу на ремоделювання хряща, ефективність їх клінічного застосування, розвиток побічних реакцій, що вимагає подальших досліджень. Існують обґрунтовані дані про перспективність комбінованого застосування хондропротекторів та пробіотиків у комплексному лікуванні та профілактиці захворювань суглобів, однак, сьогодні не достатньо проведено досліджень щодо особливостей функціонування мікробіому, та достатньо не вивчено вплив застосування різних лікарських засобів, у першу чергу НПЗП, хондромодифікуючих, пробіотичних препаратів на склад мікробіоти травної системи та біохімічні зміни в організмі за умов ОА. Тому актуальним є дослідження біологічної дії пробіотиків на організм та їх спільне використання з хондромодифікуючими засобами при патології суглобів, що сприятиме не лише глибшому розумінню фундаментальних основ патогенезу захворювань ОРА, а й розробці нових ефективних схем їх профілактики та лікування.

Результати, викладені у розділі, опубліковано у наступних роботах: [22, 203].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Використані реактиви та матеріали

У роботі використано наступні реактиви: фізіологічний розчин, 1-хлор-2,4-динітробензол, гептан, гідрофосфат натрію однозаміщений, гідрофосфат натрію двозаміщений, гідрофосфат калію одно заміщений, етиловий спирт, хлороформ, ізопропіловий спирт, β -меркаптоетанол, карбонат натрію, гідрокарбонат натрію, гідроксид натрію, гідрохлоридна кислота, сульфатна кислота, метанол, 2-хлоро-4-нітрофеніл- α -галактозилмальтозид, молібдат амонію, ортофталевий альдегід, 2,4-динітрофенілгідразин, пероксид водню, пропіловий спирт, реактив Фоліна, сіль Мора, сульфат міді, трихлороцтова кислота, мурашина кислота, нітросиній тетразолій, феназинметасульфат, формальдегід, хлорид натрію, хлорид калію, хлорид кальцію, цитрат натрію, сульфат амонію, сульфат феруму, діацетилмонооксим, ацетат кальцію, ацетат натрію, фенолфталеїн, борна кислота, парафін, еозин, гематоксилін, гліцилгліцин, п-нітроанілін, оцтова кислота, γ -L-глутаміл-4-нітроанілід, перхлорат амонію, етилацетат, диметил сульфоксид, гліцерол, бромфеноловий синій, фенол вітчизняного виробництва, кваліфікації х.ч. та о.х.ч.; глутатіон окиснений, глутатіон відновлений, телячий сироватковий альбумін, ксантин, ХТТ (2,3-біс-(2-метокси-4-нітро-5-сульфофеніл)-2Н-тетразолій-5-карбоксанілід), сорбітол, бутил гідрокситолуол, ксиленол оранж, додецилсульфат натрію, тіобарбітурова кислота, L-цистеїну гідрохлорид, L-аргінін, ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота), ауротіомалат натрію, проназа *S. griseus*, 1-дезоксид,1-морфолінофруктоза, моноіодацетат натрію, азид натрію, 10% забуферений розчин формаліну («Sigma-Aldrich Co. LLC», США); БАЕЕ (бензоіл-аргінін етиловий ефір) («Fluka AG», Швейцарія), трис-амінометан, трис-НСl,

НАДН (нікотинамідаденіндинуклеотид), НАДФН (відновлений нікотинамідаденіндинуклеотид фосфат), НЕРЕС, ДТНБК (5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойна кислота) гуанідин ізотіоціанат («Merck», Німеччина); середовище Ендо, цитратний агар Сіммонса, 5% агар крові, сольовий агар з маннітом (MSA), залізо-сульфітний агар, агар для культивування *Bifidobacterium*, MRS агар для культивування *Lactobacillus* («HiMediaLaboratoriesPvt.Ltd.», Індія); агароза LE («Gibco», Німеччина); етидіум бромід, барвник кумасі синій G250 («AppliChem», Німеччина); хлорид магнію, дНТФ (дезоксинуклеозидтрифосфат), RiboLock, Taq ДНК-полімераза, RevertAid M-MLV зворотна транскриптаза («Fermentas», Литва). Інші реактиви виробництва «Хімлаборреактив», Україна.

Комерційні набори для визначення ФНП- α , ІФН- γ , ІЛ-1 β , ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10, ІФР-1, ТФР- β , ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8 («Biotrak ELISA System», GE Healthcare, США); комерційний набір для визначення простагландину E2 («R&D Systems», США); комерційні набори ELISA для визначення COMP, ACAN, CHI3L1, CTSK, TLR2 та TLR4 («Novus Biologicals», «R&D System», «Biotrak ELISA System», Healthcare, США; «Abcam», Великобританія); комерційні набори для імуногістохімічного фарбування (Waltham, MA, США); набір для ПЛР «Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix» («Thermo Scientific», Литва).

Препарат «Драстоп®» виробництва «World Medicine Limited», Великобританія. 1 мл препарату містить: активну речовину – натрію хондроїтину сульфат (ХС) – 100 мг; допоміжні речовини – бензиловий спирт – 12 мг, 1% розчин натрію гідроксиду або 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти – до рН 6,5 – 6,8, вода для ін'єкцій – до 1 мл.

Мультипробіотик «Симбітер®» ацидофільний концентрований розроблений науково-виробничою компанією «О.Д. Пролісок», Україна (висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи

№5.03.03.-04/37/92 від 08.09.2003 р.). Мультипробіотик містить біомасу живих клітин симбіозу 17 штамів фізіологічних для травного тракту ссавців мікроорганізмів, що належать до родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* і *Acetobacter*. Штамовий склад мультипробіотика «Симбітер®»: *Bifidobacterium bifidum* IMV B-7113; *Bifidobacterium bifidum* АСІМ В-5799; *Bifidobacterium longum* АСІМ В-4557, 4635; *Lactobacillus acidophilus* АСІМ В-5254, В-5863; *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* АСІМ В-3963, В-5810; *Lactobacillus helveticus* IMV B-7115; *Acetobacter aceti* АСІМ В-5495; *Lactococcus lacti ssp. diacetylactis* АСІМ В-4303; *Propionibacterium freudenreichii ssp. schermanii* АСІМ В-4544; *Propionibacterium acidipropionici* АСІМ В-5800; *Lactococcus lactis ssp. lactis* АСІМ В-4305, АСІМ В-5387; *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* АСІМ В-4304, АСІМ В-4741. Мультипробіотик «Симбітер®» містить в одній дозі (10 мл) не менше 10^{12} живих клітин пробіотичних бактерій.

2.2 Прилади та обладнання

У роботі використано наступні матеріали та обладнання: дозатори лабораторні змінного об'єму («ThermoFisher Scientific», США), шприці інсулінові, катетер м'який («Medicare», Великобританія), пластиковий та скляний лабораторний посуд (планшети для ІФА, планшети з несорбуючою поверхнею, епендорфи, пробірки, циліндри, колби та інше), що відповідає міжнародному стандарту ISO 9001, наданий вітчизняними постачальниками («Хімлаборреактив», «Манкор», «Альфарус», Україна), дистилятор ДЕ-4-2 («Медтехніка», Україна), водяна баня лабораторна WNB 7 («Mettmert», Німеччина), термостат електричний сухоповітряний ТС-80М-2 («MicroMed», Україна), рН-метр PH 510 («Eutech Instruments», Сінгапур), електронні ваги лабораторні Scout Pro («OHAUS», США), міні-центрифуга/вортекс «Микроспин FV-2400» («СпектроЛаб», Україна),

центрифуга з охолодженням 3-16PK («Sigma», Франція), центрифуга «ОПН-3У4.2» («ЛаборКомплет», СРСР), спектрофотометр SmartSpec Plus («BioRad», США), мікропланшетний рідер «Synergy HT» («BioTeck», США), аналізатор «Multiscan» («Thermo Scientific», США), ротаційний мікромом «Мікром» (Харків, Україна), світловий мікроскоп «Olympus» ВХ-41 («Olympus Corp.», Японія), мікроскоп Ахіоскор 40 з фотокамерою AxioCam MRc5 («CarlZeiss», Німеччина).

Усі прилади та обладнання, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

2.3 Умови проведення експерименту

Дослідження проведено на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180-240 г розведення віварію ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Всі маніпуляції з тваринами проведено відповідно до положень Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» №3447-IV від 21.02.2006, Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001) та у відповідності з етичними нормами і правилами роботи з лабораторними тваринами (Керівництво по догляду та використанні лабораторних тварин, National Academy Press, Washington DC, 1996). Результати роботи було схвалено комісією з питань біоетики ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, висновок комісії протокол № 1 від 14 січня 2020 року.

Тварини отримували стандартний корм для гризунів («Vita», Україна) та дехлоровану водопровідну воду. Усіх тварин розподілено на вісім експериментальних груп по 14 у кожній за наступною схемою (рис. 2.1).

Тваринам I контрольної групи (Контроль) в перший день вводили до колінної зв'язки 0,05 мл 0,9% розчину натрію хлориду та щоденно протягом 14 діб з 8-ої по 22-гу добу перорально 1 мл води; з 2-го дня щоденно протягом 28 діб внутрішньом'язево вводили фізіологічний розчин. Щурам II групи (ХС) з 2-го дня щоденно протягом 28 діб внутрішньом'язево вводили в дозі 3 мг/кг, препарат «Драстоп» («World Medicine», Велика Британія), основною діючою складовою якого є ХС. Вибору дози передували дослідження підгострої токсичності препарату «Драстоп» [206, 207]. Щурам III групи (ПБ) протягом 14 діб з 8-ої по 21-шу добу експерименту перорально вводили розведений в питній воді в дозі 140 мг/кг мультипробіотик (ПБ) «Симбітер® ацидофільний концентрований» («Пролісок», Україна). Тваринам IV групи (ХС+ПБ) з 2-го дня щоденно протягом 28 діб внутрішньом'язево вводили ХС в дозі 3 мг/кг та щоденно протягом 14 діб з 8-ої по 22-гу добу експерименту перорально вводили ПБ в дозі 140 мг/кг. У тварин V групи (ОА) змодельовано експериментальний остеоартрит: однократно в перший день досліджень введено у колінний суглоб (в інфрапателлярний лігамент) правої задньої кінцівки 1 мг монойодацетату натрію (МІА) («Sigma», Франція), розчиненого у 0,05 мл 0,9% розчину натрію хлориду [208]; щоденно протягом 28 діб з 2-ої доби внутрішньом'язево вводили фізіологічний розчин та щоденно протягом 14 діб з 8-ої по 22-гу добу вводили перорально питну воду. Тваринам I-IV груп (окреме та комбіноване введення ХС і ПБ) замість МІА одноразово інфрапателлярно вводили рівний об'єм 0,9% розчину NaCl. Тваринам VI групи (ОА+ХС) вводили в перший день експерименту в колінну зв'язку 1 мг МІА, який розчиняли в 0,05 мл 0,9% NaCl, та щоденно протягом 28 діб з 2-ої доби внутрішньом'язево вводили ХС в дозі 3 мг/кг. Щурам VII групи (ОА+ПБ) вводили в перший день експерименту в колінну зв'язку 1 мг МІА, розчинений в 0,05 мл 0,9% NaCl, та щоденно протягом 14 діб з 8-ої по 22-гу добу перорально ПБ у дозі 140 мг/кг. Тваринам VIII групи (ОА+ХС+ПБ) вводили в перший день експерименту в колінну зв'язку 1 мг МІА, розчинений в 0,05 мл 0,9% NaCl, та щоденно протягом

28 днів з 2-ї доби внутрішньом'язево в дозі 3 мг/кг ХС і протягом 14 днів з 8-ї по 22-гу добу перорально в дозі 140 мг/кг ПБ (рис.2.1).

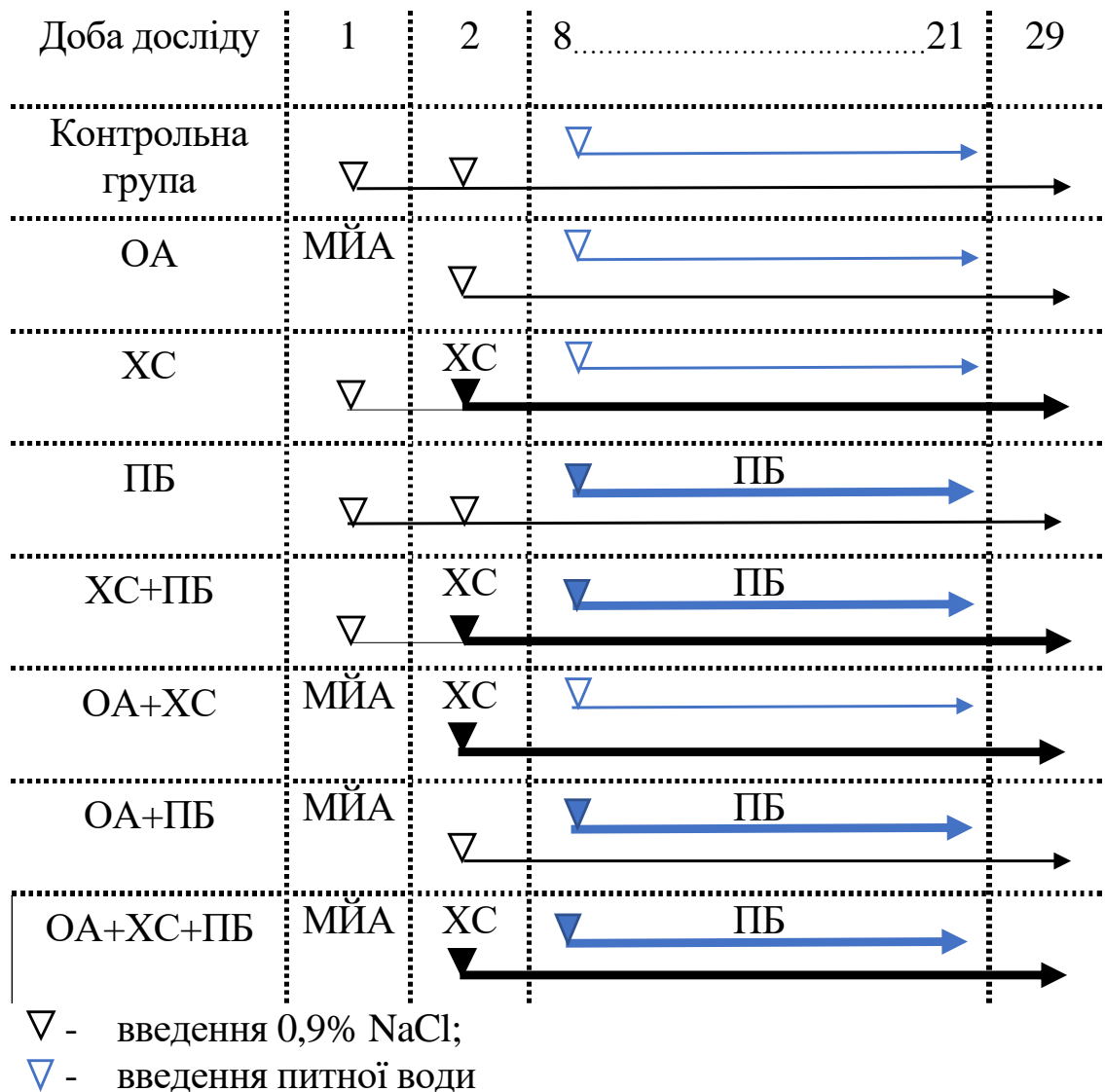


Рис. 2.1 Схема експерименту

Евтаназію тварин проведено на 30 добу після початку експерименту методом декапітації згідно протоколу етичного комітету, після чого для подальших досліджень швидко зроблено забір крові та хрящової тканини колінних суглобів на холоді. Загальна кількість тварин, які були залучені до експериментальних досліджень у чотирьох серіях, становила 448 особин.

2.4 Отримання сироватки крові щурів

Для отримання зразків сироватки крові щурів відібрану одразу після декапітації тварин кров інкубовано в термостаті протягом 30 хв за температури 37°C. Для уникнення гемолізу скляний посуд (пробірки та лійки) попередньо перед використанням ретельно висушено та прогріто в термостаті. Після утворення кров'яного згустка зразки крові центрифугуювано 1000 g за кімнатної температури протягом 15 хв. Сироватку крові (супернатант) обережно відібрано та перенесено в окремі одноразові пластикові мікропробірки (епендорфи) і заморожено для зберігання (за температури -20°C) та використання у подальших дослідженнях.

2.5 Отримання гомогенату хрящової тканини

Ізольовані гіалінові хрящі колінних суглобів щурів, очищено від прилеглих тканин і зв'язок, подрібнено та розм'якшено у фарфоровій ступці. Для отримання гомогенату хрящової тканини використано автоматичний гомогенізатор, з додаванням 0,9% розчину NaCl. Всі процедури проведено при охолодженні до +4°C.

2.6 Дослідження підгострої токсичності хондроїтину сульфату за показниками загального аналізу, лейкоцитарної формули крові та морфо-функціонального стану печінки

Для одержання даних щодо токсичності дії хондропротектора «Драстоп», основною складовою якого є ХС, були проведені дослідження підгострої токсичності за умов обмеженої тривалості його введення, яка складала 14 днів, за показниками загального аналізу, лейкоцитарної формули крові та морфо-функціонального стану печінки [206, 207]. Досліджувані дози визначали виходячи з результатів, отриманих при вивченні гострої

токсичності ХС. Згідно цих результатів, ХС відноситься до класу практично нетоксичних речовин, так як в дозі 1000 мг/кг він не викликав летальних випадків в щурів. Отже, дозу 1000 мг/кг ми вважали максимально переносимою при одноразовому введенні (LD₀). Тому для проведення досліджень підгострої токсичності ми обрали 3 дози хондропротектора «Драстоп», який вводили внутрішньочеревинно: максимально переносима доза при одноразовому введенні (1000 мг/кг), 3/5 LD₀ (600 мг/кг) і 1/5 LD₀ (200 мг/кг). Щурам контрольної групи вводили внутрішньочеревинно 0,2 мл води для ін'єкцій. Забір крові та печінки здійснювали на 15-й день після початку введення ХС. Рівень гемоглобіну в крові визначали за методом Салі, кольоровий показник – розрахунковим методом [209]. Швидкість осідання еритроцитів визначали за методом Панченкова, гематокрит визначали центрифужним методом. Мазки крові забарвлювали за Папенгеймом та в камері Горяєва визначали склад лейкоцитарної формули [210]. Печінку ділили на шматочки розміром 1×1×1 см, які потім фіксували в 10% нейтральному розчині формаліну протягом 1-2 діб, після чого зневоднювали в спиртах із зростаючою концентрацією. Далі отримані зразки заливали в парафін за класичною методикою [211]. З отриманих парафінових блоків на роторному мікротомі виготовляли зрізи товщиною 5-7 мкм, які потім забарвлювали гематоксилін-еозином. Після фарбування отримані гістологічні препарати аналізували під мікроскопом за збільшення ×100 і ×400. Кольорові мікрофотографії були отримані за допомогою цифрової фотокамери Olympus C-500Zoom та мікроскопа Olympus BX-41. Функціональний стан печінки оцінювали за показниками біохімії крові, визначаючи вміст загального білка та альбумінів, холестерину та білірубіну, а також активності аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, гама-глутаміламінотрансферази, лужної фосфатази, використовуючи тест-набори виробництва фірми «Global Scientific» (США) згідно інструкцій виробника.

Зважаючи на те, що доза ХС в наших дослідженнях становила 3 мг/кг,

одержані результати підгострої токсичності «Драстоп» свідчать про високий рівень безпеки даного препарату.

2.7 Визначення видового та кількісного складу фекальної мікробіоти

Кількісний та якісний склад фекальної мікробіоти визначено шляхом висіву відповідних розведень на диференційно-діагностичні середовища (середовище Ендо, цитратний агар Сіммонса, 5% агар крові, сольовий агар з маннітом (MSA), залізо-сульфітний агар, агар для культивування *Bifidobacterium*, MRS агар для культивування *Lactobacillus* («HiMediaLaboratoriesPvt.Ltd.», Індія). Подальшу ідентифікацію виділених мікроорганізмів здійснено за морфологічними, тинкторіальними та фізіолого-метаболическими показниками (коагуляція плазми, ДНКазна активність, продукція лізоциму та фосфатази, чутливість до новобіоцину – для ідентифікації *S. aureus* із зразків *S. saprophyticus*; оксидазний тест, тест на ферментацію вуглеводів, реакція Фогеса-Проскауера, тест на рухливість, тест на утворення сірководню – для визначення лактозо-негативної *E. coli* у зразках умовно-патогенних ентеробактерій) [212].

Результати представлено у вигляді lg КУО/г.

2.8 Гістологічний аналіз зрізів колінних суглобів

Матеріал (хрящі колінних суглобів щурів) фіксовано в 10% розчині нейтрального забуференого формаліну згідно з методикою [213]. Зневоднення зразків проводилося шляхом занурення у розчини етанолу концентрації від 60% до 96%. Для проводки матеріалу після фіксації використовували гістопроектор карусельного типу Leica TP 1020 (Німеччина). Після проводки фіксовану тканину хряща залито у парафін за допомогою станції Leica RM 2125 RT (Німеччина) відповідно до методу

[211]. Виготовлення гістологічних зрізів товщиною 5 мкм зроблено на ротаційному мікромомі «Мікром» (Харків, Україна).

Для фарбування мікропрепаратів зрізів хряща використано метод подвійного фарбування гематоксиліном-еозином [214]. Для цього зріз хряща на предметному склі занурено в ксилол до повного розчинення парафіну, потім переносено на 1 хв до ємності з 96,5% етиловим спиртом. Мікропрепарати просушено та занурено на 5 хв у розчин незакисненого гематоксиліну. Після профарбовування мікропрепарати промито у дистильованій воді та диференційовано в 0,1% розчині гідрохлоридної кислоти. Далі мікропрепарати зрізів хряща занурено на 15 хв у лужну воду та фарбувано в еозині протягом 1 хв. Профарбовані гістологічні зрізи тричі відмито в 96,5% етиловому спирті та висушено. Для просвітлення мікропрепарати занурено на 10 хв у ксилол та заключено в «канадський» бальзам.

Гістологічні дослідження проведено в стандартних умовах. Мікрофотографії препаратів хрящової тканини (збільшення×200) отримано за допомогою мікроскопу Axioskop 40 з фотокамерою AxioCam MRc5 («CarlZeiss», Німеччина). Морфометричні параметри клітин хряща оцінено за допомогою морфометричної програми. Кількість вимірів на кожний параметр – 50.

2.9 Визначення концентрації біохімічних маркерів метаболізму хрящової тканини, простагландину E₂, вмісту матриксних металопротейназ, цитокінів, факторів росту та розчинних форм Toll-подібних рецепторів

Концентрацію біохімічних маркерів метаболізму хрящової тканини (COMP, ACAN, CTSK, CH3L1), простагландину E₂, вміст ММП-1, 2, 3, 8, цитокінів і факторів росту (ІЛ-1β, ФНП-α, ІЛ-6, ІЛ-8, ІНФ-γ, ІЛ-4, ІЛ-10, ТФР-β, ІФР-1), та розчинних форм Toll-подібних

рецепторів (sTLR-2 і sTLR-4) у дослідних зразках визначено методом ІФА з використанням комерційних наборів реактивів Biotrak ELISA System "Healthcare", США; «GE Healthcare: Amersham», Великобританія; Novus Biologicals фірми "R&D System" та «Abcam», Великобританія, згідно з інструкціями виробників.

Концентрацію білків хрящової тканини COMP, ACAN, CTSK, CHI3L1 виражали в нг \times мл⁻¹, вміст ММП виражали в ум. од. \times мг⁻¹ білка, вміст цитокінів та факторів росту виражали в ум. од. \times мг⁻¹ білка, концентрацію простагландину E₂ – в пг \times мл⁻¹, вміст розчинних форм Toll-подібних рецепторів виражали в ум. од. \times мг⁻¹ білка.

2.10 Визначення вмісту супероксидного радикалу

Вміст супероксидного аніон-радикалу в сироватці крові та хрящовій тканині суглоба щурів визначали спектрофотометрично з використанням ХТТ (2,3-біс-(2-метокси-4-нітро-5-сульфофеніл)-2Н-тетразолій-5-карбоксамід) як акцептор електронів [215, 216]. Принцип методу полягає у здатності супероксидних аніонів взаємодіяти із ХТТ, утворюючи розчинний забарвлений комплекс ХТТ-формазану, що має пік поглинання за довжини хвилі 470 нм.

У дослідні проби вносено 0,15 М калій-фосфатний буфер (рН = 7,4), що містив 0,2 мМ НАДН, та досліджуваний зразок (100-200 мкг загального білка). До усіх проб додано по 0,5 мл 10 мМ розчину ХТТ та ретельно перемішано, після чого одразу визначено екстинкцію дослідних проб за довжини хвилі $\lambda=470$ нм. Надалі кожні 10 хв протягом півгодини проведено повторне визначення оптичної щільності дослідних проб та розраховано ΔE . В якості контролю використано проби, що замість зразка містили відповідну кількість буфера. Для підтвердження ролі супероксидних аніон-радикалів в утворенні ХТТ-формазану до кожного зразка додано по 100 U супероксиддисмутази на відповідному буфері.

Вміст ХТТ-формазау у дослідних пробах розраховано за формулою:

$$C = \frac{\Delta E}{\varepsilon \times a}, \quad (2.1)$$

де a – вміст загального білка у пробі, мг; ε - коефіцієнт мілімолярної екстинкції, що становить $2,16 \times 10^4 \text{ см}^{-1} \times \text{M}^{-1}$.

Результат виражено у мкмоль ХТТ-формазау \times мг⁻¹ білка.

2.11 Визначення вмісту гідроген пероксиду

Вміст гідроген пероксиду визначено у системі сорбітол-ксиленол оранж спектрофотометрично згідно з [217, 218]. Принцип методу полягає в здатності гідроген пероксиду при взаємодії із сорбітолом перетворюватись на пероксильний радикал, який за кислих значень рН здатний окиснювати йони Fe^{2+} до Fe^{3+} . У свою чергу, йони Fe^{3+} у розчині сульфатної кислоти утворюють забарвлений комплекс із барвником ксиленол оранжем, який має пік поглинання у діапазоні $\lambda=540\text{-}580 \text{ нм}$.

Для визначення вмісту гідроген пероксиду *ex tempore* приготовано робочий розчин шляхом змішування стокового розчину А (25 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ на 2,5 М H_2SO_4) та розчину Б (100 мМ сорбітол + 125 мкМ ксиленол оранж) у співвідношенні 1:100. У дослідні пробірки, що містили розчин 50 мМ калій-фосфатного буфера (рН=6,0) вносено аліквоту досліджуваного зразка (200-400 мкг загального білка) так, щоб загальний об'єм проби становив 400 мкл. У контрольну пробу вносено по 400 мкл буфера. До усіх проб додано по 2 мл робочого реагенту, ретельно перемішано та інкубовано протягом 15-20 хв за кімнатної температури, після чого визначено оптичну щільність дослідних проб проти контролю за довжини хвилі 540-580 нм.

Вміст гідроген пероксиду розраховано на основі побудованої калібрувальної кривої та перераховано на 1 мг загального білка.

2.12 Визначення вмісту дієнових кон'югатів та шиффових основ ненасичених жирних кислот

Вміст ДК визначено в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометрично, ШО – флуориметричним методом [219, 220].

У щільно притертий скляний гомогенізатор Поттера вносили 100 мкл досліджуваного зразка та додавали 5 мл суміші гептан/ізопропіловий спирт у співвідношенні 1:1 та гомогенізовано впродовж 10 хв. Після цього проби центрифугували 1000 g протягом 15 хв у пробірках з притертим корком. Відбирали надосадову фракцію та додавали 500 мкл дистильованої води для розшарування фаз гептану та ізопропілового спирту.

Верхню гептанову фазу відібрали для визначення вмісту ШО за довжини хвиль $\lambda_{зб\ddot{u}д}=360$ нм і $\lambda_{еміс}=420$ нм. Розрахунок вмісту ШО у пробі провели за формулою:

$$C = \frac{A}{a}, \quad (2.2)$$

де C – вміст ШО, A – екстинкція проб, a – вміст білка в пробі, мг.

Вміст ШО виражали в ум.од. $\times 1 \text{ мг}^{-1}$ білка.

Для визначення ДК у хімічні пробірки відібрано по 300 мкл гептанової фази, додано 1,5 мл 96% етилового спирту, проби ретельно перемішано на вортексі та виміряно екстинкцію проб за довжини хвилі 233 нм. Вміст ДК у пробі розраховано, виходячи з величини молярного коефіцієнту екстинкції при $\lambda=233$ нм для спряжених дієнів поліненасичених вищих жирних кислот, що дорівнює $2,2 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$, та виражено в ум. од. $\times \text{ мг}^{-1}$ білка, за

формулою:

$$C = \frac{A}{(\epsilon \times a)}, \quad (2.3)$$

де C – вміст ДК, A – екстинкція проб, ϵ – молярний коефіцієнт екстинкції при $\lambda=233$ нм для спряжених дієнів поліненасичених вищих жирних кислот, a – вміст білка в пробі, мг.

2.13 Визначення вмісту ТБК-активних продуктів

Вміст ТБК-активних продуктів визначено згідно методу Стальної та співавторів [221]. Принцип методу ґрунтується на зв'язуванні малонового диальдегіду (МДА) з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) з утворенням стійкого забарвленого триметинового комплексу.

У пробу, яка містила 500 мкг білка у трис-буфері (25 мМ трис-НСl, 175 мМ КСl, рН=7,4) додано 0,2 мл 17% трихлороцтової кислоти. Денатурований білок осаджено центрифугуванням за кімнатної температури 1000 g протягом 15 хв. До 500 мкл отриманого супернатанта додано 250 мкл 0,8% ТБК та інкубувано на киплячій водяній бані протягом 10 хв для розвитку забарвлення. Визначення інтенсивності забарвлення проведено на спектрофотометрі при $\lambda=532$ нм.

Вміст ТБК-активних продуктів розраховано на основі відношення значення молярного коефіцієнта екстинкції комплексу МДА з ТБК за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл}}}{a_{\text{мг}} \times 1,56 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1}}, \quad (2.4)$$

де C – вміст ТБК-активних продуктів, $E_{\text{досл}}$ – екстинція проби, $E_{\text{контр}}$ – екстинція контролю, a – вміст білка в пробі, мг; ϵ – коефіцієнт молярної екстинції ($\epsilon=1,56 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$).

Вміст ТБК-активних продуктів визначено у $\text{нмоль} \times \text{мг}^{-1}$ білка.

2.14 Визначення вмісту продуктів окисної модифікації білків

Визначення вмісту продуктів окисної модифікації білків (ОМБ) у дослідних зразках проведено за методом Дубініної [222], що базується на здатності 2,4-динітрофенілгідразину (ДНФГ) взаємодіяти з альдегідними та кето-групами амінокислотних залишків білків та утворювати альдегідні та кетонні похідні, що мають різні спектри поглинання. Так, для аліфатичних альдегід-ДНФГ нейтрального характеру спектр поглинання знаходиться в діапазоні 230-558 нм, основного характеру – 258-270 нм і 428-530 нм; для кетон-ДНФГ нейтрального характеру характерні спектри поглинання 363-367 нм, а основного характеру – 524-535 нм, відповідно.

У проби, що містили 0,5 мг білка, додано 50 мМ фосфатний буфер ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{pH} = 7,4$) та проінкубувано за температури 37°C протягом 15 хв, після чого внесено 1 мл 10 мМ розчину 2,4-динітрофенілгідразину (ДНФГ), розведеного в 1-2М HCl . Проби знову проінкубовано протягом 45 хв за температури 37°C , періодично перемішуючи. Після інкубації до проб додано 1,5 мл 20% ТХО та відцентрифугувано при 1000 g протягом 15 хв. Отриманий осад відмито в етанол-етилацетатній суміші у співвідношенні 1:1 та ретельно висушено. Надалі осад розчинено в 8 М сечовині та витримано протягом 5 хв на киплячій водяній бані.

Екстинцію проб визначено спектрофотометрично проти розчину сечовини за таких довжин хвиль: для альдегідних продуктів окисної модифікації нейтрального характеру визначено при $\lambda=356$ нм та для кетонних продуктів нейтрального характеру – при $\lambda=370$ нм; для

альдегідних продуктів окисної модифікації основного характеру визначено при $\lambda=430$ нм та для кетонних продуктів основного характеру – при $\lambda=530$ нм.

Вміст продуктів ОМБ виражали в ум. од. \times мг⁻¹ білка.

2.15 Визначення супероксиддисмутазної активності

Супероксиддисмутазну (СОД) активність визначено згідно методу Чеварі та співавторів [223], принцип якого базується на конкурентній взаємодії супероксиддисмутази з нітросинім тетразолієм (НСТ) за супероксидні аніон-радикали, що утворюються в результаті реакції відновленої форми НАДН та феназинметасульфата (ФМС).

У дослідну пробу, що містила 50 мкл досліджуваного зразка (500 мкг білка), додано 2 мл попередньо приготованого реагенту 1 (57 мкМ НСТ, 16 мкМ ФМС, розчинених у фосфатному буфері з ЕДТА, рН=7,8). Одразу виміряно спектрофотометрично екстинцію проб за довжини хвилі $\lambda=540$ нм. Після до кожної проби додано 100 мкл реагенту 2 (98,5 мкМ НАДН розчиненого у Трис-ЕДТА буфері, рН=8,0), проінкубовано за температури 30°C протягом 10 хв, та повторно визначено екстинцію за подібних умов.

Значення супероксиддисмутазної активності визначено за формулою:

$$E = \frac{\Delta E_{\text{нул}} \times 50}{\Delta E_{\text{досл}} \times 100 \times t \times a}, \quad (2.5)$$

де E – супероксиддисмутазна активність; $\Delta E_{\text{нул}}$ – екстинція проби до додавання реагенту 2; $\Delta E_{\text{досл}}$ – екстинція проби після додавання реагенту 2; 50/100 – 50% блокування реакції відновлення НСТ; a – вміст білка в пробі, мг; t – час інкубації (10 хв).

Супероксиддисмутазну активність виражено в ум. од. \times хв⁻¹ \times мг⁻¹ білка.

2.16 Визначення каталазної активності

Каталазну активність визначено за кількістю незруйнованого пероксиду водню у пробі, який взаємодіючи з солями молібдену утворює стійкий забарвлений комплекс [224].

У пробу вносено 2 мл 0,03% розчину пероксиду водню. Реакцію розпочато додаванням 0,1 мл досліджуваного зразка (0,1 мг білка). У холосту пробу замість суспензії додано 0,1 мл дистильованої води. Проби витримано протягом 10 хв за кімнатної температури. Реакцію зупинено шляхом додавання 1 мл 4% молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення виміряно спектрофотометрично за довжини хвилі $\lambda=410$ нм проти контрольної проби, в яку замість пероксиду водню додано 2 мл H_2O .

Каталазну активність розраховано за формулою:

$$E = (A_{\text{хол}} - A_{\text{досл}}) / a \times t \times K, \quad (2.6)$$

де E – каталазна активність; $A_{\text{хол}}$ і $A_{\text{досл}}$ – екстинція холостої та дослідної проб; a – вміст білка в пробі, мг; t – час інкубації (10 хв); K – коефіцієнт мілімолярної екстинції перекису водню ($22,2 \times 10^3 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$).

Ферментативну активність виражено у $\text{нмоль } \text{H}_2\text{O}_2 \times \text{хв}^{-1} \times 1 \text{ мг}^{-1}$ білка.

2.17 Визначення глутатіонпероксидазної активності

Глутатіонпероксидазну (ГП) активність в дослідних зразках оцінено за накопиченням окисненого глутатіону (GSSG) відповідно до методу [225]. До складу реакційного середовища входило: 1 мл 0,3 М фосфатного буферу, рН 7,4; 12 мМ натрію азид; 6 мМ ЕДТА; 0,5 мл 2,5 мМ відновленого глутатіону (GSH); 0,2 мл досліджуваного зразка; 0,5 мл 1,8 мМ H_2O_2 . Реакцію розпочато додаванням у пробу пероксиду водню та зупинено через 5 хв додаванням 10% ТХО. Після центрифугування при 1500 g впродовж 15 хв

визначено адсорбцію окисненого глутатіону за довжини хвилі 260 нм.

Ензиматичну активність виражено в нмоль окисненого глутатіону $\times 1 \text{ мг}^{-1}$ білка $\times \text{хв}^{-1}$.

2.18 Визначення глутатіонтрансферазної активності

Глутатіонтрансферазну (ГТ) активність визначено за накопиченням оптично активного кон'югату глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом [225]. Реакційне середовище для визначення ГТ активності містило: 1,5 мл 0,1 М фосфатного буферу, рН 6,5; 0,2 мл 10 мМ відновленого глутатіону (GSH); 0,1 мл дослідного зразку. Реакцію розпочато додаванням 0,02 мл 0,1 М 1-хлор-2,4-динітробензолу, та інкубовано протягом 5 хв.

ГТ активність визначено при довжині хвилі 346 нм та виражено в нмоль $\times 1 \text{ мг}^{-1}$ білка $\times \text{хв}^{-1}$.

2.19 Визначення глутатіонредуктазної активності

Глутатіонредуктазну (ГР) активність визначено за окисненням НАДФН згідно з методом [225] з модифікаціями для вимірювання в мікрокуветі із загальним об'ємом реакційної суміші 0,535 мл. У пробу вносено 350 мкл 0,05 М фосфатного буферу, рН 8,0; 35 мкл 1 мМ ЕДТА; 50 мкл 7,5 мМ GSSG; 50 мкл дослідного зразку; 50 мкл 1,2 мМ НАДФН. Проведено інкубацію тривалістю 8 хв. ГР активність визначено за зменшенням кількості НАДФН за температури 37 °С та довжини хвилі 340 нм.

Глутатіонредуктазну активність виражали в нмоль НАДФН $\times 1 \text{ мг}^{-1}$ білка $\times \text{хв}^{-1}$.

2.20 Визначення вмісту відновленого та окисненого глутатіону

Вміст відновленого та окисненого глутатіону в зразках сироватки крові та хрящової тканини щурів визначено спектрофлюориметричним методом із додаванням ортофталевого альдегіду за різних значень рН середовищ [226, 227].

До дослідних зразків додано 0,01 М мурашину кислоту (1:1) для осадження білків та центрифугувано при 20000 g протягом 30 хв при охолодженні для отримання супернатанту, в якому визначено вміст відновленого та окисненого глутатіону.

Приготування проб для вимірювання вмісту відновленого глутатіону проходило за наступною схемою. До 50 мкл супернатанту додано 450 мкл 0,1 М Na-фосфатного буферу з 5 мМ ЕДТА (рН=8,0) та ретельно перемішано. Кінцева суміш для аналізу містила: 10 мкл розведеного супернатанту, 180 мкл фосфат-ЕДТА буферу та 10 мкл ортофталевого альдегіду, який приготовано перед дослідом у концентрації 1 мг/мл метанолу. Після 15 хв інкубації при кімнатній температурі виміряно інтенсивність флуоресценції при довжині хвилі $\lambda_{em}=460$ нм за активації $\lambda_{ex}=360$ нм на мікропланшетному спектрофлюорофотометрі Synergy HT (BioTeck, США). Вміст відновленого глутатіону визначено за попередньо побудованою калібрувальною кривою.

Для вимірювання вмісту окисненого глутатіону до 50 мкл супернатанту додано 20 мкл 0,04 М N-етилмалеїміду, який попереджав окиснення GSH в GSSG, та інкубовано протягом 20 хв при кімнатній температурі. Далі додано 430 мкл 0,1 N NaOH, рН 12, та ретельно перемішано, після чого відібрано аліквоту в 10 мкл для аналізу. Кінцева суміш для аналізу містила: 10 мкл розведеного супернатанту, 180 мкл 0,1 N NaOH та 10 мкл ортофталевого альдегіду (1 мг/мл метанолу). Після 15 хв інкубації при кімнатній температурі виміряно інтенсивність флуоресценції за довжин хвилі $\lambda_{ex}=360$ нм та $\lambda_{em}=460$ нм. Вміст окисненого глутатіону визначено за калібрувальною кривою.

Вміст GSH та GSSG виражено в нмоль \times 1 мг⁻¹ білка.

2.21 Визначення концентрації білка

Концентрацію білка в дослідних зразках визначено за допомогою класичного методу Лоурі [228]. Даний метод базується на утворенні забарвлених продуктів ароматичних амінокислот з реактивом Фоліна в поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки.

Приготовано робочі розчини: розчин А (2 г Na₂CO₃ та 400 мг NaOH на 100 мл бідистильованої води) та розчин Б (500 мг CuSO₄ \times 5H₂O та 1 г Na₃C₆H₅O₇ \times 2H₂O на 100 мл бідистильованої води). Безпосередньо перед експериментальним дослідженням приготовано розчин С: 10 мл розчину А та 200 мкл розчину В.

Для визначення концентрації білка у дослідну пробу внесено 400 мкл проби та 2 мл реактиву С. У контрольну пробу замість досліджуваного білкового матеріалу додано 400 мкл дистильованої води. Через 10 хв у пробірки додано 200 мкл реактиву Фоліна і залишено на 30 хв за кімнатної температури для розвитку забарвлення. Інтенсивність забарвлення виміряно спектрофотометрично при $\lambda=750$ нм.

Кількість білка у пробі визначено за допомогою калібрувальної кривої.

2.22 Імуногістохімічний аналіз зрізів колінних суглобів

Експресію TLR-2, TLR-4 та NF- κ B у суглобовому хрящі, субхондральній кістці та синовіальній оболонці визначено за допомогою наборів для імуногістохімічного фарбування (Waltham, MA, США), згідно інструкцій виробника. Стандартні імуногістохімічні процедури проведено з використанням відповідних специфічних первинних антитіл: до TLR2 – рекомбінантні моноклональні антитіла кролика (JM22-41), TLR4 – поліклональні антитіла (PA5-23124), NF- κ B – P65 поліклональні

антитіла (РА5-16545). Дофарбовування ядер виконано гематоксиліном Майєра.

При інтерпретації результатів імуногістохімічного дослідження враховувано компартмент, інтенсивність експресії маркерів та кількість імунопозитивних клітин. При цьому враховувано просторовий характер експресії біомаркерів із визначенням типів клітин, залучених у прозапальну активацію: хондроцитів у межах суглобового хряща, остеобластів та остеоцитів субхондральної кістки, клітин синовіальної оболонки тощо.

Виразність експресії біомаркерів у суглобовому хрящі оцінено напівкількісним методом з використанням критеріїв, наведених у табл. 2.1, та представлено в умовних одиницях.

Таблиця 2.1

Критерії напівкількісної оцінки експресії біомаркерів прозапальної активації хондроцитів за умов моделювання ОА

Оцінка, ум.од.	Характеристика результатів імуногістохімічного дослідження
0	Негативна реакція у всіх хондроцитах (відсутність профарбовування клітин)
1	<25% хондроцитів є імунопозитивними
2	25–50% хондроцитів мають позитивну реакцію
3	50–75% хондроцитів мають позитивну реакцію
4	>75% мають позитивну реакцію

2.23 Аналіз експресії генів за допомогою ПЛР у реальному часі

Для визначення експресії генів індукцибельної нітрооксидсинтази (*Nos2*), циклооксигенази (*Ptgs2*), трансформуючого фактора росту бета (*Tgfb1*),

транскрипційного фактора NF-κB (*Nfkb1*), Toll-подібного рецептора 2 (*Tlr2*), Toll-подібного рецептора 4 (*Tlr4*), колагену типу II альфа 1 (*Col2a1*), агрекани (*Acan*), олігомерного матричного білка хряща (*Comp*) використано метод кількісної полімеразно-ланцюгової реакції.

2.23.1 Виділення загальної РНК

РНК отримано згідно з методом [229].

100 мг тканини з доданою невеликою кількістю рідкого азоту ретельно розтерто у фарфоровій ступці до однорідної порошкоподібної консистенції. Після цього вносено 1 мл суміші D, що містила гуанідин ізотіоціанат, β-меркаптоетанол та лаурилсаркозинат натрію, та ретельно перемішано. У подальшому до зразка додано 100 мкл 2 М ацетату натрію та 1 мл фенолу, 200 мкл суміші хлороформ:ізопропанол. Проби лишено на льоду на 15 хв, після чого відцентрифугувано при 10 000 g протягом 20 хв. В окремі пробірки обережно відібрано супернатант, до якого додано 1 мл ізопропанолу та, після перемішування, залишено на 1 год на льоду. Проби відцентрифугувано за подібних умов, після чого супернатант декантовано, а осад розчинено у трикратному об'ємі суміші D з додаванням ізопропанолу. Дослідні проби лишено на 1 год на льоду, після чого відцентрифугувано. Супернатант злито, а до осаду обережно додано відповідну кількість 70% етанолу, перемішано та відцентрифугувано протягом 2 хв при 13000 g. Спирт злито, осад підсушено у витяжній шафі. Сухі осади розчинено у 100 мкл етилового спирту та вкрито 96% етанолом.

2.23.2 Оцінка експресії генів

Синтез кДНК та кількісну полімеразну ланцюгову реакцію виконано в реальному часі (Real-time PCR, кПЛР) за допомогою комерційного набору «Termo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix» («Termo

Scientific», Литва), використовуючи по 0,4 мкмоль/л кожного праймера та по 2 мкл (2 мкг) виділеної РНК, за таких температурних умов: синтез кДНК 50°C – 30 хв; ініціююча денатурація 95°C – 15 хв; далі 40 циклів: денатурація ДНК 95°C – 15 с; гібридизація праймерів 50°C – 35 с; добування ланцюга 72°C – 30 с; елонгація ампліфікатів 72°C – 5 хв, які рекомендовані фірмою-виробником.

У реакціях було використано такі послідовності праймерів (розроблено за допомогою онлайн ресурсів NCBI Primer BLAS):

для *Nos2* – прямий – GTGTTCCACCAGGAGATGTTG та зворотний – TGTCAGAAACTCAGGCGTAGT;

для *Ptgs2* – прямий – TGCTGTTCCAACCCATGTCA та зворотний – TGTCAGAAACTCAGGCGTAGT;

для *Tgfb1* – прямий – CTTTCAGCTCCACAGAGAAGA ACTGC та зворотний – CACGATCATGTTG GACAACCTGCTCC;

для *Comp* прямий – ACACAGGGTCAAGGAGATCAC та зворотний – AGACTACGCCAGGGAAGCA;

для *Col2a1* – прямий - TGTCTCTGGTCCCATTGGTC та зворотний – AATCCACGAGCACCCCTGAG;

для *Acan* прямий AGATGGCACCCCTCCGATACC та зворотний – GACACACSTCGGAAGCAGAA;

для *Nfkb1* – прямий – TTCCTGATCCCGACAAGAACTG та зворотний – CCCCCAGAGACSTCATAGTTGT;

для *Tlr2* – прямий – GGAGGTCTCCAGGTCAAATCT та зворотний – TGATGTTTCCCCCAGTGTCC;

для *Tlr4* – прямий – TGTCTCAATTTTCACACSTGGAT та зворотний – CTCAGCAAAAATCCSTCATGACA;

для *Actb* (ген β-актину, що використовується в якості внутрішнього контролю реакції завдяки конститивній експресії) – прямий – TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотний – ATTGCCGATAGTGATGACCT

Відтворюваність результатів ампліфікації перевіряли в паралельних експериментах шляхом повторення кПЛР на зразках РНК усіх тварин із кожним праймером не менше трьох разів. Після кожного циклу ампліфікації зчитувалась флуоресценція барвника SYBR Green I, а по закінченню реакції будувалась крива плавлення для контролю утворення димерів праймерів і специфічності реакції. Початкову кількість мРНК обраховано за порівняльним СТ методом « $\Delta\Delta CT$ Method», ефективність ПЛР реакцій була однаковою ($E_x = (10^{-1/slope}) - 1 \times 100\%$), $slope < 0,1$. Відносну кількість мРНК зазначених генів нормалізувано до мРНК *Actb* [230].

2.24 Статистична обробка отриманих результатів

Статистичну обробку результатів досліджень проведено загальноприйнятими методами варіаційної статистики, з використанням програмного пакету GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США). Нормальність розподілу даних у групах перевірено за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Подальший обрахунок результатів зроблено за допомогою аналізу one-way ANOVA із *post hoc* тестом Тьюке. Отримані результати наведено у вигляді середнього арифметичного \pm середньоквадратичне відхилення (дисперсія) – SD. Різницю між порівнюваними показниками вважали статистично значущою при $p \leq 0,05$.

Результати, викладені у розділі, опубліковані у наступних працях: [206, 207].

РОЗДІЛ 3

ВИДОВИЙ ТА КІЛЬКІСНИЙ СКЛАД МІКРОБІОТИ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРИТУ ПРИ ВВЕДЕННІ ХОНДРОЇТИНУ СУЛЬФАТУ ТА ПРОБІОТИКА

Мікробіом – це складна система, яка тісно взаємопов'язана з функціонуванням різних органів, систем та організму в цілому, що реагує на фактори навколишнього середовища, включаючи зміну дієти та застосування лікарських засобів [231, 232]. Мікробіом бере участь у регуляції енергетичного гомеостазу і метаболізму, синтезу вітамінів, ендокринної сигналізації, метаболізму токсинів, канцерогенів та цілої низки інших корисних і шкідливих сполук, запобігає колонізації патогенами [233]. На клітинному рівні мікробіом кишечника регулює проліферацію ентероцитів, бере участь в експресії генів та регуляції імунних реакцій [233].

Спираючись на значну кількість даних сучасних наукових досліджень [16, 234], в яких показано, що дисбіоз кишечника корелює з патогенезом ряду метаболічних та запальних захворювань, можна припустити, що зміни в мікробіті кишечника можуть також бути пов'язані і з прогресуванням захворювань опорно-рухового апарату, в тому числі й ОА [235]. Однак, вивчення механізмів впливу мікробіоти кишечника та бактеріальних метаболітів на патогенез ОА є недостатнім і потребує подальших досліджень. Тому, враховуючи вище викладене, нами визначено видовий та кількісний склад фекальної мікробіоти в щурів з експериментальним ОА та при введенні хондропротекторного препарату на основі ХС і мультипробіотика.

Результати дослідження свідчать про зниження кількості мікроорганізмів роду *Bifidobacterium* та *Lactobacillus* у 1,1 та 1,3 рази ($p \leq 0,05$) за умов експериментального ОА, порівняно з

контрольними значеннями. За експериментального ОА спостерігалось достовірне підвищення кількості *Clostridium spp.* та лактозо-негативної *Escherichia coli* в 1,9 разів ($p \leq 0,05$), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, умовно патогенних ентеробактерій та дріжджоподібних грибів роду *Candida* – в 1,6; 1,4; 8 та 1,7 разів ($p \leq 0,05$) відповідно, порівняно з контрольними значеннями (табл. 3.1). Отримані дані можуть свідчити про дисбіотичний стан у щурів за умов розвитку ОА, як результат хронічного системного запального процесу, пов'язаного з дегенеративними змінами хряща колінного суглоба.

Виявлений дисбіоз може призводити до підвищення проникності слизової оболонки кишечника, та сприяти потраплянню у кров'яне русло патоген-асоційованих молекулярних паттернів РАРР і мікроб-асоційованих паттернів МАРР [236], які зв'язуються з відповідними патоген-розпізнавальними рецепторами на поверхні імунних клітин, та запускають запальні сигнальні каскади [237].

Вплив мікробіоти на розвиток патологій суглобів може бути пов'язаний з транслокацією мікроорганізмів та її метаболітів через ендотелій кишечника у системне кров'яне русло. Мікробіологічні молекулярні структури МАРР, які включають такі макромолекули, як ЛПС, пептидоглікан, флагеллін та бактеріальну безклітинну ДНК, можуть переміщуватись через ендотеліальний бар'єр кишечника у порожнину суглоба, де стимулюють рецептори вродженої імунної відповіді в кістковій і хрящовій тканинах, синовіальній оболонці, та ініціюють прозапальні реакції в резидентних імунних клітинах. В умовах підвищеної кишкової проникності рівень ЛПС у хворих на ОА підвищується не тільки в крові, а й в синовіальній рідині. Їх концентрація корелює з тяжкістю ураження суглобів, вираженістю больового синдрому і ступенем звуження суглобової щілини [238]. Крім того, можлива транслокація живих мікроорганізмів через ендотелій кишечника у порожнину суглоба, де вони безпосередньо можуть стимулювати вроджені імунні рецептори в місцевих популяціях клітин [239].

Таблиця 3.1

Видовий та кількісний склад фекальної мікробіоти щурів при експериментальному остеоартриті та за умов введення хондроїтину сульфату і пробіотики, ($M \pm m$, $n=14$)

Мікроорганізми	Групи тварин (кількість мікроорганізмів, lg CFU/g)							
	Контроль	ХС	ПБ	ХС+ПБ	ОА	ОА+ХС	ОА+ПБ	ОА+ХС+ +ПБ
<i>Bifidobacterium</i>	8,5 ± 0,2	8,6 ± 0,3	8,6 ± 0,4	8,1 ± 0,2	7,4 ± 0,3*	8,9 ± 0,3 [#]	9,5 ± 0,8 ^{*/#}	8,3 ± 0,1 [#]
<i>Lactobacillus</i>	8,1 ± 0,1	8,3 ± 0,2	8,4 ± 0,2	7,3 ± 0,2*	6,1 ± 0,3*	7,0 ± 0,2 ^{*/#}	8,0 ± 0,9 [#]	8,3 ± 0,2 [#]
<i>Clostridium spp.</i>	2,7 ± 0,3	2,5 ± 0,3	2,6 ± 0,1	2,7 ± 0,4	5,0 ± 0,3*	3,9 ± 0,1 ^{*/#}	2,8 ± 0,1 [#]	2,6 ± 0,2 [#]
<i>Escherichia coli</i> лактозо-позитивна	2,2 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,3 ± 0,2	1,6 ± 0,4	2,0 ± 0,3	2,5 ± 0,4 [#]	2,5 ± 0,3 [#]
<i>Escherichia coli</i> лактозо-негативна	3,1 ± 0,3	2,2 ± 0,4*	2,4 ± 0,3*	2,0 ± 0,1*	5,9 ± 0,3*	2,9 ± 0,3 [#]	2,3 ± 0,2 ^{*/#}	2,8 ± 0,2 [#]
Умовно-патогенні <i>Enterobacteria</i>	0,5 ± 0,1	0*	0,3 ± 0,1	0*	4,0 ± 0,5*	2,4 ± 0,2 ^{*/#}	1,0 ± 0,1 ^{*/#}	0 ^{*/#}
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,6 ± 0,4	4,2 ± 0,4	3,0 ± 0,3	2,3 ± 0,4*	5,6 ± 0,3*	4,5 ± 0,3 ^{*/#}	3,7 ± 0,3 [#]	3,6 ± 0,3 [#]
<i>Staphylococcus spp.</i>	3,2 ± 0,3	3,5 ± 0,3	3,2 ± 0,3	3,7 ± 0,4	4,5 ± 0,4*	4,3 ± 0,4*	3,2 ± 0,3 [#]	3,7 ± 0,3 [#]
<i>Candida</i>	1,9 ± 0,2	2,2 ± 0,3	1,6 ± 0,2	0,9 ± 0,2*	3,3 ± 0,2*	2,7 ± 0,3 ^{*/#}	2,1 ± 0,2 [#]	0 ^{*/#}

* – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно групи щурів з ОА

Існують дані клінічних досліджень, в яких показано, що концентрації бактеріальних ліпопротеїдів у системному кровотоці та синовіальній рідині мали позитивну кореляцію із запаленням у суглобах, дегенеративними змінами та тяжкістю перебігу захворювання [238].

Активовані нейтрофіли і макрофаги запускають запальний каскад за участі IL-1 β , ФНП- α , інгібітора активатора плазміногена 1, протеолітичних ферментів хрящового матриксу – матриксних протеїназ, вільних радикалів, що має результатом дистрофічно-дегенеративні зміни хряща [240].

Взаємодія між мікробіотою кишечника й лікарськими засобами переважно відбувається за участі коменсальної мікробіоти, яка модулює процеси метаболізму в слизовій оболонці кишечника, що виконує бар'єрну функцію [241].

ХС, який широко застосовується у лікуванні ОА, чинить протизапальний, знеболювальний, структурно-модифікуючий ефекти на суглобовий хрящ та кістку [242]. Проте, лише 5-15% отриманої дози препарату всмоктується в шлунково-кишковому тракті, і відомо, що він метаболізується кишковою мікробіотою [178]. Також ХС є важливим компонентом кишкового муцину, що виконує бар'єрну функцію між мікробіотою й кишковою стінкою, та, можливо, впливає на проникність кишечника [178, 243]. Дослідження змін у мікробіоті кишечника на тлі застосування ХС може розширити уявлення про механізми дії хондропротекторного препарату та його біологічні ефекти за умов розвитку ОА.

Встановлено, що введення ХС тваринам з експериментальним ОА сприяло збільшенню кількості бактерій роду *Bifidobacterium* та *Lactobacillus* в 1,2 та 1,1 раза ($p \leq 0,05$) відповідно, порівняно з тваринами з експериментальною патологією (табл. 3.1). За таких експериментальних умов встановлено зменшення кількості *Clostridium spp.* в 1,3 раза ($p \leq 0,05$), лактозо-негативної *Escherichia coli* в 2 раза ($p \leq 0,05$) та умовно-патогенних ентеробактерій в 1,6 раза ($p \leq 0,05$), порівняно з тваринами групи ОА. За

умов введення ХС щурам з експериментальним ОА спостерігалася тенденція до зменшення кількості мікроорганізмів *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.* та дріжджових грибів роду *Candida*, порівняно зі значеннями групи патології, однак показники значимо не досягали рівня контролю (табл. 3.1).

Одним із механізмів впливу кишкової мікробіоти на розвиток ОА може бути зміна метаболізму терапевтичних сполук під впливом останніх. У дослідженнях [55, 244] є припущення, що терапевтична дія ХС може здійснюватися через бактеріальні шляхи кишечника, оскільки ХС може розщеплюватися кишковою мікробіотою. У дослідженні Wang Q. та співавторів [174] показано, що деградація хондроїтину у кишечнику може залежати від співвідношення мікроорганізмів, які секретують сульфатазу, та сульфатредуючих бактерій, а також їх антагоніста – *Akkermansia muciniphila*. Ці групи мікроорганізмів конкурують за субстрат, що містить сульфгідрильні групи, в даному випадку – хондроїтин. Тому в присутності *A. muciniphila*, що захищає ХС від розпаду, препарат ефективний, а за її відсутності – ні [174].

Існують різні механізми, за допомогою яких ХС може здійснювати свої протизапальні ефекти. Зокрема, використання ХС може призвести до збільшення кількості бактерій роду *Bacteroides* та зміни кількості інших видів, які відіграють важливу роль у симбіозі мікроорганізмів кишечника [244, 245]. За відсутності гліканів, які надходять до організму з їжею, *Bacteroides* здатні деградувати муцинові глікани кишечника, що може приводити до запалення стінки кишечника та запальних ефектів на системному рівні. Тому, додатково введений ХС може виявлятися екзогенним субстратом для *Bacteroides*, який сприятиме захисту муцину кишечника від деградації [246]. В одному з досліджень автори показали, що дисахариди у складі ланцюга молекули ХС сприяють збільшенню кількості бактеріальних популяцій, які продукують бутират, що має протизапальні властивості [247]. Також ХС може слугувати субстратом для сульфатредуючих бактерій, які беруть участь у синтезі протизапальних

сполук [174, 246], та здатний знижувати рівень медіаторів запалення, таких як ФНП- α , ІЛ-1 β , ІЛ-6, ММП-1 та оксид азоту (NO) [205]. Нами показано зниження рівня прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів з експериментальним ОА після введення ХС. Такі протизапальні властивості ХС можуть бути зумовлені його здатністю інгібувати транслокацію ядерного фактора NF- κ B та зв'язування його з ДНК [248, 249].

Таким чином, наші результати та аналіз літературних даних показують, що ХС може мати пребіотичні властивості та здійснювати позитивний ефект на мікробіоту кишечника у тварин з ОА.

Відомо, що мікробіота кишечника переважно представлена мікроорганізмами роду *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* та ін. При виникненні дисбіозу мікробіота не може належним чином виконувати свої численні функції, що відображається на функціональному стані органів, систем та організму в цілому. Тому важливим є підтримання балансу кишкової мікробіоти задля забезпечення нормального гомеостазу організму. З метою запобігання або відновлення порушеного стану кишкової мікробіоти використовують пробіотики, які інгібують ріст кишкових патогенів, модулюють кишкове запалення та активують імунну систему [250]. В експерименті показано, що застосування пребіотика – олігофруктози у тварин з ОА призводило до нормалізації кишкової мікробіоти, зменшення запального процесу і вираженості ураження суглобів [16].

У ході досліджень нами встановлено, що введення ПБ тваринам з експериментальною патологією суглобів сприяло збільшенню кількості мікроорганізмів роду *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та лактозо-позитивної *Escherichia coli* в 1,2; 1,3 та 1,5 рази ($p \leq 0,05$) відповідно, порівняно з тваринами групи ОА (табл. 3.1). Збільшення кількості кишкових протизапальних бактерій у щурів з експериментальним ОА може мати позитивні ефекти для здорового функціонування організму за рахунок підвищення цілісності кишкового бар'єру та пригнічення запалення [212].

Слід зазначити, що введення тваринам з експериментальною патологією ПБ значно зменшувало кількісний склад бактерій *Clostridium spp.* та лактозо-негативної *Escherichia coli* в 1,7 та 2,5 рази ($p \leq 0,05$) відповідно, умовно-патогенних ентеробактерій у 4 рази ($p \leq 0,05$), порівняно з групою тварин з експериментальним ОА. За даних умов зменшувалась кількість *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* та дріжджових грибів роду *Candida* в 1,5; 1,4 та 1,6 рази ($p \leq 0,05$) відповідно, порівняно з тваринами групи ОА, при цьому значення достовірно досягали рівня контролю (табл. 3.1).

У дослідженнях [192] показано, що щоденне отримання пробіотичної добавки, зокрема *Lactobacillus casei shirota*, протягом 6 місяців значно поліпшувало функціональний стан суглобів (за шкалою WOMAC та візуальною аналоговою шкалою), знижувало рівень С-реактивного білка у крові хворих на ОА колінного суглоба.

При одночасному введенні ХС та ПБ тваринам з експериментальним ОА показано достовірне зростання кількості *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та лактозо-позитивної *Escherichia coli* в 1,1; 1,4 та 1,6 рази ($p \leq 0,05$) відповідно, порівняно з групою тварин, у яких моделювали ОА, при чому дані показники достовірно не відрізнялись від контрольної групи (табл. 3.1). За подібних умов встановлено зниження кількості *Clostridium spp.* у 1,9 рази ($p \leq 0,05$), лактозо-негативної *Escherichia coli* у 2,1 рази ($p \leq 0,05$), *Staphylococcus aureus* у 1,5 рази ($p \leq 0,05$) та *Staphylococcus spp.* в 1,2 рази ($p \leq 0,05$), порівняно з групою щурів з ОА, та достовірно не відрізнялись від показників у тварин контрольної групи (табл. 3.1). Варто відзначити елімінацію дріжджових грибів роду *Candida* та умовно-патогенних ентеробактерій при сумісному введенні ХС і ПБ тваринам з експериментальним ОА.

Слід відмітити, що сумісне введення ХС і ПБ композиції тваринам за відсутності експериментальної патології супроводжувалося зниженням кількості *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus*, лактозо-негативної *Escherichia coli*, дріжджоподібних грибів роду *Candida* та умовно-патогенних ентеробактерій, порівняно з контрольними значеннями.

Мікробіота кишечника синтезує біологічно-активні речовини та ферменти, які активують або розкладають молекули терапевтичних сполук, таким чином, впливає на їх метаболізм. У дослідженнях показано, що пробіотики, які містять вісім штамів бактерій роду *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Streptococcus*, модулюють рівень експресії мРНК і білка деяких детоксуючих ферментів [241].

Таким чином, сумісне застосування ХС і ПБ мало сприятливий вплив на якісний і кількісний склад мікробіоти кишечника за умов розвитку ОА. Виявлений синергічний позитивний ефект комбінованого застосування ПБ і ХС за умов експериментального ОА може бути пов'язаний як із безпосереднім впливом корисної мікробіоти та її метаболітів на стан запального процесу в організмі через усунення дисбіозу, так і з можливим подальшим опосередковано регулюючим впливом на TLR-2/4-залежний NF-κB запальний шлях і метаболізм хрящової тканини. У наших дослідженнях показано, що спільне введення ХС і ПБ щурам з ОА суттєво корелювало зі зниженням експресії генів TLR-2, TLR-4, NF-κB, біохімічних маркерів метаболізму хряща і сприяло зменшенню симптомів ОА [251, 252].

Експериментально індукований ОА супроводжувався порушенням якісного та кількісного складу фекальної мікробіоти, що вказувало на дисбіотичний стан кишечника. МІА-індукований ОА спричиняв значне збільшення умовно-патогенних мікроорганізмів на тлі зменшення кількості лакто- та біфідобактерій. Введення ХС та ПБ сприяло відновленню мікробіоти кишечника за умов розвитку експериментального ОА. Показано позитивний синергетичний ефект поєданого застосування ХС та ПБ на порушену мікробіоту кишечника щурів з експериментальним ОА. Отже, участь кишкової мікробіоти в механізмі розвитку ОА є беззаперечною, а виявлений нами ефект потребує подальших досліджень та є перспективним.

Результати, викладені у розділі, опубліковані у наступних працях: [253].

РОЗДІЛ 4

ГІСТОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ ДИСТРОФІЧНО-ДЕГЕНЕРАТИВНИХ ЗМІН КОЛІННОГО СУГЛОБА ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРИТУ ПРИ ВВЕДЕННІ ХОНДРОЇТИНУ СУЛЬФАТУ ТА ПРОБІОТИКА

ОА характеризується метаболічними та прогресуючими структурними змінами у тканинах суглоба, головним чином деградацією хряща, субхондральним склерозом та запаленням синовіальної мембрани, що має тяжкі наслідки, зокрема втрату функцій суглобу та інвалідність [254]. Тому важливим завданням сучасних наукових досліджень є вивчення різних аспектів ОА, що сприятиме пошуку більш ефективних засобів та методів призупинення дегенеративно-дистрофічних процесів у тканинах суглоба, подовження безсимптомного періоду та попередження прогресування захворювання.

Питання профілактики та лікування ОА є одним із найважливіших, незважаючи на те, що перелік препаратів останнім часом значно поповнився, однак більшість із них мають лише симптоматичну дію [255]. При лікуванні ОА є необхідним правильна оцінка ураженого суглоба, запалення, ступеню структурних змін, а також важливо враховувати наявність коморбідних станів, взаємодію лікарських засобів та побічні терапевтичні ефекти. Симптоматичні препарати швидкої (анальгетики центральної дії та нестероїдні протизапальні препарати) та сповільненої дії (хондропротектори), які застосовуються при лікуванні патологій ОА, можуть порушувати цілісність кишкового бар'єру, підвищувати його проникність та викликають запалення ШКТ [256]. Тому є доцільним використання ПБ, які здатні відновлювати порушений якісний та кількісний склад мікробіоти кишечника, функціональний стан кишкового бар'єру, та впливати на регуляцію прозапальних медіаторів, модулюючи інтенсивність розвитку запалення, тим

самим позитивно впливаючи на структурно-функціональний стан суглобів [257].

На початкових етапах дослідження з метою підтвердження структурних змін у тканинах суглоба при експериментальному ОА, а також при введенні хондропротекторного препарату на основі ХС і ПБ, нами проведено гістологічний аналіз колінного суглоба щурів. Показано, що у тварин контрольної (інтактної) групи гістологічна картина відповідала класичному опису неушкодженого суглобового хряща. Поверхня рівна та еластична. Пошарова будова гіалінового хряща щурів збережена: поверхневий шар представлений 3-5-ма рядами хондроцитів овально-видовженої форми, у перехідній зоні хондроцити мали округлу форму та розташовувалися поодинокі чи в ізогенних групах. Більшість ядер мали чіткі контури та світле забарвлення після профарбовування. Глибокий шар представлений великими гіпертрофованими хондроцитами. Безпосередньо під суглобовим хрящем розміщувалася субхондральна кісткова тканина та кровоносні судини (рис. 4.1).

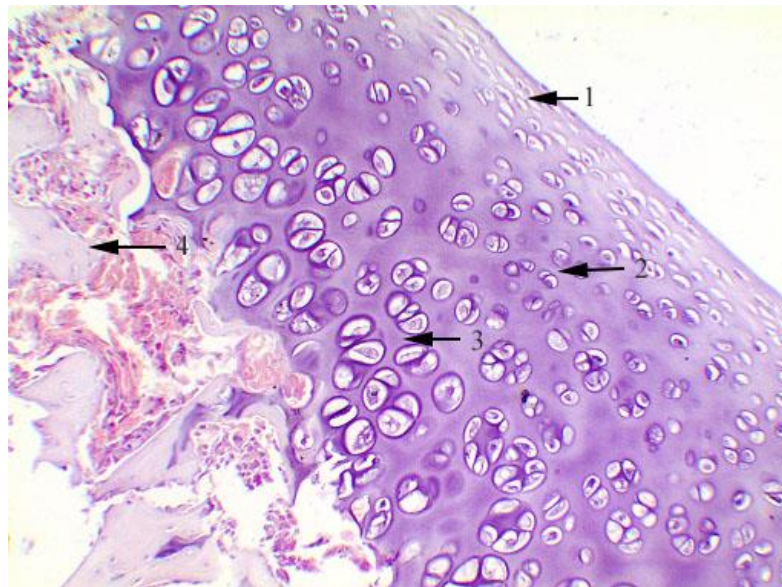


Рис. 4.1 Мікрофотографія зрізу тканини колінного суглоба щурів у контрольній (інтактній) групі. Гематоксилін-еозин. $\times 200$ (1 – хондроцити поверхневого шару; 2 – ізогенна група проміжного шару; 3 – хондроцити глибокого шару; 4 – субхондральна кісткова тканина)

У групах щурів, яким окремо вводили хондропротекторний препарат на основі ХС та ПБ композицію, а також при їх сумісній дії за відсутності експериментальної патології, гістологічний аналіз не виявив істотного порушення структури тканин колінного суглоба: розташування хондроцитів рівномірне, дисплазії сполучної тканини та змін трофіки гіалінового хряща не відбувалося (рис. 4.2; рис. 4.3; рис. 4.4).

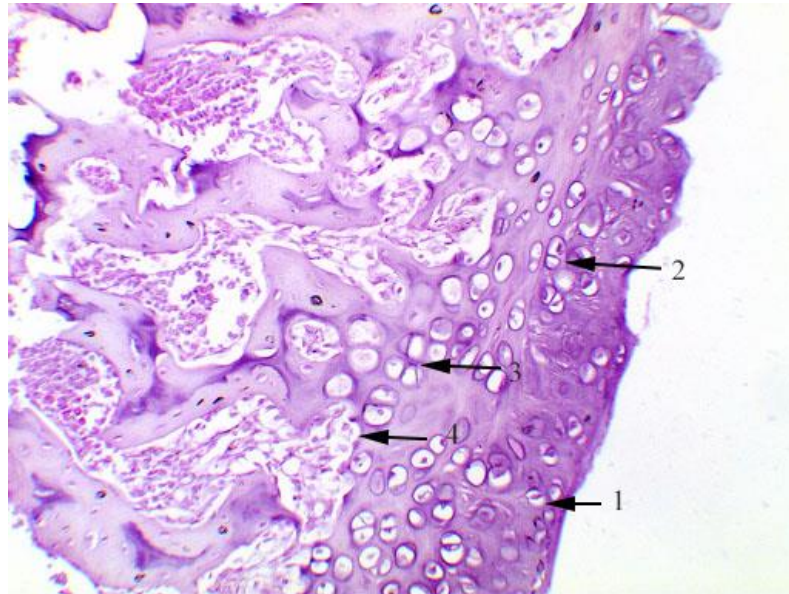


Рис. 4.2 Мікрофотографія зрізу тканини колінного суглоба щурів при введенні хондроїтину сульфату. Гематоксилін-еозин. $\times 200$. (1 – хондроцити поверхневого шару; 2 – ізогенна група проміжного шару; 3 – хондроцити глибокого шару; 4 – субхондральна кісткова тканина)

Слід відмітити, що у групі щурів, яким вводили ХС не відмічалось змін у пошаровій будові хряща, тобто гістоархітектоніка хряща залишалася повністю збереженою, однак спостерігалась нерівність суглобового краю у вигляді неглибоких дефектів поверхні (рис. 4.2). У тварин, яким вводили сумісно ХС та ПБ відмічалася проліферація хондритів та наявність у проміжному шарі хондроцитів, характерних для глибокого шару. Безпосередньо під суглобовим хрящем розміщувалася субхондральна кісткова тканина із численними судинами мікроциркуляції (рис. 4.4) Дана

гістологічна картина може бути пов'язана з фізичним пошкодженням суглобової поверхні під час імітування патології (внутрішньосуглобового введення фізіологічного розчину) та активними регенераційними процесами в хрящовій тканині тварин цих груп.

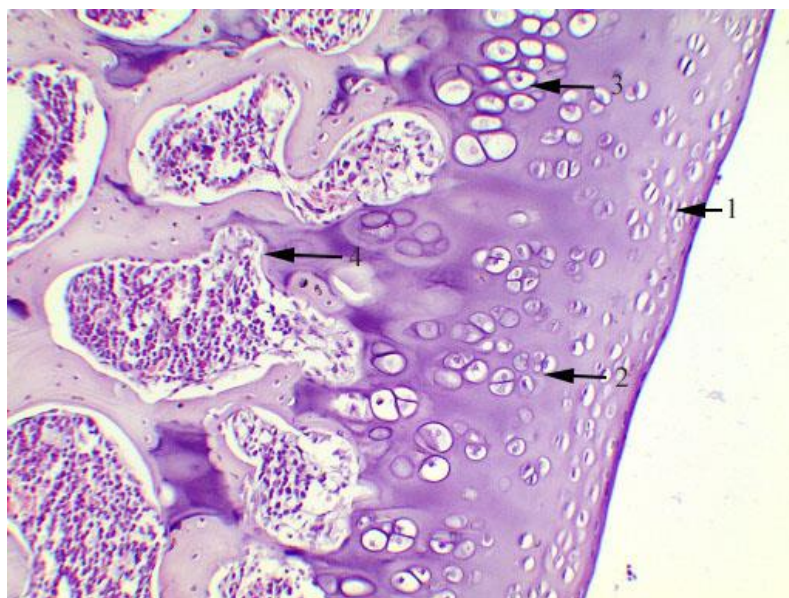


Рис. 4.3 Мікрофотографія зрізу тканини колінного суглоба щурів при введенні пробіотика. Гематоксилін-еозин. $\times 200$. (1 – хондроцити поверхневого шару; 2 – ізогенна група проміжного шару; 3 – хондроцити глибокого шару; 4 – субхондральна кісткова тканина)

Суглобовий хрящ є унікальною тканиною, складається переважно з позаклітинного матриксу, що синтезується хондроцитами, та забезпечує рухливість суглоба та його еластичність. У нормі хрящ має зоновану структуру: складається з поверхневої, середньої та глибокої зон, які відрізняються за біохімічним складом матриксу, морфологією та щільністю розташування клітин, а також метаболізмом [258]. На поверхневу зону припадає 10-20% товщини суглобового хряща; хондроцити цієї зони оточені щільно розміщеними колагеновими фібрилами. Проміжна зона становить 40-60% товщини хряща, в якій хондроцити оточені хаотично розміщеними фібрилами колагену II типу з великим вмістом агреканів, ГК та

дерматансульфату. Хондроцити глибокої зони формують своєрідні колонки, пронизані радіально орієнтованим колагеновим матриксом [258, 259]. Подібна структура хряща нами спостерігалася при гістологічному аналізі колінного суглоба щурів за відсутності експериментального ОА.

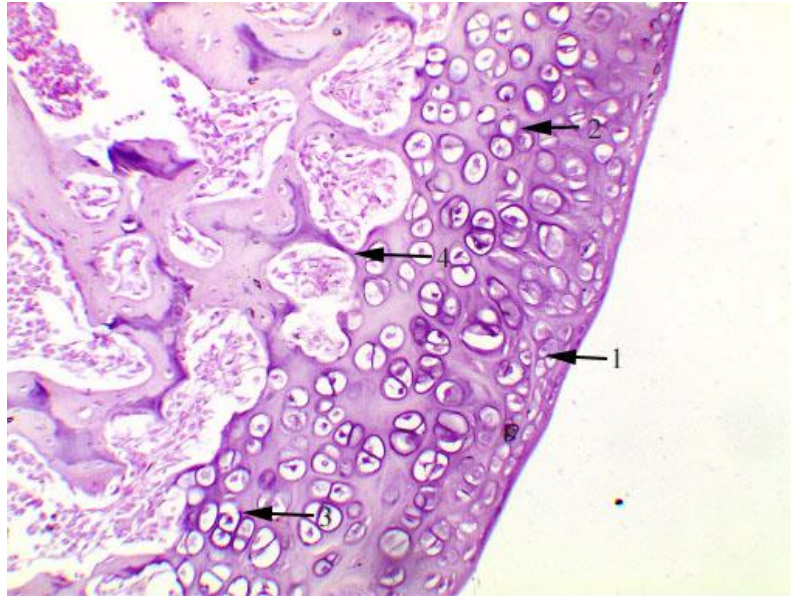


Рис. 4.4 Мікрофотографія зрізу тканини колінного суглоба щурів при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика. Гематоксилін-еозин. $\times 200$. (1 – хондроцити поверхневого шару; 2 – ізогенна група проміжного шару; 3 – хондроцити глибокого (радіального) шару; 4 – субхондральна кісткова тканина)

Встановлено, що експериментальний ОА викликав значну дезорганізацію будови гіалінового хряща колінного суглоба щурів та порушення його гістоархітекtonіки (рис. 4.5). Виявлено запальні, гіперпластичні та деструктивно-дистрофічні зміни у хрящовій та субхондральній кістковій тканинах, як описано [260]. Відмічалось значне зменшення кількості та розмірів хондроцитів. Хрящ втрачав волокнисту структуру, відбувалося його фіброзування, заміна хряща волокнистою сполучною тканиною, місцями практично повна, а також жировою тканиною. Синовіальна тканина була гіперплазована з незначними фіброзними змінами.

Відмічалися значні дефекти суглобової поверхні, вогнищева проліферація зруйнованого хряща з утворенням виростів на поверхні (остеофітів) (рис. 4.5).

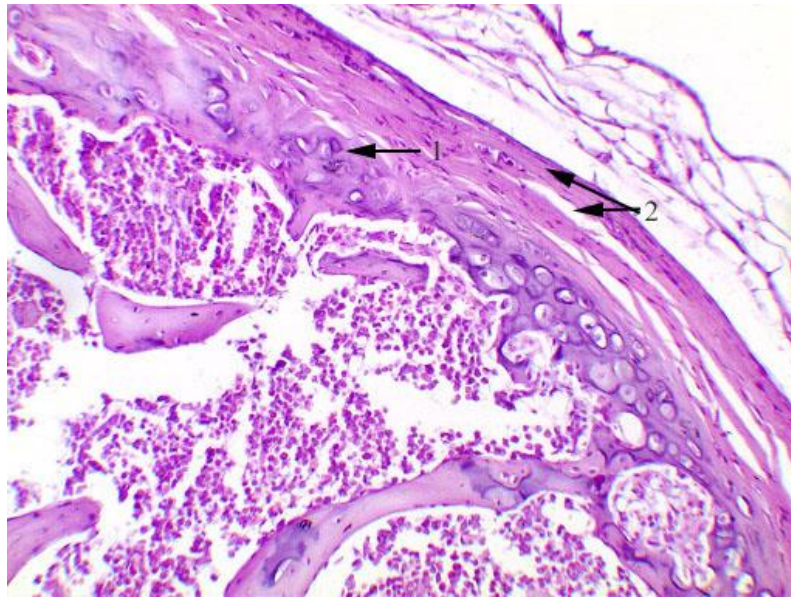


Рис. 4.5 Мікрофотографія зрізу тканини колінного суглоба щурів за експериментального остеоартрититу. Гематоксилін-еозин. $\times 200$. (1 – значне зменшення кількості і розмірів хондроцитів, 2 – заміщення хряща з поверхні фіброзною та жировою тканиною).

Відомо, що при ОА найбільше уражується хрящ, який стає шорстким та втрачає волокнисту структуру. Від нього відокремлюються невеликі частини, які потрапляють в порожнину суглоба і вільно знаходяться в суглобовій рідині, травмуючи синовіальну оболонку. У поверхневих зонах хряща виникають дрібні вогнища дистрофічної петрифікації (зwapнування). У глибоких шарах утворюються крайові остеофіти. У центральній зоні виявляються кісти, сполучені з порожниною суглоба, навколо яких через тиск внутрішньосуглобової рідини також формуються зони окостеніння [261, 262].

За подібних умов у клінічних дослідженнях показано зменшення синтезу колагену II і VI типу хондроцитами пацієнтів з ОА [263] та підвищення синтезу прозапальних цитокінів [264].

Причинами основних морфологічних змін та синовіального запалення за умов ОА є складні біохімічні каскади, за участю протеолітичних ферментів [265]. Активовані синовіоцити та хондроцити синтезують прозапальні цитокіни, зокрема ІЛ-1 та ФНП- α , які стимулюють експресію ММП, що, в свою чергу, регулюють ремоделювання тканин і деградацію позаклітинного матриксу [266]. Також ММП стимулюють функціонування остеокластів і сприяють залученню запальних клітин [267]. Гомеостаз хряща підтримується за рахунок балансу між вмістом агреканів і колагену. Структурні зміни, які пов'язані з дисбалансом процесів синтезу та катаболізму, деградацією макромолекул, значно впливають на функціональні властивості хряща. У зв'язку зі зміною концентрації, розташування та макромолекулярної організації колагенів і ПГ залежно від глибини зони хряща, варіюють біомеханічні властивості кожної зони [268].

Отже, гістологічний аналіз тканин суглоба показав, що введення МЙА, за допомогою якого моделювали експериментальну патологію суглобів, викликало пошкодження хрящової тканини, характерні для розвитку ОА: деструктивно-дистрофічні зміни та запалення.

Після введення хондропротекторного препарату на основі ХС тваринам з експериментальним ОА вираженість дегенеративних змін суглоба зменшувалася. Спостерігалася тенденція до збереження морфологічної структури хряща: поверхня була гладка та рівна, частково зберігалася диференціація зонування хондроцитів. Однак, відмічалось порушення гістоархітекtonіки: частково був виражений фіброз субхондральної поверхні, порушувалося пошарове розташування хондроцитів, відмічено наявність у поверхневому шарі кластерів дрібних хондроцитів, спостерігалось зменшення кількості їх у проміжній зоні, у глибокому шарі містилися гіпертрофовані та вакуолізовані хондроцити, відмічено ділянки їх відсутності, при цьому достатня кількість хондроцитів збережена. Стан синовіальної тканини відповідав нормі (рис. 4.6).

Позитивний ефект ХС у ремоделюванні хрящової тканини може бути пов'язаний з його впливом на синтез структурних білків, зокрема збільшення експресії генів COL2A1 та ACAN [244], а також наявністю ХС у складі протеогліканів екстрацелюлярного матриксу, що визначає його роль у регуляції метаболізму та функцій хондроцитів [269].

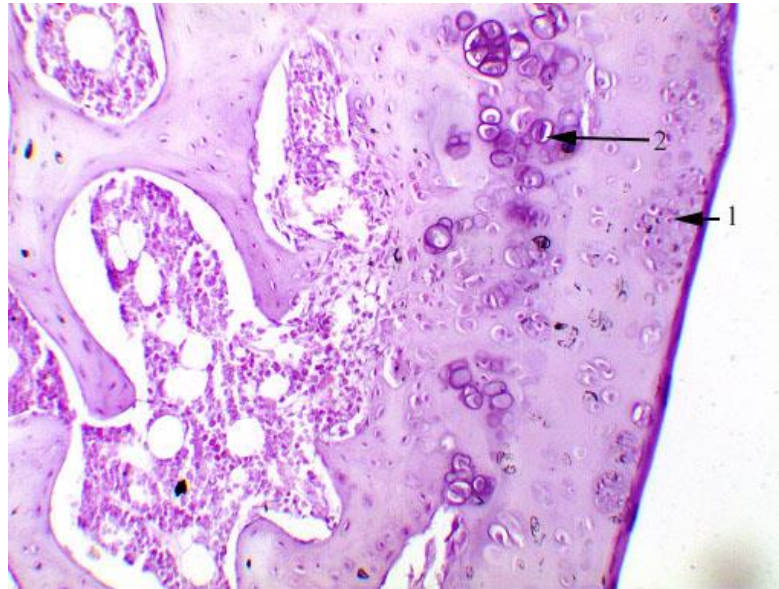


Рис. 4.6 Мікрофотографія зрізу тканини колінного суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату. Гематоксилін-еозин. $\times 200$ (1 – кластери дрібних хондроцитів; 2 – гіпертрофовані хондроцити у глибокому шарі)

Порівнюючи гістологічні зрізи тварин з експериментальним ОА та тварин з МЙА-індукованою патологією, яким вводили ПБ композицію (група ОА+ПБ), слід зазначити, що введення ПБ практично не мало ефекту на пошкоджену структуру хряща. Відмічалось порушення гістоархітектоніки та наявність постнекротичних дефектів, зменшення кількості та розмірів хондроцитів, відсутність поділу на поверхневий, проміжний і глибокий шари хондроцитів. Відмічено присутність хондроцитів глибокого шару, хрящова тканина заміщувалася фіброзною, але вона охоплювала меншу площу, порівняно з гістологічними зразками групи ОА, зберігалася можливість регенерації тканин (рис. 4.7).

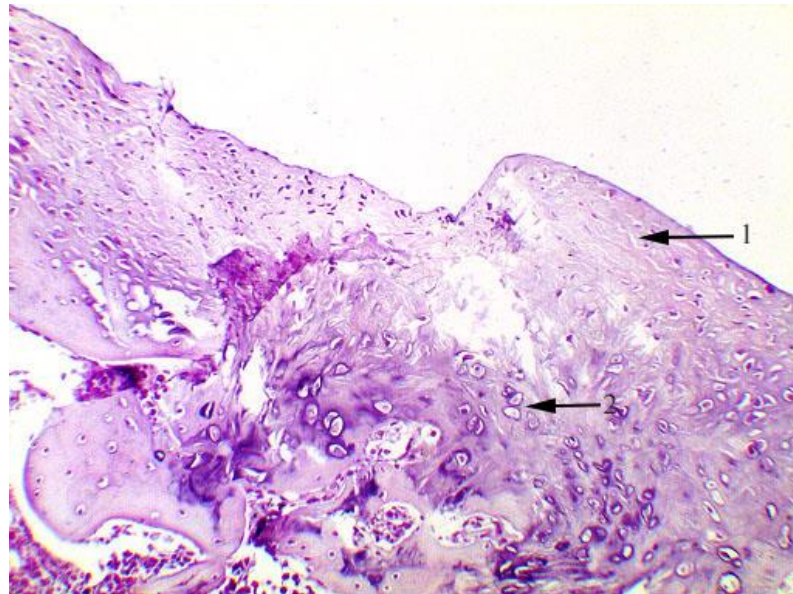


Рис. 4.7 Мікрофотографія зрізу тканини колінного суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні пробіотика. Гематоксилін-еозин. $\times 200$. (1 – заміщення поверхневого шару хрящової поверхні фіброзною тканиною; 2 – хондроцити глибокого шару)

Комбіноване введення ХС і ПБ щурам з експериментальним ОА показало найбільш значущі гістологічні зміни у тканинах суглоба. На мікрорізах тканини не спостерігалися фіброзні елементи та постнекротичні зміни хряща. Кількість хондроцитів наближалася до норми, зберігалася їх зональність: поверхневий шар складався з дрібних хондроцитів, перехідна зона була представлена невеликою кількістю поодиноких та попарних хондроцитів, глибокий шар – помірною кількістю гіпертрофованих хондроцитів (рис. 4.8).

Мікробіота кишечника бере участь у ініціації та прогресуванні захворювань, викликаних запаленням, а дисбіоз є прихованим фактором ризику, який індукує синтез прозапальних цитокінів та бактеріальних метаболітів, які в свою чергу можуть посилювати патофізіологічні механізми ОА [247]. У нещодавніх дослідженнях [270] вперше ідентифіковано мікробну ДНК у хрящах людини та мишей з ОА, однак її роль у хрящевій тканині у патогенезі ОА не становлено.

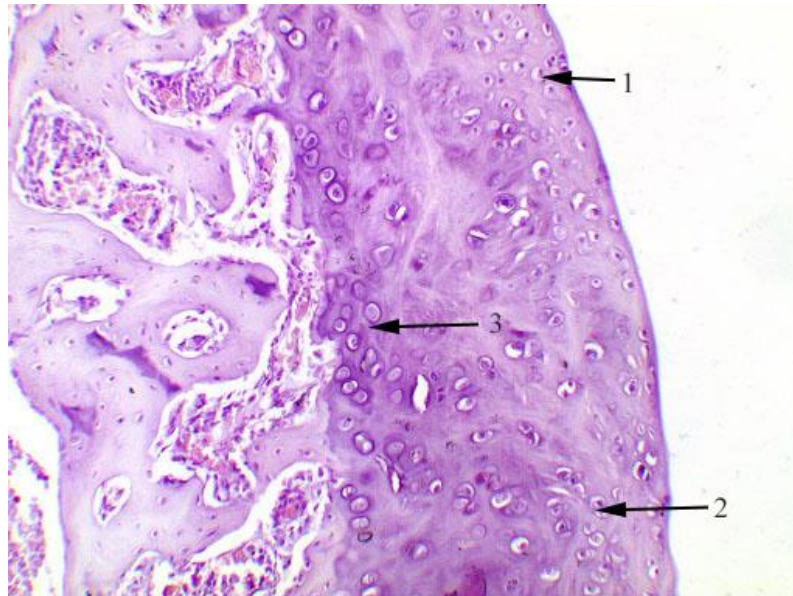


Рис. 4.8 Мікрофотографія зрізу тканини колінного суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика. Гематоксилін-еозин. $\times 200$. (1 – хондроцити поверхневого шару; 2 – перехідна зона представлена невеликою кількістю хондроцитів; 3 – хондроцити глибокого шару).

Вивчення взаємозв'язку між факторами виникнення й розвитку ОА та мікробіотою кишечника є новим рівнем досліджень патогенезу ОА, що може забезпечити нові підходи у терапії патологій ОРА [9]. Сьогодні корекцію порушень мікробіоти кишечника здійснюють за допомогою пробіотиків, пребіотиків, нутріцевтиків, трансплантації фекальної мікробіоти. Schott та ін. довели, що додавання пребіотичного харчового волокна олігофруктози, яке розщеплюючись кишковою мікробіотою в товстій кишці, може впливати на склад мікроорганізмів кишечника, збільшуючи кількість *Bifidobacterium*, яким притаманні протизапальні властивості, що приводить до зменшення системного запалення та колінного суглоба, збереження суглобового хряща та пригнічення структурних змін суглобу, викликаних ожирінням [16]. Подібні результати досліджень відкривають перспективу використання нових терапевтичних підходів у лікуванні ОА.

Таким чином, гістологічний аналіз колінного суглоба щурів з експериментальним ОА показав дегенеративні зміни у тканинах суглоба, характерні для розвитку ОА: встановлено ознаки запалення із помірною лейкоцитарною інфільтрацією, гіперпластичні та деструктивно-дистрофічні зміни у хрящовій та субхондральній кістковій тканинах. Введення ХС порівняно з ПБ більш виражено сприяло відновленню стану суглобових тканин щурів з експериментальним ОА. Найбільш виражений позитивний ефект мало комбіноване введення ХС та ПБ, за якого відбувалося відновлення порушеної гістоархітекtonіки хряща та деструктивно-дистрофічних ушкоджень у хрящовій та субхондральній кістковій тканинах.

Результати, викладені у розділі, опубліковані у наступних працях: [271, 272, 273].

РОЗДІЛ 5

БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ МЕТАБОЛІЗМУ ХРЯЦОВОЇ ТКАНИНИ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРИТУ ПРИ ВВЕДЕННІ ХОНДРОЇТИНУ СУЛЬФАТУ ТА ПРОБІОТИКА

Процеси деградації, що запускаються при ОА направлені не лише на клітини хряща, а й на матрикс хрящової тканини, який складається переважно із фібрил колагену II типу та ПГ (в основному представлених агреканом), ГК, катіонів і води [274, 275]. Хондроцити регулюють ремоделювання хрящової тканини, синтез і деградацію агрекану, а також інших компонентів хрящового матриксу. В нормі дані процеси знаходяться у стані рівноваги, однак при ОА відбувається порушення обміну хрящової тканини у бік переважання катаболічних процесів над анаболічними [276]. Функціональна активність клітин хряща регулюється різноманітними медіаторами, в тому числі прозапальними цитокінами, під дією яких хондроцити синтезують ММП, які викликають деградацію колагену та протеогліканів хряща [277, 278]. Тому визначення рівня біохімічних маркерів хрящової тканини, зокрема: COMP, ACAN, CTSK, CH3L1, ММП, які відіграють ключову роль у процесах ремоделювання та деградації хряща, може слугувати важливим показником метаболічних змін, які відбуваються в хрящовому матриксі, в тому числі й на ранніх стадіях розвитку захворювання.

5.1 Концентрація основних біохімічних показників метаболізму хрящової тканини в сироватці крові щурів

При станах, які супроводжуються пошкодженням суглобового хряща, матриксні компоненти потрапляють у синовіальну рідину, а потім у кров. Найбільший пул маркерів, проаналізований у сироватці крові за умов

розвитку патологій суглобів, включає олігомерний матриксний білок COMP, ГК, С-пропептид колагену II типу (CP-II), N-кінцевий пропептид колагену типу IIА (PIIАНP), епітоп ХС, СТХ-II, перехресно зв'язаний С-кінцевий телопептид колагену I типу (СТХ I), агрекан (CS846) та ММП-3 [279, 280]. Пошук маркерів, визначення яких дозволить найбільш точно прогнозувати розвиток ОА, є перспективним напрямком сучасних наукових досліджень. Серед таких показників може бути зміна білків сироватки крові, які беруть участь у деградації хрящового матриксу, клітинній активації, запаленні та розпаду колагену.

У наших дослідженнях визначено концентрацію у сироватці крові тварин з експериментальним ОА наступних біохімічних маркерів метаболізму хрящової тканини: олігомерного матриксного білка хряща – COMP, протеогліканового ядерного білка агрекану – ACAN, хрящового глікопротеїну-39 – CHI3L1 (YKL-40) і протеолітичного ферменту (лізосомальної цистеїнової протеази) – катепсину К (CTSK), та вивчено вплив на досліджуванні показники введення ХС і ПБ.

COMP, також відомий як тромбоспондин-5 (TSP-5), є неколагеновим кальцій-зв'язуючим глікопротеїном, який присутній у позаклітинному матриксі суглобового хряща, а також виявляється в багатьох інших тканинах, включаючи синовіальні оболонки, зв'язки і сухожилля [281]. Інтактний COMP зв'язує колаген I, II та IX типу, створюючи міцну колагенову сітку хряща, таким чином забезпечує стабільну структуру екстрацелюлярного матриксу [282]. Синтез COMP та надмірна його кількість у хрящовому матриксі суттєво зростає на ранніх стадіях ОА [283].

ACAN – основний протеоглікан суглобового хряща, який становить близько 90% загальної маси протеогліканів хрящового матриксу, має переплетену структуру, де ковалентно зв'язані глікозаміногліканові ланцюги ХС та кератану сульфату прикріплені до стрижневого білка масою 230 кД. Агрекан дуже важливий у гіалінових хрящах, так як зв'язує фібрили колагену II типу і утримує воду, забезпечуючи нормальне функціонування хрящової

тканини. Молекули ACAN синтезуються хондроцитами і секретуються у позаклітинний матрикс, де вони формують агрегати, стабілізовані молекулами зв'язувальних білків [284, 285].

CHI3L1 - хітиназо-3-подібний протеїн-1 синтезується хондроцитами, синовіальними клітинами, активованими макрофагами, нейтрофілами та фібробласт-подібними клітинами [286]. Його секреція посилюється за умов ряду захворювань, які характеризуються хронічним запаленням та ремоделюванням тканин, серед яких важливе місце займає ОА [287].

CTSK – це один із лізосомальних протеолітичних ферментів, який секретується переважно активованими остеокластами, а також синовіальними фібробластами і хондроцитами, здатний руйнувати фібрилярну структуру колагену I і II типу та агрекан. Експресія CTSK у хондроцитах стимулюється запальними цитокінами [288, 289].

Встановлено, що концентрація COMP, ACAN, CHI3L1 та CTSK у сироватці крові тварин з експериментальним ОА зростала в 3,4 рази ($p \leq 0,001$), 3 рази ($p \leq 0,001$), 2,5 рази ($p \leq 0,001$) і у 2,2 рази ($p \leq 0,001$) відповідно, порівняно з контролем (табл. 5.1).

Таке підвищення концентрації білків хрящового матриксу у сироватці крові щурів з МІА-індукованою патологією суглобів пов'язано з розвитком хронічного запалення, внаслідок якого синтезуються катаболічні білки, що призводить до інтенсифікації ферментативного лізису компонентів позаклітинного матриксу, при цьому залишкові ланцюги можуть надходити в кров'яне русло [290].

У дослідженнях, присвячених патогенезу ОА, показано високу кореляцію між рівнем COMP у сироватці крові, результатами гістологічного аналізу та ступенем тяжкості перебігу захворювання [291, 292, 293]. Зростання рівня олігомерного матриксного білку у крові може бути пов'язано з підвищенням швидкості деградації позаклітинного матриксу хрящової тканини та відображати ступінь денатурації колагену II типу [294]. Існують дані про те, що рівень COMP у сироватці знижується при збільшенні

тривалості перебігу захворювання та на пізніх його стадіях, оскільки за тривалого патологічного ремоделювання кількість хондроцитів зменшується і вони не в змозі у повній мірі забезпечити відновлення хрящового матриксу, що приводить до посилення його деградації [295]. Дане спостереження підтверджується у дослідженнях, у яких встановлено наявність в ураженому остеоартрозом хрящовому матриксу протеїназ, які руйнують молекули матриксу, включаючи COMP [282]. Тому визначення рівня COMP у сироватці крові може бути використано у якості діагностичного маркера розвитку ОА та прогнозування ризиків швидкого прогресування патології суглобів.

Таблиця 5.1

Концентрація COMP, ACAN, CTSK, CH3L1 в сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика (середнє±SD, n=14)

Показник Групи тварин	COMP, нг × мл ⁻¹	ACAN, нг × мл ⁻¹	CH3L1 нг × мл ⁻¹	CTSK нг × мл ⁻¹
Контроль	56,3±3,8	51,7±5,5	35,8±3,4	16,5±1,6
ХС	50,8±4,5	44,0±4,3	35,0±3,5	15,5±1,2
ПБ	55,2±3,9	49,2±4,4	34,3±3,2	16,5±1,3
ХС+ПБ	55,9±3,3	46,8±5,7	32,9±3,2	15±1,1
ОА	190,4±16***	155,1±15,7***	89,9±8,2***	36,0±3,2***
ОА+ХС	100,8±9,5***/###	103,5±9,3***/###	61,9±5,4***/###	25,5±2,3*/###
ОА+ПБ	126,9±12,0***/###	119,2±9,7***/###	64,7±5,9***/###	26,0±2,3*/###
ОА+ХС+ПБ	76,0±7,2*/###	68,7±7,2*/###	44,8±4,4*/###	20,2±1,9*/###

*** – $p \leq 0,001$ та * – $p \leq 0,05$ відносно контрольних тварин; ### – $p \leq 0,001$ відносно тварин групи ОА

В умовах посилення катаболічних процесів у сироватці крові виявляються різноманітні фрагменти агрекану, які утворюються під дією протеолітичних ферментів – ММП та агреканаз, що свідчить про зміни молекул ACAN при OA. ACAN є одним із перших білків, які деградує у суглобовому хрящі на ранніх стадіях розвитку OA, під дією агреканаз на стрижневий білок. Деградація агрекану та колагену, обумовлена дією ММП, відбувається на більш пізніх стадіях розвитку захворювання [296]. Продукти деградації, фрагменти ACAN виводяться в синовіальну рідину та кров, і їхнє аномальне підвищення в біологічних рідинах може також слугувати маркером порушення метаболізму хряща за умов розвитку захворювань суглобів [297].

У дослідженнях [296] показано, що за умов терапевтичних заходів при OA посилюються анаболічні процеси та підвищується вміст ПГ, відбувається відновлення хряща. Однак, синтезовані знову молекули ACAN не одразу виявляють здатність зв'язуватись з ГК та утворювати агрегати, тому їх кількість і розмір агрегатів значно зменшується з віком.

Підвищення концентрації CH3L1 у сироватці крові за умов МІА-індукованого OA корелює з результатами попередніх робіт та є наслідком активації сигнальних каскадів за участю прозапальних цитокінів ІЛ-1 β , ФНП- α , та ядерного фактора NF- κ B [298, 299]. Сигнальний шлях NF- κ B є ключовою ланкою запальної відповіді хондроцитів, що призводить до прогресуючого пошкодження екстрацелюлярного матриксу та деструкції хряща [300]. Відомо, що CH3L1 стимулює проліферацію клітин та модулює рівень експресії хемокінів і ММП у запальних фібробластах [301].

Показано, що ІЛ-1 β сприяв утворенню CH3L1 в клітинних лініях SW480 та T84. Подібний ефект викликали ФНП- α та ІФН- γ , тоді як протизапальний цитокін ІЛ-4 пригнічував синтез CH3L1 у активованих макрофагах [302]. Стимуляція ІЛ-6, ІЛ-17 та ІЛ-18 індукувала секрецію CH3L1 у хондроцитах [303], тоді як ІЛ-7, ІЛ-11, ІЛ-12, тромбоцитарний фактор росту та основний фактор росту фібробластів не мали подібних

ефектів на синтез і секрецію СНЗL1 у культурах хондроцитів і хрящових експлантатів людини. ІФР-I та ІФР-II стимулювали синтез СНЗL1 в хондроцитах морських свинок, однак не мали ефектів на хондроцити людини [304]

Згідно імуногістологічного аналізу, який проведено у дослідженнях [305], у хондроцитах хряща хворих на ОА виявлялася надекспресія СНЗL1, тоді як за відсутності патології експресія хітиназо-3-подібного білку була слабкою або не виявлялася [306].

Підвищення СНЗL1 у крові при розвитку патології суглобів є одним із ключових сигналів системного запалення, маркером деградації хрящового матриксу та порушення метаболізму кісткової тканини [307].

CTSK – цистеїнова лізосомальна протеїназа, бере участь у деградації та ремоделюванні білків екстрацелюлярного матриксу й регуляції імунної відповіді. Відомо, що лізосоми залучаються до процесів нейтралізації етіологічних факторів запалення. Встановлене підвищення концентрації CTSK у сироватці крові щурів з експериментальною ОА може бути зумовлено порушенням проникності як мембран лізосом з наступним вивільненням їх вмісту в цитозоль, так і зміною проникності клітинних мембран. Крім того, вивільнення катепсинів у цитозоль відбувається в результаті порушення ПОЛ, наявності окиснених форм ліпідів низької щільності та накопичення АФК [308]. Зростання АФК та ПОЛ за умов експериментального ОА встановлено у наших дослідженнях [309].

Інгібування активності протеази CTSK є важливим для попередження ерозії кісток, деградації хрящової тканини та зменшення утворення остеофітів. Слід зазначити, що інактивація CTSK приводить до блокування шляхів TLR, пригнічення секреції цитокінів імунними клітинами та зменшення запалення [310].

Дегенеративні зміни у суглобі за умов ОА у першу чергу пов'язані з порушенням структури хрящової тканини та недостатністю основного протеоглікану хрящового матриксу – ХС [311]. У досліджах *in vitro* показано,

що хондропротектор може взаємодіяти з компонентами позаклітинного матриксу та сприяє редиференціюванню хондроцитів шляхом активації мезенхімальних клітин-попередників [312]. Тому є доцільним застосування препаратів, які містять сульфатовану форму цієї речовини, при захворюваннях суглобів для відновлення структури хряща, гальмування процесів деградації та пригнічення запалення.

Концентрація білків хрящового матриксу COMP, ACAN, CHI3L1 та CTSK у сироватці крові у тварин з експериментальним ОА, яким вводили хондропротекторний препарат на основі ХС зменшувалась в 1,9 ($p \leq 0,001$), 1,5 ($p \leq 0,001$), 1,5 ($p \leq 0,001$) і в 1,4 раза ($p \leq 0,001$) відповідно, відносно тварин групи ОА, однак лишалася вищою за контрольні значення в 1,8 ($p \leq 0,001$), 2 ($p \leq 0,001$), 1,7 ($p \leq 0,001$) і в 1,6 раза ($p \leq 0,05$) відповідно (табл. 5.1).

Підсумовуючи отримані дані, можна зробити висновок, що використання ХС лише частково наближало концентрацію вище зазначених структурних компонентів хрящової тканини до контрольних значень, отже застосування лише хондропротектора не призводило до відновлення метаболічних порушень у хрящі.

У нещодавніх дослідженнях виявлено, що ХС може впливати на функціональний стан мікробіоти ШКТ як за фізіологічних умов, так і під час дії стресорів, модулюючи імунну відповідь організму [313].

Слизова кишечника активно взаємодіє з його мікробіотою та забезпечує гомеостаз організму в цілому. Показано, що лікування пробіотиками сприяло покращенню процесів обміну кісток, зменшувало біль і запальні реакції при порушеннях ОРА [192, 314]. Тому доцільним є вивчення механізмів впливу кишкової мікробіоти на розвиток метаболічних змін хряща в умовах ОА

Встановлено, що при введенні ПБ композиції щурам з експериментальним ОА концентрація COMP, ACAN, CHI3L1 та CTSK була нижчою в 1,5 ($p \leq 0,001$), 1,3 ($p \leq 0,001$), 1,4 ($p \leq 0,001$) та 1,4 раза ($p \leq 0,001$) відповідно, ніж у тварин групи ОА; однак лишалася підвищеною відносно

рівня контролю у 2,3 ($p \leq 0,001$), 2 ($p \leq 0,001$), 1,8 ($p \leq 0,001$) та в 1,6 рази ($p \leq 0,05$) відповідно (табл. 5.1).

За комбінованого введення ХС і ПБ у щурів із експериментальним ОА концентрація відповідних білків зменшувалася у 2,5 ($p \leq 0,001$), 2,3 ($p \leq 0,001$), 2 ($p \leq 0,001$) та в 1,8 рази ($p \leq 0,001$) відповідно, відносно тварин групи ОА, однак лишалася вищою за контрольні значення в 1,4 ($p \leq 0,05$), 1,3 ($p \leq 0,05$), 1,3 ($p \leq 0,05$) і в 1,2 рази ($p \leq 0,05$) відповідно (табл. 5.1).

Концентрація білків хрящового матриксу COMP, ACAN, CH3L1 та CTSK у сироватці крові тварин, яким вводили ХС та ПБ окремо, а також при сумісному їх використанні за відсутності експериментальної патології суглобів знаходилась у межах контрольних значень (табл. 5.1).

Можна припустити, що виявлене підвищення концентрації досліджуваних компонентів хрящового матриксу у сироватці крові за експериментального ОА, а також при введенні ХС та ПБ, може бути пов'язано з регуляцією цитокінового профілю і модуляцією синтезу про- та протизапальних цитокінів, та підтверджує один із механізмів впливу запалення на стан мікробіому кишечника. Зміна різноманіття мікробіому може впливати на інтенсивність утворення патоген-асоційованих молекулярних патернів та стимуляцію прозапальних процесів і катаболізму хрящової тканини. Тому ведення ПБ разом з ХС, який є складовим компонентом агрекану, може позитивно впливати на метаболізм хрящового матриксу та його структуру, відновлювати регуляцію вище зазначених процесів завдяки корекції кількісного та видового складу кишкової мікробіоти.

Крім того, слід зазначити, що CH3L1 входить до родини хітиназ/хітотріозидаз, що мають гідролітичну активність відносно бактеріальних клітинних стінок, у складі яких наявний N-ацетиглюкозамін, тому є припущення, що даний білок бере участь у захисті від мікроорганізмів: білок CH3L1 здатний взаємодіяти з бактеріальною

хітиназаю ChiA через домени, що зв'язують хітин, та сприяти опосередкованій адгезії та агрегації бактеріальних колоній в ШКТ [315, 316].

Таким чином, посилення синтезу глікопротеїнів COMP, ACAN, CHI3L1 та протеолітичного фермента CTSK у сироватці крові щурів за умов експериментального ОА може свідчити про надмірне запалення, подальшу деградацію нативного фібрилярного колагену та порушення функцій суглобів, що може корелювати з тяжкістю перебігу захворювання. ХС та ПБ здатні частково відновлювати, при комбінації більш виражено, рівень структурних компонентів хрящового матриксу у сироватці крові щурів з експериментальною патологією, та зміщувати метаболізм хрящової тканини до фізіологічного рівня.

5.2 Вміст матриксних металопротеїназ у сироватці крові та хрящовій тканині суглоба щурів

Важливу роль у формуванні остеоартритів виконує система протеолізу. Функціональними представниками даної системи є ММП, які беруть участь у деструкції суглобових тканин. ММП належать до родини цинк- та кальцій-залежних ендопептидаз, та безпосередньо впливають на метаболізм компонентів екстрацелюлярного матриксу суглобового хряща: є основним фактором деградації ПГ та колагену II типу, забезпечують подальше розщеплення денатурованих фібрил колагену, руйнують агрекан [317].

Значення ММП за умов розвитку патологій ОРА є актуальною темою сучасних наукових досліджень. Встановлено, що ММП задіяні не тільки у процеси деградації хрящової тканини, а й беруть участь у підтримці гомеостазу хряща за відсутності патології. Представлені експериментальні дані, у яких зазначено, що мРНК ММП-1, -2, -3 та -13 постійно експресується у суглобовому хрящі, а продукти деградації агреканів виявляються у синовіальній рідині людей за відсутності патології суглобів [318, 319].

ММП у суглобі продукуються переважно синовіоцитами, хондроцитами, фібробластами, макрофагами та остеобластами. Їх синтез та секреція знаходяться під контролем цитокінів, факторів росту, інтегринів та таких хімічних сполук, як форболові ефіри, ЛПС, простагландин Е. Але в основному ММП секретуються під дією прозапальних цитокінів [320, 321]. За специфічністю ММП поділяють на колагенази (ММП-1, -8 -13), які забезпечують гідроліз колагенів; желатинази (ММП-2 і -9), які активно руйнують денатуровані колагени; та стромелізини (ММП-3, -10, -11), які активують інші ММП та руйнують більшість компонентів зовнішньоклітинного матриксу.

Нами досліджено вміст ММП-1, -2, -3, та -8, які є важливими у деструкції хрящового матриксу суглоба, у сироватці крові та хрящовій тканині щурів за умов експериментального ОА, та за умов дії хондропротекторного препарату на основі ХС і ПБ. Встановлено, що при МЙА-індукованому ОА вміст ММП у сироватці крові щурів підвищувався: ММП-1 та ММП-8 – в 1,5 рази ($p \leq 0,05$), ММП-2 – в 1,7 рази ($p \leq 0,05$), ММП-3 – в 1,8 рази ($p \leq 0,05$), порівняно з контрольною групою тварин (рис.5.1). Підвищення вмісту ММП у сироватці крові може свідчити про розвиток деструктивних процесів у колінному суглобі щурів за умов МЙА-індукованого ОА [322].

При введенні ХС тваринам з експериментальною патологією вміст досліджуваних ММП у сироватці крові знижувався: ММП-1 та ММП-3 – в 1,3 рази ($p \leq 0,05$), ММП-2 і ММП-8 – в 1,4 рази ($p \leq 0,05$) відповідно, відносно групи тварин з ОА, однак, значення вмісту усіх досліджуваних ММП достовірно перебували вище значень тварин контрольної групи (рис.5.1).

При введенні ПБ щурам з МЙА-індукованим ОА вміст ММП у сироватці крові зменшувався: ММП-1 та ММП-8 – в 1,3 рази ($p \leq 0,05$), ММП-3 – в 1,2 рази ($p \leq 0,05$) відповідно, порівняно з групою щурів з експериментальним ОА, тоді як у випадку ММП-2 не відбувалось

достовірних змін вмісту цього показника (рис. 5.1).

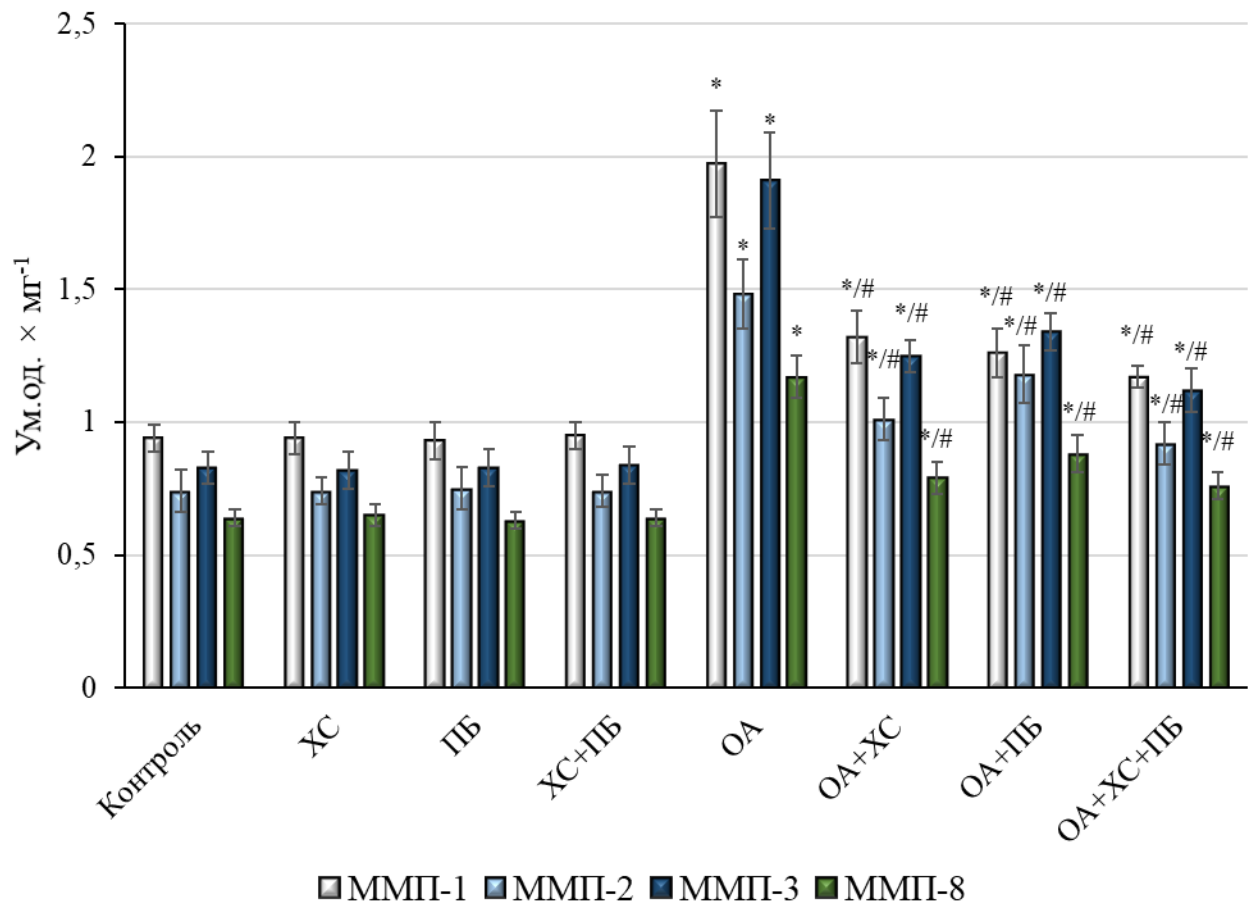


Рис. 5.1 Вміст матричних металопротеїназ у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика, Ум. од. × мг⁻¹ (M±m, n=14; * – p≤0,05 відносно контролю; # – p≤0,05 відносно щурів групи ОА)

За умов комбінованого введення препаратів у тварин з експериментальним ОА відбувалось зниження вмісту ММП: ММП-1 – 1,3 раза (p≤0,05), ММП-2, ММП-3 та ММП-8 – в 1,4 раза (p≤0,05) відповідно, відносно групи тварин з ОА, при чому значення вмісту ММП-8 достовірно досягали рівня контролю. При введенні як ХС, так і ПБ, окремо і разом інтактним щурам досліджувані показники перебували в межах контрольних значень (рис. 5.1).

У хрящовій тканині суглоба щурів за умов експериментального ОА спостерігалось більш виражене зростання вмісту ММП: ММП-1 – в 4,3 раза ($p \leq 0,05$), ММП-2 – в 2,7 раза ($p \leq 0,05$), ММП-3 – в 3,8 раза ($p \leq 0,05$), ММП-8 – в 3,1 раза ($p \leq 0,05$), порівняно з контрольною групою тварин (рис. 5.2).

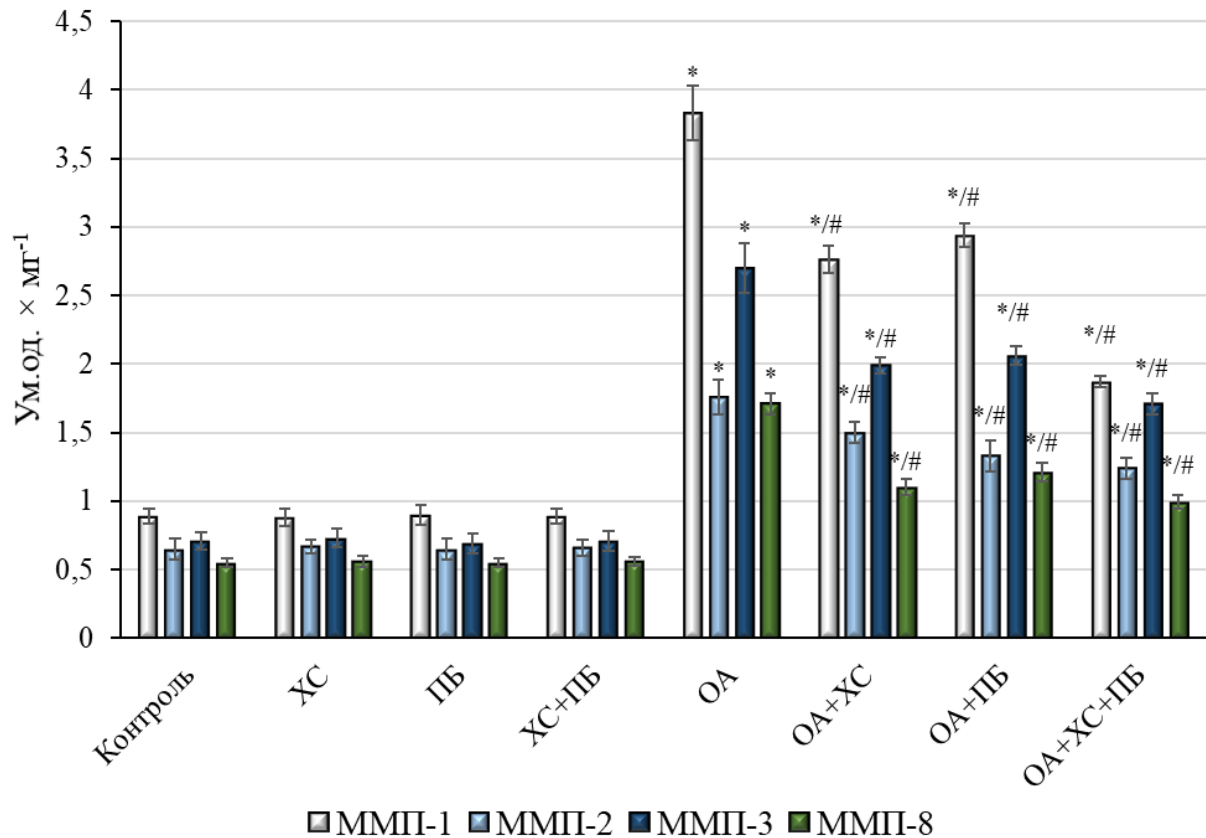


Рис. 5.2 Вміст матричних металопротеїназ у хрящовій тканині суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика, Ум. од. \times мг⁻¹ ($M \pm m$, $n=14$; * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно щурів групи ОА)

Отримані нами експериментальні результати узгоджувалися з даними інших досліджень, в яких показано підвищення рівня ММП у сироватці крові, тканинах суглоба та синовіальній рідині на фоні дегенеративно-дистрофічних процесів у суглобі за експериментальних моделей ОА. Також

виявлялася підвищена експресія ММП у хрящі з ОА [323].

За умов розвитку патології суглобів ММП утворюють у зоні резорбції кістки та хряща комплекси, що складаються з двох С-телопептидів молекул колагену I і II типу. Ці комплекси потрапляють у кров, однак їхня структура не є стабільною, і вони руйнуються під дією катепсину К, а також протеолітичних ферментів, у результаті чого в крові виявляються фрагменти С-телопептиду. За умов ОА спостерігалось підвищення рівня ММП у сироватці крові, тканинах і синовіальній рідині [70, 324]. Підвищення концентрації ММП при патології суглобів співпадало з високим рівнем мРНК у тканинах та підвищенням кількості проММП у синовіальній рідині [325]. Крім того, у дослідженнях [319, 326] показано, що існує дисбаланс між ММП та їх тканинними інгібіторами ТІМР у бік ММП за умов патологічних станів суглобів.

Не дивлячись на те, що ММП-2 переважно бере участь у протеолізі колагену IV та V типів, також вона може залучатися до руйнування хрящового колагену II типу, денатурованого активованою ММП-1 [327]. ММП-3 руйнує компоненти суглобових тканин, такі як желатин, агрекан та колаген III, IV, IX и X типів, а також активує про-ММП-1, -7, -8, -9 і 13, тому ММП-3 вважають системним маркером, який відображає локальне запалення суглоба [328]. Колагенази ММП-1 та ММП-8 можуть розщеплювати інтактний колаген II типу, один із основних компонентів суглобового хряща, на фрагменти, які у подальшому можуть підлягати протеолізу желатиназами [329]. ММП-8 (відома як нейтрофільна колагеназа) міститься у специфічних гранулах поліморфноядерних лейкоцитів у неактивній формі проферменту. При стимуляції цитокінами, такими як ІЛ-1, ІЛ-8, ФНП- α та гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор, ММП-8 вивільняється із нейтрофілів та розщеплює компоненти зовнішньоклітинного матриксу хряща [330].

Відомо, що запальні цитокіни стимулюють синтез ММП, які руйнують компоненти позаклітинного матриксу за умов ОА. Зазвичай матриксні

протеолітичні ферменти експресуються в незначній кількості і їх транскрипція регулюється як в анаболічний, так і катаболічний бік цитокінами та факторами росту: ІЛ-1, ІЛ-4, ІЛ-6, ІФР, ТФР- β та ФНП- α . Деякі з цих молекул, в свою чергу, можуть інактивуватися протеолітичним зворотнім шляхом за участю ММП, тобто можуть бути субстратами для ММП [331]. Так, прозапальний цитокін ІЛ-1 β може бути інактивований ММП-1, -2, та -3. При деградації білків матриксу за участю ММП-2 та ММП-3 може вивільнятися та накопичуватися у матриксі ТФР- β 1 [332], підвищення вмісту якого у сироватці крові та хрящовій тканині суглоба щурів з ОА встановлено у наших експериментальних дослідженнях. Також нами показано порушення балансу катаболічних цитокінів ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-8 та ІФН- γ та анаболічних протизапальних цитокінів ІЛ-4, ІЛ-10 та ІФР-1 у сироватці крові та хрящовій тканині суглоба щурів з експериментальним ОА, що свідчило про розвиток запалення та розвиток деструктивних процесів у тканинах суглоба.

При введенні ХС тваринам з експериментальним ОА вміст досліджуваних ММП у хрящовій тканині знижувався: ММП-1 та ММП-3 – в 1,4 раза ($p \leq 0,05$), ММП-2 – в 1,2 раза ($p \leq 0,05$), ММП-8 – в 1,6 раза ($p \leq 0,05$) відносно тварин групи ОА (рис. 5.2).

При введенні ПБ щурам з експериментальним ОА вміст ММП-1, ММП-2, ММП-3 зменшувався – в 1,2 раза ($p \leq 0,05$), ММП-8 – в 1,4 раза ($p \leq 0,05$) відповідно, порівняно з групою щурів з ОА (рис. 5.2).

За умов комбінації ХС та ПБ у тварин з експериментальним ОА у хрящовій тканині відбувалось зниження вмісту ММП: ММП-1 – 2 рази ($p \leq 0,05$), ММП-2 – 1,4 раза ($p \leq 0,05$), ММП-3 – в 1,6 раза ($p \leq 0,05$) та ММП-8 – в 1,7 раза ($p \leq 0,05$) відносно групи тварин з ОА. Однак, значення вмісту усіх досліджуваних протеолітичних ферментів у щурів з експериментальною патологією при введенні ХС і ПБ перебували вище контрольних (рис. 5.2).

Таким чином, введення ХС показує модулюючу дію хондропротектора на протеолітичні ферменти хрящового матриксу, які беруть участь у ремоделюванні та деградації структурних компонентів сполучної тканини. У дослідженнях встановлено, що ХС та ГАС знижують рівень колагеназ ММП-1, ММП-2 та ММП-13, які розщеплюють колаген [333, 334], що призводить до зменшення деградації хряща. Також ХС підвищує рівень ММП-3, яка викликає деградацію фібронектину, коллагену III, IV, X та IX типів, хондроїтину протеогліканів хряща, та агреканизи ADAMTS1, яка розщеплює ПГ хряща агрекан у місці прикріплення ХС [335].

Зниження вмісту ММП при дії ПБ композиції може бути пов'язано з її здатністю ефективно відновлювати порушений мікроекологічний баланс та гомеостаз організму завдяки здатності бактеріальних штамів у складі мультипробіотика синтезувати біологічно активні метаболіти та зменшувати розвиток запальних процесів як на системному, так і на місцевому рівні, та інгібувати активність протеолітичних ферментів хрящового матриксу [10]

У експериментах на тваринах, у яких моделювали ОА, показано позитивний ефект введення ПБ, який містив мікроорганізми *L. Casei*, за рахунок регуляції функції ефектора Th1, яка полягала у збільшенні експресії прозапального цитокіну ІЛ-10 [336]. Пізніше, більш детальні дослідження показали зниження рівня ІЛ-1 β , ФНП- α , ММП-1 та ММП-3 при введенні ПБ [337]. У клінічних дослідженнях показано ефективність комплексного застосування *Lactobacillus* у лікуванні різних патологій, наприклад, захворювання нирок, маститу, патологій ШКТ, інсулінорезистентності, артриту та при імуномодулюючій терапії [338, 339]. Використання багатокомпонентних ПБ показало значну перевагу над моно-штамними на моделях ожиріння у щурів; показано здатність мульти-ПБ впливати на різні клітинні рецептори та синтезувати біологічно активні сполуки [340, 341]. Також встановлено позитивний ефект використання ПБ на регуляцію запальних цитокінів у сироватці крові за умов безалкогольної жирової хвороби печінки [342, 343]. У нашому дослідженні встановлено сприятливий

ефект введення ПБ на рівень про- та протизапальних цитокінів, структурних компонентів матриксу хрящової тканини та вміст ММП у сироватці крові та хрящовій тканині щурів з експериментальним ОА.

Таким чином, отримані нами результати дослідження можуть свідчити про деградацію хрящової тканини та запалення у щурів після експериментального моделювання ОА. Ведення ХС і ПБ, особливо їх сумісне застосування, сприяло зменшенню протеолітичних показників метаболізму хрящової тканини та розвитку деструктивних процесів у колінному суглобі щурів за умов експериментального ОА. Визначення рівня ММП у сироватці крові може бути потенційним біохімічним маркером деградації хрящового матриксу та ОА колінного суглоба.

5.3 Експресія структурних генів *Col2a1*, *Acan* та *Comr* у хрящовій тканині суглоба щурів

Важливим напрямком сучасних наукових досліджень є вивчення закономірностей та механізмів метаболічних зсувів у різних органах в умовах патології, виявлення молекулярно-генетичних маркерів патогенезу захворювання, що дозволяє встановити найбільш чутливі параметри, наприклад, зміни генної експресії, для своєчасного прогнозування важкості перебігу та розробки обґрунтованих схем лікування [344].

Розвиток запалення, деструктивних змін тканин суглобів, ендогенної інтоксикації, порушення зональності хондроцитів та структури хрящового матриксу можуть призвести до зміни метаболізму клітин хряща на генетичному рівні, а саме, можлива активація генів, що залучені до деградації хряща. Гени, які впливають на морфологію хряща й навколосуглобових тканин при ОА, поділяють на структурні гени, та гени, що регулюють експресію генів сполучної тканини [345]. До структурних генів відносять такі, що кодують переважно білки матриксу сполучної тканини, які, у свою чергу, кодують однойменні колагени (фібрилярні білки,

що утворюють основу сполучної тканини організму (кістки, хрящі, тощо) і забезпечують її міцність та еластичність.

Col2a1 – ген, який кодує однойменний колаген II типу COL2A1 (англ. Collagen type II alpha 1 chain). Мутації в гені COL2A1 призводять до утворення дефектного колагена та порушення структури тканин суглоба. У дослідженнях показано структурні зміни (мутації, поліморфізм), наприклад, заміну аргініну на цистеїн у положенні 519 гена COL2A1, що призводило до виникнення раннього ОА та хондродисплазії у людей [346]. У той же час, показано зв'язок між зміною експресії цього гена (зокрема, її зниження) у хондроцитах та синовіоцитах та проявами патології суглобів на тваринних моделях та у людей [347]. Підтверджено важливе значення даного гена в патогенезі ОА: у мишей з мутацією гена *Col2a1* спостерігались тяжкі порушення, які викликали не тільки ахондроплазію, а й ранній розвиток ОА суглобів, навіть призводили до порушення остеогенезу [348].

Acnp кодує хрящовий протеоглікановий білок агрекан. Показано, що мутація гена ACAN у людини, може привести до дисплазії, у той час, як нестача агрекану може зумовити розвиток артритів різної етіології, а також інших захворювань суглобів [275].

У дослідженнях [349] показано зв'язок зниження рівня експресії гена *Comr* та, відповідно, збільшення концентрації олігомерного матричного білка COMP, який він кодує, у сироватці крові хворих на ОА з прогресуючою деструкцією суглобового хряща. Існують дані, що мутації генів ACAN та COMP у людей можуть призвести до виникнення різного ступеню ахондроплазії, спондилоепіфізарної дисплазії суглобів та розвитку генералізованого ОА [275, 349]. Зниження експресії мРНК колагену II типу та агрекану на фоні активації експресії мРНК генів, залучених до змін проліферації, розвитку запалення та окисного стресу, може підтримувати хронічну фазу захворювання та посилювати деградацію хрящової тканини.

У проведених нами експериментальних дослідженнях показано, що рівень експресії гена *Col2a1* у хрящах колінного суглоба щурів у групі

тварин з МІА-індукованим ОА знижувався в 4,1 раза ($p \leq 0,001$) порівняно з контрольними тваринами (рис. 5.3).

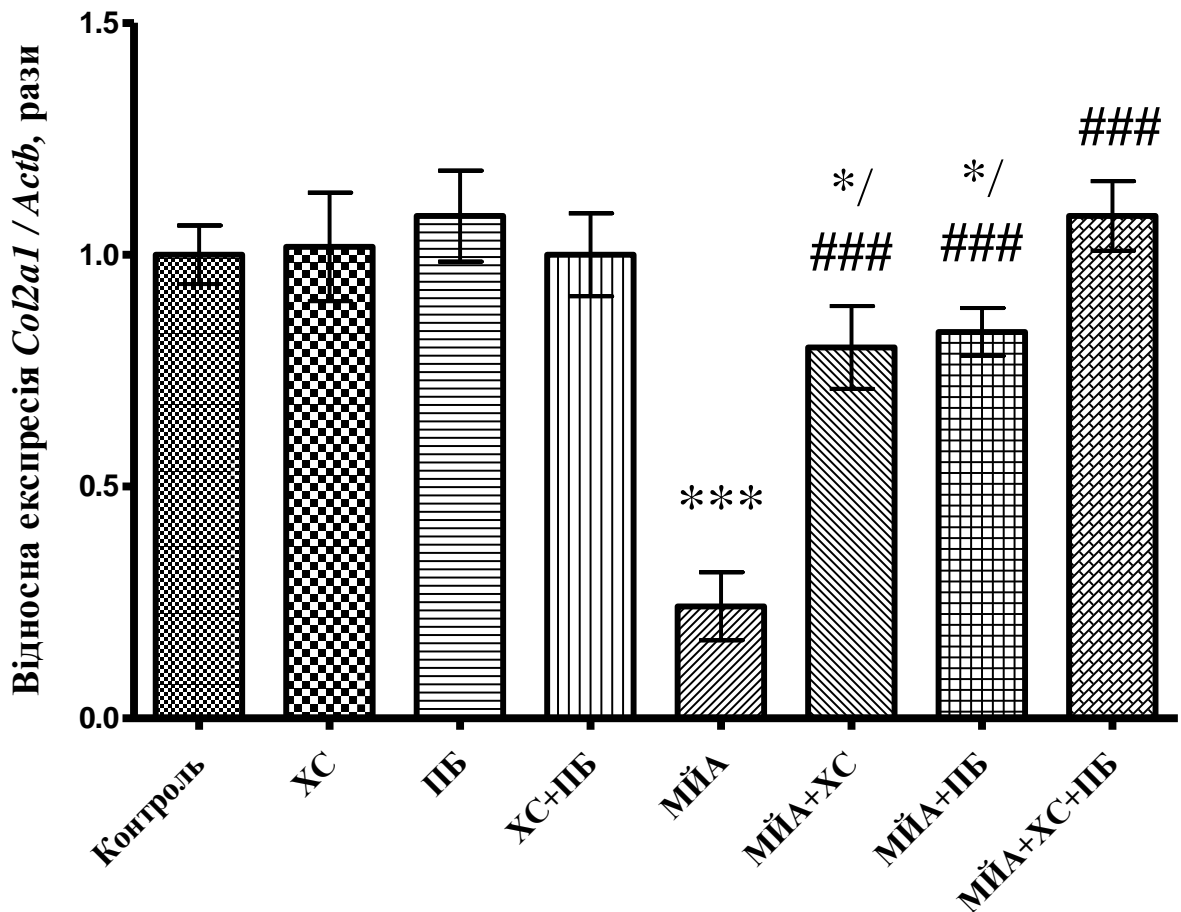


Рис. 5.3 Рівень експресії гена *Col2a1* у хрящах колінного суглоба щурів за умов експериментального остеоартиту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; *** – $p \leq 0,001$, * – $p \leq 0,05$ відносно контрольних тварин; ### – $p \leq 0,001$ відносно тварин групи ОА)

У групах щурів ХС, ПБ та ХС+ПБ рівень експресії цього гена знаходився в межах значень контрольної групи. При введенні ХС тваринам з експериментальним ОА рівень експресії відповідного гена підвищувався у 3,3 раза ($p \leq 0,001$) відносно тварин з ОА, проте лишався нижчим майже в 1,3 раза, порівняно з контрольними тваринами ($p \leq 0,05$). При введенні ПБ тваринам з експериментальною патологією рівень гена *Col2a1* був у 3,5 рази ($p \leq 0,001$) вищим, ніж у тварин групи ОА, які не отримували ПБ

композицію, проте був нижчим відносно контролю в 1,2 раза ($p \leq 0,05$). При комбінації ХС та ПБ у щурів із експериментальним ОА рівень експресії гена, що кодує колаген, повертався до контрольних значень (рис. 5.3).

Отримані нами результати щодо зниження експресії гена *Col2a1* у хрящах колінного суглоба щурів з експериментальним ОА можна співставити з літературними даними, в яких зазначено, що зниження рівня *Col2a1* за умов ОА спричинювало зменшення утворення колагену та заміну хрящової тканини на фіброзну, яка не мала подібних механічних функцій [349, 350], що узгоджувалося з одержаними нами даними гістологічного аналізу, в яких відмічено деградацію міжклітинної речовини та втрату волокнами хрящового матриксу впорядкованого розташування. Введення ХС та ПБ тваринам з експериментальним ОА сприяло відновленню матриксу хрящової тканини.

Окрім структурного компоненту, – колагену II типу, у підтримці нормального функціонування хряща важливу роль відіграють протеоглікани. Основним протеогліканом суглобових хрящів є агрекан, тому визначення експресії його гена є важливим етапом комплексного вивчення розвитку захворювань суглобів.

В експериментальних дослідженнях нами показано, що рівень експресії гена *Acan* у групі тварин з МІА-індукованим ОА знижувався в 2 рази ($p \leq 0,001$) порівняно з контролем (рис. 5.4).

У групах щурів ХС, ПБ та ХС+ПБ рівень експресії цього гена вірогідно не відрізнявся від відповідних показників контрольної групи тварин. У той же час, при введенні тваринам з експериментальним ОА ХС рівень відповідної експресії гена зростав у 1,5 рази ($p \leq 0,01$) відносно тварин з ОА, однак був нижчим за контрольні значення в 1,3 раза ($p \leq 0,05$). При введенні ПБ щурам з експериментальним ОА рівень експресії гена *Acan* був в 1,4 раза ($p \leq 0,05$) вищим, ніж у тварин групи ОА, проте лишався зниженим в 1,4 раза ($p \leq 0,01$) порівняно з контрольними тваринами (рис.5.4). За комбінованого введення ХС і ПБ у щурів із експериментальною

патологією рівень експресії зазначеного гена достовірно перебував на рівні контрольних значень (рис. 5.4).

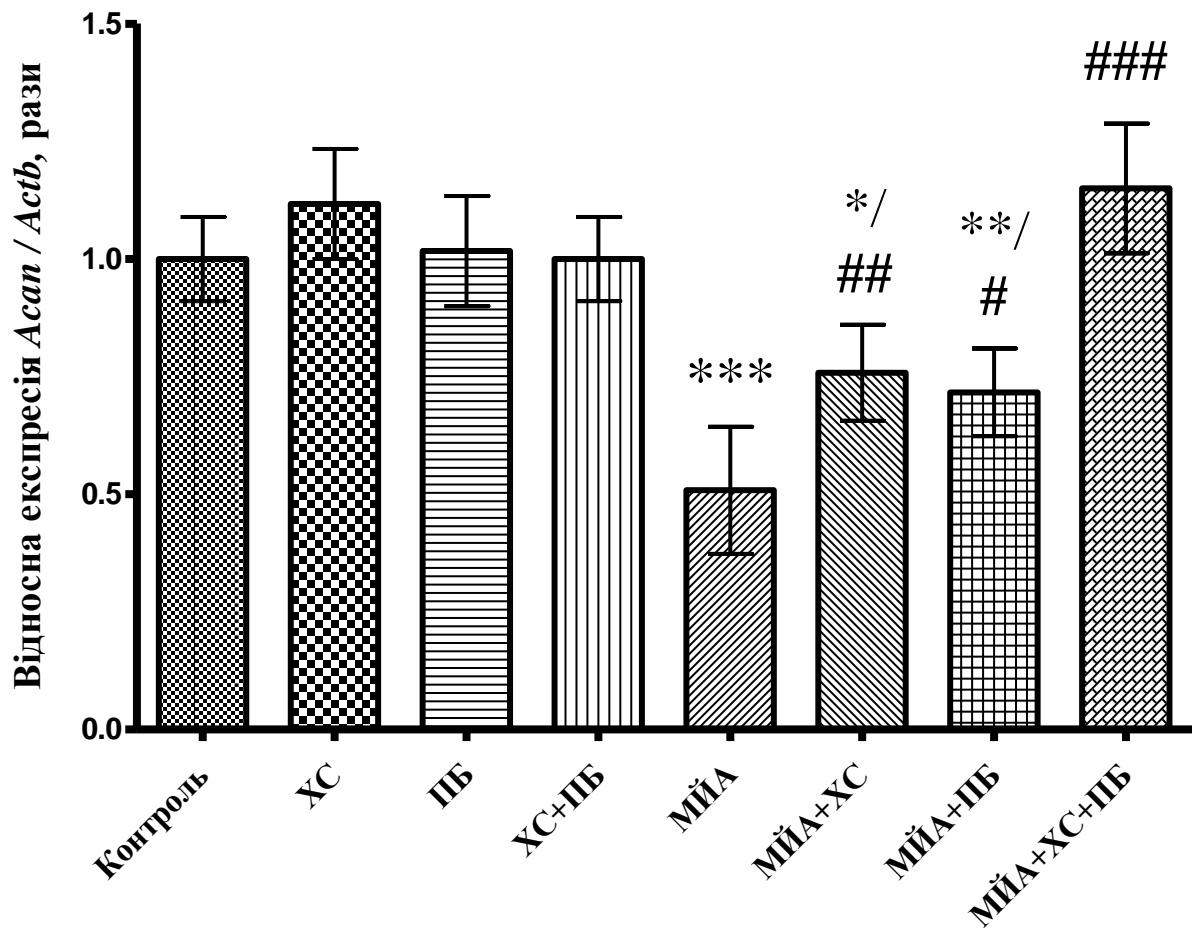


Рис. 5.4 Рівень експресії гена *Acan* у хрящах колінного суглоба щурів за умов експериментального остеоартиту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотики ($M \pm m$, $n=14$; *** – $p \leq 0,001$, ** – $p \leq 0,01$, * – $p \leq 0,05$ відносно контрольних тварин; ### – $p \leq 0,001$, ## – $p \leq 0,01$ відносно тварин групи ОА)

Агрекан продукується хондроцитами, і його продукція регулюється цитокінами та факторами росту, зокрема ІЛ-1, ФНП- α , ІФР-1 та ТФР- β [351]. Втрата агрекану й інших компонентів матриксу хряща веде до деструкції тканини, викликаючи повне пошкодження суглобової поверхні. У процесі деградації агрекан та його фрагменти надходять у синовіальну рідину і кров, та можуть служити маркерами метаболічних змін при захворюваннях суглобів.

Відновлювальна дія ХС на експресію структурних генів може бути пов'язана з тим, що ХС є основним компонентом протеогліканів, складовою хрящової матриці [77]. На деяких тваринних моделях ОА показано, що при введенні ХС знижувалась експресія та синтез ЦОГ-2, iNOS, ІЛ-1 β [352] та інших медіаторів запалення, пригнічувався синтез ММП-3, -9, -13 у хондроцитах [312]. Також у дослідях *in vitro* показано, що хондропротектор може взаємодіяти з компонентами позаклітинного матриксу та сприяти редиференціюванню хондроцитів шляхом активації мезенхімальних клітин-попередників [353].

Важливим компонентом хрящової тканини є олігомерний матриксний білок хряща COMP, – це кальцій-зв'язуючий неколагеновий глікопротеїн родини тромбоспондинів, який відіграє важливу роль у підтримці властивостей та цілісності колагенової сітки, виконує функції збереження та доставки гідрофобних молекул клітинної сигналізації [192].

Встановлено, що рівень експресії гена *Comp* в групі тварин з експериментальним ОА знижувався у 2,2 раза ($p \leq 0,001$) порівняно з контролем (рис. 5.5).

У групах щурів ХС, ПБ та ХС+ПБ рівень експресії мРНК гена, що кодує олігомерний матриксний білок, знаходився на рівні контрольних значень. При окремому введенні ХС щурам з експериментальним ОА рівень експресії гена зростав в 1,8 раза ($p \leq 0,001$) відносно тварин з ОА, однак був нижчим за контрольні значення в 1,2 раза ($p \leq 0,05$). При введенні тваринам з експериментальною патологією суглобів ПБ рівень експресії гена *Comp* був в 1,5 рази ($p \leq 0,05$) вищим, ніж у тварин групи ОА, однак лишався зниженим у 1,5 рази ($p \leq 0,001$) порівняно з контрольними тваринами. За комбінованого введення ХС і ПБ у щурів із експериментальним ОА рівень експресії цього гена достовірно перебував на рівні контрольних значень (рис. 5.5).

Таким чином, встановлене зниження експресії структурних генів *Col2a1*, *Acan* та *Comp* при експериментальному ОА в щурів свідчило про порушення молекулярної будови хрящового матриксу, зокрема, зниження рівня

колагенових фібрил, утворених колагеном II типу, протеогліканів, 90% яких утворює агрекан, та олігомерного матричного білка хряща, який зв'язує колагени I, II та IX типів. Відповідно, такі зміни можуть призвести до порушення властивостей хрящової тканини, зокрема її цілісності, механічної стійкості, проникності та метаболізму.

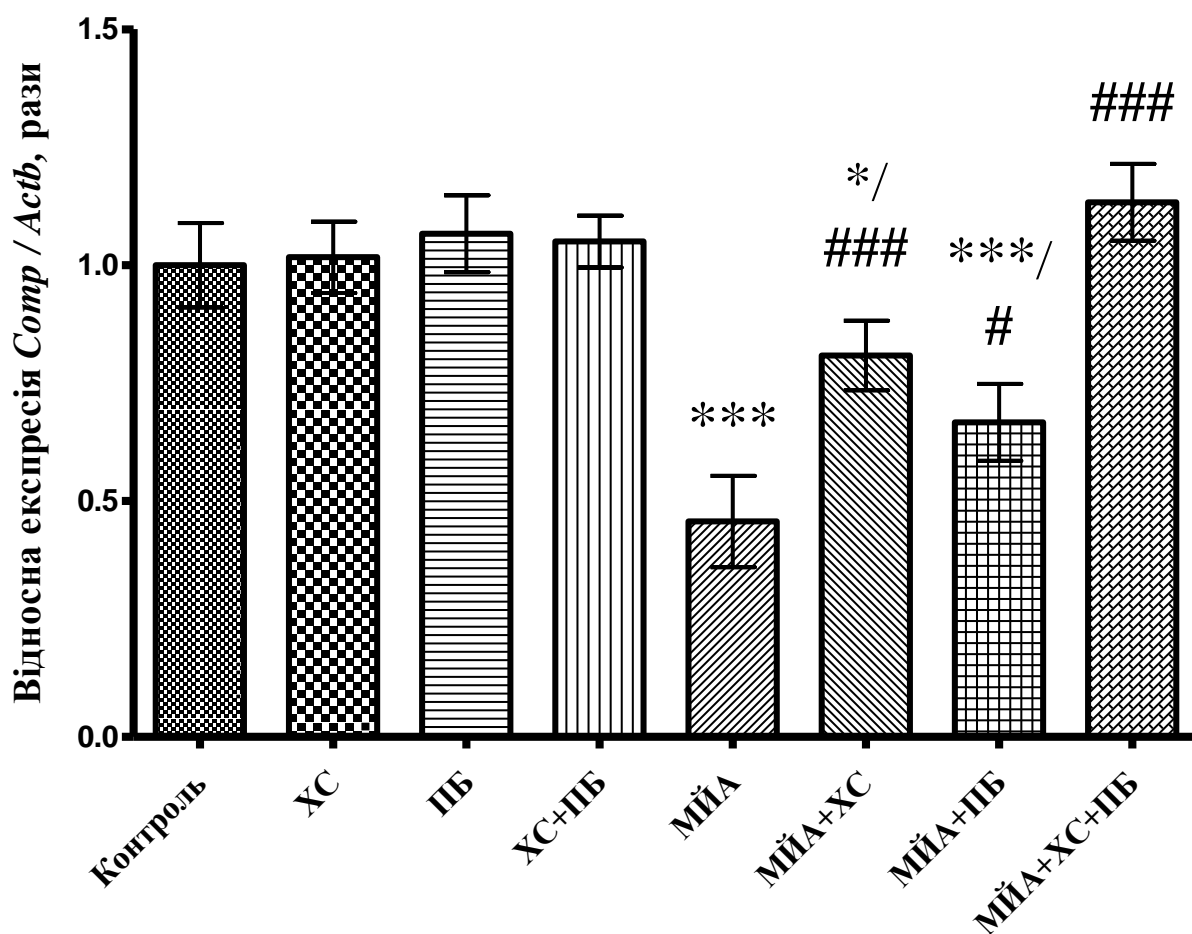


Рис. 5.5 Рівень експресії гена *Comp* у хрящах колінного суглоба щурів за умов експериментального остеоартиту при введенні хондроїтин сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; *** – $p \leq 0,001$, * – $p \leq 0,05$ відносно контрольних тварин; ### – $p \leq 0,001$, # – $p \leq 0,05$ відносно тварин групи ОА)

Введення як ХС, так і ПБ тваринам з експериментальним ОА викликало відносне підвищення експресії генів *Col21a*, *Acan* та *Comp*, яке могло свідчити про часткове відновлення структурної будови матриксу хрящової

тканини та його метаболізму, що мало підтверження у гістологічному аналізі суглобів щурів проаналізованих груп, та у дослідженнях, у яких встановлено відносне зниження рівня COMP, ACAN, CHI3L1 та CTSK у сироватці крові щурів з ОА, які отримували хондропротектор та пробіотичну композицію. Ефекти вище зазначених сполук можуть бути пов'язані з їх антиоксидантними та антизапальними властивостями. Крім того, ХС є структурним компонентом матриксу хрящової тканини, тому його введення може безпосередньо впливати на експресію генів структурних білків та сприяти відновленню будови хряща.

Щодо можливих механізмів впливу ПБ на експресію структурних генів у хрящовій тканині, перш за все, слід відзначити його здатність елімінувати бактеріальну колонізацію ШКТ та дисбіоз. Ефективність дії пробіотичної композиції пов'язана з широким спектром біологічної активності, так як продукти життєдіяльності бактеріальних штамів, представлених у препараті (вітаміни, амінокислоти, коротколанцюгові жирні кислоти, імуномодулятори, тощо) мають антиоксидантні властивості, завдяки чому вони здатні гальмувати розвиток ОС і знижувати інтенсивність запальних та деструктивних процесів в організмі. На тваринних моделях ОА за допомогою ПЛР було виявлено бактеріальну ДНК [195], що підтверджує присутність продуктів життєдіяльності бактерій у суглобі під час прогресування хвороби, а отже, подальше збільшення синтезу прозапальних цитокінів та активацію катаболічних шляхів. У дослідженнях [195, 354] показано, що при сумісному введенні пробіотиків, що включали штами *Lactobacillus casei* та *L. Acidophilus*, з індометацином або колагеном II типу, спостерігалася їх синергічна дія, яка виражалася у зменшенні болю, деструкції хрящової тканини та інфільтрації лімфоцитів, зниженні експресії генів прозапальних цитокінів та матричних металопротеїназ.

Отже, зниження експресії генів *Col2a1*, *Acan* та *Comp* у хрящовій тканині на фоні зростання концентрації COMP, ACAN, CHI3L1 та CTSK у сироватці крові щурів за умов МІА-індукованого ОА може свідчити про

розвиток патологічних процесів у хрящовій тканині, зокрема дегенерацію та запалення, що узгоджувалося з сучасними даними літератури [355].

Таким чином, розвиток експериментального ОА супроводжувався зростанням концентрації ключових біохімічних маркерів метаболізму хрящової тканини: COMP, ACAN, CTSK, CHI3L1 у сироватці крові; підвищенням вмісту протеолітичних ферментів (ММП-1, -2, -3, -8) у крові та хрящі; зниженням рівня експресії генів основних компонентів хрящового матриксу *Col2a1*, *Acan*, *Comp* у хрящовій тканині. Отримані нами результати можуть свідчити про розвиток патологічних деструктивних процесів у хрящі колінного суглоба, які пов'язані з порушенням метаболізму колагену та заміщенням хрящової тканини на фіброзну, що узгоджувалося з отриманими нами даними гістологічних досліджень, у яких показано деградацію міжклітинної речовини та втрату впорядкованого розташування колагенових волокон за умов ОА.

Введення ХС і ПБ тваринам з експериментальною патологією суглобів мало позитивні ефекти на досліджувані показники метаболізму хрящової тканини щурів й експресію структурних генів, більш виражено при їх комбінованому застосуванні, сприяло відновленню стану суглобових тканин та ремодуляції хряща щурів з експериментальним ОА.

Результати, викладені у розділі, опубліковані у наступних працях: [62, 205, 248, 252, 356, 357, 358].

РОЗДІЛ 6

ОЦІНКА СТАНУ ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРИТУ ПРИ ВВЕДЕННІ ХОНДРОЇТИНУ СУЛЬФАТУ ТА ПРОБІОТИКА

6.1 Вміст катаболічних медіаторів запалення в сироватці крові та суглобовому хрящі щурів

В останні роки формується нова концепція патогенезу ОА, яка відносить дане дегенеративно-дистрофічне захворювання до групи патологій запального характеру [359]. Під дією «механічного стресу» (травми, перенавантаження, метаболічні зміни організму) виникає хронічне запалення, пошкодження та патологічне ремоделювання тканин суглоба. В ці процеси залучені як високоспеціалізовані клітини (хондроцити, остеоцити, синовіальні фібробласти), так і елементи позаклітинного матриксу, які за таких умов змінюють свою метаболічну активність і починають виробляти значну кількість цитокінів, хемокінів та факторів росту [360]. Цитокіни спричиняють різноманітні біологічні ефекти, одним з основних є забезпечення імунної відповіді шляхом взаємозв'язку між неспецифічними захисними реакціями та специфічним імунітетом [361]. Отже, рівень цитокінів, які є ендогенними медіаторами, що регулюють інтенсивність і тривалість імунозапальної відповіді, є інформативним показником патогенетичних змін та ступеню запалення в організмі в умовах ОА.

Серед цитокінів, які беруть участь у метаболізмі хряща, виділяють катаболічні прозапальні цитокіни, до яких належать ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-8 та ІФН- γ , які в найбільшій мірі відповідають за порушення гомеостазу тканин суглоба, за рахунок стимуляції катаболічних і деструктивних процесів; та анаболічні цитокіни – ІЛ-4, ІЛ-10, ТФР- β й ІФР-1, які модулюють запальну відповідь та захищають тканини суглоба від

пошкоджень.

Прозапальні цитокіни, зокрема ІЛ-1 β та ФНП- α , виконують ключову роль у розвитку імунного запалення за умов ОА, оскільки виявляють ряд біологічних ефектів: стимулюють синтез ІЛ-6 та ІЛ-8, активують ММП, знижують синтез колагену II і IX типів, активують ЦОГ-2 у фіброblast-подібних синовіоцитах і хондроцитах, яка індукує утворення запальних медіаторів простагландинів; стимулюють вироблення кисневих радикалів та оксиду азоту, що зумовлює прогресування катаболічних процесів у хрящі. Обидва цитокіни в підвищених кількостях виявлені в синовіальній оболонці, синовіальній рідині та хрящі у хворих на ОА [362].

Цитокіни є переважно молекулами, які діють місцево, синтезуються паралельно, мають здатність індукувати продукцію один одного, таким чином забезпечуючи каскад і протікання запальних процесів. Оскільки більшість цитокінів діють переважно локально, тому їх концентрація у синовіальній рідині може бути вища, ніж у сироватці крові [363], однак у разі неспроможності місцевих захисних реакцій їх дія проявляється на системному рівні [364, 365].

Відомо, що ХС, який є найпоширенішим в організмі глікозамінгліканом, виявляє протизапальні властивості, пригнічує активність та знижує експресію деяких цитокінів, медіаторів деградації суглобового хряща (ММП, ІЛ-1 β , ІЛ-8, ЦОГ-2, ФНП- α) [366], однак механізми його дії *in vivo* вивчені недостатньо та потребують подальших досліджень.

Доведено, що кишкова мікробіота бере участь у запальному процесі організму шляхом регуляції індукування продукції прозапальних цитокінів імунними клітинами та завдяки продукуванню запальних метаболітів бактерій [367]. Більшість висновків наукових досліджень про роль кишкової мікробіоти в розвитку запалення зроблено поза межами контексту опорно-рухової системи. Утім, останнім часом з'являються дані про залучення мікробіому в кістковий гомеостаз, перебіг РА та прогресування ОА [1, 46]. У дослідженнях [238, 368] виявлено кореляцію між підвищенням рівнів

маркерів запалення, в тому числі ЛПС бактерій, та вираженістю патологічного процесу у суглобі. Тому можна припустити, що прозапальні метаболіти мікробіому беруть участь у запальних реакціях при ОА.

ПБ можуть регулювати як вроджену, так і набуту імунну відповідь. Ці ефекти включають зменшення Т-клітин і прозапальних цитокінів, таких як ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-8, ІФН- γ та ФНП- α , та збільшення Т-регулюючих клітин. Механізми дії ПБ на організм та імунну систему є складними та потребує з'ясування. Достатня кількість ПБ може стимулювати вроджений та набутий імунітет господаря [369].

Визначення цитокінового профілю в крові та тканинах організму є важливим діагностичним інструментом, що дозволяє визначити імунобіохімічні порушення як на місцевому рівні, так і організму в цілому, оцінити функціональну активність різних типів імунокомпетентних клітин, динаміку імунопатологічного процесу, важкість запального процесу на стемному рівні, що корелює з клінічним перебігом захворювання. Тому нами було досліджено вміст катаболічних прозапальних медіаторів ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-8 та ІФН- γ у сироватці крові та хрящовій тканині колінного суглоба щурів за умов розвитку експериментального ОА та при дії ХС і ПБ.

Проведені експериментальні дослідження показали, що за умов МІА-індукованого ОА вміст катаболічних цитокінів у сироватці крові зростав вміст: ІЛ-1 β у 2 рази ($p \leq 0,05$), ФНП- α – в 1,9 рази ($p \leq 0,05$), ІЛ-6 й ІЛ-8 – в 1,3 рази ($p \leq 0,05$) та ІФН- γ – в 1,6 рази ($p \leq 0,05$), відповідно, порівняно з тваринами контрольної групи, що свідчило про розвиток запалення та активацію лімфоцитів в умовах експериментальної патології (рис. 6.1).

При введенні ХС щурам з експериментальним ОА у сироватці крові знижувався вміст ІЛ-1 β та ФНП- α в 1,3 та 1,4 рази ($p \leq 0,05$), ІЛ-6, ІЛ-8 та ІФН- γ – в 1,2 рази ($p \leq 0,05$), відповідно, відносно тварин групи ОА, однак значення вмісту усіх досліджуваних показників перебували вище відповідних значень контрольних тварин (ІЛ-1 β – в 1,5 рази ($p \leq 0,05$), ФНП- α – в 1,3 рази ($p \leq 0,05$), ІЛ-6 та ІЛ-8 – в 1,1 рази ($p \leq 0,05$), ІФН- γ – в 1,3 рази ($p \leq 0,05$)) (рис. 6.1).

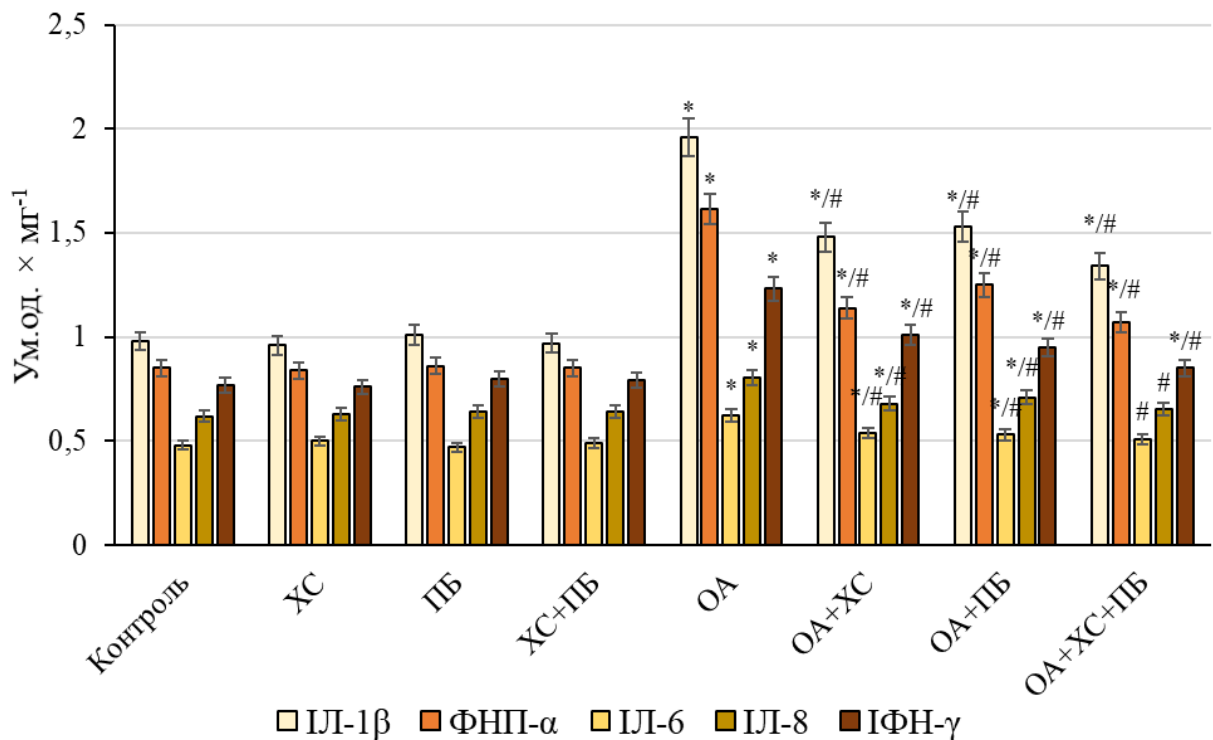


Рис. 6.1 Вміст прозапальних катаболічних цитокінів у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; * – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p < 0,05$ відносно щурів групи ОА)

За умов введення ПБ тваринам з експериментальною патологією вміст прозапальних цитокінів у крові знижувався: IL-1 β , ФНП- α та IFN- γ – в 1,3 раза ($p \leq 0,05$), IL-6 – в 1,2 раза ($p \leq 0,05$), IL-8 – в 1,1 раза ($p \leq 0,05$) порівнянно зі значеннями у тварин групи ОА, однак показники лишалися підвищеними відносно контролю (IL-1 β – в 1,6 раза ($p \leq 0,05$), ФНП- α – в 1,5 рази ($p \leq 0,05$), IL-6 та IL-8 – в 1,1 раза ($p \leq 0,05$), IFN- γ – в 1,2 раза ($p \leq 0,05$)) (рис. 6.1). Зниження вмісту досліджуваних показників прозапального цитокінового профілю у сироватці крові щурів з МІА-індукованим ОА при введенні ПБ може свідчити про біологічні ефекти даної сполуки та взаємозв'язок між станом мікробіоти ШКТ й активацією запальних шляхів за участі IL-1 β , ФНП- α , IL-6,-8 та IFN- γ .

При сумісному введенні ХС і ПБ тваринам з експериментальним ОА вміст катаболічних показників цитокінового профілю знижувався більш

виражено: ІЛ-1 β , ФНП- α та ІФН- γ – у 1,5 рази ($p \leq 0,05$), ІЛ-6 та ІЛ-8 – в 1,2 рази ($p \leq 0,05$) відносно тварин групи ОА, при цьому значення вмісту ІЛ-6 та ІЛ-8 достовірно досягали рівня контролю (рис. 6.1).

У хрящовій тканині колінного суглоба щурів за умов експериментального ОА вміст катаболічних цитокінів зростав: вміст ІЛ-1 β підвищувався у 2,5 рази ($p \leq 0,05$), ФНП- α – 2,3 рази ($p \leq 0,05$), ІЛ-6 – в 1,9 рази ($p \leq 0,05$), ІЛ-8 – в 1,8 рази ($p \leq 0,05$) та ІФН- γ – в 1,5 рази ($p \leq 0,05$) порівняно з контрольною групою тварин (рис. 6.2).

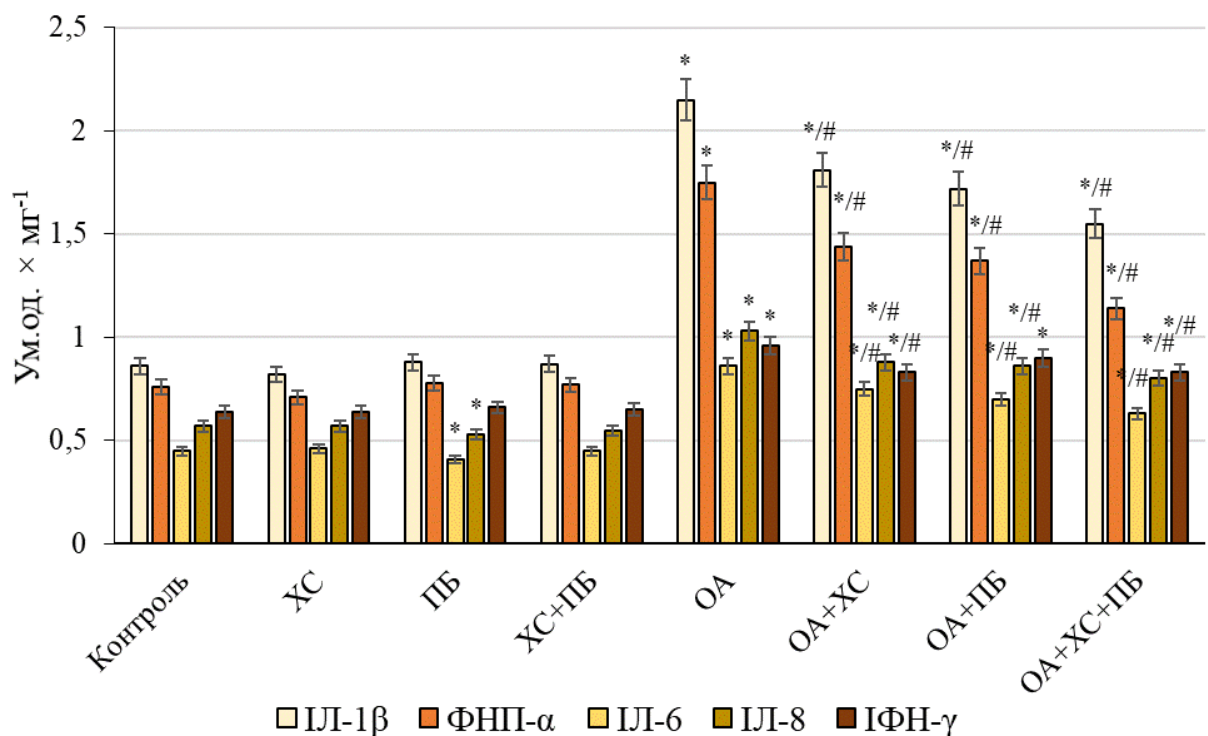


Рис. 6.2 Вміст прозапальних катаболічних цитокінів у хрящовій тканині суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотики ($M \pm m$, $n=14$; * – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно щурів групи ОА)

При введенні ХС щурам з експериментальним ОА вміст ІЛ-1 β , ФНП- α ІЛ-8 та ІФН- γ у хрящі знижувався в 1,2 рази ($p \leq 0,05$), ІЛ-6 – в 1,1 рази ($p \leq 0,05$) відносно тварин групи ОА, однак значення вмісту усіх досліджуваних показників перебували вище відповідних значень

контрольних тварин (ІЛ-1 β – в 1,5 рази ($p \leq 0,05$), ФНП- α – в 1,3 рази ($p \leq 0,05$), ІЛ-6 та ІЛ-8 – в 1,1 рази ($p \leq 0,05$), ІФН- γ – в 1,3 рази ($p \leq 0,05$)) (рис. 6.2).

При введенні ПБ тваринам з експериментальною патологією вміст прозапальних цитокінів у хрящі знижувався: ІЛ-1 β та ФНП- α в 1,3 рази ($p \leq 0,05$), ІЛ-6 та ІЛ-8 – в 1,2 рази ($p \leq 0,05$), ІФН- γ – в 1 раз ($p \leq 0,05$) порівнянно зі значеннями у тварин групи ОА, однак показники лишалися підвищеними відносно контролю (ІЛ-1 β – у 2 рази ($p \leq 0,05$), ФНП- α – в 1,8 рази ($p \leq 0,05$), ІЛ-6 – в 1,6 рази ($p \leq 0,05$), ІЛ-8 – в 1,5 рази ($p \leq 0,05$), ІФН- γ – в 1,4 рази ($p \leq 0,05$)) (рис. 6.2).

При сумісному введенні ХС і ПБ тваринам з експериментальним ОА вміст катаболічних показників цитокінового профілю у хрящовій тканині суглоба знижувався більш виражено: ІЛ-1 β та ІЛ-6 – в 1,4 рази ($p \leq 0,05$), ФНП- α – у 1,5 рази ($p \leq 0,05$), ІЛ-8 – в 1,3 рази ($p \leq 0,05$) та ІФН- γ – в 1,2 рази ($p \leq 0,05$) відносно тварин групи ОА, однак значення вмісту цитокінів були вищими за рівень контролю (ІЛ-1 β – в 1,8 рази ($p \leq 0,05$), ФНП- α – в 1,5 рази ($p \leq 0,05$), ІЛ-6 та ІЛ-8 – в 1,4 рази ($p \leq 0,05$) та ІФН- γ – в 1,3 рази ($p \leq 0,05$)) (рис. 6.2).

При введенні як ХС, так і ПБ інтактним щурам вміст усіх досліджуваних катаболічних медіаторів запалення в сироватці крові та хрящі достовірно знаходився на рівні контрольних значень.

Відомо, що ІЛ-1 β та ФНП- α є ключовими цитокінами, які синтезуються на початку і на більш пізніх етапах розвитку ОА, та виявляють синергетичний ефект по відношенню один до одного, який є результатом активації однієї ланки внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, які посилюють запалення та катаболічні процеси у тканинах суглобів [370, 371]. Під впливом прозапальних цитокінів хондроцити регулюють ремоделювання хрящової тканини, синтезують протеолітичні ферменти ММП-1, ММП-3, ММП-13 та ADAMTS-4 [372], які, в свою чергу викликають деградацію колагену та ПГ хряща [373]. В наших дослідженнях встановлено, що на тлі

зростання вмісту ІЛ-1 β та ФНП- α відбувалося підвищення концентрації ММП-1, -2, -3 та ММП-8 у сироватці крові та хрящовій тканині щурів з експериментальним ОА, що підтверджувало розвиток деструктивних процесів у колінному суглобі за умов МІА-індукованої патології. Слід зазначити, що у хрящі спостерігалось більш виражене зростання вмісту як прозапальних цитокінів, так і концентрації досліджуваних ММП.

Стимуляція клітин за участю ІЛ-1 β відбувається через зв'язування та активацію специфічного рецептора ІЛ-1RI, розташованого на поверхні клітин, експресія якого значно підвищується у хондроцитах при ОА [374]. Деякі клітини, включаючи хондроцити, експресують конкурентний інгібітор ІЛ-1 β , антагоніст його рецептора – ІЛ-1Ra, який може зв'язуватися з ІЛ-1RI, але не передає сигнал і володіє протизапальними властивостями [375]. ФНП- α є лігандом для двох специфічних рецепторів (TNFR1 та TNFR2), які експресуються на клітинних мембранах хондроцитів. За ОА хондроцити експресують високий рівень TNFR1, який є домінуючим рецептором ФНП- α [376]. Показано, що введення ІЛ-1 β та ТФР- α у колінний суглоб кролика викликало прогресування ОА, яке посилювалося за комбінованої їх дії [377].

ІЛ-6 та ІЛ-8 є регуляторними цитокінами, які активують імунну систему та посилюють запальну відповідь. У дослідженнях [378, 379] показано, що у нормі хондроцити експресують дуже низький рівень ІЛ-6, експресія якого значно підвищується при введенні прозапальних цитокінів ТФР- α та ІЛ-1 β . Спостерігалось значне підвищення рівня утворення ІЛ-6 та ІЛ-8 у хворих на ОА [380, 381]. Favero та ін. у експериментах на культурі тканин меніска та синовіальної оболонки на ранній та кінцевій стадіях ОА визначили запальні молекули, та показали наявність ІЛ-6 та ІЛ-8 у хворих обох стадій, однак їх рівень був вищим серед хворих кінцевої стадії [382].

ІФН- γ традиційно вважається прозапальним цитокіном завдяки його здатності активувати макрофаги та інші лімфоцити, забезпечуючи імунну відповідь [382]. ІФН- γ продукується в організмі переважно у разі виникнення

патології та відповідає практично за всі фази імунної та запальної реакції: активізацію, ріст та диференціацію Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів, макрофагів, клітин природних кілерів та інших типів клітин, таких як ендотеліальні й фібробласти [383, 384]. ІФН- γ сприяє збільшенню кількості різних прозапальних факторів, серед яких ІЛ-1, ІЛ-6 та ІЛ-8 [385]. Показано, що ІФН- γ інгібує індуковану ІЛ-1 експресію ММП-13 у хондроцитах здорового хряща, тоді як при ОА така здатність ІФН- γ знижена, що викликано зменшенням рівня його рецепторів [386]. Shan та ін. показали підвищення рівня ІФН- γ у сироватці крові хворих на ОА [387], яке корелювало зі встановленим нами результатами, у яких показано зростання вмісту ІФН- γ як у хрящовій тканині, так і в сироватці крові щурів з експериментальним ОА, що свідчило про розвиток запалення, як на місцевому, так і на системному рівні, та активацію лімфоцитів в умовах патології.

Виявлений нами протизапальний та хондротрофічний ефект ХС може бути пов'язаний з його прямою протизапальною дією через макрофагальні рецептори CD44, толл-подібні рецептори TLR4, молекули клітинної адгезії ICAM1, інактивацію сигнальних шляхів JAK/STAT та NF- κ B [388]; опосередкованим протизапальним впливом (регуляцію міграції лейкоцитів через зниження активності прозапальних хемокінів); зниження секреції гістаміну та посилення активності фактора росту фібробластів [389].

Експериментально встановлено, що в щурів із хірургічно викликаним ОА ХС захищає від деградації хрящі, шляхом зниження рівня цілої низки медіаторів запалення, в тому числі ІЛ-1 β та ФНП- α у тканинах колінного суглоба. Крім того, показано значне зниження рівня біомаркерів запалення та деградації кісткової тканини як у сироватці крові так і хрящах при введенні хондропротектора [390].

Відомо, що протизапальний та імуномодулюючий ефект ПБ полягає у вивільненні імунними клітинами цитокінів: ІЛ, ФНП, ІФН, ТФР та хемокінів (лімфоцитів, гранулоцитів, макрофагів, тучних, епітеліальних та дендритних клітин) [391], які регулюють вроджений та адаптивний

імунітет [392].

У дослідженнях, проведених *in vitro* [391] показано стимуляцію прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-8 та ФНП- α) *Lactobacillus sakei*, тоді як *Lactobacillus johnsonii* впливали на синтез ТФР- β (протизапального). У мишей, які отримували пробіотики, було виявлено значне зниження рівня ІФН- γ та ФНП- α у лімфоцитах та продукції прозапальних цитокінів клітинами селезінки [393]. Karameşe та ін. провели оцінку імуномодулюючих ефектів пробіотиків та показали, що при введенні щурам *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* відбувається модуляція і регуляція імунної відповіді за рахунок підвищення рівня протизапального ІЛ-10 та пригнічення ФНП- α й ІЛ-6 [393].

Таким чином, зростання вмісту катаболічних медіаторів прозапального пулу ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-8 та ІФН- γ в сироватці крові та хрящовій тканині суглоба щурів за умов ОА свідчить про розвиток запалення, активацію лімфоцитів, проліферацію фібробластів, а також запуск компенсаторних механізмів, оскільки цитокіни здатні регулювати захисні реакції організму як на системному, так і на місцевому рівнях. Під дією ХС та ПБ рівень прозапальних цитокінів частково зменшувався, найбільш виражено при їх сумісному застосуванні, однак не досягав значень контрольних тварин.

6.2 Вміст анаболічних протизапальних цитокінів і факторів росту в сироватці крові та суглобовому хрящі щурів

Модулюючими цитокінами, що мають супресивний ефект на ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-8 та ІФН- γ є ІЛ-4 і ІЛ-10 та фактори росту ТФР- β і ІФР-1, які зменшують інтенсивність запального процесу, потенціюють функцію хондроцитів та хондробластів, можуть проявляти анаболічні властивості та сповільнювати розвиток ОА. Показано, що ІЛ-4 та ІЛ-10 є протизапальними цитокінами, які зв'язуючись зі своїми рецепторами, запускають каскади

внутрішньоклітинної сигналізації JAK1/STAT3/STAT6 [394], SMAD1/SMAD5/SMAD8 й ERK1/2MAP, що приводить до експресії генів, які визначають розвиток ОА суглобів [395]. Існують дані про їх хондропротекторні властивості, які виявляються у стимуляції синтезу колагену II типу і агрекану, та інгібуванні ММП [396, 397]. Також ІЛ-4 та ІЛ-10 здатні пригнічувати апоптоз хондроцитів та фібробласт-подібних клітин [398]. Такі властивості, ймовірно, є результатом стимуляції синтезу антагоніста ІЛ-1 β (ІЛ-1Ra), тканинного інгібітора ММП (TIMP-1) та факторів росту [399].

Фактори росту ТФР- β і ІФР-1, в свою чергу, є індукторами анаболічної відповіді хондроцитів, яким притаманна імуносупресивна активність, та стимулюють клітинну проліферацію, диференціювання, ініціюють синтез матриксних білків, регулюють функціонування зовнішньоклітинного матриксу [400]. Встановлено підвищення концентрації ТФР- β у синовіальній рідині та хрящі, що сприяє продукції протеоглікану та агрекану [401]. Також ТФР- β підвищує експресію TIMP, інгібуючи активність ММП [402]. Вплив ТФР- β 1 на макрофаги і моноцити переважно супресивний, даний цитокін може пригнічувати проліферацію цих клітин і перешкоджати утворенню АФК та оксиду азоту. Однак, як і у випадку з іншими типами клітин, ТФР- β 1 також може мати протилежний ефект на клітини мієлоїдного походження. Наприклад, ТФР- β 1 діє як хемоаттрактант, направляючи імунну відповідь на деякі патогени, при цьому макрофаги та моноцити здатні реагувати на низький рівень ТФР- β 1. Крім того, експресія моноцитарних цитокінів (включаючи ІЛ-1 α , ІЛ-1 β та ФНП- α) та фагоцитоз макрофагів може стимулюватися за рахунок дії ТФР- β 1 [403].

При дослідженні анаболічних показників цитокінового профілю у щурів з експериментальним ОА нами встановлено у сироватці крові (рис. 6.3) зниження вмісту ІЛ-4 й ІЛ-10 в 1,3 раза ($p \leq 0,05$) та ІФР-1 в 1,2 раза ($p \leq 0,05$) відносно відповідних показників вмісту в контрольних тварин. За таких умов спостерігалось підвищення вмісту ТФР- β в

1,2 раза ($p \leq 0,05$), що могло свідчити про компенсаторну активацію антизапальної системи при експериментальному ОА колінного суглоба щурів. Слід зазначити, що посилення анаболічних ефектів є тимчасовим і характерне для ранньої фази ОА, і тому не може компенсувати загальний катаболічний вплив на хрящ [404].

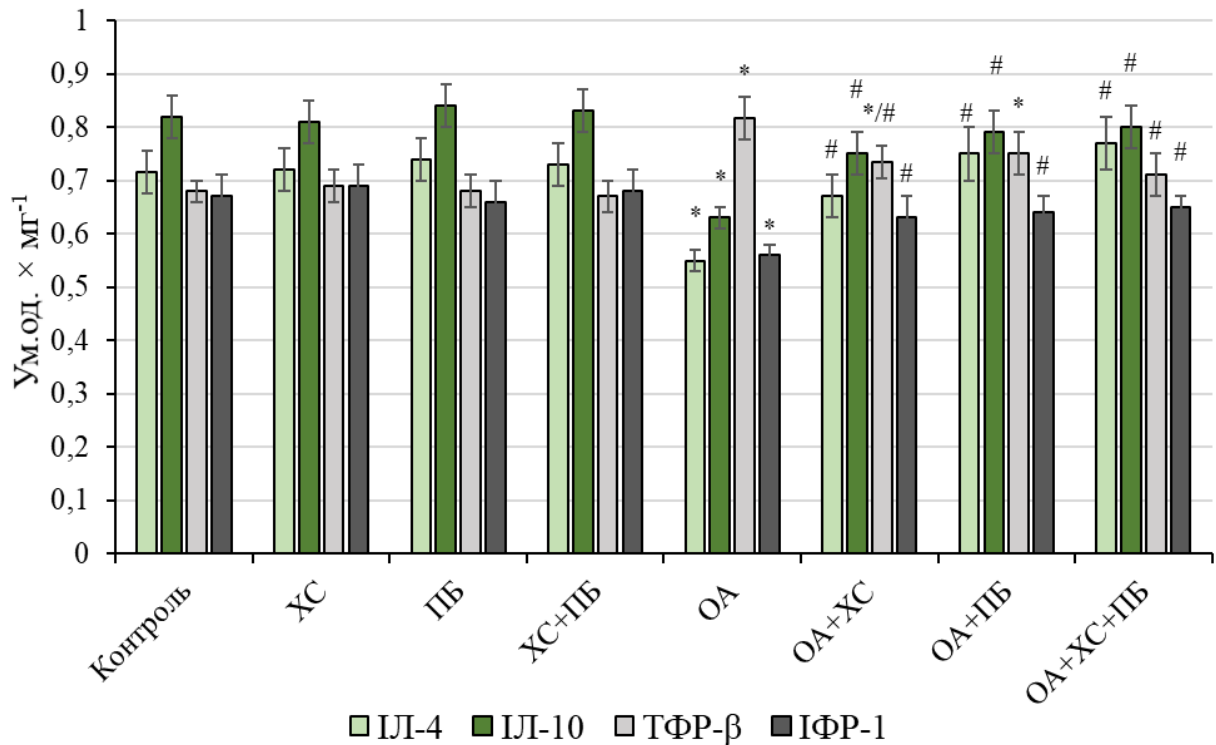


Рис. 6.3 Вміст анаболічних протизапальних цитокінів і факторів росту в сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотики ($M \pm m$, $n=14$; * – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно щурів групи ОА)

Введення ХС тваринам з експериментальним ОА мало модулюючий вплив на протизапальні цитокіни у сироватці крові: вміст ІЛ-4, ІЛ-10 та ІФР-1 підвищувався та значимо досягав рівня контрольних значень, тоді як вміст ТФР-β знижувався в 1,1 раза ($p \leq 0,05$) порівняно з таким у тварин групи ОА, однак лишався нижчим за контроль в 1,1 раза ($p \leq 0,05$) (рис. 6.3).

Введення ПБ тваринам з експериментальним ОА супроводжувалося достовірним підвищенням вмісту ІЛ-4, ІЛ-10 та ІФР-1 до рівня контрольних

значень. Однак, вміст ТФР- β у сироватці крові щурів за таких умов значимо не змінювався порівняно з тваринами з експериментальним ОА, які не отримували ПБ (рис. 6.3). Проте, сумісна дія ХС та ПБ мала результатом достовірне відновлення вмісту всіх досліджуваних анаболічних параметрів цитокінового профілю у сироватці крові до рівня контролю (рис. 6.3).

У хрящовій тканині суглоба щурів з експериментальним ОА спостерігалася подібна до крові тенденція змін вмісту протизапальних цитокінів: вміст ІЛ-4, ІЛ-10 та ІФР-1 знижувався в 2; 1,4 та 2,2 рази ($p \leq 0,05$) відповідно порівняно з контрольними значеннями, при цьому вміст ТФР- β зростав у 1,5 рази ($p \leq 0,05$) відносно контрольних значень (рис. 6.4).

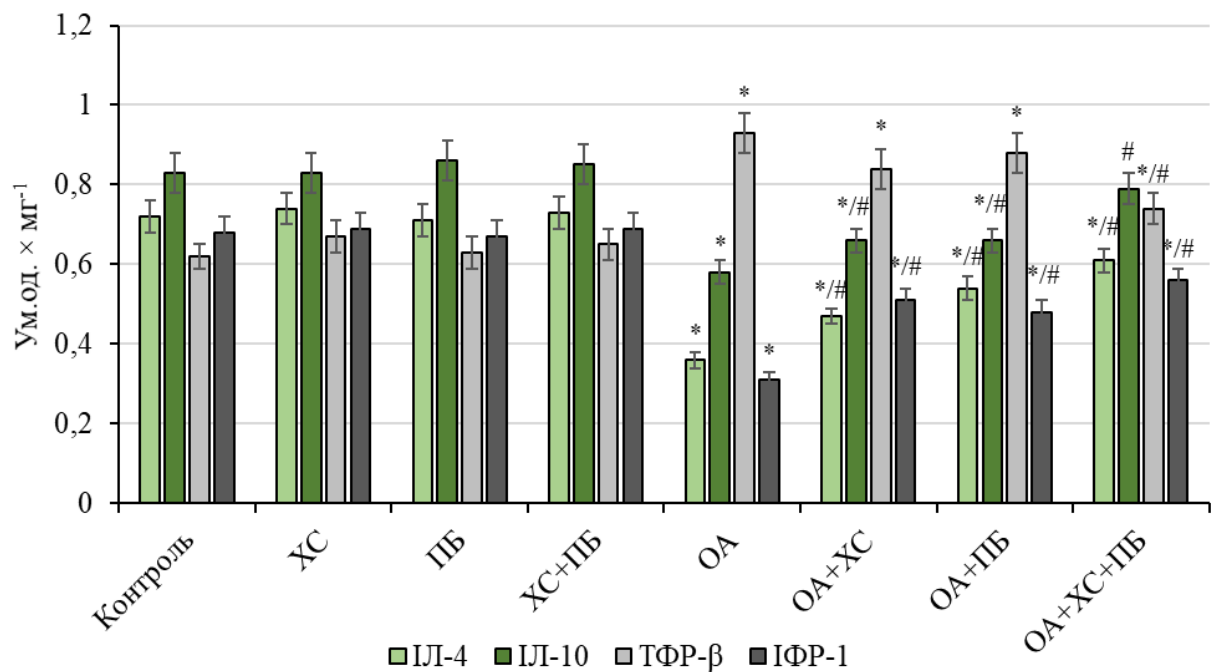


Рис. 6.4 Вміст анаболічних протизапальних цитокінів і факторів росту в хрящовій тканині суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотику ($M \pm m$, $n=14$; * – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно щурів групи ОА)

Окреме введення ХС і ПБ тваринам з експериментальним ОА мало лише частковий модулюючий ефект на вміст протизапальних цитокінів у хрящовій тканині: при введенні ХС вміст ІЛ-4, ІЛ-10 та ІФР-1 підвищувався в 1,3; 1,1

та 1,6 раза ($p \leq 0,05$) відповідно, відносно значень у тварин групи ОА; при введенні ПБ вміст ІЛ-4 та ІФР-1 підвищувався в 1,5 рази ($p \leq 0,05$), ІЛ-10 – в 1,1 раза ($p \leq 0,05$) відносно значень у тварин групи ОА, однак показники залишалися достовірно нижчими за контрольні. Вміст ТФР- β у хрящі щурів з МІА-індукованою патологією при окремому введенні як ХС, так і ПБ не мав достовірних змін, порівняно з тваринами групи ОА, та залишався значимо вищим відносно показників контрольних тварин (рис. 6.4).

При сумісному введенні ХС та ПБ тваринам з експериментальним ОА вміст ІЛ-4 та ІФР-1 у хрящі підвищувався в 1,7 та 1,8 раза ($p \leq 0,05$) відповідно відносно тварин з експериментальною патологією, які не отримували вище зазначені сполуки, тоді як вміст ІЛ-10 достовірно перебував в межах контрольних значень. Вміст ТФР- β в хрящовій тканині щурів за таких умов знижувався в 1,3 раза ($p \leq 0,05$) відносно значень у варин групи ОА, проте залишався підвищеним в 1,2 раза ($p \leq 0,05$) відносно контролю (рис. 6.4). При введенні як ХС, так і ПБ інтактним щурам, досліджувані показники статистично значимо залишалися в межах контрольних значень.

Частковий модулюючий ефект введення ХС та ПБ щурам з експериментальним ОА, що виявлявся у наближенні до нормалізації вмісту катаболічних та анаболічних цитокінів у сироватці крові та хрящі, може бути пов'язаний з антизапальними та регенераційними властивостями даних сполук, зокрема ХС, який може активувати анаболічні процеси за рахунок стимуляції синтезу ПГ і колагену, а також інгібування синтезу ферментів деструкції хряща та інших факторів запалення [405]. Деякі дослідження вказують, що пробіотики, які містять кисломолочні бактерії, такі як *L. Plantarum*, *L. Lactis*, *L. Casei* та *L. Rhamnosus*, можуть пригнічувати Th2 імунну відповідь, та впливати на продукцію ІЛ-4 мононуклеарними клітинами периферійної крові [406]. Вивчення впливу *Bacillus coagulans* на цитокіновий профіль показало пригнічення синтезу ІЛ-2, посилення ІЛ-4, ІЛ-10 та ІЛ-6, незначне збільшення продукції ФНП- α [407].

Отже, розвиток деструкції хряща за умов експериментального ОА призводив до активації запальних процесів, як на місцевому, так і на системному рівні, які потенціюють патологічні зміни у тканинах суглоба щурів. Отримані результати свідчили про порушення балансу катаболічних та анаболічних цитокінів у сироватці крові та хрящовій тканині щурів у бік розвитку запалення, що могло бути відповіддю організму як на PAMP так і на DAMP. Введення ХС і ПБ за ОА мало сприятливий ефект, що виявлявся у зниженні в сироватці крові та хрящі рівня прозапальних цитокінів, та зростанні протизапальних, які модулюють імунну відповідь, зменшують запалення в організмі та пригнічують деструктивні процеси в тканинах суглоба. Сумісна дія ХС та ПБ мала найбільш виражений ефект на протизапальні цитокіни, який полягав у відновленні вмісту всіх досліджуваних параметрів анаболічного цитокінового профілю у сироватці крові до рівня контрольних тварин.

6.3. Концентрація простагландину E_2 в сироватці крові щурів

Пошкодження хряща, загибель клітин і вивільнення фрагментів макромолекул у міжклітинну речовину та кров може стимулювати зростання рівня медіаторів запалення, тому наступним етапом досліджень було встановлення концентрації простагландину E_2 (PGE_2) у сироватці крові щурів з експериментальним ОА та при введенні ХС і ПБ.

Ейкозаноїд простагландин E_2 є фізіологічно активною речовиною, що виконує ключову роль у розвитку запалення при ОА [408]. Не дивлячись на те, що PGE_2 може продукуватися клітинами різних типів, імунні клітини є основним джерелом його синтезу під час запальної реакції. PGE_2 , що генерується хондроцитами, є необхідним для підтримання гомеостазу хряща. Він є залученим як в катаболічні, так і анаболічні процеси у суглобовому хрящі: здатний інгібувати синтез колагену хондроцитами росткової пластинки, опосередковує синтез ММП, підвищує експресію ІЛ-1 β , індукує

апоптоз хондроцитів, а також разом з тим може інгібувати експресію колагенази та стромелізину, ІЛ-1 β та ФНП- α , стимулювати синтез колагену та ПГ, проліферацію хондроцитів, інгібувати гіпертрофію хондроцитів та апоптоз у клітинах ендотелію [409]. Результати експериментальних досліджень також показують, що при ОА екзогенний ПГЕ₂ може викликати сенсibilізацію хондроцитів людини до NO-залежного апоптозу [409, 410].

ПГЕ₂ має важливе значення для гомеостазу та процесу ремоделювання хрящової й кісткової тканини в індукованому ІЛ-1 β метаболізмі кісток *in vitro* та *in vivo* [411]. Однак, механізм, за допомогою якого ПГЕ₂ опосередковує його ефекти при ОА, вивчений недостатньо.

В експериментальних дослідженнях нами встановлено, що при розвитку МІА-індукованого ОА у сироватці крові щурів концентрація ПГЕ₂ підвищувалася в 1,6 раза ($p \leq 0,05$) порівняно зі значеннями контрольних тварин (рис. 6.5).

Таке підвищення концентрації ПГЕ₂ у сироватці крові може бути пов'язано з активним розщепленням колагену та утворенням його фрагментів у матриксі хряща, які індукують активацію ММП та синтез цитокінів, зокрема ФНП- α та ІЛ-1 β , які в свою чергу стимулюють продукцію ПГЕ₂.

При введенні ХС тваринам з експериментальним ОА концентрація ПГЕ₂ у сироватці крові зменшувалася в 1,3 раза ($p \leq 0,05$) порівняно з тваринами групи ОА, однак лишалася в 1,2 раза ($p \leq 0,05$) вищою за контрольні значення (рис. 6.5).

Відомо, що ХС може інгібувати синтез ПГЕ₂ за рахунок інгібування активності ЦОГ-2, а також синтезу та активності мікросомальної простагландин Е - синтетази 1 – індукцибельного ферменту, який каталізує перетворення ПГН₂ в ПГЕ₂, таким чином зменшувати запалення у хворих на ОА [412].

При окремому введенні ПБ та комбінації ПБ з ХС у щурів з експериментальним ОА концентрація досліджуваного прозапального ейкозаноїда в сироватці крові щурів зменшувалася в 1,4 раза ($p \leq 0,05$)

відносно тварин групи з патологією та достовірно досягала рівня контрольних значень (рис. 6.5). При введенні як ХС, так і ПБ інтактним щурам досліджувані показники достовірно залишалися в межах контролю.

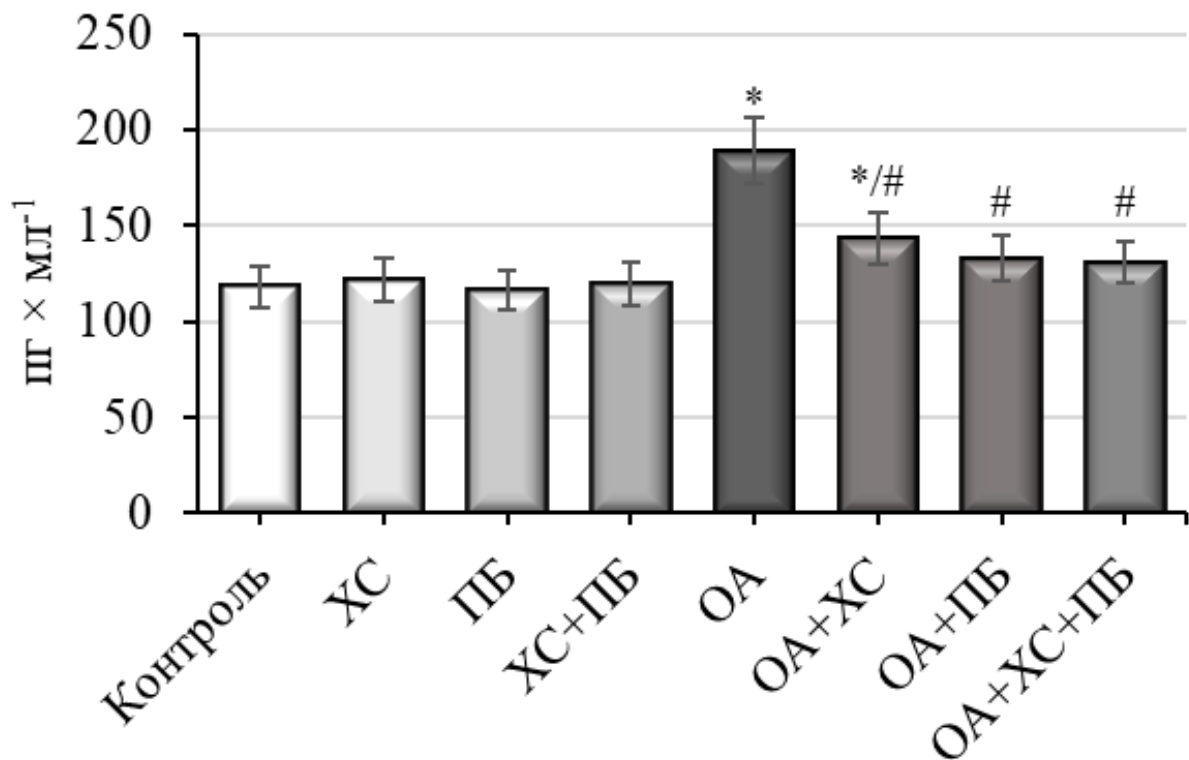


Рис. 6.5 Концентрація простагландину E_2 в сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; * – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно щурів групи ОА)

Бактеріальні патогени, в тому числі грампозитивні та грамнегативні бактерії, викликають збільшення утворення ПГ E_2 для регуляції імунної відповіді в умовах розвитку захворювання. При цьому грамнегативні мікроорганізми викликають більш інтенсивну відповідь синтезу ПГ E_2 моноцитами [413]. Тому є очевидним, що рівень ПГ E_2 регулюється у ШКТ для підтримання цілісності слизового бар'єру, а мікробіота може модулювати рівень ПГ E_2 , регулюючи активацію, дозрівання, міграцію та секрецію цитокінів імунними клітинами [414]. Тому введення ПБ композиції тваринам

з ОА сприяло зменшенню кількості шкідливої кишкової мікробіоти, зниженню концентрації ПГЕ₂ у сироватці крові та пригніченню запалення, як на системному рівні, так і локально.

Отже, результати дослідження показали зростання концентрації ПГЕ₂ у сироватці крові щурів з експериментальним ОА, яке свідчило про розвиток системного запалення в організмі тварин в умовах розвитку патології суглобів. ХС і ПБ виявилися ефективними протизапальними засобами, які сприяли зниженню концентрації ПГЕ₂ у сироватці крові щурів з експериментальним ОА.

6.4 Рівень експресії генів *Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1* у хрящовій тканині та сироватці крові щурів

Дегенеративні зміни хряща та субхондральної кісткової тканини зумовлені порушенням метаболізму у тканинах суглоба внаслідок травм, вроджених вад розвитку, генетичної схильності (зокрема, мутації в гені колагену II типу), ожиріння, активації вільнорадикальних процесів, тощо [415]. Такі фактори можуть призвести до надлишку синтезу прозапальних цитокінів, які, у свою чергу, стимулюють експресію численних хемокінів та прозапальних генів, таких як *Nos2*, *Ptgs2* та *Tgfb1* [359, 416, 417].

Тому наступним етапом наших досліджень було визначити рівень експресії генів *Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*, які залучені у розвиток запалення, у хрящовій тканині суглоба та цільній крові щурів з експериментальним ОА, а також при введенні ХС і ПБ.

Ген *Ptgs2* кодує ЦОГ-2 – фермент, який відповідає за синтез простагландину E₂ з арахідонату. Метаболіти й ферменти каскаду арахідонової кислоти, як відомо, є важливими медіаторами запальної реакції. ЦОГ-2 задіяна у таких біологічних процесах, як метаболізм жирних кислот та ліпідів, їх біосинтез, та метаболізм простагландинів. Фермент є мішенню дії НПЗП, які використовують в якості консервативної терапії [418]. Показано

швидку зміну рівня експресії *Ptgs2* та вмісту прозапальних цитокінів у синовіоцитах і хондроцитах людини в ранньому періоді розвитку ОА [419].

У наших експериментальних дослідженнях виявлено, що рівень експресії гена *Ptgs2* у хрящах колінного суглоба щурів з експериментальним ОА був вищим у 8,1 раза ($p \leq 0,001$) порівняно з контрольними тваринами (рис. 6.6).

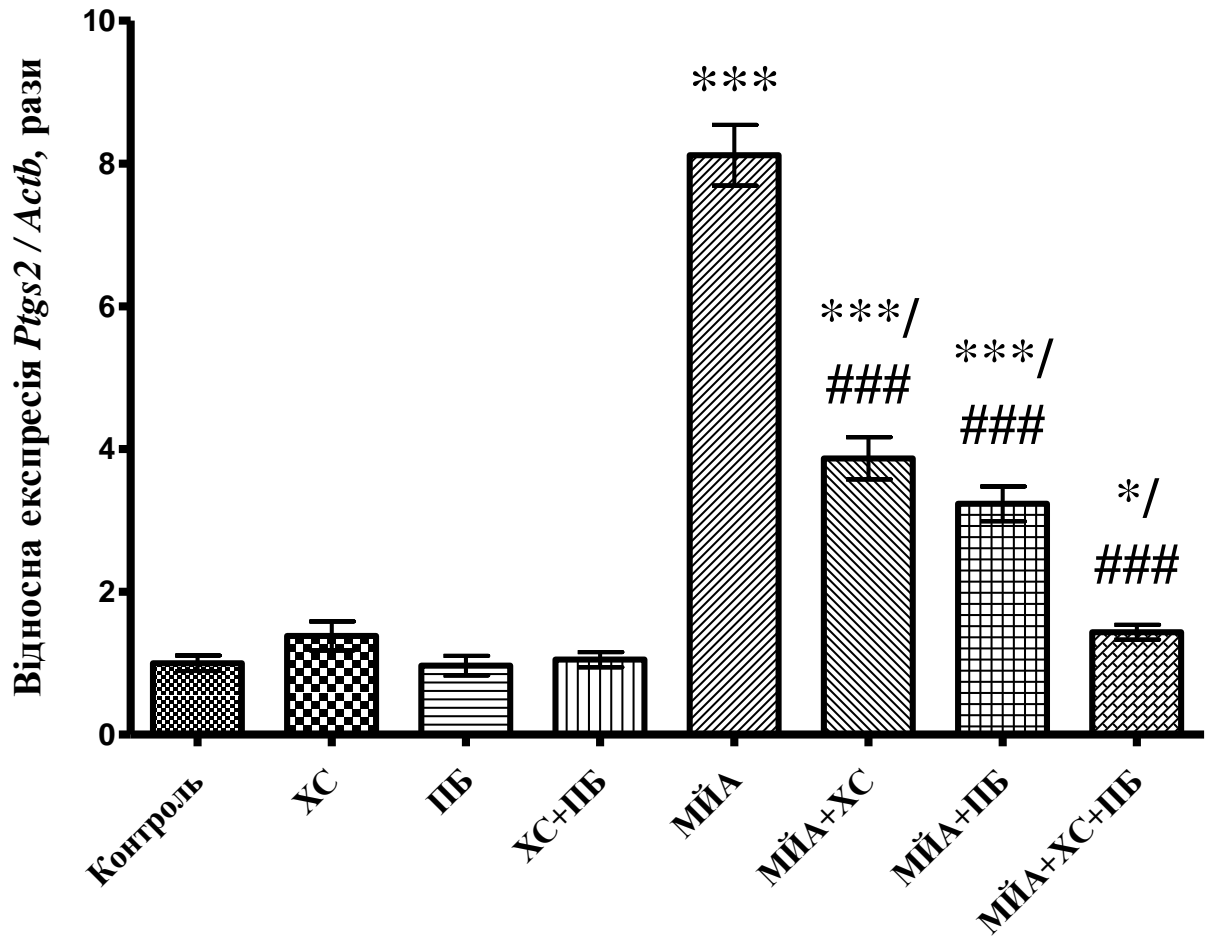


Рис. 6.6 Рівень експресії гена *Ptgs2* в хрящовій тканині колінного суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика (М±m, n=14; *** – $p \leq 0,001$, * – $p \leq 0,05$ відносно контрольних тварин; ### – $p \leq 0,001$ відносно тварин групи ОА)

У щурів, яким окремо вводили ХС і ПБ, а також за їх комбінації, при відсутності МІА-індукованої патології рівень експресії цього гена достовірно не відрізнявся від показників контрольної групи тварин. У той же

час, при введенні ХС щурам з експериментальним ОА, рівень експресії *Ptgs2* знижувався у 2,1 раза ($p \leq 0,001$) відносно тварин з ОА, проте був підвищеним у 3,9 раза ($p \leq 0,001$) порівняно з контрольними тваринами. При введенні ПБ тваринам, у яких моделювали остеоартроз, рівень експресії гена *Ptgs2* був у 2,5 рази ($p \leq 0,001$) нижчим, ніж у тварин групи ОА, однак лишався підвищеним відносно контролю в 3,2 раза ($p \leq 0,05$). За сумісного введення ХС та ПБ у щурів із експериментальним ОА рівень експресії гена, який кодує ЦОГ-2, повертався до контрольних значень (рис. 6.6).

У крові щурів було виявлено, що рівень експресії гена *Ptgs2* у групі тварин з експериментальним ОА був вищим у 4,0 рази ($p \leq 0,001$) порівняно з контрольними тваринами (рис. 6.7).

У групах щурів за відсутності експериментальної патології, яким окремо вводили ХС і ПБ, а також при їх комбінації, рівень експресії *Ptgs2* знаходився в межах контрольних значень. При введенні ХС щурам з експериментальним ОА рівень експресії гена *Ptgs2* знижувався в 1,9 раза ($p \leq 0,001$) відносно тварин групи ОА, проте був підвищеним у 2,1 раза ($p \leq 0,001$) порівняно з контрольними тваринами. При введенні ПБ щурам з експериментальним ОА рівень експресії гена *Ptgs2* був у 2,6 раза ($p \leq 0,001$) нижчим, ніж у тварин групи ОА, однак лишався підвищеним відносно контролю майже в 1,6 раза ($p \leq 0,01$). За сумісного введення ХС та ПБ у щурів із МІА-індукованим ОА рівень експресії цього гена достовірно повертався до контрольних значень (рис. 6.7).

Показане нами значуще посилення експресії *Ptgs2* у хрящевій тканині та крові щурів з експериментальним ОА корелювало зі зростанням експресії прозапального гена *Nos2*, який кодує індукбельну NO-синтазу (iNOS), синтез якої активується бактеріальними ЛПС та прозапальними цитокінами. Фермент синтезує оксид азоту, який є вільним радикалом, і діє як вторинний посередник у багатьох процесах, включаючи нейротрансмісію, протимікробну та протипухлинну активність; при надмірному синтезі – стимулює розвиток ОС і пошкодження компонентів клітин [420].

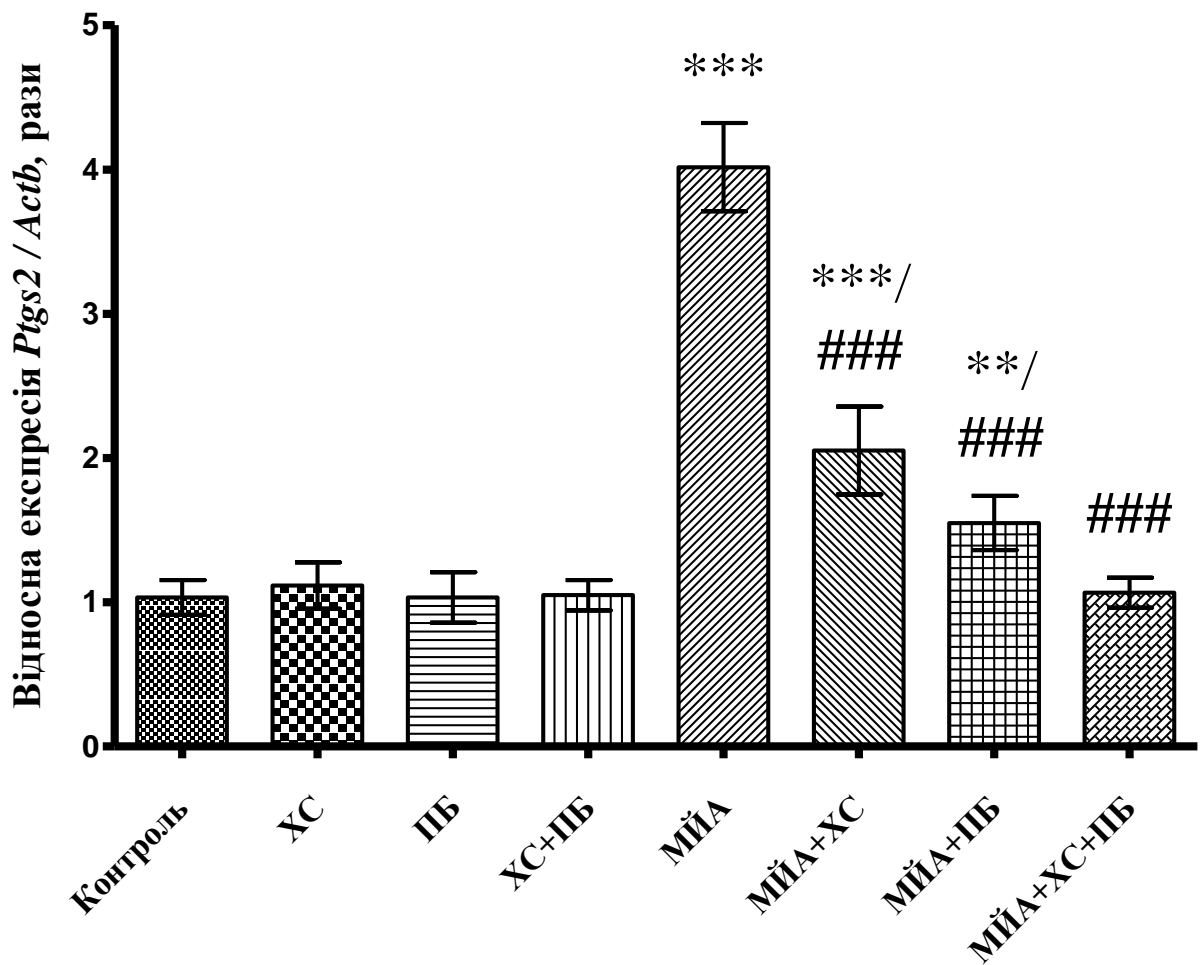


Рис. 6.7 Рівень експресії гена *Ptgs2* у крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотики ($M \pm m$ *** – $p \leq 0,001$, ** – $p \leq 0,01$ відносно контрольних тварин; ### – $p \leq 0,001$ відносно тварин групи ОА)

Показано кореляцію між рівнем експресії цього гена в хондроцитах, синовіоцитах, фібробластах, макрофагах та проявами захворювання при розвитку ОА на деяких тваринних моделях та в людини. Зокрема, виявлено, що гранулоцити синовіальної рідини локально задіяні у синтезі NO [417].

Нами показано, що рівень експресії гена *Nos2* у хрящах колінного суглоба щурів з експериментальним ОА був вищим у 5,8 раза ($p \leq 0,001$) порівняно з контрольними тваринами (рис. 6.8).

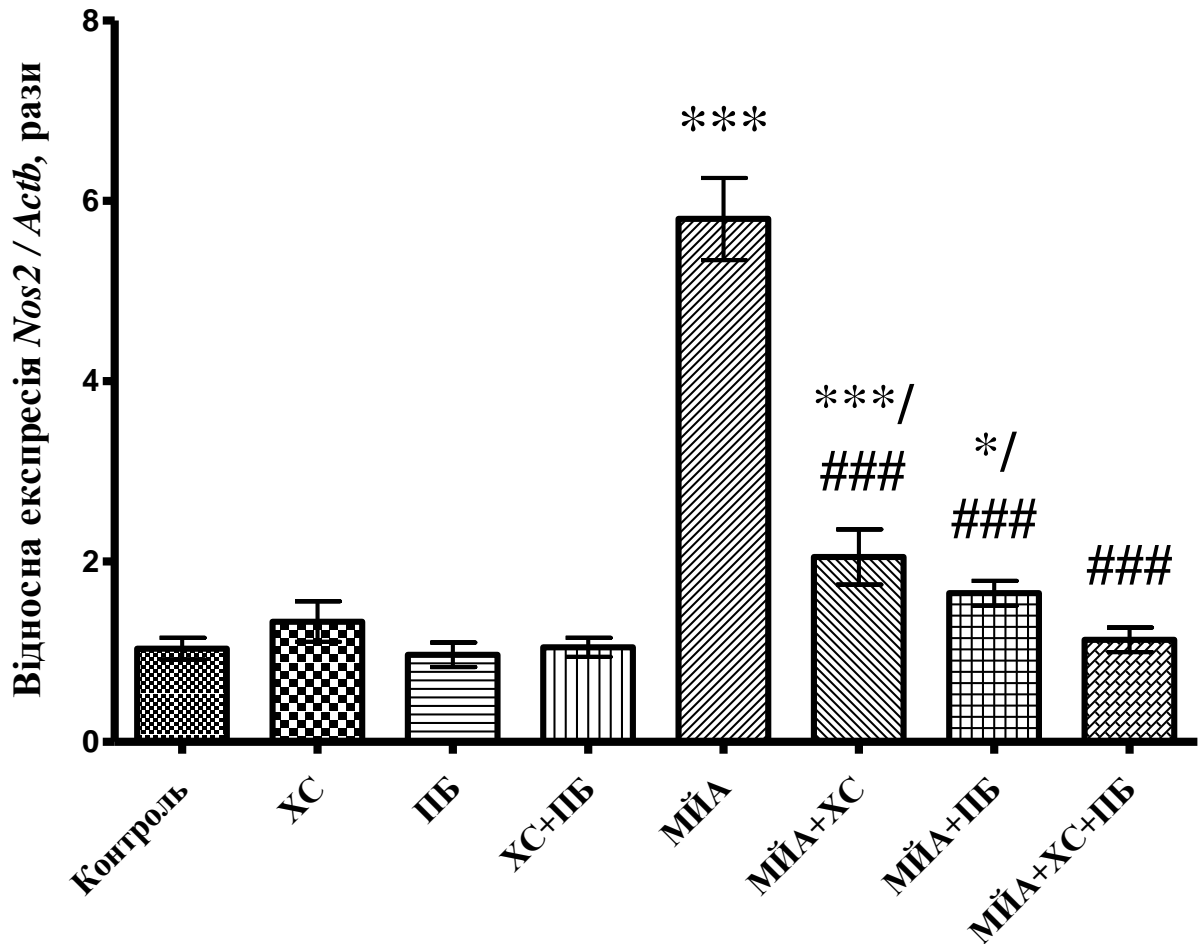


Рис. 6.8 Рівень експресії гена *Nos2* в хрящах колінного суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтин сульфату та пробіотику ($M \pm m$, $n=14$; *** – $p \leq 0,001$, * – $p \leq 0,05$ відносно контрольних тварин; ### – $p \leq 0,001$ відносно тварин групи ОА)

У групах щурів за відсутності експериментальної патології, яким окремо вводили ХС та ПБ, а також при їх сумісній дії, рівень експресії *Nos2* знаходився в межах значень контрольної групи. Проте, при введенні тваринам з МІА-індуковану патологією ХС рівень експресії цього гена знижувався у 2,8 раза ($p \leq 0,001$) відносно тварин групи ОА, проте був підвищеним у 2,1 раза ($p \leq 0,001$), порівняно зі значеннями тварин контрольної групи. При введенні ПБ щурам із ОА рівень експресії гена *Nos2* був в 3,5 рази ($p \leq 0,001$) нижчим, ніж у тварин групи ОА, проте лишався підвищеним відносно контролю майже в 1,7 раза ($p \leq 0,05$). За комбінованого

введення ХС та ПБ у щурів із експериментальним ОА рівень експресії цього гена повертався до контрольних значень (рис.6.8).

Подібна тенденція змін рівня експресії гена *Nos2* спостерігалася у цільній крові тварин контрольної та дослідних груп. У крові щурів нами показано, що рівень експресії гена *Nos2* у тварин з експериментальним ОА був вищим у 3,1 раза ($p \leq 0,001$) порівняно з контрольними тваринами (рис. 6.9).

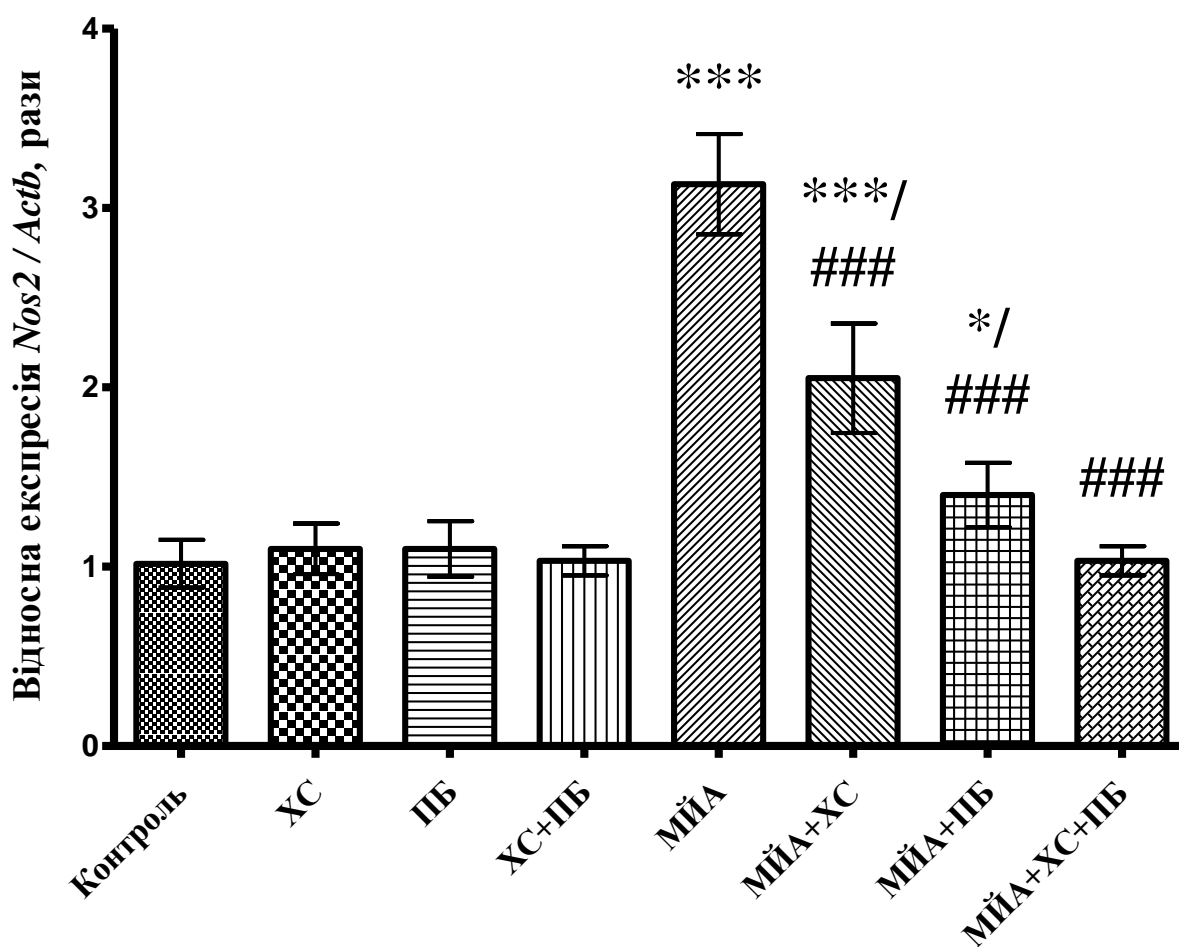


Рис. 6.9 Рівень експресії гена *Nos2* у крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотики ($M \pm m$, $n=14$; *** – $p \leq 0,001$, * – $p \leq 0,05$ відносно контрольних тварин; ### – $p \leq 0,001$ відносно тварин групи ОА)

У групах щурів за відсутності експериментальної патології, яким окремо вводили ХС і ПБ, та при їх сумічній дії, рівень експресії цього гена також знаходився в межах контрольних значень. При введенні ХС за експериментального ОА рівень експресії гена *Nos2* знижувався в 1,5 рази ($p \leq 0,001$) відносно тварин групи ОА, проте був підвищеним у 2,1 рази ($p \leq 0,001$) порівняно з контрольними тваринами. При введенні ПБ тваринам з експериментальною патологією рівень експресії гена *Nos2* був у 2,2 рази ($p \leq 0,001$) нижчим, ніж у тварин групи ОА, проте лишався підвищеним відносно контролю майже в 1,4 рази ($p \leq 0,05$). За комбінованого введення ХС і ПБ у щурів із МІА-індукованим ОА рівень експресії цього гена достовірно повертався до рівня контролю (рис. 6.9).

Отримані результати свідчили про значне підвищення експресії ЦОГ-2 та iNOS у суглобовому хрящі та крові, що характерно для розвитку запалення. Як правило, iNOS активна в імунних клітинах і забезпечує протимікробний та протипухлинний захист, але надвисока її експресія може спричинювати цитотоксичну дію на резидентні клітини [421]. Встановлено, що в культурах *ex vivo* хрящ людини, уражений ОА, протягом 72 годин виділяє значні кількості нітритів, проте автори припускають, що ОА-NOS може бути унікальною ізоформою, що синтезується хондроцитами при патологічних станах [422].

Показано, що NO пригнічує синтез протеоглікану, зменшує метаболічне включення сульфату (35SO_4^{2-}) до глікозаміногліканів [423], активує ММП у хондроцитах хряща [424] та гальмує синтез колагену II [425]. iNOS регулюється ІЛ-1 та ФНП- α . При аналізі РТ-ПЛР помічено, що без стимуляції цитокінами навіть в ураженому ОА хрящі не виявляється експресія iNOS [426]. ЦОГ або простагландин Н-синтаза, як і NO-синтаза, регулюється ІЛ-1. Показано, що ЦОГ у бичачих хондроцитах може активуватися NO через взаємодію з залізом у каталітичному сайті, але після специфічного інгібування iNOS ЦОГ все ще залишається активною, а рівень ПГЕ₂ продовжує зростати [427]. У клінічних дослідженнях виявлено, що

блокування ефектів ІЛ-1 β та інгібування запальних ензимів, таких як NOS та ЦОГ-2, є одним з причин застосування хондропротекторів [428].

Кодований геном *Tgfb1* білок, який локалізований у позаклітинному матриксі, за функціями належить до факторів росту та мітогенів, у нормі ТФР- β 1 відіграє ключову роль у процесах росту, диференціації та гомеостазі хряща: регулює ріст хондроцитів, синтез компонентів позаклітинного матриксу, синтез агрекану, а також є імуносупресивним фактором; тоді як за умов розвитку патології стимулює надмірну проліферацію клітин, що викликає розвиток захворювань, подібних до ОА, при чому його активність залежить від комплексу цитокінів та інших регуляторів [429]. Відомо, що в умовах запалення суглобів ТФР- β 1 синтезується в синовіальній оболонці, його посилена експресія може бути пов'язана з ремісією захворювання [430].

У наступних експериментах встановлено, що рівень експресії гена *Tgfb1* у хрящах колінного суглоба щурів з експериментальною патологією був вищим у 1,7 раза ($p \leq 0,001$) порівняно з контрольними тваринами (рис. 6.10).

У групах щурів за відсутності експериментальної патології, яким окремо та разом вводили ХС та ПБ, рівень експресії цього гена у хрящі значуще не відрізнявся від показників тварин контрольної групи. При введенні ХС щурам з експериментальним ОА рівень експресії гена *Tgfb1* знижувався в 1,3 раза ($p \leq 0,01$) відносно тварин групи ОА, проте був підвищеним в 1,3 раза ($p \leq 0,01$) порівняно з контрольними тваринами. При окремому введенні ПБ та за комбінованого введення ХС і ПБ у щурів із експериментальною патологією рівень експресії цього гена достовірно повертався до контрольних значень (рис.6.10).

У цільній крові щурів було виявлено, що рівень експресії гена *Tgfb1* у тварин з експериментальним ОА був вищим у 4 рази ($p \leq 0,001$) порівняно з контрольними тваринами (рис. 6.11).

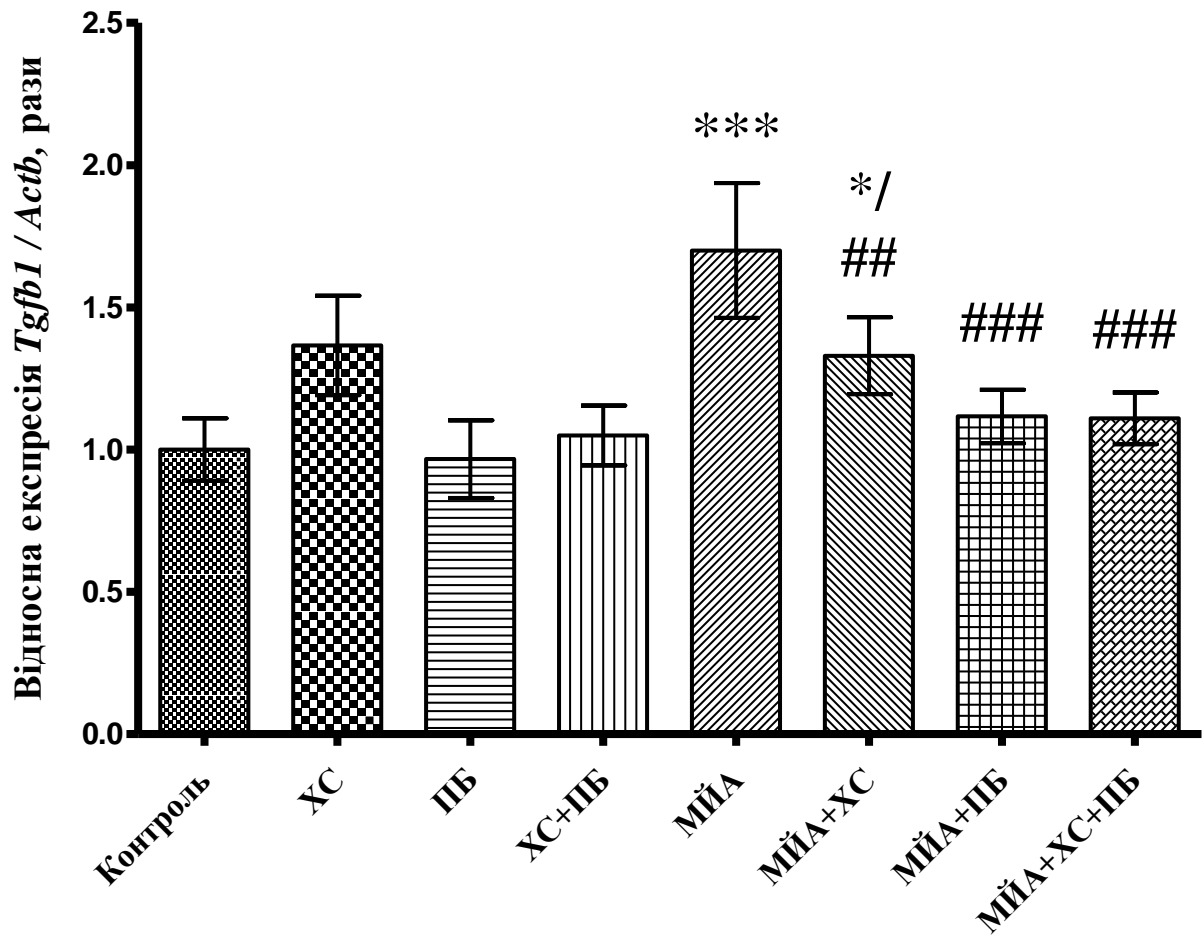


Рис. 6.10 Рівень експресії гена *Tgfb1* у хрящовій тканині колінного суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; *** – $p \leq 0,001$, * – $p \leq 0,05$ відносно контрольних тварин; ### – $p \leq 0,001$, ## – $p \leq 0,01$ відносно тварин групи ОА)

У групах щурів за відсутності експериментальної патології, яким вводили ХС та ПБ, та при їх поєднанні, рівень експресії цього гена у крові знаходився в межах контрольних значень. При введенні щурам з експериментальною патологією ХС рівень експресії гена *Tgfb1* знижувався в 1,2 раза ($p \leq 0,05$) відносно тварин групи ОА, проте залишався підвищеним в 1,2 раза ($p \leq 0,05$) порівняно з контрольними тваринами. При окремому введенні ПБ та за комбінації ХС і ПБ щурам з експериментальним ОА рівень експресії цього гена також повертався до контрольних значень (рис. 6.11).

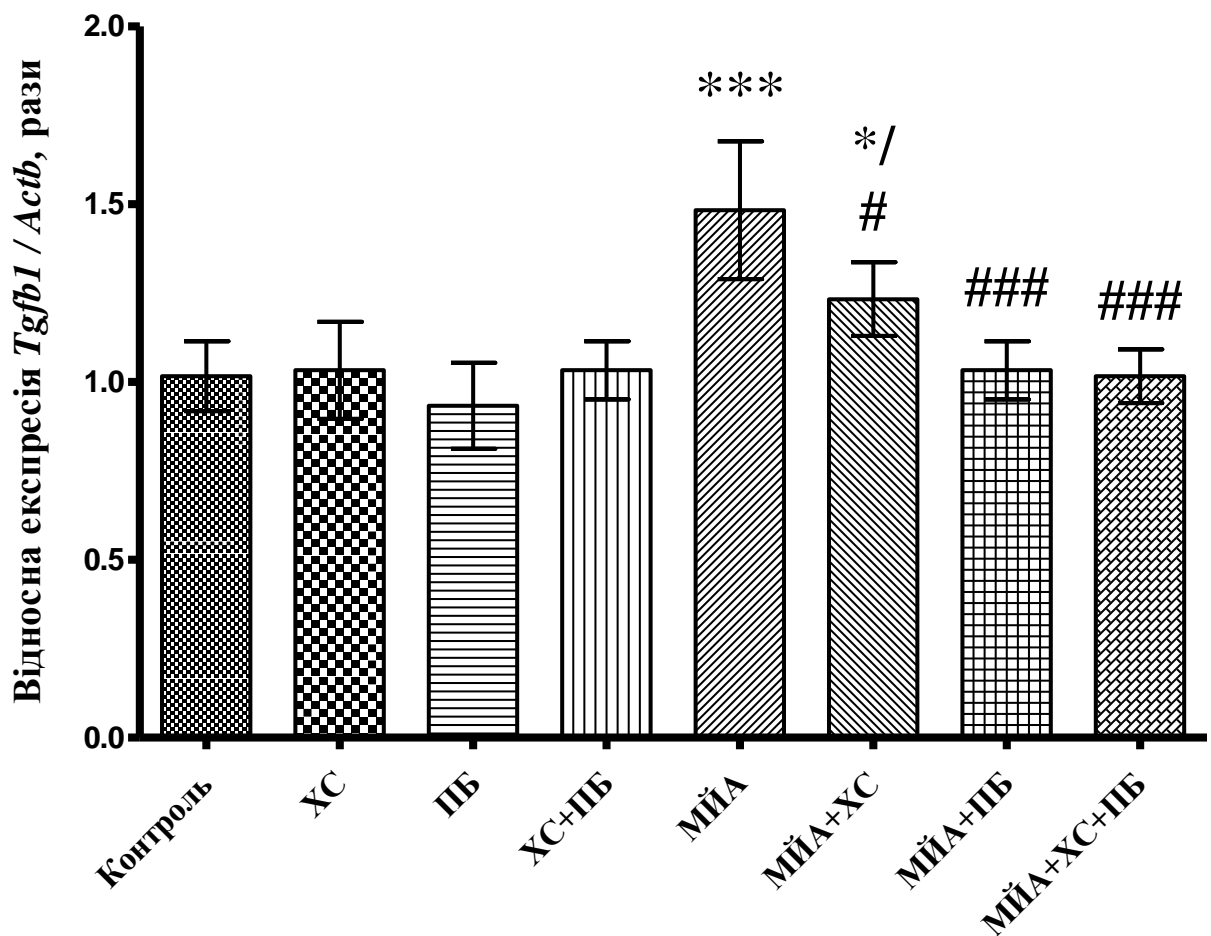


Рис. 6.11 Рівень експресії гена *Tgfb1* в крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтин сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; *** – $p \leq 0,001$, * – $p \leq 0,05$ відносно контрольних тварин; ### – $p \leq 0,001$, # – $p \leq 0,05$ відносно тварин групи ОА)

ТФР- β є потужним індуктором синтезу компонентів екстрацелюлярного матриксу хряща, зокрема протеогліканів та колагену II типу, проявляє виражену протизапальну дію на ІЛ-1 через пригнічення експресії генів, що стимулюються прозапальними цитокінами, наприклад, генів ММП та колагеназ. Відсутність експресії ТФР- β викликає зменшення утворення компонентів матриксу і посилення наслідків катаболічних процесів [431]. Показано [432], що високий рівень експресії ТФР- β може виявлятися у хрящах за відсутності патології, тоді як за умов ОА його експресія може

майже не спостерігати. Також показано [433], що блокування ТФР- β робить хрящ більш сприйнятливим до пошкоджень. На тваринних моделях ОА виявлено зв'язок між надмірною експресією ТФР- β та пригніченням захворювання [434]. У дослідженнях [435, 436] введення щурам ТФР- β стимулювало набряк, запалення, синовіальну гіперплазію та інфільтрацію суглоба Т-лімфоцитами, тоді як введення анти-ТФР- β антитіл безпосередньо у суглобову сумку пригнічувало резорбцію кістки, синтез прозапальних цитокінів та зменшувало прояви синовііту, тому його роль у запаленні ще достовірно не встановлена.

У дослідах на мишах показано, що ТФР- β та його основна внутрішньоклітинна сигнальна молекула Smad3 є важливими для запобігання гіпертрофічної диференціації хондроцитів та підтримки нормального фенотипу суглобових хрящів. У мутантних мишей нокаутних по Smad3 спостерігався розвиток дегенеративних змін у суглобах, що характеризувалися прогресуючою втратою суглобового хряща, утворенням великих остеофітів, зниженням продукції ПГ, аномальним зростанням рівня експресії колагену X типу в хондроцитах, що характерно для ОА людини. Тому вірогідно, що сигнальний каскад ТФР- β / Smad3 має важливе значення для інгібування диференціації хондроцитів суглобового хряща. За відсутності сигналу хондроцити виходять зі стану спокою і піддаються термінальній диференціації, що приводить до розвитку ОА [437].

Показано, що посилення транскрипції генів, які відповідають за синтез ЦОГ-2, NO-синтази, значної кількості хемокінів, ІЛ-6 та інших генів, залучених у каскад запальних реакцій, може регулюватися ІЛ-1 β , надлишок синтезу якого зумовлений різними чинниками, у тому числі виникненням ОС за умов дегенерації хрящової тканини та розвитку запалення [416]. Відбувається вивільнення прозапальних цитокінів у хондроцитах, зокрема ІЛ-6, ІЛ-8, ФНП- α , фактора активації тромбоцитів, тощо, на тлі зниження протизапальних ІЛ-4 та ІЛ-10. Вище зазначені цитокіни індукують синтез молекул клітинної адгезії (МКА) на плазматичній мембрані нейтрофілів і

ендотеліоцитів, що призводить до міграції нейтрофілів з мікроциркуляторного русла в хондроцити [416]. Активація нейтрофілів обумовлює подальше збільшення вироблення прозапальних цитокінів і простагландинів, зростання синтезу МКА, підвищення проникності судин і генерацію АФК у хондроцитах. Вивільнення цитокінів і зростання синтезу МКА сприяють подальшій міграції нейтрофілів, рекрутуванню В-клітин та активованих Т-клітин, що зумовлює цикл запалення, наслідком чого стає посилена генерація АФК, розвиток ОС, зміна метаболізму хондроцитів і збільшення експресії ряду генів, залучених у розвиток запалення, та тих, які кодують ММП [416, 438]. За таких умов пригнічується експресія матриксних генів, зокрема *Col2a1*, який кодує колаген II типу. Існує припущення, що вплив ІЛ-1 β на експресію вище зазначених генів може відбуватися за допомогою наступних факторів транскрипції: міоцит-енхансер, що зв'язує фактор-3 (MEF-3), ССААТ/енхансер-зв'язуючий білок (С/ЕВР) та NF- κ B [416, 439].

Як і в нашому дослідженні, зростання рівня експресії *Tgfb1* показано на різних моделях ОА тварин, на клітинних лініях та у пацієнтів, хворих на ОА та РА. Викликає зацікавленість те, що введення ТФР- β_1 приводило до часткового наближення до фізіологічних значень рівня експресії деяких генів різних хемокінів та цитокінів, зростання експресії яких було зумовлене експериментальним додаванням ІЛ-1 β . Таким чином, підвищення експресії *Tgfb1*, окрім участі у розвитку запалення, може дещо інгібувати прозапальну та катаболічну дію ІЛ-1 β .

Отже, встановлені зміни експресії прозапальних генів *Nos2*, *Ptgs2* та *Tgfb1* у хрящовій тканині колінного суглоба та крові щурів з експериментальним ОА свідчили про розвиток патологічних процесів у хрящі, зокрема дегенерацію та запалення.

Відомо, що ХС є основним компонентом протеогліканів, складовою хрящової матриці. На деяких тваринних моделях хронічного ОА показано, що при введенні ХС знижувалась експресія та синтез ЦОГ-2 і хемокіну

CCL2, пригнічувалась інфільтрація імунними клітинами синовіальної оболонки, і зменшувався ступінь клітинної проліферації в синовіальній оболонці [440]. У дослідженнях *in vivo* встановлено, що при введенні ХС в синовіальну тканину знижувалась концентрація ІЛ-1 β [441] та інших медіаторів запалення (ІЛ-6, NO-синтази, простагландину E₂), та пригнічувалась індукована експресія ММП-3, -9, -13 у хондроцитах [442]. Хондропротектори захищають клітини, інгібуючи як окиснення білків та ліпідів, так і синтез вільних радикалів, перешкоджаючи апоптозу хондроцитів [443].

Таким чином, показане зростання експресії прозапальних генів *Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1* у хрящовій тканині та крові щурів з експериментальним ОА може свідчити про розвиток патологічних процесів у тканинах суглоба та організмі вцілому, зокрема дегенеративні зміни у хрящі та запалення. Введення ХС та ПБ сприяло пригніченню експресії генів, що кодують ЦОГ-2, iNOS та ТФР- β , зниженню розвитку запальних процесів в організмі, та відповідно структурному відновленню хрящової тканини щурів з експериментальним ОА. Особливо виражений ефект на експресію вище зазначених генів спостерігався при комбінованому введенні ХС і ПБ.

Отже, за умов розвитку експериментального ОА колінних суглобів щурів спостерігалися ознаки посилення запальних процесів та деградації хряща: в сироватці крові та хрящовій тканині зростав вміст катаболічних цитокінів ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-8, ІФН- γ та ПГЕ₂, підвищувався рівень експресії генів *Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*, залучених до розвитку запалення, при одночасному зниженні вмісту анаболічних цитокінів ІЛ-4, ІЛ-10 та ІФР-1, а також підвищенні вмісту ТФР- β , що свідчило про активацію імунної відповіді та запалення на пошкодження та зміну гомеостазу хондроцитів хряща. Введення як ХС, так і ПБ сприяло зниженню розвитку запальних процесів в організмі, та, відповідно, структурному відновленню хрящової тканини щурів з ОА. Комбіноване введення ХС та ПБ найбільш виражено

сприяло зниженню запальних досліджуваних параметрів у крові та хрящовій тканині щурів за умов розвитку експериментального ОА.

Результати, викладені у розділі, опубліковані у наступних працях: [205, 248, 252, 273, 357, 358, 444, 445, 446, 447, 448].

РОЗДІЛ 7

ОКИСНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ ГОМЕОСТАЗ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ТА ХРЯЦОВІЙ ТКАНИНІ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРИТУ ПРИ ВВЕДЕННІ ХОНДРОЇТИНУ СУЛЬФАТУ ТА ПРОБІОТИКА

7.1 Вміст активних форм кисню в сироватці крові та хрящовій тканині щурів

Провідну роль у виникненні та прогресуванні ОА відіграє інтенсифікація реакцій вільнорадикального окиснення, що призводить до структурних та функціональних змін у хондроцитах і позаклітинному матриксі, запальних і дегенеративних змін хряща й оточуючих тканин [449, 450]. Нещодавні дослідження [451, 452, 453] показали залучення ОС як у патогенез ОА, так і до ефектів терапевтичних засобів, що застосовуються у лікуванні захворювань ОРА. Внаслідок дії прозапальних цитокінів та активації сигнальних каскадів у клітинах утворюються надлишки АФК, що має результатом посилення ПОЛ, ОМБ, деструкції нуклеїнових кислот, вуглеводів. Окремі автори наукових досліджень вважають, що супероксидний радикал ($O_2^{\cdot-}$) та пероксид водню (H_2O_2) рідко спричиняють суттєві функціональні пошкодження у клітинах, однак, небезпечним є те, що при підвищенні їх концентрації утворюється гідроксильний радикал OH^{\cdot} , який є найреактивнішим оксидантом біологічних систем [454, 455].

У ході проведених нами експериментальних досліджень встановлено підвищення вмісту супероксидного радикалу та пероксиду водню в сироватці крові щурів з експериментальним ОА у 2,3 та 2,4 раза ($p \leq 0,05$) відповідно, порівняно з контролем (табл. 7.1). При введенні ХС тваринам з експериментальним ОА вміст зазначених АФК знижувався в 1,5 рази ($p \leq 0,05$) відносно відповідних показників групи ОА. При введенні

ПБ тваринам з експериментальною патологією суглобів вміст супероксидного радикалу знижувався в 1,6 раза ($p \leq 0,05$), пероксиду водню – в 1,7 раза ($p \leq 0,05$) відносно відповідних показників у щурів групи ОА. За комбінованого введення ХС та ПБ у щурів із МІА-індукованим ОА вміст досліджуваних АФК у сироватці крові зменшувався майже у 2 рази ($p \leq 0,05$) відносно тварин з експериментальною патологією, однак значення залишалися вищими за рівень контролю в 1,2 раза (табл. 7.1).

Таблиця 7.1

Вміст активних форм кисню у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$)

Показник Групи тварин	Супероксидний радикал, мкмоль ХТТ формазау × мг ⁻¹ білка	Гідрогену пероксид, мкмоль × мг ⁻¹ білка
Контроль	4,79 ± 0,43	0,36 ± 0,03
ХС	4,85 ± 0,45	0,37 ± 0,03
ПБ	4,64 ± 0,42	0,34 ± 0,03
ХС+ПБ	4,98 ± 0,52	0,41 ± 0,88
ОА	11,03 ± 1,07*	0,87 ± 0,08*
ОА+ХС	7,59 ± 0,69*/#	0,59 ± 0,05*/#
ОА+ПБ	6,74 ± 0,51*/#	0,51 ± 0,04*/#
ОА+ХС+ПБ	5,87 ± 0,54*/#	0,44 ± 0,04*/#

* – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно тварин групи ОА

У хрящовій тканині щурів з експериментальним ОА вміст супероксидного радикалу зростав в 3,1 раза ($p \leq 0,05$), пероксиду водню – в 1,8 раза ($p \leq 0,05$), порівняно з контролем (табл. 7.2). При введенні ХС щурам з експериментальним ОА вміст O_2^- знижувався – в 1,5 рази ($p \leq 0,05$), H_2O_2 –

в 1,4 раза ($p \leq 0,05$) відносно відповідних показників тварин групи ОА. При введенні ПБ щурам з експериментальним ОА вміст супероксидного радикалу знижувався в 1,8 раза ($p \leq 0,05$), пероксиду водню – в 1,5 рази ($p \leq 0,05$) відносно відповідних показників групи ОА. Комбіноване введення ХС і ПБ щурам із експериментальним ОА викликало зниження вмісту $O_2^{\cdot-}$ та H_2O_2 у хрящовій тканині колінного суглоба у 2,1 та 1,6 рази ($p \leq 0,05$) відповідно, відносно значень тварин групи ОА, які не отримували ХС та ПБ, при цьому вміст пероксиду водню досягав рівня контрольних значень, тоді як вміст $O_2^{\cdot-}$ лишався вище рівня контролю в 1,5 рази ($p \leq 0,05$). При введенні як ХС, так і ПБ інтактним щурам, досліджувані показники достовірно перебували в межах контрольних значень (табл. 7.2).

Таблиця 7.2

Вміст активних форм кисню у хрящовій тканині суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$)

Показник Групи тварин	Супероксидний радикал, мкмоль ХТТ формагану \times мг ⁻¹ білка	Гідрогену пероксид, мкмоль \times мг ⁻¹ білка
Контроль	7,95 \pm 0,71	12,45 \pm 1,09
ХС	8,82 \pm 0,83	12,65 \pm 1,21
ПБ	7,47 \pm 0,72	11,98 \pm 1,07
ХС+ПБ	9,02 \pm 0,04	13,45 \pm 1,45
ОА	25,36 \pm 2,19*	23,02 \pm 2,24*
ОА+ХС	16,48 \pm 1,61*/#	17,05 \pm 1,57*/#
ОА+ПБ	13,85 \pm 1,21*/#	15,36 \pm 1,42*/#
ОА+ХС+ПБ	12,04 \pm 1,18*/#	14,21 \pm 1,11#

* – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно тварин групи ОА

Відомо, що АФК, зокрема $O_2^{\cdot -}$ та пероксинітрит, безпосередньо пошкоджують гуанінові повтори в теломерних ділянках ДНК, що вказує на те, що окиснення призводить до скорочення теломерів, незалежно від активності поділу клітини [456]. Ці дослідження дозволяють припустити, що ОС може викликати нестабільність теломерів хондроцитів, яка може приводити до передчасного старіння клітин [457].

У дослідженнях [458] показано, що механічне перенавантаження суглобів сприяло генерації мітохондріального супероксидного аніон-радикалу та селективному інгібуванню СОД 2 у хондроцитах. Дефіцит ферменту може призводити до надмірного утворення мітохондріального супероксидного радикалу в хондроцитах, що може викликати дегенерацію хряща. У клітинах суглобового хряща пероксид водню, що в нормі є сигнальною молекулою, запускає NF- κ B/MAPK каскад, який активує експресію прозапальних цитокінів та аутоімунну деградацію хрящової тканини [459]. Виявлене нами підвищення вмісту АФК у хрящовій тканині при експериментальному ОА може призводити до розривів ДНК, модифікації нуклеїнових основ, ушкодження хромосом. При взаємодії пероксиду водню з білками утворюються гідрпероксида, змінюється третинна структура білків, що призводить до їх агрегації, денатурації та втрати їх функціональної активності. ПОЛ порушує структуру мембран, змінює клітинну сигналізацію, що може призводити до апоптозу клітин [460].

Таким чином, згідно отриманих результатів експериментальних досліджень при МІА-індукованому ОА в сироватці крові та хрящовій тканині щурів зростає рівень АФК, що свідчить про активацію вільнорадикальних процесів як безпосередньо у суглобі, так і на системному рівні в організмі тварин. Окреме введення ХС і ПБ, та їх сумісна дія, сприяли зниженню вмісту АФК у крові та хрящі щурів з експериментальним ОА, не порушуючи окисного балансу в нормі, що свідчило про їх антиоксидантні властивості.

7.2 Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у сироватці крові та хрящовій тканині щурів

Одним із наслідків дії АФК на компоненти клітини є окиснення ліпідів. Його оцінюють за вмістом продуктів ПОЛ – ДК (первинних продуктів), ТБК-активних продуктів, (проміжних, основним компонентом яких є МДА), та ШО (кінцевих продуктів).

Відомо, що у синовіальній рідині хворих на ОА людей вміст продуктів ПОЛ зростає в кілька разів [461]. ДК утворюються при окисненні арахідонової кислоти з відривом водню у α положенні по відношенню до подвійного зв'язка. Дані сполуки пошкоджують структурні білки, ферменти, ліпопротеїди і нуклеїнові кислоти. ДК є нестійкими і перетворюються на ненасичені альдегіди, одним з яких є МДА. За фізіологічних умов МДА бере участь в синтезі простагландинів і стероїдів, а за розвитку патології – сшиває молекули ліпідів і знижує плинність мембран, внаслідок чого може відбуватись порушення цілої низки метаболічних процесів [462].

Взаємодія карбонільних груп альдегідів чи кетонів з вільними аміногрупами призводить до утворення ШО, за надлишку яких дестабілізуються мембрани та може активуватись апоптоз клітин. Продукти ПОЛ здатні пригнічувати гліколіз і окисне фосфорилування, активність мембранних ферментів, процеси синтезу біомолекул, а також володіють вираженою цитотоксичністю [463].

Згідно проведених нами досліджень встановлено, що при експериментальному ОА в організмі активуються процеси ПОЛ, про що свідчило підвищення у сироватці крові щурів вмісту ДК – у 2,6 рази ($p \leq 0,05$), ТБК-активних продуктів – у 2 рази ($p \leq 0,05$) та ШО – в 1,8 рази ($p \leq 0,05$) відносно контролю (табл. 7.3). Показано, що при введенні ХС щурам з експериментальним ОА вміст продуктів ПОЛ у сироватці крові знижувався: ДК – в 1,4 рази ($p \leq 0,05$), ТБК-активних продуктів – в 1,5 рази ($p \leq 0,05$) та ШО – в 1,2 рази ($p \leq 0,05$) відносно тварин групи ОА.

При введенні ПБ тваринам з експериментальним ОА у сироватці крові рівень продуктів ліпідної пероксидації знижувався: ДК та ТБК-активних продуктів – в 1,7 та 1,6 раза ($p \leq 0,05$) відповідно, вміст ШО – в 1,3 раза ($p \leq 0,05$) відносно тварин групи ОА. Сумісне введення ХС і ПБ щурам з експериментальною патологією викликало зниження у крові продуктів ПОЛ: ДК – в 1,6 раза ($p \leq 0,05$), ТБК-активних продуктів – в 1,8 раза ($p \leq 0,05$) та ШО – в 1,4 раза ($p \leq 0,05$) відносно тварин групи ОА, при цьому значення перебували вище контрольного рівня. При окремому та комбінованому введенні ХС і ПБ інтактним щурам досліджувані показники достовірно залишалися в межах контрольних значень (табл. 7.3).

Таблиця 7.3

Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$)

Показник Групи тварин	Дієнові кон'югати, нмоль \times мг ⁻¹ білка	ТБК-активні продукти, нмоль \times мг ⁻¹ білка	Шиффові основи, ум. од. \times мг ⁻¹ білка
Контроль	30,86 \pm 2,84	7,12 \pm 0,65	0,75 \pm 0,07
ХС	31,25 \pm 3,09	6,89 \pm 0,67	0,79 \pm 0,07
ПБ	29,94 \pm 2,88	6,64 \pm 0,61	0,74 \pm 0,06
ХС+ПБ	32,21 \pm 3,15	8,05 \pm 0,71	0,81 \pm 0,09
ОА	80,17 \pm 7,58*	14,82 \pm 1,27*	1,36 \pm 0,12*
ОА+ХС	57,04 \pm 5,25*/#	10,02 \pm 0,94*/#	1,12 \pm 0,08*/#
ОА+ПБ	46,11 \pm 4,11*/#	9,27 \pm 0,85*/#	1,03 \pm 0,09*/#
ОА+ХС+ПБ	50,32 \pm 4,63*/#	8,69 \pm 0,78*/#	0,98 \pm 0,08*/#

* – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно тварин групи ОА

У хрящовій тканині за умов експериментального ОА також інтенсифікувалися процеси ліпідної пероксидації, про що свідчить збільшення рівня ДК у 2 рази ($p \leq 0,05$), ТБК-активних продуктів – в 2,5 рази ($p \leq 0,05$) та ШО – у 2,2 рази ($p \leq 0,05$) відносно контролю (табл. 7.4).

Таблиця 7.4

Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів хрящовій тканині суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$)

Показник Групи тварин	Дієнові кон'югати, нмоль \times мг ⁻¹ білка	ТБК-активні продукти, нмоль \times мг ⁻¹ білка	Шиффові основи, ум. од. \times мг ⁻¹ білка
Контроль	279,88 \pm 18,27	63,56 \pm 5,75	8,01 \pm 0,75
ХС	271,29 \pm 26,08	61,92 \pm 5,84	7,88 \pm 0,71
ПБ	265,82 \pm 26,12	65,33 \pm 6,12	8,12 \pm 0,79
ХС+ПБ	282,35 \pm 27,02	66,25 \pm 6,34	9,03 \pm 0,86
ОА	579,94 \pm 55,73*	158,59 \pm 14,02*	17,49 \pm 1,66*
ОА+ХС	397,81 \pm 37,54*/#	112,93 \pm 10,34*/#	12,25 \pm 1,18*/#
ОА+ПБ	400,92 \pm 36,74*/#	118,01 \pm 11,01*/#	12,73 \pm 1,21*/#
ОА+ХС+ПБ	356,81 \pm 32,91*/#	93,71 \pm 8,69*/#	11,04 \pm 0,93*/#

* – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно тварин групи ОА

Показано, що при окремому введенні як ХС, так і ПБ щурам з експериментальним ОА вміст продуктів ПОЛ у хрящовій тканині знижувався: ДК – в 1,5 та 1,4 рази ($p \leq 0,05$) відповідно, ТБК-активних продуктів – в 1,4 та 1,3 рази ($p \leq 0,05$) відповідно, ШО – в 1,4 рази ($p \leq 0,05$) відносно тварин групи ОА. За сумісного введення ХС і ПБ вміст продуктів ПОЛ в хрящовій тканині суглоба щурів з експериментальним ОА

зменшувався: ДК та ШО – у 1,6 раза ($p \leq 0,05$), ТБК-активних продуктів – в 1,7 раза ($p \leq 0,05$) відносно значень групи тварин з ОА, однак лишався достовірно вищим за рівень у контрольних тварин. При введенні інтактним щурам ХС і ПБ окремо та разом, досліджувані показники достовірно залишалися в межах контрольних значень (табл. 7.4).

Таким чином, згідно проведених нами досліджень встановлено, що при експериментальному ОА в хрящовій тканині та крові інтенсифікувалися процеси ПОЛ, про що свідчить збільшення рівня ДК, ТБК-активних продуктів і ШО.

У дослідженнях [464, 465] були отримані подібні результати та встановлено, що в хондроцитах *in vitro* при ОА збільшувався вміст продуктів ПОЛ, а саме: МДА та гідроксиноненалу. Оскільки суглобовий хрящ не має в своєму складі судин, то надходження до нього кисню обмежене. Незважаючи на те, що метаболізм клітин добре пристосований до гіпоксії, виявлено, що хондроцити чутливі до кисню. В дослідженні *in vitro* акцентовано на важливості підтримки певного рівня парціального тиску кисню в культурі клітин хондроцитів, оскільки гіпоксія сприяла експресії хондрогенного фенотипу і формуванню специфічного хрящового матриксу. Окрім того, АФК відіграють важливу роль у регуляції ряду основних видів метаболізму, таких як активація клітин хондроцитів, проліферація і ремоделювання матриксу. Проте, за надлишкової генерації АФК, яка перевищує антиоксидантний потенціал клітини, розвивається ОС, що, в свою чергу, викликає структурні та функціональні ушкодження хряща, включаючи загибель клітин і деградацію матрикса [466].

Показано, що МДА, який є продуктом ПОЛ при ОС здатен окиснювати білки хрящового матриксу, що призводить до змін біохімічних та біофізичних властивостей хрящової тканини [467]. У синовіальній рідині пацієнтів, хворих на ОА виявлено розвиток ОС, що супроводжувався підвищеною продукцією активованих кисневих метаболітів (H_2O_2 , NO^*) і активацією ПОЛ (підвищення вмісту МДА) на фоні дисбалансу і інгібування

компонентів антиоксидантної системи (СОД, КАТ, ГТ, ГП, зниження вмісту відновленого глутатіону). Інтенсифікація вільнорадикального окиснення і посилення прооксидантних властивостей синовіальної рідини хворих на ОА залежали від вираженості патологічного процесу, оперативного втручання при артроскопії, і викликали деструктивно-дистрофічні зміни суглобового хряща, активацію апоптозу і некроз хондроцитів [451, 468].

Виявлене зниження продуктів ПОЛ у сироватці крові та хрящовій тканині щурів з експериментальним ОА при застосуванні ХС і ПБ вказувало на антиоксидантний ефект цих сполук. Відомо, що ХС володіє власною антиоксидантною активністю. Так, у ряді досліджень [469, 470] показано здатність ХС хелатувати йони перехідних металів (залізо, мідь та ін.), які беруть безпосередню участь у ініціюванні реакцій Фентона та Хабер-Вейса, що, в свою чергу, приводить до зменшення утворення вільних радикалів. Окрім того, хелатування може відбуватись за рахунок зв'язування металів з карбоксильною групою залишку глюкуронової кислоти та сульфатованою групою в 4-ому або 6-ому положенні амінокислотного залишку карбонової групи молекули ХС [471]. Також деякі штами молочнокислих бактерій можуть інгібувати процеси ПОЛ, захоплювати вільні радикали, посилювати експресію генів антиоксидантної системи в різних тканинах [472]. Існують експериментальні дані, в яких показано, що використання *Lactobacillus casei* з колагеном II типу та глюкозаміном у щурів з артритом мало синергетичний ефект, відбувалося значне пригнічення експресії прозапальних цитокінів та ММП, зменшувалася інфільтрація лімфоцитів та руйнування хряща [347].

7.3 Вміст продуктів окисної модифікації білків у сироватці крові та хрящовій тканині щурів

За умов надмірної генерації АФК, що утворюються при інтенсифікації вільнорадикальних процесів, та ОС розвиваються процеси неконтрольованої ОМБ, які спричиняють зміни фізико-хімічних властивостей макромолекул:

фрагментацію, агрегацію та протеоліз, що призводить до втрати їх біологічної активності, інактивації активних центрів ферментів, порушення процесів обміну, що може бути як одним із факторів ініціації патологічного процесу, так і сприяти подальшому руйнуванню хряща та субхондральної кістки. Якщо ліпіди мембран захищені від радикальної атаки жиророзчинними антиоксидантами (вітаміни Е, А), то білки, що знаходяться у водному оточенні, таким захистом не володіють. Є дані, що ліпіди та трансмембранні білки руйнуються під дією вільних радикалів у водному середовищі набагато швидше, ніж в гідрофобному [473].

Основними структурними білками хрящової тканини, які модифікуються в окисних реакціях, є ПГ. Вважається, що деструкція білків є раннім маркером окиснювальних пошкоджень тканин, порівняно з ПОЛ, оскільки продукти ОМБ стабільніші порівняно з пероксидами ліпідів, які швидко метаболізують під дією пероксидаз і низькомолекулярних антиоксидантів [474].

У ході проведених експериментальних досліджень встановлено, що у щурів із експериментальним ОА в сироватці крові вміст продуктів ОМБ зростав (табл. 7.5). Так, для продуктів нейтрального характеру: альдегідних – в 1,7 раза ($p \leq 0,05$) і кетонних – в 1,9 раза ($p \leq 0,05$); для продуктів основного характеру: альдегідних – в 1,5 рази ($p \leq 0,05$) та кетонних – в 1,6 раза ($p \leq 0,05$), відповідно порівняно з контролем. Виявлено, що при введенні ХС щурам із експериментальним ОА в сироватці крові вміст нейтральних та альдо- і кетопохідних основного характеру знижувався в 1,3 та 1,2 раза ($p \leq 0,05$) відповідно відносно показників тварин групи ОА, при цьому значення продуктів ОМБ основного характеру значимо досягали рівня контролю. За умов введення ПБ тваринам з експериментальним ОА та при його комбінації з ХС вміст продуктів ОМБ не відрізнявся статистично від такого у тварин контрольної групи. При окремому та комбінованому введенні як ХС, так і ПБ інтактним щурам, досліджувані показники у сироватці крові статистично значимо залишалися в межах контрольних значень (табл. 7.5).

Таблиця 7.5

Вміст продуктів окисної модифікації білків у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту та при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$)

Показник Групи тварин	Продукти нейтрального характеру, ум.од. \times мг ⁻¹ білка		Продукти основного характеру, ум.од. \times мг ⁻¹ білка	
	альдопохідні	кетопохідні	альдопохідні	кетопохідні
Контроль	0,051 \pm 0,005	0,038 \pm 0,004	0,035 \pm 0,003	0,029 \pm 0,003
ХС	0,053 \pm 0,005	0,041 \pm 0,004	0,037 \pm 0,004	0,031 \pm 0,003
ПБ	0,052 \pm 0,005	0,036 \pm 0,003	0,032 \pm 0,003	0,028 \pm 0,002
ХС+ПБ	0,058 \pm 0,008	0,045 \pm 0,005	0,038 \pm 0,004	0,035 \pm 0,003
ОА	0,087 \pm 0,008*	0,071 \pm 0,007*	0,054 \pm 0,005*	0,046 \pm 0,004*
ОА+ХС	0,068 \pm 0,006*/#	0,061 \pm 0,005*/#	0,042 \pm 0,004#	0,038 \pm 0,004#
ОА+ПБ	0,061 \pm 0,006#	0,049 \pm 0,004#	0,044 \pm 0,004#	0,035 \pm 0,003#
ОА+ХС+ПБ	0,059 \pm 0,006#	0,045 \pm 0,004#	0,041 \pm 0,003#	0,032 \pm 0,003#

* – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно щурів групи ОА

Показано, що у хрящовій тканині тварин із експериментальним ОА вміст продуктів ОМБ зростав: для альдегідних і кетонних продуктів нейтрального характеру – в 1,8 і 1,5 рази ($p \leq 0,05$); для основного характеру – в 1,4 та 1,7 рази ($p \leq 0,05$) відповідно, порівняно з контролем (табл. 7.6). При введенні як ХС, так і ПБ, а також при їх комбінації у тварин з експериментальним ОА, вміст нейтральних та основних альдегідних і кетонних продуктів у хрящовій тканині значимо перебував у межах контрольних значень. За умов окремого та сумісного введення інтактним щурам як ХС, так і ПБ, досліджувані показники у хрящовій

тканині суглоба значимо залишалися в межах контролю (табл. 7.6).

Таблиця 7.6

Вміст продуктів окисної модифікації білків у хрящовій тканині суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту та при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика (M ± m, n=14)

Показник Групи тварин	Продукти нейтрального характеру, ум.од. × мг ⁻¹ білка		Продукти основного характеру, ум.од. × мг ⁻¹ білка	
	альдопохідні	кетопохідні	альдопохідні	кетопохідні
Контроль	0,048 ± 0,004	0,052 ± 0,005	0,045 ± 0,005	0,039 ± 0,004
ХС	0,051 ± 0,005	0,049 ± 0,004	0,042 ± 0,004	0,041 ± 0,005
ПБ	0,049 ± 0,005	0,051 ± 0,004	0,043 ± 0,004	0,037 ± 0,004
ХС+ПБ	0,052 ± 0,005	0,054 ± 0,005	0,047 ± 0,005	0,043 ± 0,005
ОА	0,088 ± 0,008*	0,076 ± 0,008*	0,064 ± 0,006*	0,067 ± 0,006*
ОА+ХС	0,071 ± 0,007#	0,052 ± 0,005#	0,048 ± 0,005#	0,052 ± 0,005#
ОА+ПБ	0,066 ± 0,006#	0,058 ± 0,005#	0,051 ± 0,003#	0,051 ± 0,004#
ОА+ХС+ПБ	0,062 ± 0,006#	0,049 ± 0,005#	0,043 ± 0,003#	0,046 ± 0,004#

* – p ≤ 0,05 відносно контролю; # – p ≤ 0,05 відносно щурів групи ОА

Індукторами ОМБ в умовах зниження антиоксидантного захисту можуть виступати АФК, зростання вмісту вільного заліза, продукти ПОЛ. Гідроксильний радикал змінює нативну конформацію доменів білків, в результаті чого збільшується кількість гідрофобних залишків на поверхні глобули, що зумовлює агрегацію молекул, а в комбінації з супероксидним радикалом – викликає фрагментацію з утворенням низькомолекулярних фрагментів. Ліпідні пероксиди кон'югують із залишками гістидину, цистеїну

та лізину, змінюючи активність ферментів. Лізинові та аспарагінові залишки піддаються глікуванню та глікооксидації, а за умов додаткової дії вільних форм кисню з лізину можуть утворюватися стабільні карбонільовані похідні. SH-групи піддаються поступовому окисненню: від утворення дисульфідів Cys-S-S-Cys, цистеїн-сульфенової кислоти (SO), та сульфоксиду метіоніну (MetSO), що можуть бути зворотньо відновлені до сульфїнової (SO^{2-}) та сульфонової (SO^{3-}) кислот, які не відновлюються в клітинах [475]. Під дією АФК за участі металів, як каталізаторів, залишки аргініну та лізину піддаються карбонільованню з втратою одного чи більше атомів азоту, а залишки проліну, треоніну та цистеїну утворюють стабільні аддукти Міхаеля. Карбонільовання призводить до цільового розщеплення білків протеазами і деградації в протеасомах [476]. Помічено, що накопичення модифікованих білкових агрегатів та альдегідів має результатом виснаження протеазних систем та подальшого накопичення в клітині пошкоджених та неправильно згорнутих білків [477].

Окиснення амінокислотних залишків до альдегідів призводить до інактивації мембранних транспортерів – Na^+/K^+ -АТФ-ази та транспортерів глюкози, білків холдингу – шаперонів Hsp90 та протеїндисульфідізомерази, інактивації сигнальних шляхів за участі протеїнкаїназ, посилення запалення та розвитку апоптозу [478].

Отже, при експериментальному ОА в крові та хрящах зростає вміст продуктів ОМБ, що свідчить про зсув окисно-антиоксидантної рівноваги у прооксидантний бік. Введення ХС і ПБ тваринам з ОА сприяло пригніченню утворення окиснених білкових молекул, більш виражено в хрящовій тканині, яке узгоджувалося з даними щодо зниження рівнів АФК та ПОЛ за таких умов, що може бути пов'язано з широким спектром біологічної активності даних досліджуваних сполук. Відомо [479], що ХС – це сульфатований глікозаміноглікан, який входить до складу протеогліканових комплексів основної речовини хрящової тканини, має виражену гідрофільність і активує анаболічні процеси за рахунок стимуляції синтезу протеогліканів і колагену,

забезпечуючи збереження еластичних властивостей хряща. Механізм дії ПБ базується на його здатності ефективно усувати мікроекологічні порушення за рахунок високої антагоністичної активності щодо широкого спектра патогенних й умовно-патогенних мікроорганізмів, та зменшувати запальні процеси на місцевому та системному рівнях організму. Крім того, мікроорганізми в складі ПБ є активними продуцентами біологічно активних метаболітів: полісахаридів, коротколанцюгових жирних кислот, глікопептидів, антиоксидантів, імуномодуляторів [10].

Встановлене підвищення вмісту супероксидного радикалу, пероксиду водню та зростання вмісту ПОЛ та ОМБ свідчить про доцільність оцінити стан антиоксидантної системи при експериментальному ОА за введення ХС і ПБ.

7.4 Стан антиоксидантної системи у сироватці крові та хрящовій тканині щурів

7.4.1. Антирадикальні супероксиддисмутаза та каталазна ферментативні активності

Захист клітин від ушкоджуючої дії вільних радикалів і пероксидних сполук, а також підтримання окисного балансу в організмі забезпечує багатокомпонентна АОС. Першою ланкою захисту клітин від кисневих вільних радикалів є ферменти СОД (ЕС 1.15.1.1) та КАТ (ЕС 1.11.1.6). СОД каталізує реакцію дисмутації супероксидного радикалу $O_2\cdot^-$ з утворенням кисню й пероксиду водню та відіграє найважливішу роль в антиоксидантному захисті практично всіх клітин, що так чи інакше знаходяться в контакті з киснем. КАТ – фермент класу оксидоредуктаз, що розкладає пероксид водню, який утворився в процесі біологічного окиснення, а також в результаті дії СОД і органічних гідропероксидів ліпідів, на воду та молекулярний кисень [480]. При цьому в окисненому стані каталаза працює

і як пероксидаза – каталізує окиснення спиртів або альдегідів. Крім того, КАТ може виступати джерелом утворення АФК: близько 5% кисню, що утворюється в результаті розкладання H_2O_2 , переходить у збуджений синглетний стан [481].

Встановлено, що за умов експериментального ОА СОД активність у сироватці крові щурів знижувалася у 2 рази ($p \leq 0,05$) порівняно з контролем (рис. 7.1). Введення ХС тваринам із експериментальною патологією суглобів викликало підвищення СОД активності в 1,3 рази ($p \leq 0,05$) порівняно з тваринами групи ОА. При введенні ПБ тваринам із експериментальним ОА СОД активність у сироватці крові підвищувалася в 1,4 рази ($p \leq 0,05$), порівняно з тваринами групи ОА, які не отримували ПБ. Сумісне введення ХС і ПБ у тварин із експериментальним ОА супроводжувалася зростанням СОД активності у 1,5 рази ($p \leq 0,05$) відносно тварин групи ОА (рис. 7.1).

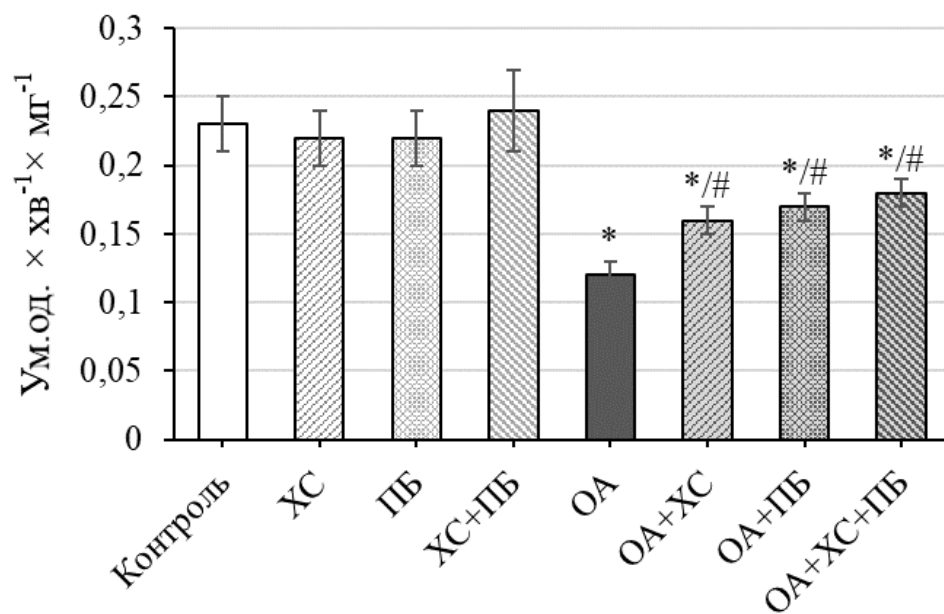


Рис. 7.1 Супероксиддисмутазна активність у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно тварин групи ОА)

Показано, що КАТ активність за умов експериментального ОА в сироватці крові щурів зростала в 1,7 раза ($p \leq 0,05$) порівняно з контролем (рис. 7.2). Введення ХС тваринам із ОА мало результатом зниження даної ферментативної активності в 1,4 раза ($p \leq 0,05$) порівняно з тваринами групи ОА. При введенні ПБ щурам з експериментальним ОА КАТ активність у сироватці крові знижувалася в 1,5 рази ($p \leq 0,05$) порівняно з тваринами групи ОА, які не отримували ПБ, та значимо досягала рівня контролю. При сумісному введенні ХС і ПБ відбувалось зниження КАТ активності в 1,8 раза ($p \leq 0,05$) відносно тварин групи ОА, при цьому значення ферментативної активності достовірно досягали рівня контрольної групи (рис. 7.2).

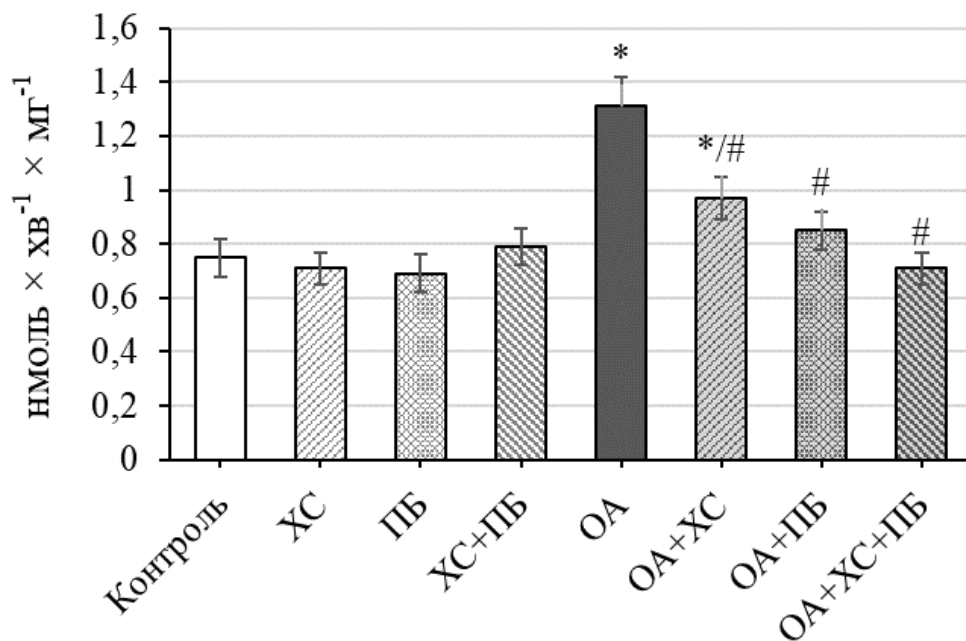


Рис. 7.2 Каталазна активність у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно тварин групи ОА)

Встановлене зниження СОД активності в сироватці крові щурів з експериментальним ОА може бути викликано зростанням рівня вільнорадикальних сполук, які можуть окиснювати амінокислотні залишки в активному центрі ферменту, що спричиняє конформаційні зміни СОД та втрату її функціональної активності [482].

Показано, що у хрящовій тканині за умов експериментального ОА відбувалось підвищення СОД активності в 4 рази ($p \leq 0,05$) відносно щурів, у яких була відсутня експериментальна патологія суглобів (рис. 7.3). Окреме введення як ХС, так і ПБ тваринам з експериментальним ОА супроводжувалося зниженням СОД активності – в 1,8 та в 1,7 рази ($p \leq 0,05$) відповідно, порівняно з щурами групи ОА. Сумісне введення ХС і ПБ у тварин з експериментальним ОА викликало зниження СОД ферментативної активності у хрящовій тканині у 2 рази ($p \leq 0,05$), порівняно з щурами групи ОА, однак ці значення статистично значимо перебували вище контрольного рівня (рис. 7.3).

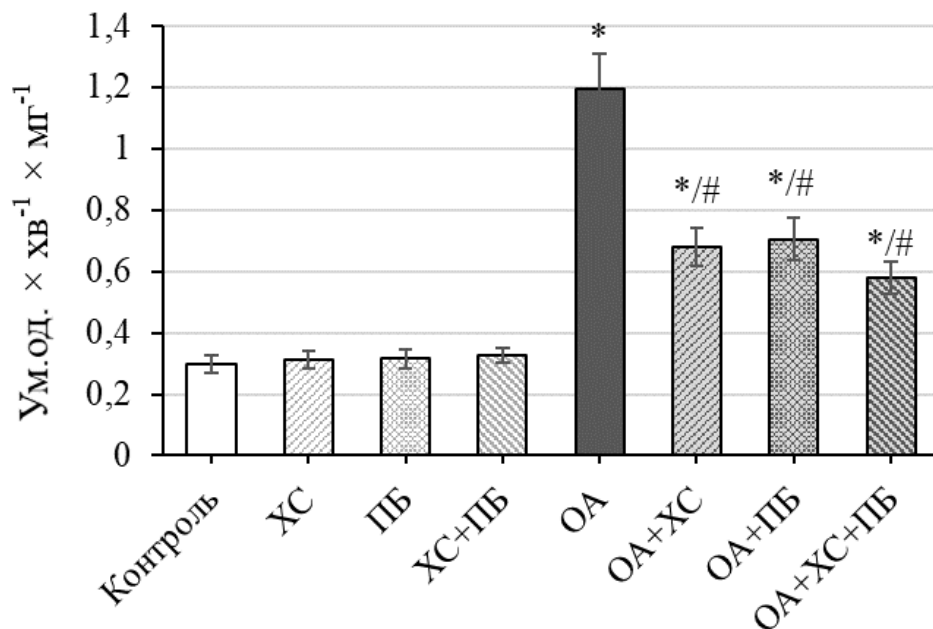


Рис. 7.3 Супероксиддисмутазна активність у хрящовій тканині суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотику ($M \pm m$, $n=14$; * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно тварин групи ОА)

У хрящовій тканині суглоба щурів розвиток експериментального ОА супроводжувався підвищенням КАТ активності в 4,9 раза ($p \leq 0,05$) відносно контролю (рис. 7.4). Окреме введення як ХС, так і ПБ тваринам із експериментальною патологією мало результатом зниження КАТ активності – в 1,7 та в 1,8 раза ($p \leq 0,05$) відповідно, порівняно з щурами групи ОА. Сумісне введення ХС і ПБ щурам з експериментальним ОА викликало зниження КАТ активності у хрящовій тканині в 2,3 раза ($p \leq 0,05$) порівняно з тваринами групи ОА, однак значення достовірно перебували вище контрольного рівня (рис. 7.4).

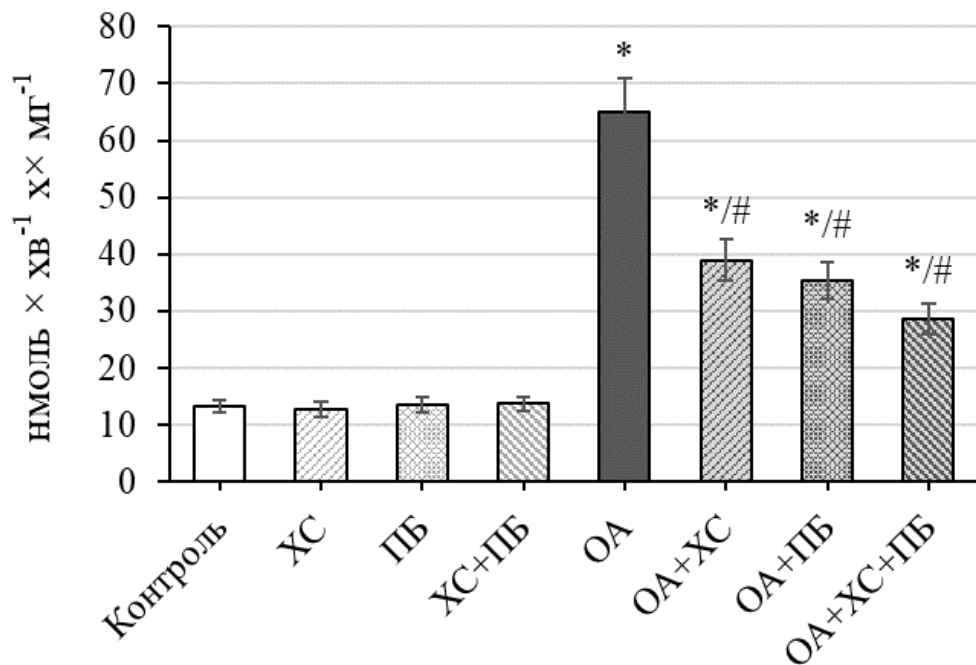


Рис. 7.4 Катазна активність у хрящовій тканині суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно тварин групи ОА)

Слід зазначити, що при окремому та комбінованому введенні як ХС, так і ПБ інтактним щурам значення активності досліджуваних ферментів АОС статистично значимо залишалися в межах контролю (рис. 7.3; рис. 7.4).

У суглобовій порожнині пошкоджений некротичний хрящ та кісткові фрагменти піддаються фагоцитозу лейкоцитами з вивільненням медіаторів запалення, АФК (супероксидного аніону ($O_2^{\cdot-}$), гідроксильного радикалу, пероксиду водню, гіпохлорної кислоти (HOCl)) та лізосомальних ферментів. Цей процес клінічно має прояви розвитку синовііту та появу імунологічних реакцій на продукти розпаду [483]. У хондроцитах АФК регулюють роботу внутрішньоклітинних сигнальних молекул, таких як рецепторні тирозинкінази, MAP-кінази (ERK1/2, JNK, p38), ліпідні шляхи (фосфоліпази, PKC і шлях PI3-кінази/Акт), фосфатази та фактори транскрипції (NFIB, p53 та AP-1), які беруть участь у сигнальних каскадах, що регулюють синтез та деградацію хрящової матриці. АФК можуть сприяти активації деяких сигналів шляхом зворотної інактивації специфічних фосфатаз зі збільшенням рівня АФК, активувати катаболічну сигналізацію, викликати ОС і пригнічувати анаболічну сигналізацію через інгібування ІФР-1 та синтез ПГ [484, 485]. За таких подій у тканинах суглоба та крові відбувається порушення функціонування ферментів антирадикального захисту, що свідчить про підвищення генерації АФК та відповідно інтенсифікацію вільнорадикальних процесів. При введенні ХС і ПБ у хрящовій тканині та сироватці крові щурів із експериментальною патологією суглобу СОД і КАТ активності частково відновлювалася порівняно з тваринами групи ОА з гострим запаленням суглобу. Отримані експериментальні дані свідчили про коригувальний ефект ХС і ПБ на стан антирадикальних ферментів у крові та хрящі щурів.

7.4.2 Вміст глутатіону та глутатіонзалежна ферментативна активність

Внаслідок дії прозапальних цитокінів та активації сигнальних каскадів в клітинах синтезується надлишки пероксиду водню, супероксидного аніону та оксиду азоту, які активують колагеназу та пригнічують інгібітори протеаз,

викликають ПОЛ мембран, пошкоджують ферменти, структурні білки та руйнують нуклеїнові кислоти [486].

Невід'ємною ланкою антиоксидантного захисту є глутатіонова система, яка захищає компоненти клітини від окиснення. Основним антиоксидантом є відновлений глутатіон (GSH) – низькомолекулярний тіол, який виступає донором водню в окисно-відновних реакціях [487]. У відновленій формі глутатіон хімічно взаємодіє з АФК, таким чином знешкоджує вільні радикали, видаляє ацилперокси з мембран. В якості кофактора він входить до складу ферментів глутатіонової системи: ГП (ЕС 1.11.1.9), яка знешкоджує перекис водню, ГТ (ЕС 2.5.1.18), яка знешкоджує ліпоперекиси мембран і ксенобіотики, та ГР (ЕС 1.8.1.7), яка підтримує пул відновленого глутатіону, таким чином забезпечуючи комплексний антиоксидантний захист, та захищаючи організм від окиснювального пошкодження, що відбувається за умов розвитку різних патологічних станів, в тому числі й захворювань ОРА. Крім того, глутатіон, беручи участь в редокс-регуляції, впливає на експресію сигнальних білків на рівні транскрипції [488]. Пригнічення відновлення глутатіону та розвиток ОС в організмі призводить до зниження синтезу ПГ і ГК – компонентів матриксу хряща [489].

Нами встановлено, що за умов експериментального ОА вміст відновленого глутатіону в сироватці крові знижувався у 1,4 раза ($p \leq 0,05$), тоді як вміст окисненої його форми зростав у 1,3 раза ($p \leq 0,05$) відповідно, порівняно з контрольною групою (табл. 7.7).

Одночасно зі змінами вмісту глутатіону в умовах патології суглобів спостерігалось зниження в сироватці крові щурів глутатіонзалежних ферментативних активностей: ГП (рис. 7.5) та ГТ (рис. 7.6) – в 1,5 рази ($p \leq 0,05$), ГР (рис. 7.7) – в 1,6 рази ($p \leq 0,05$) відповідно, порівняно зі значеннями тварин контрольної групи.

Вміст глутатіону в сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика (M±m, n=14)

Показник Групи тварин	Глутатіон відновлений, нмоль×мг ⁻¹ білка	Глутатіон окиснений, нмоль×мг ⁻¹ білка
Контроль	21,64 ± 2,08	6,71 ± 0,65
ХС	22,19 ± 2,12	6,48 ± 0,64
ПБ	25,36 ± 2,54	6,29 ± 0,61
ХС+ПБ	25,12 ± 2,65	6,98 ± 0,68
ОА	15,31 ± 1,11*	9,01 ± 0,55*
ОА+ХС	18,03 ± 1,32*/#	7,81 ± 0,54#
ОА+ПБ	23,33 ± 2,18#	7,09 ± 0,62#
ОА+ХС+ПБ	25,01 ± 2,42#	6,52 ± 0,58#

* – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно щурів групи ОА

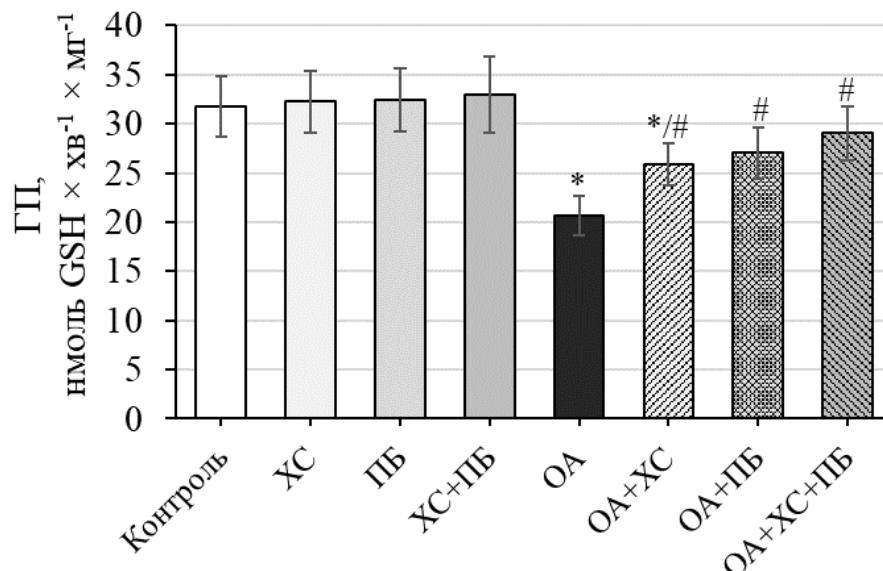


Рис. 7.5 Глутатіонпероксидазна активність у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика (M±m, n=14; * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно щурів групи ОА)

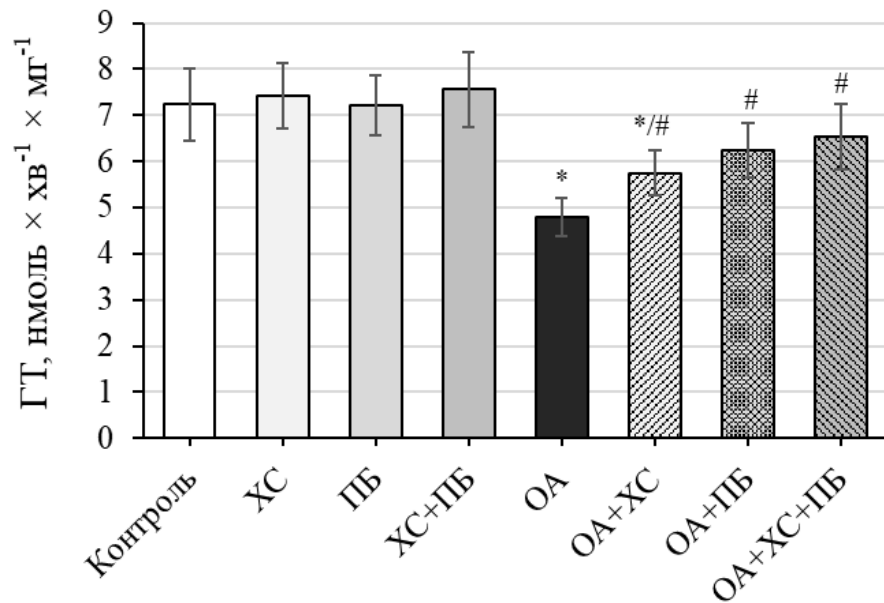


Рис. 7.6 Глутатіонтрансферазна активність у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно щурів групи ОА)

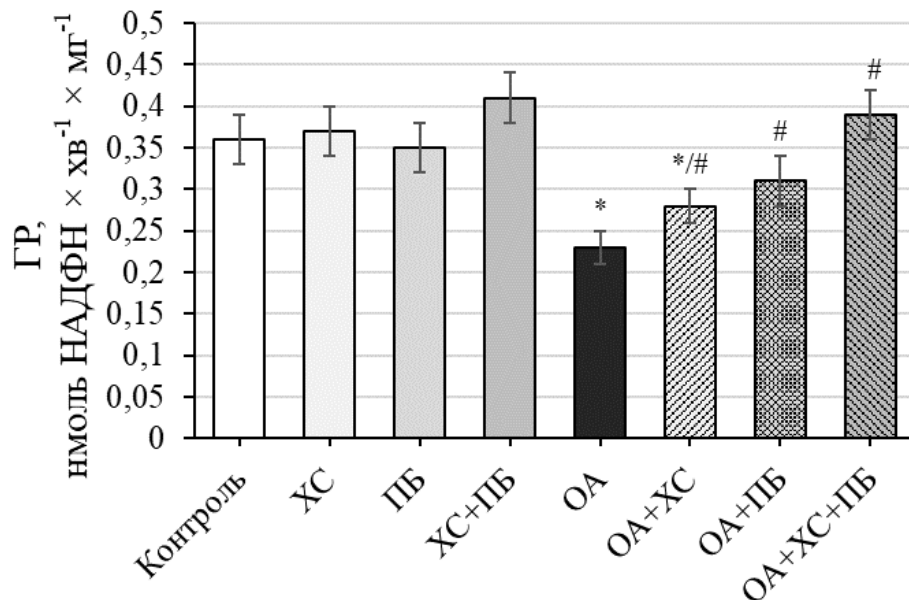


Рис. 7.7 Глутатіонредуктазна активність у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно щурів групи ОА)

Дія ХС за умов експериментального ОА сприяла підвищенню ГП активності в 1,3 раза ($p \leq 0,05$) (рис. 7.5), ГТ та ГР – в 1,2 раза ($p \leq 0,05$) (рис. 7.6; 7.7) відносно тварин групи ОА, однак значення перебували статистично значимо нижче контрольного рівня. За умов окремого введення ПБ щурам з експериментальною патологією, а також при його поєднанні з ХС, глутатіонзалежна ферментативна активність у сироватці крові статистично значимо перебувала у межах показників тварин контрольної групи (рис. 7.5; 7.6; 7.7).

У хрящовій тканині за умов розвитку експериментального ОА зміни в системі глутатіону відбувалися більш виражено. Так, вміст відновленого глутатіону знижувався в 1,9 раза ($p \leq 0,05$), а вміст окисненого зростав в 1,9 раза ($p \leq 0,05$) відносно показників контрольної групи (табл. 7.8).

Таблиця 7.8

Вміст глутатіону в хрящовій тканині суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$)

Групи тварин \ Показник	Глутатіон відновлений, нмоль \times мг ⁻¹ білка	Глутатіон окиснений, нмоль \times мг ⁻¹ білка
Контроль	7,15 \pm 0,55	2,33 \pm 0,21
ХС	7,19 \pm 0,68	2,26 \pm 0,19
ПБ	8,01 \pm 0,74	2,29 \pm 0,21
ХС+ПБ	8,12 \pm 0,72	2,57 \pm 0,25
ОА	3,79 \pm 0,32*	4,37 \pm 0,26*
ОА+ХС	5,72 \pm 0,54 ^{*/#}	3,62 \pm 0,35 ^{*/#}
ОА+ПБ	6,21 \pm 0,61 [#]	3,49 \pm 0,32 ^{*/#}
ОА+ХС+ПБ	6,42 \pm 0,58 [#]	3,11 \pm 0,28 ^{*/#}

* – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно щурів групи ОА

Введення ХС щурам із експериментальною патологією супроводжувалося підвищенням вмісту відновленого глутатіону в 1,5 рази ($p \leq 0,05$) та зниженням вмісту його окисненої форми в 1,2 рази ($p \leq 0,05$) відносно тварин групи ОА, однак значення достовірно перебували вище контрольного рівня. При окремому введенні ПБ і комбінованому з ХС тваринам із експериментальним ОА вміст відновленого глутатіону достовірно перебував в межах контрольних значень, тоді як вміст окисненої його форми в хрящовій тканині залишався в 1,5 та 1,3 рази ($p \leq 0,05$) відповідно вищим за вміст у тварин контрольної групи. Слід зазначити, що введення ХС і ПБ сприяло відновленню співвідношення окисненого і відновленого глутатіону у хрящовій тканині щурів з експериментальним ОА (табл. 7.8).

Показано зниження глутатіонзалежної ферментативної активності в хрящовій тканині суглоба щурів з експериментальним ОА: ГП (рис. 7.8) та ГТ (рис. 7.9) активності знижувалися в 1,9 раза ($p \leq 0,05$), ГР (рис. 7.10) активність – в 2,5 рази ($p \leq 0,05$) відповідно відносно контрольних значень.

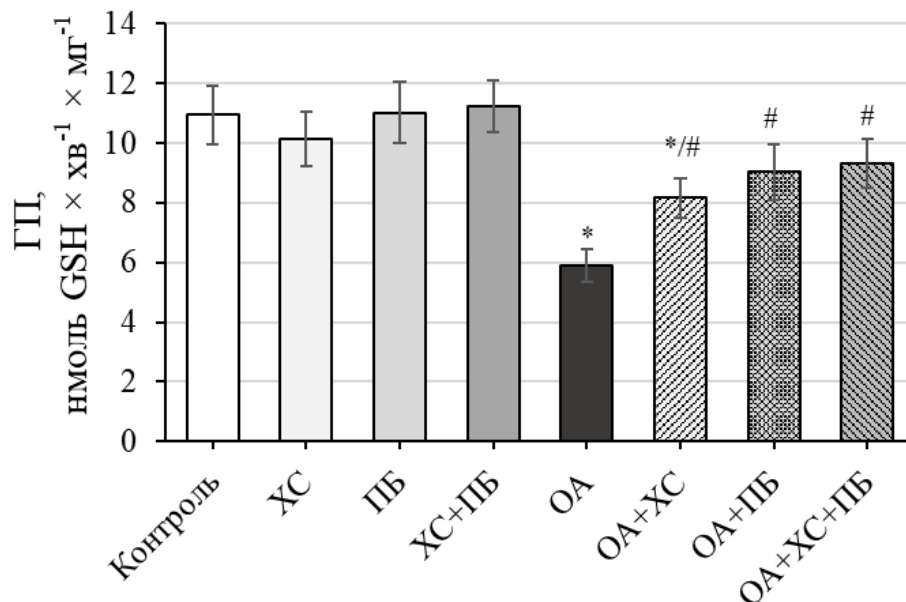


Рис. 7.8 Глутатіонпероксидазна активність у хрящовій тканині суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно щурів групи ОА)

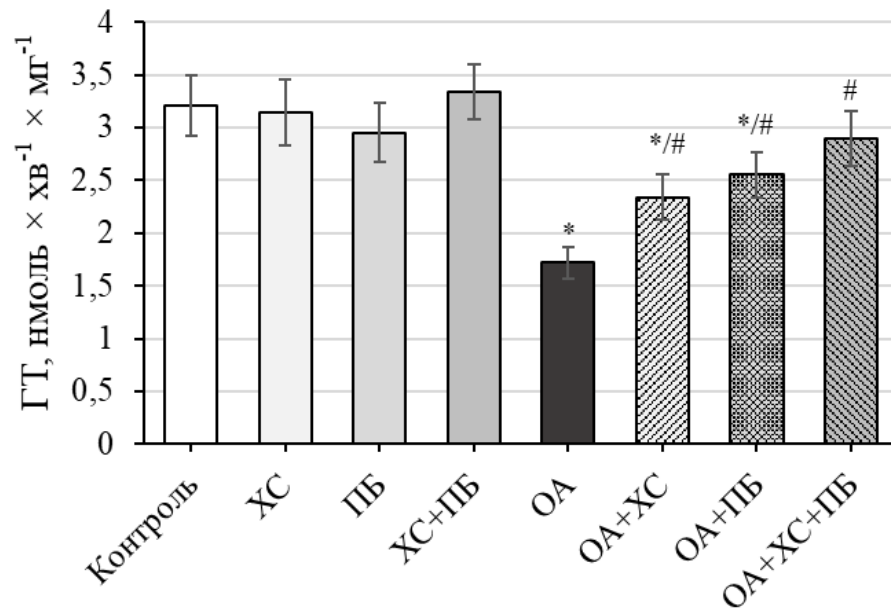


Рис. 7.9 Глутатіонтрансферазна активність у хрящовій тканині суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтин сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно щурів групи ОА)

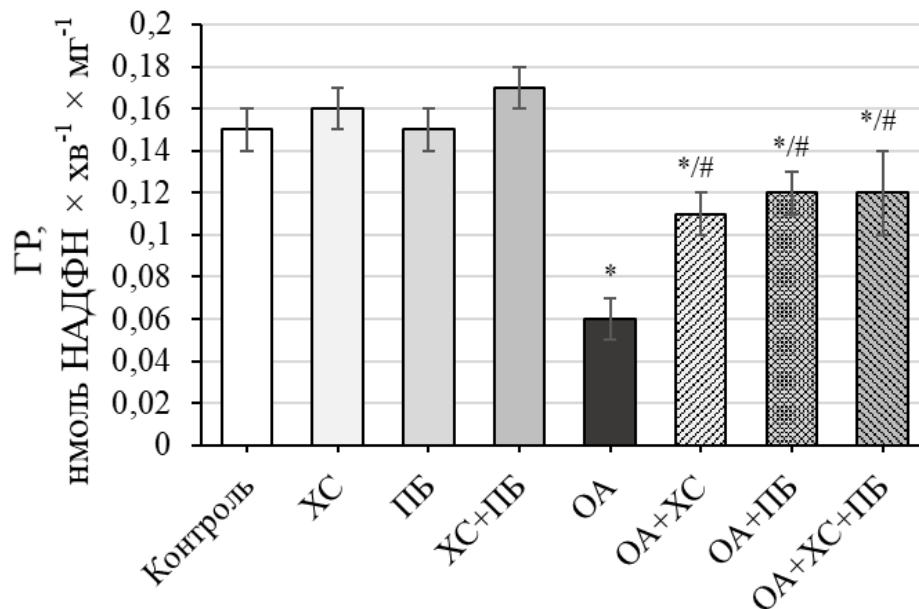


Рис. 7.10 Глутатіонредуктазна активність у хрящовій тканині суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно щурів групи ОА)

Окреме введення ХС і ПБ сприяло підвищенню ферментативної активності глутатіонової системи в хрящовій тканині щурів з експериментальним ОА: за умов введення ХС тваринам із ОА ГП та ГТ активність зростала в 1,4 раза ($p \leq 0,05$), ГР – в 1,8 раза ($p \leq 0,05$), відносно відповідних показників у тварин групи ОА; за умов введення ПБ – ГП та ГТ активність зростала в 1,5 рази ($p \leq 0,05$), ГР активність – в 2 рази ($p \leq 0,05$) відносно значень у тварин з експериментальною патологією, при цьому значення ГП активності достовірно досягали рівня контролю (рис. 7.8-7.10).

Сумісне введення ХС і ПБ тваринам з експериментальним ОА мало результатом достовірне підвищення ГП та ГТ активності до рівня значень тварин контрольної групи (рис. 7.8; 7.9), тоді як ГР активність підвищувалася у 2 рази ($p \leq 0,05$) відносно тварин групи ОА, однак значимо залишалася нижчою відносно контролю (рис. 7.10). При окремому та комбінованому введенні ХС і ПБ інтактним щурам не виявлено статистично значимих змін значень ферментативної активності системи глутатіону порівняно з контролем (рис. 7.8-7.10).

ГП каталізує реакції відновлення пероксиду водню до води та органічних гідропероксидів (ROOH), до гідроксипохідних, і в результаті переходить в окиснену дисульфідну форму GS-SG. Навідміну від КАТ, яка локалізована в пероксисомах, ГП функціонує в цитозолі та мітохондріях і має вищу спорідненість до перексиду. Фермент відновлює різні органічні ліпідні пероксили, які утворюються в організмі при активації ПОЛ, такі як гідропероксид лінолевої і ліноленової кислот, холестерин-7 β -гідропероксид і деякі синтетичні речовини (кумен-, трет-бутил-гідропероксиди), захищаючи від окисної атаки білки, ліпіди, НАДФН, НАДН. Відновлення ферменту відбувається за участі ГР та відновленого глутатіону [490]. Показано, що у хворих на системні захворювання сполучної тканини с ураженням суглобів спостерігається знижений антиоксидантний статус зі зменшенням ГП та ГР активності еритроцитів при зниженому рівні відновленої форми глутатіону на тлі підвищеного рівня оксиду азоту в плазмі крові [491].

Доведено, що ГТ використовують відновлений глутатіон не лише для знешкодження ксенобіотиків та екзогенних електрофільних сполук, а й для регуляції сигнальних шляхів, які активуються кінцевим продуктом окиснення n-6-поліненасичених жирних кислот- 4-гідрокси-транс 2-ноненалем, вторинним месенджером, який впливає на активацію транскрипційних факторів/репресорів. Низькі рівні гідроксіноненала активують клітинну проліферацію, синтез білків та ДНК; високі рівні, які досягаються при розвитку ПОЛ, запускають механізми апоптозу. ГТ використовують гідроксіноненал у якості субстрату, ферменти регулюють клітинні рівні гідроксіноненала, пригнічуючи його утворення в процесі ПОЛ, а також знижують його вміст за допомогою кон'югації з відновленим глутатіоном та АТФ-залежного експорту кон'югатів [492, 493]. Відомо, що у людей у сироватці крові при ОА активність ГТ знижується на фоні зростання рівнів АФК та активації ММП-3 [494].

Окиснений глутатіон (GSSH) відновлюється ГР за участі НАДФН. Існують дані, що у людей з ОА активність цього ферменту знижена, відповідно, знижено вміст відновленого глутатіону на фоні активації окисних процесів. Пригнічення відновлення глутатіону та розвиток ОС призводить до зниження синтезу ПГ і ГК – компонентів матриксу хряща [451, 495].

За даними досліджень [496], рівень відновленого глутатіону істотно не відрізняються у різних вікових груп, однак у хондроцитах людей старшої вікової групи спостерігався підвищений рівень окисненого глутатіону. Таке збільшення кількості окисненої форми глутатіону достатньо для зміни співвідношення GSSG до GSH, що може посилювати цитотоксичну дію ОС в клітинах. Вікові зміни у внутрішньоклітинному тіол-редокс-статусі хондроцитів можуть бути основним фактором, який сприяє підвищенню клітинної загибелі, що спостерігалось при розвитку ОА та при збільшенні рівню АФК [497].

Таким чином, у ході досліджень показано зміни вмісту глутатіону, порушення співвідношення його окисненої і відновленої форм у бік

окиснення, порівняно з відповідними показниками контрольних тварин, та інактивацію глутатіон-залежних ферментів у сироватці крові та хрящовій тканині щурів з експериментальним ОА. Окреме та комбіноване введення ХС і ПБ сприяло відновленню стану глутатіонової антиоксидантної системи у сироватці крові до рівня контролю та частково у хрящовій тканині щурів із експериментальним ОА.

Отже, при експериментальному ОА в хрящовій тканині суглоба щурів розвивався ОС, що характеризувався зростанням АФК (вмісту O_2^- та H_2O_2), продуктів ПОЛ (ДК, ТБК-активних продуктів, ШО) та ОМБ (альдо- та кетопохідних нейтрального та основного характеру). Виявлено порушення функціонування АОС захисту в хрящовій тканині та в сироватці крові щурів при експериментальному ОА, яке виражалося у підвищенні СОД і КАТ активностей у хрящовій тканині на фоні виснаження глутатіон-залежної ланки антиоксидантного захисту, та зниження СОД активності і підвищення КАТ активності на фоні пригнічення активності глутатіонової системи у сироватці крові.

Введення ХС та ПБ тваринам із експериментальним ОА частково відновлювало порушену окисно-антиоксидантну рівновагу як у суглобі, так і в крові, сприяючи пригніченню утворення кисневих радикалів, зниженню інтенсивності процесів ліпідної і білкової пероксидації, нормалізації ферментативної і неферментативної ланок антиоксидантної системи.

Результати, викладені у розділі, опубліковані у наступних працях: [309, 356, 447, 498, 499, 500, 501, 502, 503].

РОЗДІЛ 8

МЕХАНІЗМИ СИГНАЛЬНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ РЕМОДЕЛЮВАННЯ ХРЯЦОВОЇ ТКАНИНИ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРИТУ ПРИ ВВЕДЕННІ ХОНДРОЇТИНУ СУЛЬФАТУ ТА ПРОБІОТИКА

8.1 Експресія Toll-подібних рецепторів TLR-2, TLR-4 та ядерного фактора NF-κB у тканинах колінного суглоба щурів

Регуляція синтезу та деградації суглобового хряща здійснюється комплексом гуморальних механізмів, із залученням складних шляхів сигнальної трансдукції, які активуються різноманітними біологічно активними молекулами [504, 505]. Хондроцити реалізують свій катаболічний вплив на хрящ шляхом активації патерн-розпізнавальних Toll-подібних рецепторів TLR-2 та TLR-4. Приєднання Toll-подібними рецепторами адаптерних білків приводить до запуску складних внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, результатом яких стає активація ряду транскрипційних факторів, які регулюють експресію певних генів та запускають клітинну відповідь. Наприклад, ядерний фактор NF-κB, активуючий білок-1 (AP-1) та регуляторний фактор інтерферону-5 (IRF-5) контролюють експресію генів, які кодують запальні цитокіни, тоді як транскрипційні фактори IRF3 та IRF7 індукують експресію ІФН та ІФН-індукованих генів I типу [506].

Сигнальний шлях за участі NF-κB є важливою ланкою запальної відповіді хондроцитів, через посилення транскрипції прозапальних цитокінів, активності ЦОГ-2 та iNOS із подальшою продукцією ПГЕ₂ і NO, активацію ММП, що має наслідком прогресуюче пошкодження екстрацелюлярного матриксу, деструкцію хряща, та відіграє ключову роль у патогенезі ОА [359, 507, 508].

З метою оцінки прозапальних змін та ланок, що ініціюють запуск катаболічного каскаду в тканинах суглоба проведено імуногістохімічне (ІГХ) дослідження експресії Toll-подібних рецепторів TLR-2 та TLR-4 та ядерного фактора NF-κB при експериментальному моделюванні ОА колінного суглоба в щурів та за умов введення ХС і ПБ. Оцінку виразності експресії досліджуваних біомаркерів у суглобовому хрящі проводили напівкількісно з використанням критеріїв, наведених у табл. 2.1, та представляли в умовних одиницях (рис 8.1).

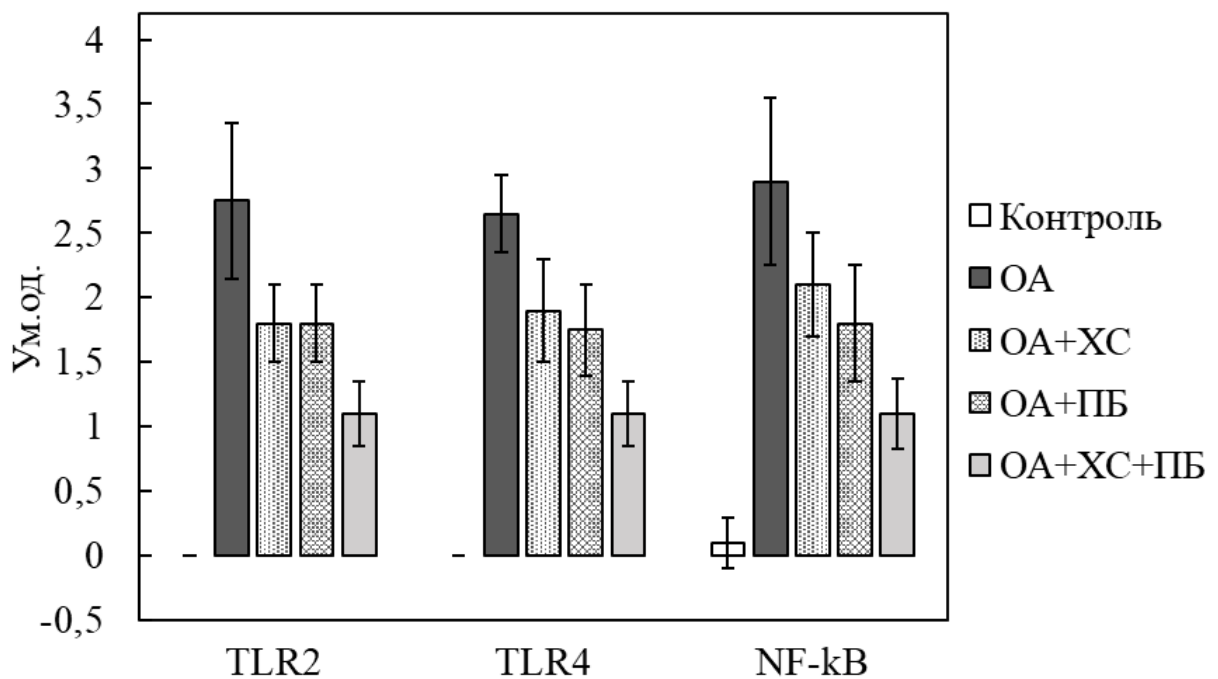


Рис. 8.1 Оцінка виразності імуногістохімічної експресії TLR-2, TLR-4 та NFκB у хондроцитах суглобового хряща щурів за умов остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$)

При ІГХ аналізі суглобів тварин контрольної групи та груп щурів, які отримували ХС і ПБ за відсутності експериментальної патології, встановлено негативну реакцію щодо експресії TLR-2, TLR-4 та NF-κB, окрім окремих клітин мієлоїдної тканини (рис. 8.1; 8.2). Розташування імунопозитивних клітин у центрі гемопоетичних острівців, дозволяє припустити їх відношення до лінії макрофагів, що пояснює позитивну реакцію на використані

прозапальні біомаркери. В хондроцитах у межах усіх зон суглобового хряща визначено негативну реакцію на експресію TLR-2 та TLR-4 (рис. 8.1; 8.3). В окремих вакуолізованих хондроцитах глибокої зони суглобового хряща було виявлено позитивну реакцію на NF- κ B. Також позитивна реакція на NF- κ B виявлялася в остеобластах у ділянках активного енхондрального остеогенезу (рис. 8.1; 8.4).

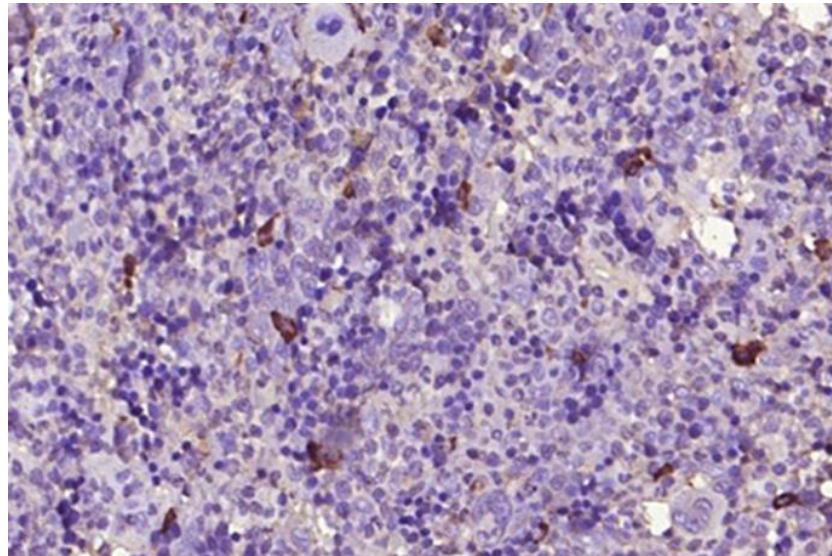
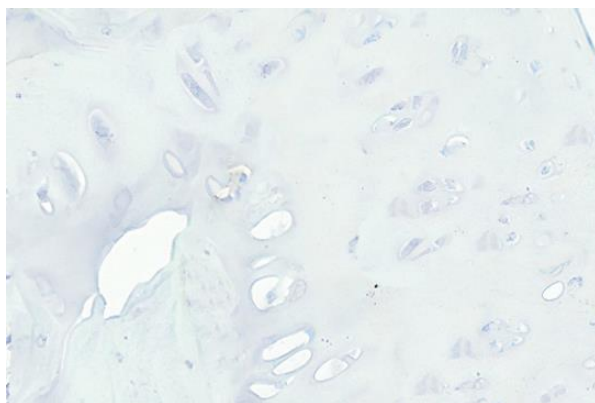
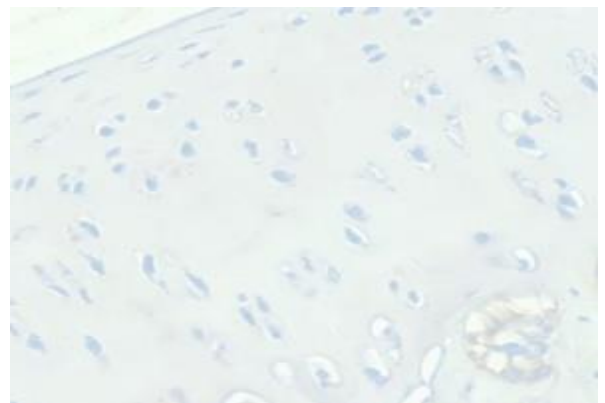


Рис. 8.2 Експресія NF- κ B у клітинах (макрофагального ряду) червоного кісткового мозку щурів контрольної групи. Імуногістохімічне забарвлення з використанням МАТ до NF- κ B. Збільшення $\times 200$



А



Б

Рис. 8.3 Експресія TLR-2 (А) та TLR-4 (Б) у клітинах суглобового хряща щурів контрольних груп. Імуногістохімічне забарвлення з використанням МАТ до TLR-2 та TLR-4. Збільшення $\times 200$

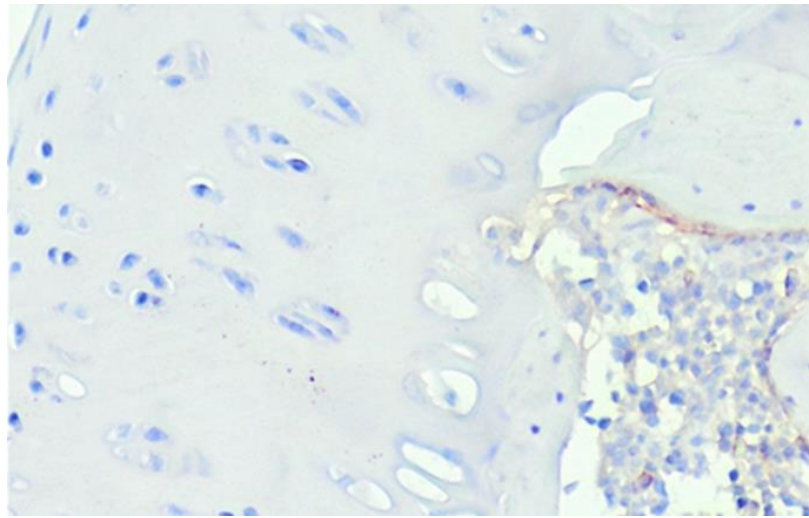


Рис.8.4 Експресія NF-κB у клітинах суглобового хряща щурів контрольних груп. Позитивна реакція в остеобластах на поверхні трабекул субхондральної кістки з ознаками остеогенезу. Імуногістохімічне забарвлення з використанням МАТ до NF-κB. Збільшення $\times 200$

ІГХ дослідження показало, що деструктивні зміни, ознаки загибелі хондроцитів та деградація матриксу в щурів з експериментальним ОА асоційовані з виразною активацією експресії всіх оцінюваних біомаркерів: TLR-2, TLR-4 та NF-κB (рис. 8.1). При визначенні експресії Toll-подібних рецепторів у хондроцитах суглобового хряща та клітинах субхондральної кістки щурів з експериментальним ОА показано позитивну реакцію на експресію TLR-2 та TLR-4 у хондроцитах у межах усіх зон, окрім окремих хондроцитів глибокої зони з вираженими дистрофічними змінами (рис. 8.5). В них реакція на TLR-4 була слабкою або не визначалася (рис. 8.5 Б). Найбільш виразною реакція на експресію TLR-2 спостерігалася в клітинах поверхневих шарів у ділянках деструктивних змін, що може свідчити про реактивний характер експресії даного рецептора (рис.8.5 А).

При аналізі експресії NF-κB визначено наявність імунопозитивних клітин як в межах суглобового хряща тварин з експериментальним ОА, так і в субхондральній кістці. У суглобовому хрящі експресія NF-κB визначалася у більшості клітин зі збереженою структурою, виключення складала тільки

клітини з ознаками загибелі (клітини-привиди). Більш вираженою експресія була у клітинах поверхневого та глибокого шарів. Особливо високою експресія NF-кВ була у хондроцитах у ділянках репаративних змін, що характеризувалися виразною проліферацією клітин (рис. 8.1; 8.6).

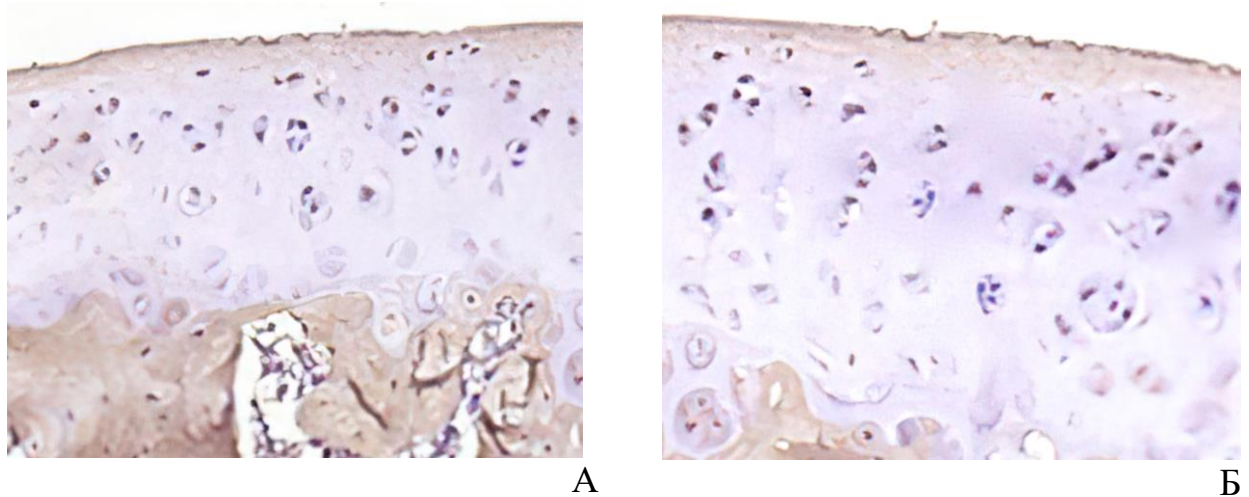


Рис. 8.5. Експресія TLR-2 (А) та TLR-4 (Б) у суглобовому хрящі щурів за умов експериментального остеоартриту. Імуногістохімічне забарвлення з використанням МАТ до TLR-2 та TLR-4. Збільшення $\times 200$

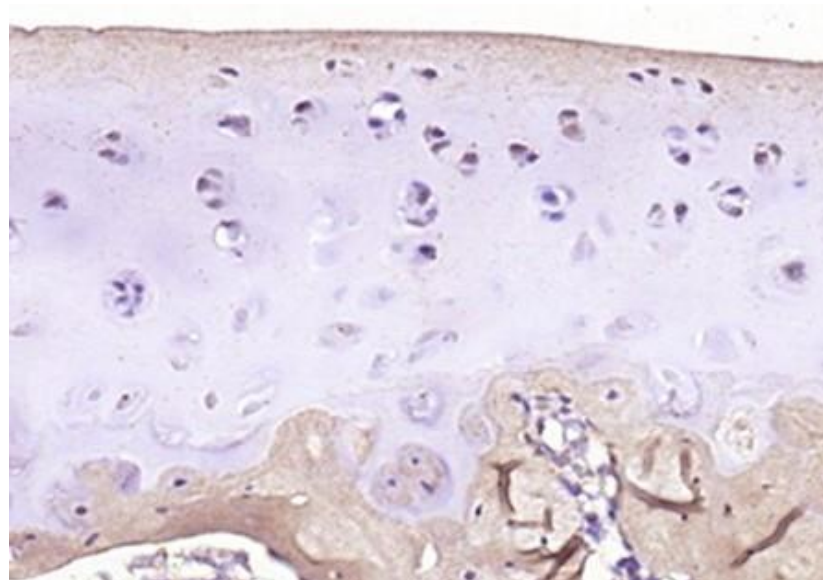


Рис. 8.6 Експресія NF-кВ у суглобовій хрящовій тканині щурів з експериментальним остеоартритом. Імуногістохімічне забарвлення з використанням МАТ до NF-кВ. Збільшення $\times 200$

За умов експериментального ОА відзначено наявність позитивної реакції на NF- κ B у клітинах ендотелію, що вистилає кровоносні судини у ділянках penetрації субхондральної пластинки, що може свідчити про активацію процесів неоваскуляризації та ремоделювання субхондрального компартменту. Позитивна реакція на експресію ядерного фактора визначалася також у клітинах, розташованих на поверхні кісткових трабекул (що відповідає локалізації остеобластів та остеокластів). Останнє може свідчити про активацію процесів резорбції та ремоделювання кістки. Зміни у скелетних тканинах супроводжувалися зростанням кількості клітин, імунопозитивних до NF- κ B. Крім того, відзначено зростання кількості NF- κ B-позитивних клітин у межах червоного кісткового мозку, що по суті може відображати системні зміни гемопоезу та прозапальної активації за умов моделювання ОА (рис. 8.7).

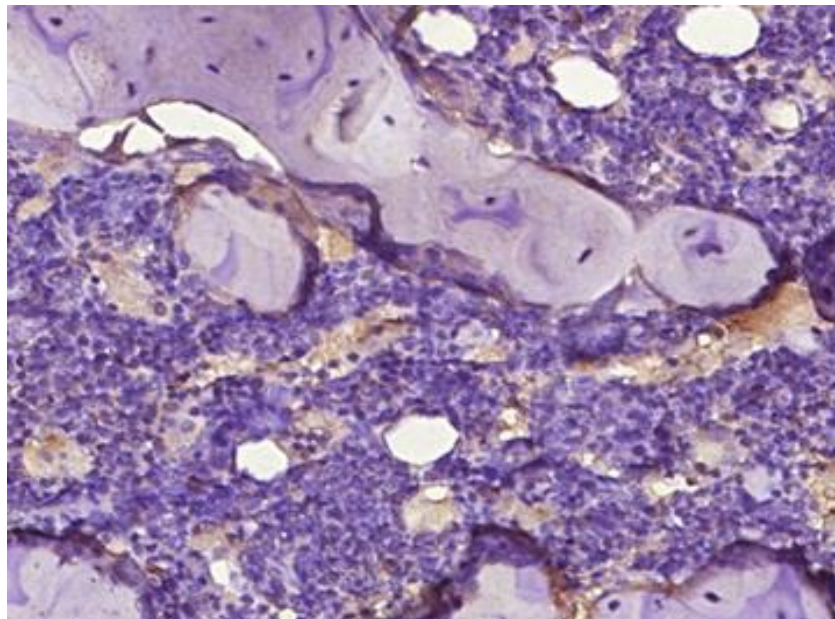


Рис. 8.7 Експресія NF- κ B у межах субхондральної кістки щурів з експериментальним остеоартритом. Імунопозитивні клітини визначаються на поверхні трабекул, а також в стінці синусоїдних судин червоного кісткового мозку. Імуногістохімічне забарвлення з використанням МАТ до NF- κ B. Збільшення $\times 200$

Резорбція кісткових трабекул призводила до значного розширення міжтрабекулярного простору зі зменшенням щільності розташування кісткових трабекул у цілому. При цьому в межах розширеного компартменту червоного кісткового мозку визначалися певні зміни й у міслоїдній тканині. Остання характеризувалася збільшенням кількості білих адипоцитів(рис. 8.7). Ці зміни в скелетних тканинах супроводжувалися зростанням кількості клітин, імунопозитивних до NFκB, в межах синовіальної оболонки щурів при експериментальному ОА (рис. 8.8).

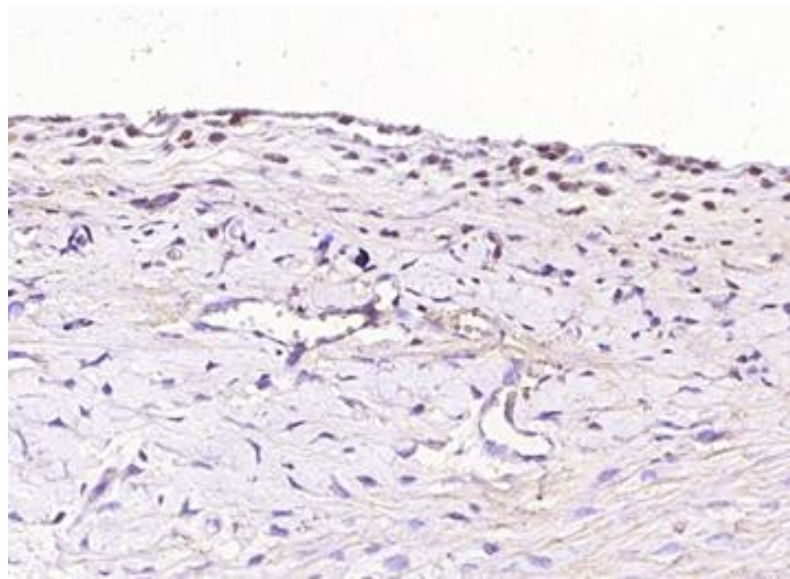


Рис. 8.8 Експресія NF-κB у клітинах синовіальної оболонки щурів з експериментальним остеоартритом. Позитивна реакція визначається не тільки у покривних клітинах синовіальної вистилки, а й в сполучній тканині та стінці кровоносних судин. Імуногістохімічне забарвлення з використанням МАТ до NF-κB. Збільшення ×100

Таким чином, дезорганізація будови хряща, порушення його гістоархітектоніки, резорбція субхондральної кістки, гіперпластичні та деструктивно-дистрофічні зміни у хрящовій та субхондральній кістковій тканинах супроводжувалися зростанням експресії TLR-2, TLR-4 та ядерного фактора NF-κB у тканинах суглоба, що свідчить про активацію прозапальних шляхів сигнальної трансдукції в умовах експериментального ОА.

Враховуючи позитивні зміни, які виявлено при дослідженні мікробіоти кишечника, біохімічних маркерів метаболізму хрящової тканини, медіаторів запалення та окисно-антиоксидантного гомеостазу в хрящі та крові щурів з експериментальним ОА при дії ХС та ПБ, нами проведено ІГХ аналіз зрізів хрящової тканини суглоба щурів з МЙА-індукованим ОА за умов введення вище зазначених сполук. ІГХ аналіз показав позитивний ефект введення ХС і ПБ тваринам з експериментальним ОА, найбільш виражений за умов їх комбінації, обумовлений зниженням експресії TLR-2, TLR-4 та NF-κB у межах хондроцитів хряща (рис. 8.1). Так, при окремому введенні тваринам з експериментальним ОА як ХС, так і ПБ встановлено зниження експресії TLR-2 та TLR-4, проте близько 50% клітин проміжного шару суглобового хряща мали позитивну реакцію щодо експресії даного виду рецепторів (рис 8.9; 8.10). Показано, що до 25% хондроцитів хряща зберігали ознаки експресії NF-κB за умов окремого введення ХС і ПБ тваринам з експериментальною патологією (рис. 8.11 А, Б).

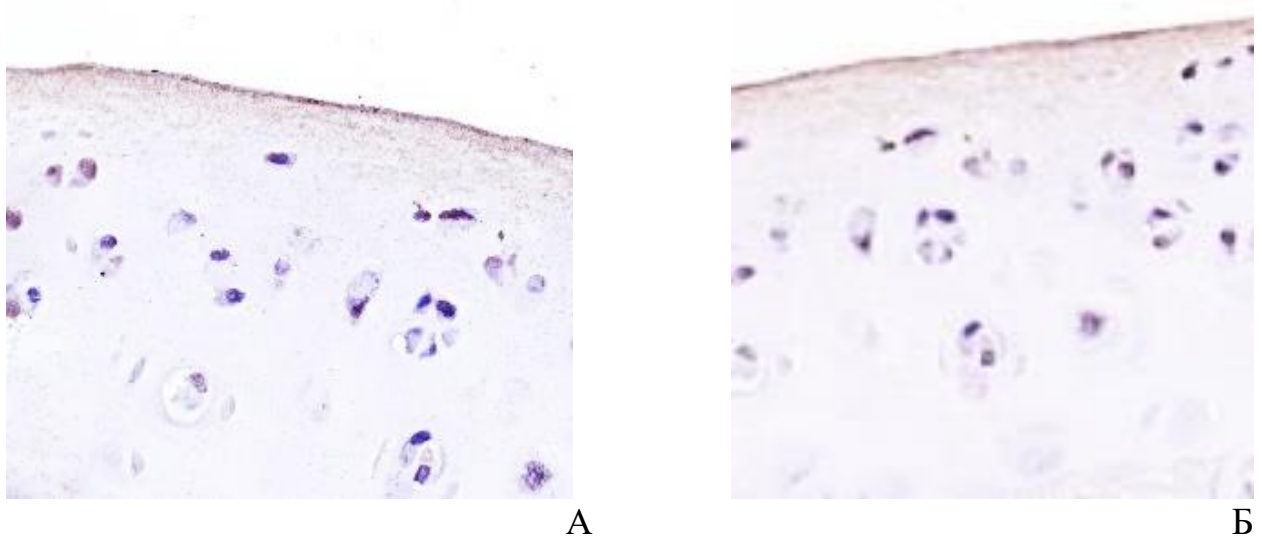


Рис. 8.9 Експресія TLR2 (А) та TLR4 (Б) у хондроцитах суглобового хряща тварин з експериментальним остеоартритом при введенні хондроїтину сульфату. Імуногістохімічне забарвлення з використанням МАТ до TLR-2 та TLR-4. Збільшення $\times 200$

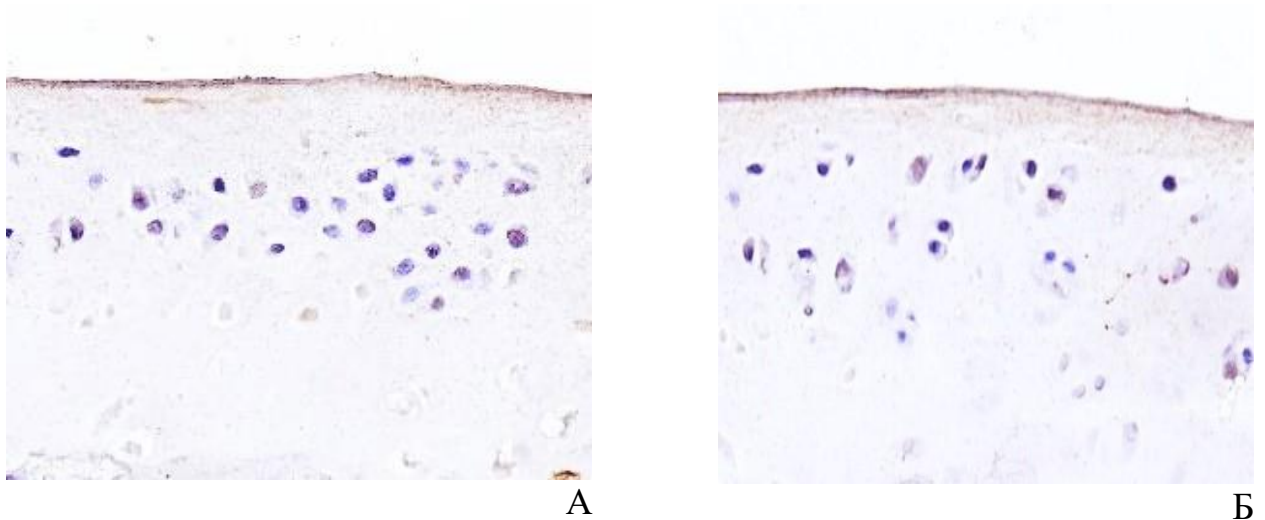


Рис. 8.10 Експресія TLR-2 (А) та TLR-4 (Б) у хондроцитах суглобового хряща тварин з експериментальним остеоартритом при введенні пробіотика. Імуногістохімічне забарвлення з використанням МАТ до TLR-2 та TLR-4. Збільшення $\times 200$

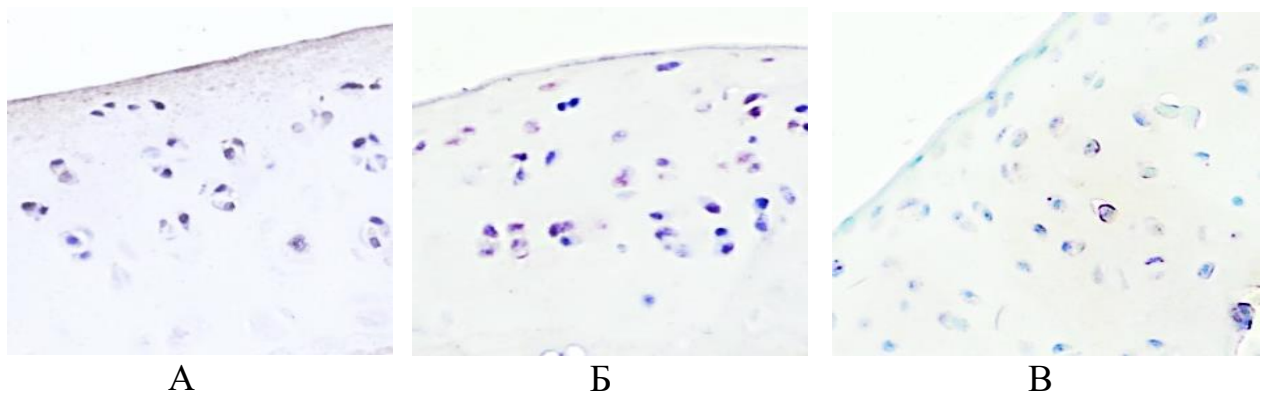


Рис. 8.11 Експресія NF-кВ у хондроцитах суглобового хряща тварин з експериментальним остеоартритом при введенні хондроїтин сульфату (А), пробіотики (Б) та їх сумісній дії (В). Імуногістохімічне забарвлення з використанням МАТ до NF-кВ. Збільшення $\times 200$

Сумісне введення ХС і ПБ у щурів з МЙА-індукованим ОА мало результатом відсутність експресії TLR-2 та TLR-4 (рис.8.12) та значне зниження експресії NF-кВ у хрящі, порівняно з показниками тварин групи ОА, але до 25% хондроцитів зберігали ознаки експресії NF-кВ (рис. 8.11 В).

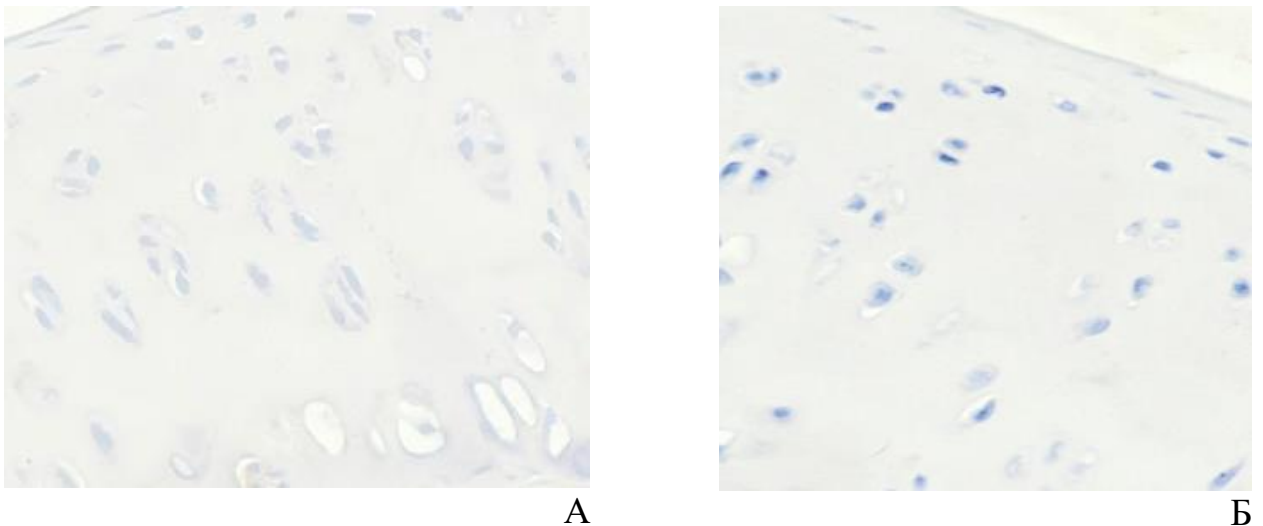


Рис. 8.12 Експресія TLR-2 (А) та TLR-4 (Б) у хондроцитах суглобового хряща тварин з експериментальним остеоартритом при сумісному введенні хондроїтину сульфату та пробітика. Імуногістохімічне забарвлення з використанням МАТ до TLR-2 та TLR-4. Збільшення $\times 200$

Зниження експресії досліджуваних сигнальних прозапальних маркерів у щурів з експериментальним ОА, яким вводили ХС та ПБ супроводжувалося відновленням гістоархітекtonіки суглобового хряща, зменшенням деструктивних змін, втрати протеогліканів суглобового хряща та резорбції субхондральної кістки.

Позитивний ефект ХС на експресію досліджуваних Toll-подібних рецепторів та ядерного фактора NF- κ B у тканинах суглоба щурів може бути пов'язаний з тим, що ХС, зв'язуючись з білками-рецепторами CD44, TLR-4 та ICAM1 на поверхні хондроцитів, може знижувати транскрипцію ядерного фактора NF- κ B та блокувати прозапальні сигнальні шляхи за участю білків ADAMTS, MMP, IL-1 β [509, 510]. Також ХС може взаємодіяти з цитозольним адапторним білком MyD88, який є ключовою ланкою у передачі сигналу від Toll-подібних рецепторів та є необхідним для індукції синтезу цитокінів; та рецептором ФНП- α на поверхні лімфоцитів [511]. Екзогенний ХС, взаємодіючи з Toll-подібними рецепторами, може блокувати активацію ендогенних глікозаміногліканів (зокрема, біглікану – дволанцюгової молекули, що включає фрагменти ХС), які регулюють імунну

відповідь [512].

Toll-подібні рецептори розпізнають патогени за молекулярними патернами, які є унікальними для мікроорганізмів, і їх зв'язування приводить до активації ядерного фактора транскрипції NF-κB, який стимулює експресію генів запальних цитокінів, таких як ФНП-α, ІФН-γ, й ІЛ-1 та викликає імунну відповідь [513]. Слід відмітити, що значна кількість лігандів TLR характерні не тільки для патогенних мікроорганізмів, а й для умовно-патогенних бактерій та інших представників нормальної мікробіоти [514]. Розпізнавання коменсальної мікробіоти Toll-подібними рецепторами відбувається й за фізіологічних умов, яке є необхідним для підтримання кишкового гомеостазу. Існує припущення, що негативна роль Toll-подібних рецепторів за умов патології може бути пов'язана з активацією клітин вродженого імунітету (макрофагів та нейтрофілів) та високою експресією TLR рецепторів, а також зі стимуляцією таких рецепторів, локалізованих на клітинах-мішенях, зокрема хондроцитах хряща, що призводить до деструкції тканин [515].

TLR-2 може розпізнавати нетипові ЛПС *Leptospira interrogans* та *Porphyromonas gingivalis*, однак не може виявляти ті, що синтезуються *E. coli* або *Salmonella spp.*, які є лігандами для TLR-4. У дослідженнях [516] встановлено, що молочно-кислі бактерії *Lactobacillus* у складі пробіотиків активують імунну систему шляхом відновлення балансу про- та протизапальних цитокінів за участю рецепторного комплексу TLR. Зокрема Shimazu та ін. *in vitro* на лінії епітеліальних клітин кишечника свиней показали, що *Lactobacillus jensenii* послаблює експресію прозапальних цитокінів, викликану введенням бактеріального ліпополісахариду (ЛПС), шляхом пригнічення TLR-4-залежного NF-κB сигнального шляху та активації мітоген-активованої протеїнкінази (MAPK) [517].

Таким чином, комбіноване застосування ХС та ПБ забезпечувало потужний захисний ефект на суглобовий хрящ: зменшувало запалення та ураження суглобових тканин, сприяло відновленню структури хряща після

моделювання МІА-індукованого ОА. Ці ефекти можуть бути обумовлені пригніченням надмірної експресії Toll-подібних рецепторів TLR-2 та TLR-4, а також ядерного фактора NF-κB у тканинах колінного суглоба.

8.2 Вміст розчинних форм TLR-2 та TLR-4 у сироватці крові щурів

Toll-подібні рецептори TLR-2 та TLR-4, які ініціюють запуск запальних сигнальних каскадів у тканинах суглоба, представлені не лише трансмембранними, а й розчинними формами (sTLR-2 та sTLR-4), які виявляють у біологічних рідинах [518]. Дані розчинні Toll-подібні рецептори вважаються ендogenous негативними регуляторами передачі ліганд-індукованого сигналу TLR-2 та TLR-4 [519].

При запальних захворюваннях відмічають різноспрямовані зміни рівня sTLR у сироватці крові: зниження при системному червоному вовчаку [520]; підвищення при розсіяному склерозі [521], ревматоїдному артриті [522], захворюваннях, викликаних бактеріальною інфекцією, при онкологічних патологіях та ін. [523].

Встановлене нами ІГХ підвищення експресії Toll-подібних рецепторів TLR-2 та TLR-4 у хрящі за умов експериментального ОА відповідало збільшенню вмісту розчинних їх форм у сироватці крові. Показано, що вміст sTLR-2 та sTLR-4 у сироватці крові щурів з МІА-індукованим ОА був вищим, порівняно зі значеннями у тварин контрольної групи, в 1,1 та 1,2 рази ($p \leq 0,05$) відповідно (рис. 8.13).

Така кореляція вмісту може бути пов'язана з передачею сигналу TLR-2 та TLR-4, активацією NF-κB, що приводить до підвищення експресії цитокінів і хемокінів, та залучення імунних клітин у запальну відповідь [521].

Підвищення рівня sTLR-4 у сироватці крові співпадає з результатами досліджень Ten Oever та ін. [524], у яких показано значне зростання рівня sTLR-4 у плазмі при введенні ЛПС у якості прозапального цитокіну, що мало

результатом швидку активацію механізму зворотного зв'язку для протидії активації передачі сигналу TLR-4.

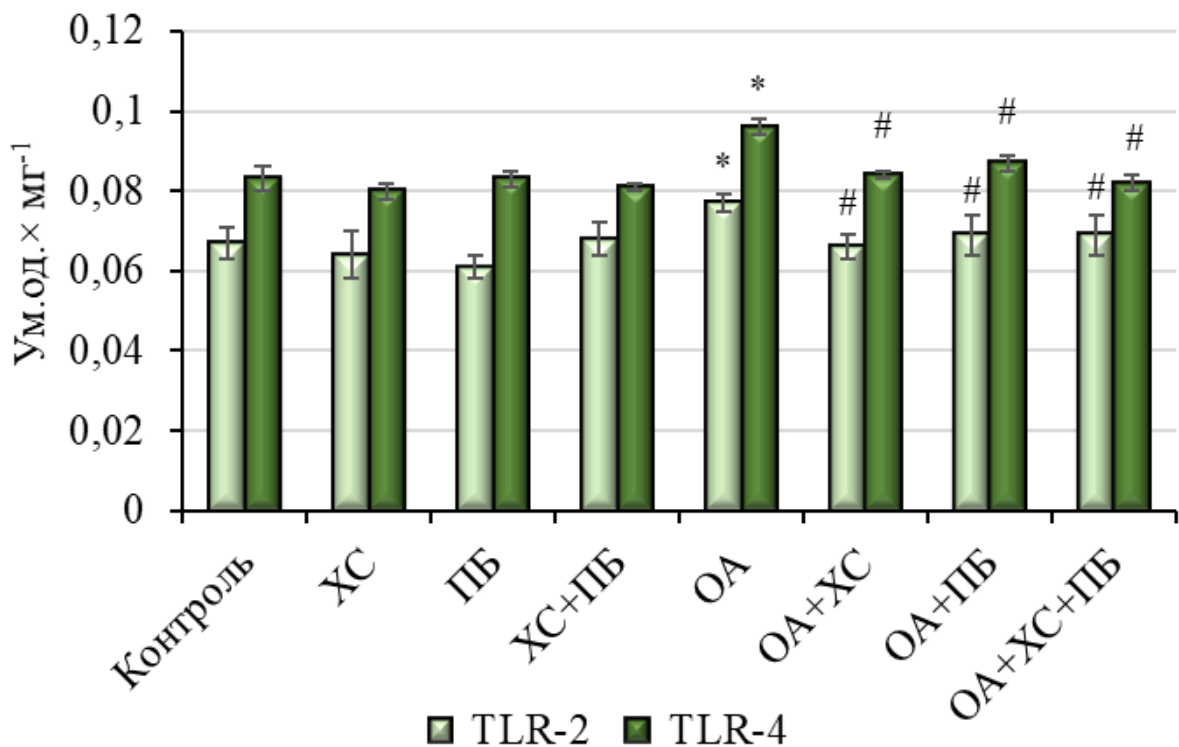


Рис. 8.13 Вміст розчинних форм TLR-2 та TLR-4 у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; * – $p \leq 0,05$ відносно контрольних тварин; # – $p \leq 0,05$ відносно тварин групи ОА)

Крім того, sTLR-2 та sTLR-4 діють як «рецептори-пастки», зв'язуючись з лігандами, які розпізнають мембранозв'язані відповідні їх форми, без активації сигнальних каскадів, тим самим інгібують трансдукцію сигналів TLR-2 та TLR-4 [525]. Інший механізм дії sTLR полягає у запобіганні зв'язуванню TLR-2 та TLR-4 з їх корецептором CD14, який має вирішальне значення для ефективною передачі сигналу [526].

Відомо, що sTLR-2 утворюється із трансмембранної форми TLR-2 шляхом протеолітичного розщеплення його зовнішньоклітинного домена, що приводить до утворення щонайменше шести ізомерів [200]. З іншого боку,

розчинні форми TLR-4, які були виявлені у слині та синовіальній рідині суглобів, уражених ОА, утворюються за механізмом альтернативного сплайсингу, який є відмінним від посттрансляційної модифікації [200].

Введення тваринам з експериментальною патологією суглобу ХС і ПБ призводило до значимого зниження вмісту розчинних рецепторних форм TLR-2 та TLR-4 до рівня контрольних значень (рис. 8.13).

Такий ефект ХС може бути пов'язаний з пригніченням запального процесу та деградації хрящового матриксу щурів з МІА-індукованим ОА шляхом впливу сульфатованого глікозаміноглікану на передачу сигналів TLR-2(4)/MyD88/NF-κB, інгібування прозапального транскрипційного фактора NF-κB та збереження його в неактивній формі. Введення ХС може мати синергічний ефект на запальний процес при його поєднанні з ПБ. Подібний синергічний вплив виявляли в інших дослідженнях на тваринах, у яких моделювали експериментальний ОА, де показано, що введення *Lactobacillus casei* щурам разом з колагеном II типу та глюкозаміном мало результатом зниження больової чутливості, зменшення інфільтрації лімфоцитів та деструкції хряща, зменшувався рівень прозапальних цитокінів та ММП, та зростав рівень протизапальних цитокінів у тканинах суглоба [204, 205].

Патерн-розпізнавальні Toll-подібні рецептори TLR в організмі виконують щонайменше дві важливі функції – захист від інфекції та підтримання тканинного гомеостазу, в здійсненні яких ключовою є роль лігандів мікробіоти кишечника [527]. Пробіотики можуть відновлювати нормальний мікробіоценоз, тоді як взаємодія лігандів кишкової мікробіоти забезпечує баланс функцій кишкового епітелію, синтезу про- і протизапальних цитокінів, катаболічних та анаболічних факторів, які впливають на метаболізм хряща [528]. Слід зазначити, що епітеліальні клітини ШКТ продукують значну кількість TLR-інгібуючого пептиду (TOLLIP), який пригнічує TLR-2/TLR-4-опосередковані каскади і, таким чином, захищає від компульсивного запального впливу коменсальну

мікробіоту [529].

Встановлено, що деякі грамнегативні мікроорганізми (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*) є потужними тригерами передачі сигналів TLR-2 та TLR-4, тоді як *Staphylococcus aureus* та *Staphylococcus epidermidis* індукують більш слабку передачу сигналу, а *Enterococcus faecalis* та *Streptococcus pyogenes* взагалі не впливають на TLR-опосередкований сигнальний шлях [530].

Таким чином, підвищення рівня розчинних форм Toll-подібних рецепторів TLR-2 та TLR-4 у сироватці крові та підвищення експресії мембраннозв'язаних їх форм у хрящовій тканині щурів з експериментальним ОА можна вважати одним з чинників прогресування імунозапальних та деструктивних змін у суглобах. Введення ХС та ПБ мало позитивний синергічний вплив на пригнічення запального процесу та деградації хрящового матриксу щурів з експериментальним ОА шляхом зменшення ІГХ експресії TLR-2, TLR-4 і NF-κB в хрящовій тканині та вміту розчинних форм TLR-2 і TLR-4 у сироватці крові, що може свідчити про імуномодуючі, протизапальні та регенеруючі властивості даних сполук.

8.3 Рівень експресії генів *Tlr2*, *Tlr4* та *Nfkb1* у хрящовій тканині колінного суглоба щурів

Зміни в геномі можуть визначати особливості перебігу запальної відповіді та специфічних імунних реакцій клітин. Гени Toll-подібних рецепторів відповідають за продукцію патерн-розпізнавальних рецепторів здатних розпізнавати відповідні ліганди. TLR-2 та TLR-4, які кодуються генами *Tlr2* та *Tlr4*, є потужними клітинними генними модуляторами, які розпізнають широкий спектр лігандів, в тому числі асоційовані з пошкодженням молекулярні фрагменти та консервативні патоген-асоційовані молекулярні патерни, які є важливими у індукції клітинної вродженої та набутої імунної відповіді [531]. Приєднання Toll-подібними рецепторами

адаптерних білків приводить до запуску внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, результатом яких є активація ядерного транскрипційного фактора NF- κ B, який кодується геном *Nfkb1*, і є ключовою ланкою у процесі проліферації клітин, індукує експресію генів прозапальних цитокінів, зокрема ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8, ФНП- α , та є основним регулятором специфічної адаптивної імунної відповіді [532]. Однак, при наявності функціональних поліморфізмів TLR відбуваються зміни функціонування відповідних генів, в результаті яких знижується здатність TLR розпізнавати ліганди або проводити внутрішньоклітинні сигнали, що призводить до менш вираженої активації імунних клітин після зустрічі з патогеном [533].

Нами досліджено рівень експресії генів *Tlr2*, *Tlr4* та *Nfkb1*, які залучені у шляхи сигнальної трансдукції та модуляції імунної відповіді в хрящовій тканині щурів із експериментальним ОА, при введенні ХС і ПБ.

У результаті досліджень виявлено, що рівень експресії гена *Tlr2* у хрящах колінного суглоба щурів групи з експериментальною патологією був вищим у 3,2 раза ($p \leq 0,001$) порівняно з контрольними тваринами (рис. 8.14).

При введенні шурам з експериментальним ОА препарату на основі ХС рівень експресії *Tlr2* знижувався в 1,6 раза ($p \leq 0,001$) відносно тварин групи ОА, проте був підвищеним у 2 рази ($p \leq 0,001$) порівняно з контролем. При введенні шурам з експериментальною патологією ПБ композиції та при комбінації її з ХС у щурів із МІА-індукованим ОА рівень експресії цього гена повертався до контрольних значень. У щурів, яким окремо вводили ХС і ПБ, а також при їх комбінації за відсутності експериментального ОА, рівень експресії *Tlr2* гена значуще не відрізнявся від показників тварин контрольної групи (рис. 8.14).

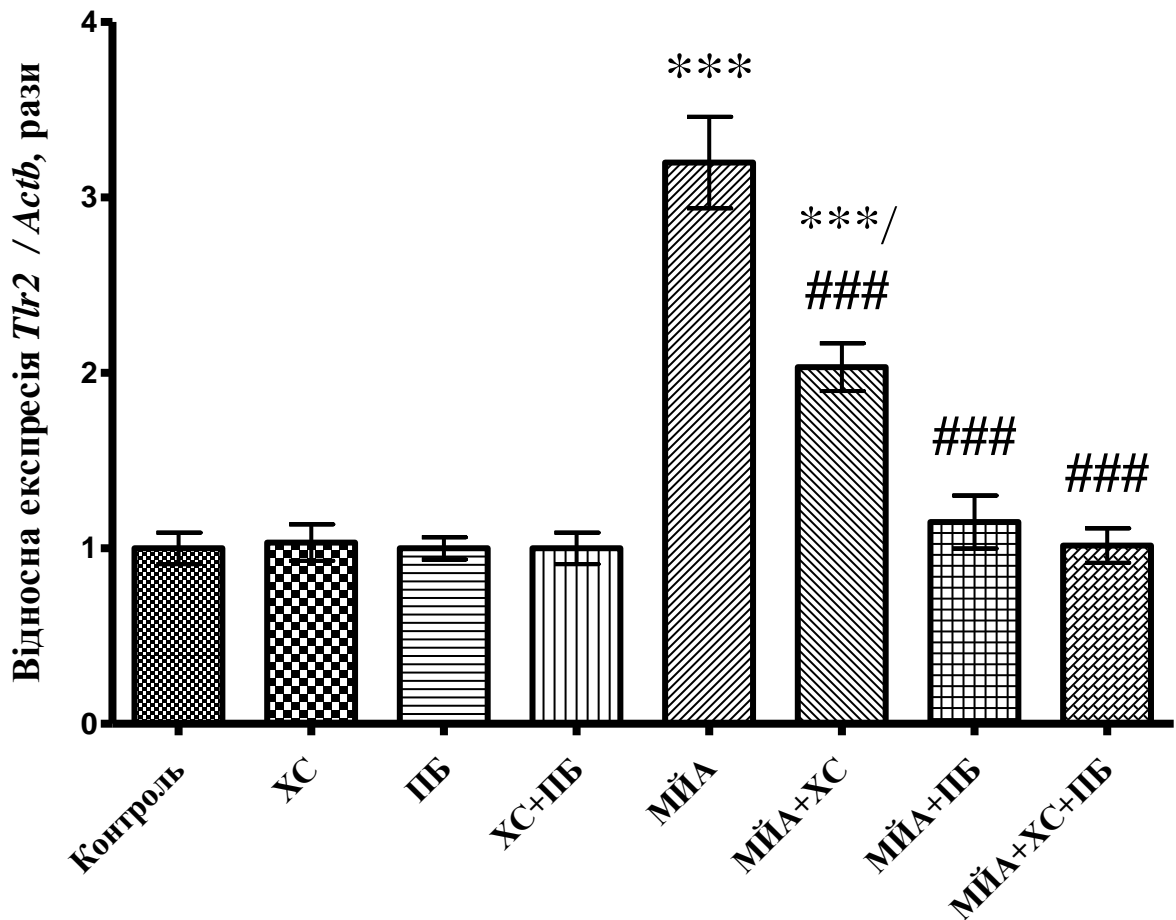


Рис. 8.14 Рівень експресії гена *Tlr2* у хрящах колінного суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; *** – $p \leq 0,001$ відносно контрольних тварин; ### – $p \leq 0,001$ відносно тварин групи ОА)

Показано, що рівень експресії гена *Tlr4* у хрящах колінного суглоба щурів з експериментальною патологією був вищим у 2 рази ($p \leq 0,001$) порівняно з контрольними тваринами (рис. 8.15).

При введенні ХС щурам з експериментальним ОА експресія *Tlr4* знижувалася 1,4 рази ($p \leq 0,001$) відносно тварин групи ОА, проте була підвищеною в 1,4 рази ($p \leq 0,01$) порівняно з контрольними тваринами. При окремому введенні ПБ тваринам з експериментальним ОА та за комбінації ХС і ПБ експресія гена *Tlr4* достовірно не відрізнялася від контрольних значень. У щурів груп ХС, ПБ та ХС+ПБ рівень експресії цього гена значуще не відрізнявся від показників тварин контрольної групи (рис. 8.15).

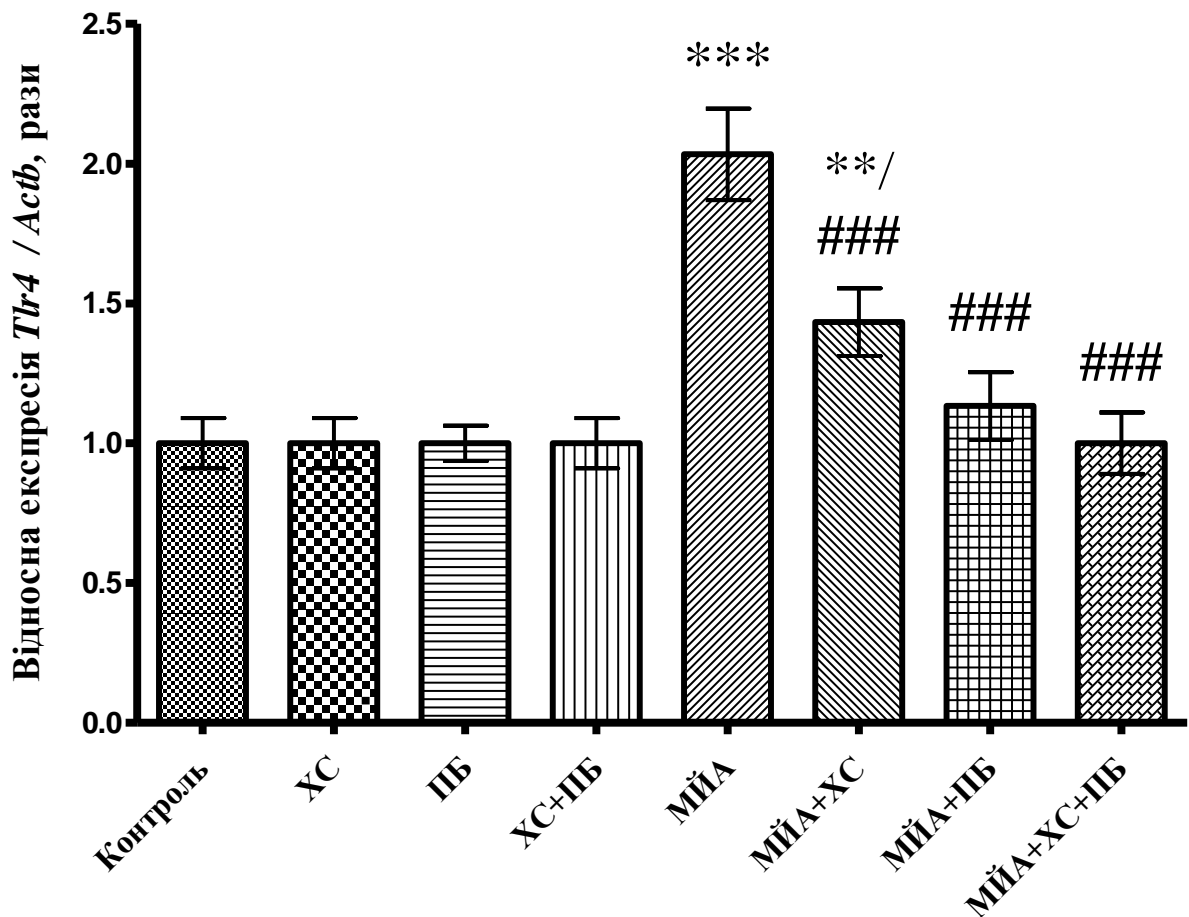


Рис. 8.15 Рівень експресії гена *Tlr4* у хрящах колінного суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; *** – $p \leq 0,001$, ** – $p \leq 0,01$ відносно контрольних тварин; ### – $p \leq 0,001$ відносно тварин групи ОА)

Зрілі хондроцити експресують рецептори TLR-2, TLR-4 та ін. і можуть реагувати на сигнали з хрящевої матриці/похідні хондроцитів або на продукти розпаду. Це призводить до синтезу прозапальних цитокінів (як було описано вище), які стимулюють подальше утворення TLR і цитокінів, встановлюючи обернений взаємозв'язок. Порушення регуляції передачі сигналів TLR-2 та TLR-4, викликане одиночними нуклеотидними поліморфізмами (SNP) у зовнішньоклітинному домені рецептора, може призводити до змін зв'язуючої здатності ліганду, порушення синтезу про- та протизапальних цитокінів, та модуляції ризиків хронічного запалення, тим самим стримуючи ремоделювання суглобового хряща. У результатах

досліджень [534] представлені дані про ідентифікацію SNP: Asp299Gly (rs4986790) та Thr399Ile (rs4986791), які можуть викликати зміну амінокислотних залишків у зовнішньоклітинному домені TLR-4 та впливати на ефекторні функції рецептора. Apetoh та ін. стверджують, що дані поліморфізми знижують ефективність зв'язування TLR-4 з його екзогенними та ендogenous лігандами [535], тоді як Prohinar та ін. повідомляють, що ці поліморфізми зменшують зовнішньоклітинне накопичення функціонального TLR-4, що приводить до порушення передачі сигналу TLR-4 у відповідь на патогенів [536]. Існують дані, що такі SNP, серед яких rs11536858, rs1927911 та rs1927914 гени TLR-4, пов'язані із запальними захворюваннями [537]. Ген TLR-2 CD282, який кодує білок з 784 амінокислотних залишків, після взаємодії з лігандом запускає каскад реакцій, в результаті яких активується фактор NF-κB [538].

Доведено, що TLR-2 проявляє найбільшу специфічність серед Toll-подібних рецепторів, так як може утворювати функціональні гетеродимери рецепторів (з TLR-1 або з TLR-6), що дозволяє взаємодіяти з різними лігандами. TLR-2 відіграє важливу роль у ранньому утворенні медіаторів запалення та у розвитку хронічної запальної патології. Для гена TLR-2 описані поліморфізми TLR-2 (Arg753Gln) та TLR-2 (Arg677Trp) у внутрішньоклітинній частині молекули (область TIR-домена), які викликають до порушення передачі сигналу від лігандів TLR2 [300].

Підвищена експресія TLR-2 та TLR-4 у хондроцитах хряща, ураженого ОА, стимулює синовіоцити до синтезу активатора рецептора ліганду NF-κB RANKL, який виконує важливу роль у деградації суглобового хряща, проте механізми регуляції цих процесів вивчені не достатньо [539, 540]

Посилення синтезу NF-κB в умовах ОА зумовлене дією прозапальних цитокінів, продуктів розпаду позаклітинного матриксу та окислювально-відновної сигналізації [359, 541]. Активованій NF-κB регулює експресію катаболічних генів цитокінів, хемокінів, індукцибельних ферментів (iNOS, ЦОГ-2), молекул адгезії (ICAM-1, VCAM-1), головного комплексу

гістосумісності (МНС-I, МНС-II), білків комплемента (В, С3, С4), факторів, які контролюють клітинний цикл, інгібіторів та активаторів апоптозу, та протеолітичних ферментів, які руйнують хрящову матрицю та впливають на ремоделювання хряща, апоптоз хондроцитів, синовіальне запалення [542, 543].

У наступних дослідженнях нами виявлено, що рівень експресії гена *Nfkb1* у хрящах колінного суглоба щурів з експериментальним ОА був вищим у 3,8 раза ($p \leq 0,001$) порівняно з контрольними тваринами (рис. 8.16). При введенні ХС тваринам з експериментальною патологією рівень експресії *Nfkb1* знижувався в 1,5 рази ($p \leq 0,001$) відносно тварин групи ОА, проте був підвищеним у 2,5 рази ($p \leq 0,001$) порівняно з контролем. При введенні щурам з експериментальним ОА пробіотичної композиції рівень *Nfkb1* був у 2,7 раза ($p \leq 0,001$) нижчим, ніж у тварин групи ОА, однак лишався підвищеним в 1,4 раза ($p \leq 0,01$) відносно контролю. За сумісного введення ХС і ПБ у щурам із МІА-індукованим ОА рівень експресії цього гена повертався до контрольних значень. У щурів, яким окремо вводили ХС і ПБ, а також при їх комбінації за відсутності експериментального ОА, рівень експресії гена, що кодує ядерний фактор, знаходився в межах значень тварин контрольної групи (рис. 8.16).

При дослідженні експресії гена *Nfkb1* у крові щурів з експериментальним ОА виявлено, що його рівень був у 2,2 раза ($p \leq 0,001$) вищим порівняно з контрольними тваринами (рис. 8.17). При введенні ХС щурам з експериментальним ОА рівень експресії *Nfkb1* знижувався майже в 1,3 раза ($p \leq 0,001$) відносно тварин групи ОА, проте був підвищеним у 1,8 раза порівняно з контрольними тваринами ($p \leq 0,001$). При введенні ПБ щурам із експериментальною патологією рівень експресії гена *Nfkb1* у крові був у 1,6 раза ($p \leq 0,001$) нижчим, ніж у тварин групи ОА, однак лишався підвищеним в 1,4 раза ($p \leq 0,01$) відносно контролю. За умов комбінованого введення ХС і ПБ у щурів із експериментальним ОА рівень експресії цього гена *Nfkb1* у крові повертався до рівня контролю. У щурів груп ХС, ПБ та

ХС+ПБ експресія гена *Nfkb1* значуще не відрізнялася від показників тварин контрольної групи (рис. 8.17).

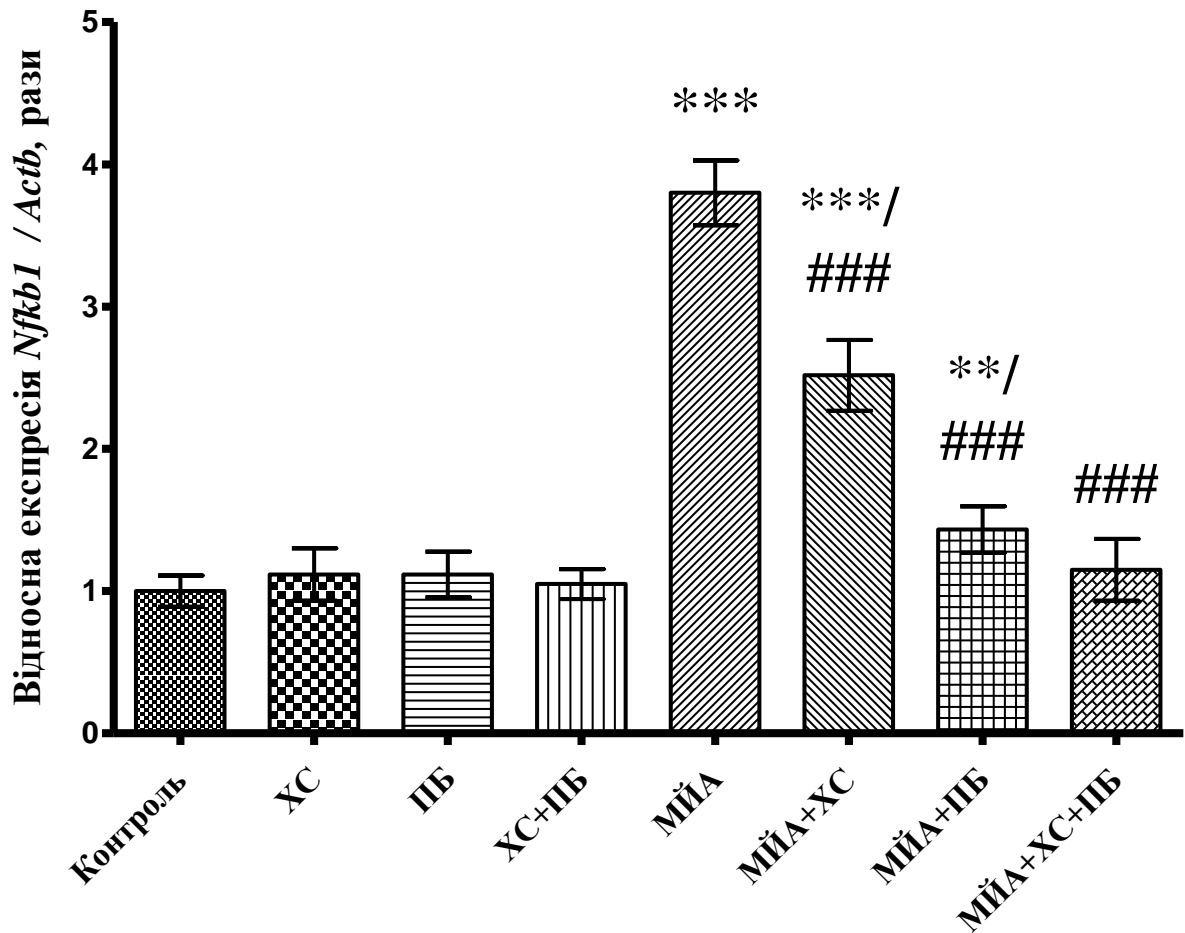


Рис. 8.16 Рівень експресії гена *Nfkb1* у хрящах колінного суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; *** – $p \leq 0,001$, ** – $p \leq 0,01$ відносно контрольних тварин; ### – $p \leq 0,001$ відносно тварин групи ОА)

Встановлене підвищення експресії TLR-2 і TLR-4, та їх генів у хрящовій тканині колінного суглоба, зростання вмісту розчинних форм TLR-2 і TLR-4 у сироватці крові щурів з експериментальним ОА супроводжувалося підвищенням вмісту прозапальних цитокінів ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-8, ІФН- γ та експресії прозапальних генів *Nos2*, *Ptgs2*, *Tgfb1* у хрящовій тканині колінного суглоба та крові щурів з експериментальним ОА, підвищенням

експресії ядерного фактора NF-κB та його гена *Nfkb1* у хрящовій тканині щурів, що може свідчити про цитокін-індуковану експресію Toll-подібних рецепторів, активацію прозапальних шляхів сигнальної трансдукції, розвиток патологічних дегенеративних процесів у хрящі та катаболічну реакцію хондроцитів на запалення [506, 544, 545]. Введення ХС і ПБ, особливо їх комбінація, мало позитивний ефект на експресію досліджуваних генів, залучених у шляхи сигнальної трансдукції та модуляцію імунної відповіді в клітинах хрящової тканини суглоба.

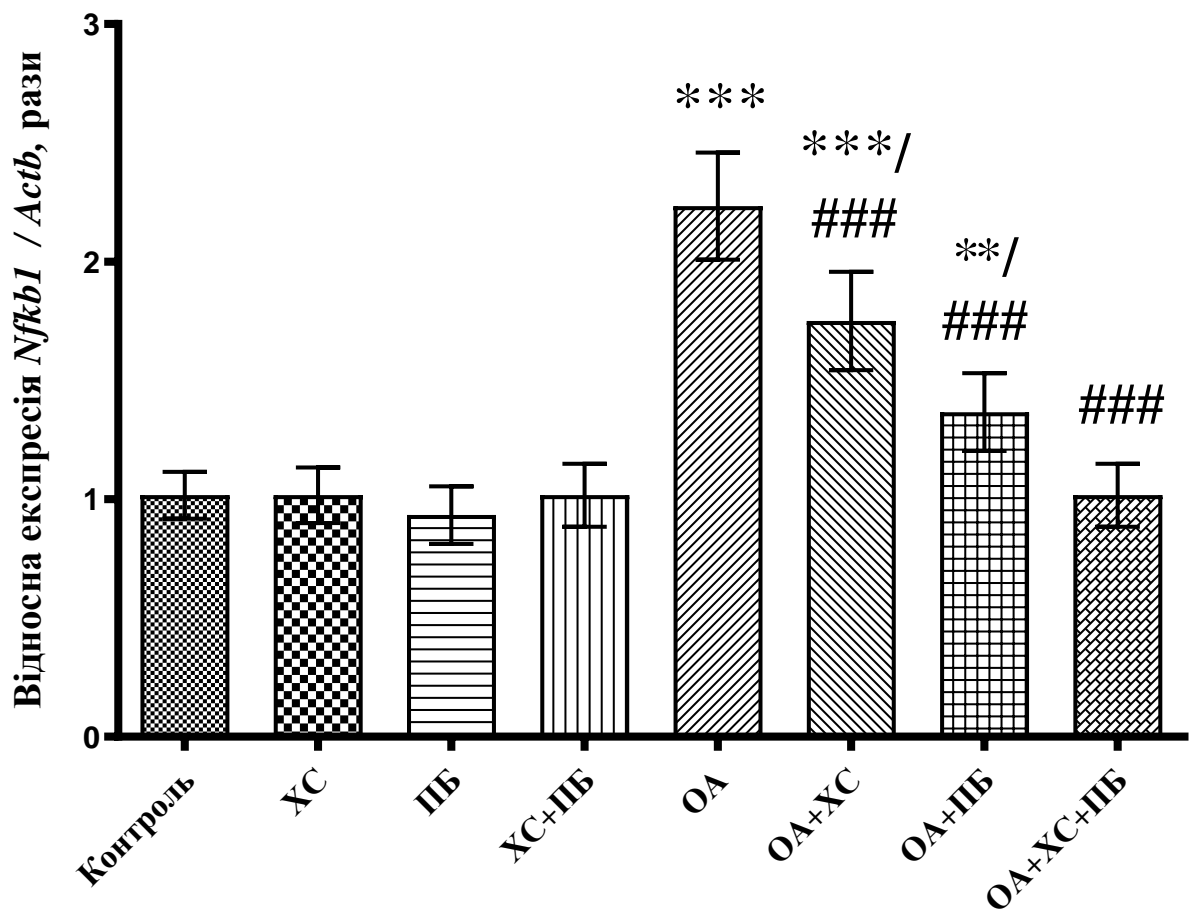


Рис. 8.17. Рівень експресії гена *Nfkb1* в крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ($M \pm m$, $n=14$; *** – $p \leq 0,001$, ** – $p \leq 0,01$ відносно контрольних тварин; ### – $p \leq 0,001$ відносно тварин групи ОА)

ХС – структурний модулятор, який не тільки синтезується в організмі, а також після введення в організм інтегрується у структуру хрящової тканини, стимулюючи її синтез і пригнічуючи деструкцію. Біологічна активність ХС підтвержена відносно дії на NF-κB, зменшення експресії ІЛ-1β хондроцитами та синовіоцитами, а також інгібування експресії ЦОГ-2 [546]. У літературних наукових джерелах зазначено, що в культурі хондроцитів кролів ХС обмежує транслокацію фактора транскрипції NF-κB до ядра, знижує фосфорилування зовнішньоклітинної сигнал-регулюючої кінази (ERK-1/2) та мітогенактивованої протеїнкінази (p38MAPK) у відповідь на стимуляцію ІЛ-1β [547]. При наявності фонові патології ХС здійснює системний позитивний вплив, так як здатний зменшувати активацію NF-κB не тільки у хрящовій тканині. Так, показано, що введення ХС пригнічувало активацію NF-κB у гепатоцитах за умов розвитку гепатиту [470]

Вплив ПБ опосередковується стимуляцією епітеліальних клітин та активацією клітин імунної системи, яка здійснюється переважно за допомогою Toll-подібних рецепторів та цитокінів [391]. Деякі види молочно-кислих бактерій у складі ПБ, такі як *Lactobacillus*, *Enterococcus* та *Bifidobacterium*, колонізуючись у кишечнику можуть відігравати важливу роль у розподіленні субпопуляцій лімфоцитів та впливати на вроджену імунну відповідь слизової оболонки шляхом імуномодуляції експресії TLR та контролю запалення як на системному рівні, так і на місцевому – у тканинах суглобу [548]. Показано, що введення *Lactobacillus acidophilus* може впливати на імунну відповідь клітин, знижуючи експресію TLR-2, TLR-4 та TLR-5 у тканинах сліпої кишки [549].

Таким чином, встановлене підвищення експресії генів *Tlr2*, *Tlr4* в хрящовій тканині та *Nfkb1* у хрящовій тканині та крові щурів з експериментальним ОА можуть свідчити про їх важливу роль у розвитку запального процесу в колінному суглобі тварин та залучення хондроцитів до адаптивної імунної відповіді. ХС і ПБ мали позитивний ефект на експресію вище зазначених генів у хрящовій тканині та експресію *Nfkb1* у крові при

сповільненні прогресування ОА.

Таким чином, розвиток експериментального ОА супроводжувався не лише порушенням структури тканин суглоба, а й стимуляцією прозапальних катаболічних сигнальних шляхів з можливою активацією патерн-розпізнавальних молекул, включаючи експресію Toll-подібних рецепторів TLR-2 і TLR-4 та ядерного фактора NF-κB у тканинах суглоба, підвищенням експресії генів *Tlr2*, *Tlr4* та *Nfkb1* у хрящовій тканині, зростанням вмісту розчинних форм TLR-2 і TLR-4 у сироватці крові, що свідчило про їх суттєву роль у розвитку запального процесу в суглобі та можливе залучення хондроцитів до адаптивної імунної відповіді.

Встановлено, що ремоделювання хрящової тканини за умов експериментального остеоартриту регулюється TLR-2/4-опосередкованим запальним шляхом NF-κB. Показано залучення мікробіоти до біохімічних механізмів регуляції метаболізму хряща при експериментальному остеоартриті через TLR-2/4-опосередкований NF-κB-залежний запальний шлях. Доведена експериментально ефективність комбінованої дії ХС і ПБ для корекції патології суглобів за умов МІА-індукованого остеоартриту через здатність впливати на TLR-2/4-опосередкований NF-κB-залежний запальний шлях, що пов'язано з імуномодулюючими, протизапальними, антиоксидантними та регенеруючими властивостями даних сполук.

Результати, викладені у розділі, опубліковані у наступних працях: [62, 251].

РОЗДІЛ 9

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, за останні десятиліття змінилася структура захворюваності населення. Відбулося істотне зрушення в бік хронічної патології, в тому числі збільшилася частота дегенеративно-дистрофічних та запальних захворювань ОРА. Серед патологій ОРА провідне місце займають ОА, в основі яких лежить ураження всіх компонентів суглоба. В першу чергу, ураження хряща, субхондральної кістки, синовіальної оболонки, зв'язок, суглобової капсули та навколосуглобових м'язів. Сьогодні відомо, що на ОА хворіє 10-20% населення планети. В зв'язку зі старінням та збільшенням кількості ожиріння серед населення поширеність даної патології стрімко зростає та набуває все більшої актуальності. Розвиток патології суглобів пов'язаний з цілим рядом факторів: інфекційні захворювання, механічні травми, надлишкова вага, хвороби хребта, аутоімунні процеси, порушення обміну речовин, малорухливий спосіб життя, спадкова схильність, неправильне харчування, хронічний стрес тощо [2, 3, 32, 550, 551, 552, 553]. Все частіше в публікаціях з'являються повідомлення про генетичну етіологію захворювань суглобів, що зумовлена мутаціями гена проколагену II типу (основного колагену гіалінового хряща) [554, 555].

Недивлячись на те, що ОА раніше тривалий час вважався дегенеративним захворюванням хряща, дослідження останніх років вказують на те, що запалення відіграє вирішальну роль у патогенезі захворювання суглобів, зокрема безпосередню участь хондроцитів у запальних реакціях, що зумовлені активацією рецепторів вродженої імунної відповіді та запуском сигнальних шляхів, вивільненням медіаторів запалення [25, 26, 359, 360, 556]. Отже, розвиток ОА безпосередньо пов'язаний з неконтрольованими запальними процесами та порушеннями метаболізму хряща, наслідком яких є

його руйнування, біль у суглобах та інвалідність [1].

Незважаючи на певні успіхи у лікуванні патологій ОРА, в даний час не існує затверджених ефективних препаратів, які б усували або запобігали розвитку ОА та знижували показники захворюваності на ОА [4, 5, 139, 140]. Медикаментозне лікування переважно складається із симптоматичних лікарських засобів швидкої та повільної дії, які застосовують з метою зменшення болю, поліпшення функції суглобів і уповільнення прогресування ОА. Найпоширенішими є препарати, що містять ХС, який є природнім компонентом міжклітинної речовини хряща та підтримує його пружність і щільність, однак механізми дії та ефективність його застосування залишаються суперечливими і остаточно нез'ясованими [5, 6]. Саме зі зниженням вмісту ХС, який виконує не тільки структурну функцію в суглобі, а й виявляє антиоксидантні та протизапальні властивості, пов'язані дистрофічні зміни хрящової тканини [6, 159, 161]. Тому дослідження препаратів, основу яких складає ХС, є актуальними та перспективними для профілактики й лікування захворювань суглобів.

Серед досліджень останніх років з'являються дані щодо залучення дисбіозу ШКТ у захворюваннях ОРА [8, 44, 45]. Оскільки зміни у складі мікробіоти травної системи тісно пов'язані з патогенезом багатьох різних метаболічних та запальних захворювань, відповідно, дисбіоз може бути задіяний у розвиток ОА [2, 9, 557]. Роль кишкової мікробіоти або продуктів її метаболізму в патогенезі ОА залишається не відомою. Тому актуальним питанням є дослідження участі в розвитку ОА мікробіоти травного тракту та пробіотиків, які здатні зменшувати розвиток запальних процесів в організмі, виявляти антиоксидантні властивості, підтримувати та відновлювати нормобіоз ШКТ [10, 11].

Виходячи з вище викладеного, стає очевидним, що з'ясування біохімічних механізмів ремоделювання хрящової тканини за розвитку ОА та встановлення зв'язку між станом мікробіоти травного тракту і функціонуванням ОРА, є актуальною проблемою сучасних біохімії та

медицини. Такі дослідження дозволять більш глибоко зрозуміти принципи системного функціонування та метаболічних порушень при супутніх патологічних станах, і сприятимуть пошуку нових ефективних стратегій лікування та профілактики захворювань суглобів різного генезу.

На основі проведених експериментальних досліджень нами запропоновано концепцію, яка полягає в тому, що ремоделювання хрящової тканини за розвитку експериментального ОА пов'язане не лише зі зміщенням рівноваги між катаболічними й анаболічними процесами із залученням місцевих і системних запальних процесів та окисно-антиоксидантних порушень, а й з розвитком дисбіотичних змін мікробіоти товстої кишки за безпосередньої участі TLR-2/4-опосередкованого сигнального NF- κ B запального шляху.

При визначенні видового та кількісного складу фекальної мікробіоти кишечника у щурів з експериментальним ОА встановлено зниження кількості мікроорганізмів роду *Bifidobacterium* та *Lactobacillus*, підвищення кількості *Clostridium spp.* та лактозо-негативної *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, умовно-патогенних ентеробатерій та дріжджоподібних грибів роду *Candida*. Отримані результати свідчили про дисбіотичний стан у щурів за умов розвитку ОА, який може бути наслідком хронічного системного запального процесу, пов'язаного з місцевими дегенеративними змінами хряща. Крім того, виявлений дисбіоз може призводити до підвищення проникності слизової оболонки кишечника, та сприяти потраплянню до кров'яного русла різноманітних молекулярних паттернів: патоген-асоційованих PAMP, асоційованих з пошкодженням DAMP та мікроб-асоційованих паттернів MAMP [236], які можуть зв'язуватися з відповідними паттерн-розпізнавальними рецепторами на поверхні імунних клітин, та запускати запальні та катаболічні сигнальні каскади [237].

Відомо, що мікробіота кишечника переважно представлена мікроорганізмами роду *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*,

Clostridium, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* та ін. При виникненні дисбіозу мікробіота не може належним чином виконувати свої численні специфічні функції, що відображається на функціональному стані органів, систем та організму в цілому. Тому важливим є підтримання балансу кишкової мікробіоти задля забезпечення нормального гомеостазу організму. З метою запобігання або відновлення порушеного стану кишкової мікробіоти використовують пробіотики [250]. Нами встановлено, що введення тваринам з експериментальною патологією суглобів пробіотичної композиції сприяло збільшенню кількості мікроорганізмів роду *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та лактозо-позитивної *Escherichia coli*, зменшенню кількісного складу бактерій *Clostridium spp.* та лактозо-негативної *Escherichia coli*, умовно-патогенних ентеробактерій, *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* та дріжджових грибів роду *Candida*.

Одним із механізмів впливу кишкової мікробіоти на розвиток ОА може бути зміна ефектів терапевтичних сполук під впливом мікроорганізмів ШКТ. У дослідженнях [55, 244] є припущення, що терапевтична дія ХС може здійснюватися через модифікаційні шляхи кишечника, оскільки ХС може розщеплюватися кишковою мікробіотою. Дослідження змін у мікробіоті кишечника щурів з експериментальним ОА при введенні ХС показало збільшення кількості бактерій роду *Bifidobacterium* та *Lactobacillus*, зменшення кількості *Clostridium spp.*, лактозо-негативної *Escherichia coli*, спостерігалася тенденція до зменшення кількості мікроорганізмів *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.* та дріжджових грибів роду *Candida*. Отримані нами результати та аналіз літературних джерел свідчать, що ХС може мати пребіотичні властивості та здійснювати позитивний ефект на мікробіоту кишечника у тварин з ОА.

За комбінованого введення ХС і ПБ щурам із експериментальним ОА показано достовірне зростання кількості *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* і лактозо-позитивної *Escherichia coli*, зниження кількості *Clostridium spp.* лактозо-негативної *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* і

Staphylococcus spp., та елімінацію дріжджових грибів роду *Candida* й умовно-патогенних ентеробактерій. Виявлений синергічний позитивний ефект сумісного застосування ХС і ПБ за умов експериментального ОА може бути пов'язаний як із безпосереднім впливом корисної мікробіоти та її метаболітів на перешкоджання розвитку дисбіозу мікробіоти кишечника та запального процесу, так і з можливим подальшим опосередковано регулюючим впливом на TLR-2/4-залежний NF-κB запальний шлях і метаболізм хрящової тканини.

Для підтвердження структурних змін у тканинах суглоба при експериментальному ОА, а також при введенні ХС і ПБ, проведено гістологічний аналіз колінного суглоба щурів. Суглобовий хрящ є унікальною тканиною, складається переважно з позаклітинного матриксу, що синтезується хондроцитами, та забезпечує рухливість суглоба та його еластичність. У нормі хрящ має зоновану структуру: складається з поверхневої, середньої та глибокої зон, які відрізняються за біохімічним складом матриксу, морфологією та щільністю розташування клітин, а також їх метаболізмом [258]. Встановлено, що експериментальний ОА викликав значну дезорганізацію будови хряща колінного суглоба щурів та порушення його гістоархітекtonіки. Виявлено запальні, гіперпластичні та деструктивно-дистрофічні зміни у хрящовій та субхондральній кістковій тканинах. Відмічалось значне зменшення кількості та розмірів хондроцитів. Хрящ втрачав волокнисту структуру, відбувалося його фіброзування. Синовіальна тканина була гіперплазована з незначними фіброзними змінами. Відмічалися значні дефекти суглобової поверхні, вогнищева проліферація зруйновного хряща з утворенням остеофітів.

Введення ХС тваринам з експериментальним ОА супроводжувалося зменшенням вираженості дегенеративних змін суглоба. Спостерігалася тенденція до збереження морфологічної структури хряща. Введення ПБ практично не мало ефекту на пошкоджену структуру хряща: відмічалось порушення гістоархітекtonіки та наявність постнекротичних дефектів, зменшення кількості та розмірів хондроцитів, відсутність поділу на

поверхневий, проміжний і глибокий шари хондроцитів, хрящова тканина заміщувалася фіброзною, але вона охоплювала меншу площу, порівняно з гістологічними зразками тварин групи ОА. Тоді як комбіноване введення ХС і ПБ щурам з експериментальним ОА показало найбільш значущі гістологічні зміни у тканинах суглоба: на мікрорізах тканини не спостерігалися фіброзні елементи та постнекротичні зміни хряща, кількість хондроцитів наближувалася до норми, зберігалася їх зональність. Отже за сумісного введення ХС і ПБ відбувалося відновлення порушеної гістоархітекtonіки хряща та деструктивно-дистрофічних ушкоджень у хрящовій та субхондральній кістковій тканинах.

Процеси деградації, що запускаються при ОА направлені не лише на клітини хряща, а й на матрикс хрящової тканини. Хондроцити регулюють ремоделювання хрящової тканини, синтез і деградацію агрекану та інших компонентів хрящового матриксу. Тому визначення рівня біохімічних маркерів метаболізму хрящової тканини, серед яких COMP, ACAN, CHI3L1, CTSK та MMP, які відіграють ключову роль у процесах деградації та ремоделювання хряща, може слугувати важливим показником метаболічних змін, які відбуваються в хрящовому матриксі, зокрема на ранніх стадіях розвитку захворювання.

Встановлено посилення синтезу глікопротеїнів COMP, ACAN, CHI3L1 та протеолітичного фермента CTSK у сироватці крові та підвищення вмісту MMP-1, -2, -3, -8 у сироватці крові й хрящовій тканині тварин з експериментальним ОА. MMP є функціональними представниками системи протеолізу в суглобовому хрящі, безпосередньо впливають на метаболізм компонентів екстрацелюлярного матриксу та беруть участь у деструкції суглобових тканин. MMP продукуються переважно синовіоцитами, хондроцитами, фібробластами й остеобластами. Їх синтез і секреція відбувається під дією прозапальних цитокінів, факторів росту, інтегринів, ЛПС та ПГЕ₂. Посилення утворення вищезазначених глікопротеїнів хрящового матриксу та протеолітичних ферментів за умов

експериментального ОА може свідчити про подальшу деградацію нативного фібрилярного колагену, порушення обміну хрящової тканини та функцій суглобів, що також може корелювати з тяжкістю перебігу захворювання. Введення ХС і ПБ тваринам з експериментальним ОА, особливо їх комбінація, частково відновлювало концентрації структурних компонентів хрящового матриксу та вмісту ММП в сироватці крові щурів з експериментальною патологією, що сприяло зміщенню метаболізму хрящової тканини до фізіологічного рівня та зменшенню розвитку деструктивних процесів у колінному суглобі щурів з експериментальним ОА.

Розвиток запалення, деструкції тканин суглобів, ендогенної інтоксикації, порушення зональності хондроцитів та структури хрящового матриксу можуть призвести до зміни метаболізму клітин хряща на генетичному рівні, а саме, можлива активація генів, що залучені до деградації хряща. До генів, які впливають на морфологію хряща й навколосуглобових тканин при ОА відносять такі, що кодують переважно білки матриксу сполучної тканини, – *Col2a1*, який кодує однойменний колаген; *Comp*, який кодує олігомерний матриксний протеїн хряща, та *Acan*, що кодує агрекан. За умов проведених експериментальних досліджень виявлено, що ОА супроводжувався зниженням рівня експресії структурних генів *Col2a1*, *Acan* та *Comp* у хрящі колінного суглоба щурів. Отримані результати щодо зниження експресії генів *Col21a*, *Comp* та *Acan* у хрящовій тканині колінного суглоба щурів з експериментальним ОА на тлі зростання концентрації COMP, ACAN, CH3L1 та CTSK можуть свідчити про розвиток патологічних деструктивних процесів у хрящі, які пов'язані з порушенням метаболізму колагену та заміщенням хрящової тканини на фіброзну. Застосування ХС і ПБ у тварин з патологією суглобів у певній мірі відновлювало експресію структурних генів та сприяло активації анаболічних процесів при ремоделюванні хряща.

Під дією «механічного стресу» (травми, перенавантаження, метаболічні зміни організму) виникає хронічне запалення, пошкодження та патологічне ремоделювання тканин суглоба. В ці процеси залучені як

високоспеціалізовані клітини (хондроцити, остеоцити, синовіальні фібробласти), так і елементи позаклітинного матриксу, які за таких умов змінюють свою метаболічну активність і починають виробляти значну кількість цитокінів, хемокінів та факторів росту [360, 558]. Рівень цитокінів, які є ендogenousними медіаторами, що регулюють інтенсивність і тривалість імунозапальної відповіді, є інформативним показником патогенетичних змін та ступеню запалення в організмі в умовах ОА. Серед цитокінів, які беруть участь у метаболізмі хряща, виділяють катаболічні прозапальні цитокіни та анаболічні цитокіни та фактори росту. Прозапальні цитокіни, зокрема ІЛ-1 β та ФНП- α , виконують ключову роль у розвитку імунного запалення за умов ОА, оскільки виявляють ряд біологічних ефектів: стимулюють синтез ІЛ-6 та ІЛ-8, активують ММП, знижують синтез колагену II і IX типів, активують ЦОГ-2 у фібробласт-подібних синовіоцитах і хондроцитах, яка індукує синтез запальних медіаторів простагландинів; стимулюють вироблення кисневих радикалів, оксиду азоту, що зумовлює прогресування катаболічних процесів у хрящі [362, 363, 365]. Визначення цитокінового профілю є важливим діагностичним інструментом, що дозволяє визначити імунобіохімічні порушення на місцевому та системному рівнях, оцінити функціональну активність різних типів імункомпетентних клітин, динаміку імунопатологічного процесу, важкість запального процесу, що корелює з клінічним перебігом захворювання [559, 560].

Нами показано, що за умов експериментального ОА зростає вміст катаболічних медіаторів запалення ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-8, ІФН- γ , як у сироватці крові, так і хрящовій тканині щурів, знижувався вміст анаболічних показників цитокінового профілю ІЛ-4, ІЛ-10 та ІФР-1, які мають супресивний модулюючий ефект на катаболічні цитокіни, при цьому спостерігалось підвищення вмісту ТФР- β відносно контрольних тварин, що могло бути пов'язано з катаболічними ефектами ТФР- β у суглобовому матриксі. Зростання вмісту прозапальних катаболічних цитокінів та зниження вмісту анаболічних протизапальних у сироватці крові та хрящовій

тканині суглоба щурів з експериментальним ОА може свідчити про розвиток запалення, активацію лімфоцитів, проліферацію фібробластів, а також запуск компенсаторних механізмів, оскільки цитокіни здатні регулювати захисні реакції організму, як на системному, так і на місцевому рівнях. Крім того, в умовах експериментального ОА зростала концентрація ПГЕ₂ у сироватці крові та експресія прозапальних генів *Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1* у хрящовій тканині та крові щурів.

Введення ХС і ПБ мало сприятливий ефект, найбільш виражений при їх сумісному застосуванні, що виявлявся у наближенні до нормалізації вмісту катаболічних та анаболічних цитокінів у сироватці крові та хрящі, зменшенні концентрації ПГЕ₂ та пригніченні експресії прозапальних генів, що кодують ЦОГ-2, іNOS та ТФР-β, у сироватці крові, як наслідок, зменшуючи інтенсивність запалення в організмі, та, пригнічуючи деструктивні процеси в тканинах суглоба. Частковий модулюючий вплив введення ХС і ПБ може бути пов'язаний з антизапальними та регенераційними властивостями даних сполук, зокрема ХС, який може активувати анаболічні процеси за рахунок стимуляції синтезу ПГ і колагену, а також інгібування синтезу ферментів деструкції хряща та інших факторів запалення [36, 37, 405].

Провідну роль у виникненні та прогресуванні ОА відіграє інтенсифікація реакцій вільнорадикального окиснення, що призводить до структурних та функціональних змін у хондроцитах і позаклітинному матриксі, запальних і дегенеративних змін хряща й оточуючих тканин [449, 450]. Встановлено, що при експериментальному ОА у сироватці крові та хрящовій тканині щурів розвивався ОС, що характеризувався зростанням вмісту АФК (супероксидного радикалу та пероксиду водню), продуктів ПОЛ (ДК, ТБК-активних продуктів та ШО) та ОМБ (альдо- та кетопохідних продуктів нейтрального та основного характеру), відбувалися зміни активності антиоксидантних ензимів (СОД та КАТ), спостерігалось виснаження глутатіонової системи. Застосування ХС і ПБ тваринам з експериментальною патологією відновлювало порушену окисно-

антиоксидантну рівновагу як у суглобі (місцево), так і в крові, на системному рівні, сприяючи пригніченню утворення кисневих радикалів, зниженню інтенсивності процесів ліпідної і білкової пероксидації, нормалізації ферментативної та неферментативної ланок антиоксидантної системи. Даний ефект сприяв зміщенню метаболічної рівноваги в бік активації анаболічних процесів ремоделювання хрящової тканини за експериментального ОА.

Регуляція синтезу та деградації суглобового хряща здійснюється комплексом гуморальних механізмів, із залученням складних шляхів сигнальної трансдукції, які активуються різноманітними біологічно активними молекулами. Хондроцити реалізують свій катаболічний вплив на хрящ шляхом активації Toll-подібних рецепторів TLR-2 та TLR-4, в тому числі патернами мікробного походження. Приєднання Toll-подібними рецепторами адаптерних молекул, приводить до запуску внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, результатом яких стає активація ряду транскрипційних факторів, зокрема NF-κB. Сигнальний шлях за участі NF-κB є важливою ланкою запальної відповіді хондроцитів, через посилення транскрипції прозапальних цитокінів, активності ЦОГ-2 та iNOS із подальшою продукцією ПГЕ₂ і NO, активацією ММП, що має наслідком прогресуюче пошкодження екстрацелюлярного матриксу та деструкцію хряща, а також відіграє ключову роль у патогенезі ОА [506, 507, 508].

З метою оцінки прозапальних змін та ланок, які здатні ініціювати запуск імунної відповіді та катаболічного каскаду в тканинах суглоба при експериментальному ОА та за умов введення ХС і ПБ, проведено ІГХ дослідження експресії TLR-2, TLR-4 та NF-κB. При ІГХ аналізі тканин суглобів тварин контрольної групи та груп щурів, які отримували ХС і ПБ за відсутності експериментальної патології, встановлено відсутність експресії TLR-2, TLR-4 та NF-κB. Деструктивні зміни, ознаки загибелі хондроцитів та деградації матриксу в щурів з експериментальним ОА були асоційовані з виразною активацією експресії всіх оцінюваних біомаркерів: TLR-2, TLR-4 та NF-κB. При визначенні експресії Toll-подібних рецепторів у хрящі та

клітинах субхондральної кістки було показано позитивну експресію TLR-2 та TLR-4 у хондроцитах у межах усіх зон, окрім окремих хондроцитів глибокої зони з дистрофічними змінами. Реакція на експресію TLR-2 була найбільш вираженою у клітинах поверхневих шарів у ділянках деструктивних змін. При аналізі експресії NF-κB було визначено наявність імунопозитивних клітин як у межах суглобового хряща, так і в субхондральній кістці. У хрящі експресія NF-κB визначалася у більшості клітин зі збереженою структурою. Крім того, розвиток експериментального ОА супроводжувався підвищенням рівня експресії генів *Tlr2*, *Tlr4* та *Nfkb1* у хрящовій тканині, що могло свідчити про їх суттєву роль у активації катаболічних і запальних процесів у суглобі та залучення хондроцитів до імунної відповіді.

Введення ХС і ПБ тваринам з експериментальним ОА супроводжувалося зниженням ІГХ експресії TLR-2, TLR-4 та NF-κB у хондроцитах хряща, порівняно з тваринами групи ОА. За умов комбінованого введення ХС і ПБ у хрящі тварин з експериментальним ОА спостерігалися найбільш виражені зміни експресії досліджуваних показників: зафіксовано відсутність експресії TLR-2 та TLR-4 та значне зниження експресії NF-κB, відносно тварин з експериментальною патологією.

Зміни рівня експресії Toll-подібних рецепторів TLR-2 та TLR-4 у хрящі за умов експериментальної патології та при введенні ХС і ПБ корелювали зі встановленими змінами вмісту їх розчинних форм у сироватці крові, які вважаються ендogenousними негативними регуляторами передачі ліганд-індукованого сигналу TLR-2 та TLR-4 [515], що могло свідчити не лише про асоціацію розвитку патологічного процесу з індуцибельною надекспресією паттерн-розпізнавальних рецепторів у хрящовій тканині, а й бути наслідком їх шедінгу.

На основі даних експериментальних досліджень нами запропонована узагальнююча концептуальна схема біохімічних механізмів ремоделювання хрящової тканини за умов експериментального ОА при введенні ХС та ПБ (рис. 9.1).

БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ РЕМОДЕЛЮВАННЯ ХРЯЦОВОЇ ТКАНИНИ

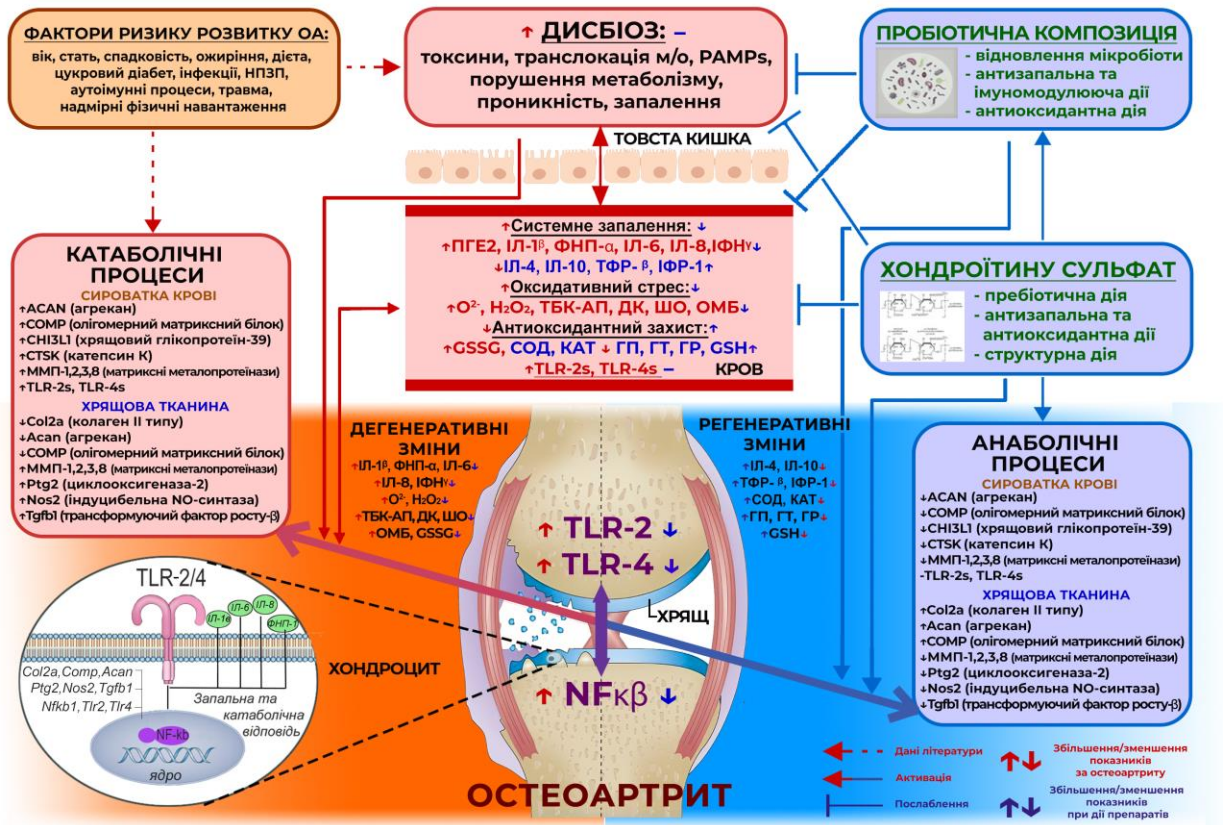


Рис. 9.1 Узагальнююча схема біохімічних механізмів ремоделювання хрящової тканини за експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика

При розвитку патології імунна система реагує на механічні, фізіологічні та біологічні зміни в суглобі. При цьому вроджений імунітет є основним фактором, який сприяє запальному процесу за ОА: відіграє важливу роль не тільки в захисті організму від патогенних мікроорганізмів, а також і в регуляції тканинного гомеостазу шляхом розпізнавання за допомогою Толл-подібних рецепторів різних молекулярних структур, асоційованих з патогенами (PAMP) та пов'язаних з пошкодженням DAMP. Розпізнавання лігандів PAMP/DAMP-TLR призводить до запуску сигнальних каскадів, які викликають активацію клітин. Зокрема, механічний стрес призводить до вивільнення молекулярних патернів з позаклітинного матриксу у порожнину суглоба, які стимулюють синтез та вивільнення синовіальними клітинами (макрофагами та фібробластами) запальних медіаторів (цитокінів,

хемокінів, ліпідних медіаторів, а також самих DAMP) [561, 562]. Ці медіатори, у свою чергу, активують хондроцити та стимулюють продукцію протеолітичних ферментів ММП та агреканаз, які викликають деградацію агрекану і колагену, що є ключовим у пошкодженні суглобового хряща за ОА. Розщеплення та деградація молекулярних компонентів хрящового матриксу порушує структуру залишкових надмолекулярних білків, які надають хрящовій тканині унікальних властивостей для забезпечення функціонування суглоба. В умовах запалення катаболічні події недостатньо врівноважуються анаболічними, враховуючи порушений синтез молекул матриксу хряща, зокрема, колагену II типу та агрегану [563], такий постійний дисбаланс призводить до відсутності компенсації пошкодження хрящового матриксу, та подальшого його руйнування. Хондроцити не тільки відіграють роль у катаболічних процесах матриксу, також вони активно регулюють анаболізм матриксу [564]. У здоровому хрящі хондроцити синтезують молекули екстрацелюлярного матриксу для заміщення пошкоджених молекул, однак за ОА, їх анаболічна активність порушена та обмежена. Результати, представлені у дисертаційній роботі свідчать про зміщення метаболічної рівноваги в бік активації катаболічних процесів, зі збільшенням концентрації біохімічних маркерів метаболізму хряща, вмісту прозапальних медіаторів і ММП, розвитку ОС та деструкцією хряща в умовах експериментального ОА.

Виявлено, що ХС і ПБ виявляли протизапальну, антиоксидантну та регенеруючу дію шляхом як нормалізації кишкової мікробіоти, так і активації анаболічних процесів у хрящовій тканині за умов експериментального ОА, що могло свідчити про участь кишкової мікробіоти в біохімічних механізмах ремоделювання хрящової тканини, ймовірно, через залучення в регуляцію TLR-2/4-опосередкованим запальним шляхом NF-κB. Слід відмітити, що значна кількість лігандів TLR характерні не тільки для патогенних мікроорганізмів, а й для умовно-патогенних бактерій та інших представників нормальної мікробіоти [514]. Розпізнавання коменсальної мікробіоти Toll-подібними рецепторами відбувається й за фізіологічних

умов, яке є необхідним для підтримання кишкового гомеостазу.

Таким чином, мікробіота товстої кишки суттєво впливає на фізіологічний стан і розвиток патології в організмі, завдяки діяльності мікробіому та продуктів його метаболізму, зокрема й за розвитку ОА, який характеризується руйнуванням суглобового хряща, активацією катаболічних процесів, локальним/системним запаленням і порушенням оксидантно-антиоксидантної рівноваги (рис. 9.1).

Позитивний ефект ХС на прозапальний сигнальний шлях за участю Toll-подібних рецепторів у тканинах суглоба може бути пов'язаний з тим, що ХС, зв'язуючись з білками-рецепторами CD44, TLR-4 та ICAM1 на поверхні хондроцитів, може знижувати транскрипцію ядерного фактора NF-κB та блокувати прозапальні сигнальні шляхи за участю білків ADAMTS, MMP, IL-1β [509, 510]. Також ХС може взаємодіяти з цитозольним адапторним білком MyD88, який є ключовою ланкою у передачі сигналу від Toll-подібних рецепторів та є необхідним для стимуляції синтезу цитокінів; та рецептором ФНП-α на поверхні лімфоцитів [511]. Екзогенний ХС, взаємодіючи з Toll-подібними рецепторами, може блокувати активацію ендогенних глікозаміногліканів (зокрема, біглікану – дволанцюгової молекули, що включає фрагменти ХС), які регулюють імунну відповідь [510].

Хоча різні фактори ризику розвитку ОА запропоновано етіологічними для патогенезу ОА, основні зв'язки між ними та перебігом ОА все ще залишаються невідомими [51, 565]. Сучасні уявлення щодо впливу мікробіоти ШКТ на розвиток ОА та отримані нами експериментальні дані дають підстави стверджувати, що дисбіоз може бути одним із основних об'єднуючих механізмів всіх етіологічних факторів, які задіяні в патогенез ОА. Експериментальне обґрунтування біологічної дії ХС і ПБ на стан мікробіоти кишечника та хрящовий метаболізм за умов розвитку ОА завдяки здатності впливати на TLR-2/4-опосередкований NF-κB запальний шлях відкриває перспективи їх сумісного використання в якості засобів додаткової комплексної терапії та профілактики патології суглобів різного генезу.

ВИСНОВКИ

Результати, представлені у дисертаційній роботі, розширюють уявлення щодо ролі кишкової мікробіоти в біохімічних механізмах ремоделювання хрящової тканини за умов експериментального остеоартриту, зокрема через залучення в регуляцію TLR-2/4-опосередкованим запальним шляхом NF-κB, який активує катаболічні процеси, зі збільшенням концентрації прозапальних медіаторів і металопротеїназ, а також призводить до оксидативного стресу і деструкції хряща. Виявлено, що хондроїтину сульфат і пробіотик проявляють протизапальну, антиоксидантну та регенеруючу дію шляхом як нормалізації кишкової мікробіоти, так і активації анаболічних процесів у хрящовій тканині за умов моноіодацетат-індукованого остеоартриту в щурів.

1. Виявлено, що при експериментальному остеоартриті виникає дисбіотичний стан в товстій кишці, про що свідчить зниження кількості *Lactobacillus* в 1,3 раза та підвищення кількості *Clostridium spp.*, умовно-патогенних ентеробактерій, лактозонегативної *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.* та дріжджоподібних грибів роду *Candida* в 1,9; 8; 1,9; 1,5; 1,4 та 1,7 раза відповідно, порівняно з контролем. Введення хондроїтину сульфату та пробіотичної композиції сприяло відновленню мікробіоти кишечника за умов розвитку експериментального остеоартриту.

2. У ході гістологічних досліджень колінних суглобів щурів з експериментальним остеоартритом встановлено ознаки запалення із помірною лейкоцитарною інфільтрацією, гіперпластичні та деструктивно-дистрофічні зміни у хрящовій та субхондральній кістковій тканинах. Введення хондроїтину сульфату та пробіотика сприяло відновленню стану та запобігало дегенеративним змінам суглобових тканин щурів із експериментальним остеоартритом.

3. Показано зростання концентрації ключових біохімічних маркерів метаболізму хрящової тканини: олігомерного матричного білка хряща (COMP), агрекану (ACAN), катепсину К (CTSK), хрящового глікопротеїну-39 (CHI3L1) у сироватці крові та збільшення вмісту матричних металопротеїназ (ММП-1,2,3,8) у сироватці крові та хрящовій тканині, а також зменшення рівня експресії генів основних компонентів хрящового матриксу (*Col2a1*, *Acan*, *Comp*) за експериментального остеоартриту. Введення хондроїтину сульфату та пробіотика тваринам з експериментальним остеоартритом значимо сприяло відновленню досліджуваних показників метаболізму хрящової тканини щурів, наближаючи їх до значень у тварин контрольної групи.

4. Встановлено, що за умов експериментального остеоартриту в сироватці крові та хрящовій тканині колінного суглоба щурів зростав вміст прозапальних (катаболічних) цитокінів ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-8, ІФН- γ та ТФР- β , збільшувались концентрація простагландину E₂ та рівні експресії генів, залучених до розвитку запалення (*Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*), при одночасному зниженні вмісту анаболічних цитокінів ІЛ-4, ІЛ-10 та ІФР-1. Комбіноване введення хондроїтину сульфату та пробіотика найбільш виражено сприяло зниженню запальних (катаболічних) та відновленню вмісту протизапальних (анаболічних) медіаторів у сироватці крові та хрящовій тканині щурів за умов розвитку експериментального остеоартриту.

5. Показано інтенсифікацію вільнорадикальних процесів (зростання вмісту супероксидного радикалу, перекису водню, продуктів перекисного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків) у хрящовій тканині та сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту, порівняно з показниками контрольної групи тварин. Введення як хондроїтину сульфату, так і пробіотика тваринам з експериментальним остеоартритом призводило до часткового відновлення досліджуваних показників вільнорадикального окиснення.

6. Виявлено порушення антиоксидантної системи в хрящовій тканині та в сироватці крові щурів при експериментальному остеоартриті: в хрящовій тканині зростали супероксиддисмутазна та каталазна активності на фоні збільшення вмісту окисненої та зниження – відновленої форм глутатіону, а також виснаження глутатіон-залежної ферментативної ланки антиоксидантного захисту; в сироватці крові знижувалася супероксиддисмутазна активність та зростала каталазна активність на фоні зростання вмісту окисненої та зниження – відновленої форм глутатіону, а також пригнічення глутатіон-залежної ферментативної активності. Комбіноване введення хондроїтину сульфату та пробіотика тваринам з експериментальним остеоартритом більш виражено, порівняно з окремим введенням, відновлювало порушений антиоксидантний гомеостаз як у суглобі, так і в крові.

7. Ремоделювання хрящової тканини за умов експериментального остеоартриту регулюється TLR-2/4-опосередкованим запальним шляхом NF-κB. Показано позитивну імуногістохімічну експресію Toll-подібних рецепторів -2, -4, транскрипційного фактору NF-κB в хондроцитах у межах всіх зон хрящової тканини та збільшення рівнів експресії генів *Tlr2*, *Tlr4*, *Nfkb1* в хрящах колінного суглоба щурів, а також виявлено зростання вмісту розчинних форм TLR-2 і TLR-4 в сироватці крові за експериментального остеоартриту. При введенні хондроїтину сульфату та пробіотика за експериментального остеоартриту спостерігались значне зниження експресії TLR-2, TLR-4, NF-κB в хрящовій тканині та відсутність розчинних форм TLR-2 і TLR-4 у сироватці крові.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Favazzo LJ, Hendesia H, Villania DA. The gut microbiome-joint connection: implications in osteoarthritis. *Cur Opin Rheumatol*. 2020;32(1):92-101.
2. Boer CG, Radjabzadeh D, Medina-Gomez C, Garmaeva S, Schiphof D. et al. Intestinal microbiome composition and its relation to joint pain and inflammation. *Nat Commun*. 2019;10:4881.
3. Sánchez Romero EA, Oliva EM, Pérez JLA, Pérez SM, Turroni S, Marchese L, Villafañe JH. Relationship between the gut microbiome and osteoarthritis pain: review of the literature. *Nutrients*. 2021;13(3):716.
4. Ghouri A, Conaghan PG. Update on novel pharmacological therapies for osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2019;11:1759720X19864492.
5. Bishnoi M, Jain A, Hurkat P, Jain SK. Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis. *Glycoconj J*. 2016;33(5):693-705.
6. Lila A, Gromova OA, Torshin IY, Montell E. Molecular effects of chondroitin sulfate in osteoarthritis and herniated discs. *J Rheumatol Arthritic Dis*. 2018;3(2):1-11.
7. Li Y, Luo W, Deng Z, Lei G. Diet-intestinal microbiota axis in osteoarthritis: a possible role. *Mediat Inflamm*. 2016;349517:4.
8. Wells PM, Adebayo AS, Bowyer RCE, Freidin MB, Finckh A, et al. Associations between gut microbiota and genetic risk for rheumatoid arthritis in the absence of disease: a cross-sectional study. *Lancet Rheumatol*. 2020;2(7):e418-e427.
9. Hao X, Shang X, Liu J, Chi R, Zhang J, Xu T. The gut microbiota in osteoarthritis: where do we stand and what can we do? *Arthritis Res Ther*. 2021;23(1):42.
10. ЯНКОВСЬКИЙ ДС, ШИРОБОКОВ ВП, ДИМЕНТ ГС. Інноваційні технології оздоровлення мікробіому людини. *Наука innov*. 2018;14(6):5-17.

11. Xu H, Liu M, Cao J, Li X, Fan D, Xia Y, Lu X, Li J, Ju D, Zhao H. The dynamic interplay between the gut microbiota and autoimmune diseases. *J Immunol Res.* 2019;27;2019:7546047.
12. Briggs AM, Cross MJ, Hoy DG, Sanchez-Riera L, Blyth FM, Woolf AD, March L. Musculoskeletal health conditions represent a global threat to healthy aging: a report for the 2015 World Health Organization world report on ageing and health. *Gerontologist.* 2016;56(2):S243-255.
13. Бур'янов ОА, Скляренко ЄТ, Волошин ОІ, Кваша ВП, Задніченко МО. Лекція для студентів медичних та медико-психологічних факультетів вищих медичних навчальних закладів України та тему: “Дегенеративно-дистрофічні захворювання суглобів”. *Літопис травматології та ортопедії.* 2013;1-2:25-26.
14. CDC National Center for Health Statistics. International Classification of Diseases, Tenth Revision, Clinical Modification (ICD-10-CM) 2017; <https://www.cdc.gov/nchs/icd/icd10cm.htm>.
15. Hall AJ, Stubbs B, Mamas MA, Myint PK, Smith TO. Association between osteoarthritis and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol.* 2016;23(9):938-946.
16. Schott EM, Farnsworth CW, Grier A, Lillis JA, Soniwala S, et al. Targeting the gut microbiome to treat the osteoarthritis of obesity. *JCI Insight.* 2018;3(8):95997.
17. Courties A, Sellam J. Osteoarthritis and type 2 diabetes mellitus: What are the links? *Diabetes Res Clin Practice.* 2016;122:198-206.
18. Wysocka-Skurska I, Sierakowska M, Kułak W. Evaluation of quality of life in chronic, progressing rheumatic diseases based on the example of osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Clin Interv Aging.* 2016;11:1741-1750.
19. Bortoluzzi A, Furini F, Scirè CA. Osteoarthritis and its management - Epidemiology, nutritional aspects and environmental factors. *Autoimmunity Rev.* 2018;17(11):1097-1104.

20. Magnusson K, Turkiewicz A, Englund M. Nature vs nurture in knee osteoarthritis – the importance of age, sex and body mass index. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019;27(4):586-592.
21. Ashkavand Z, Malekinejad H, Vishwanath BS. The pathophysiology of osteoarthritis. *J Pharm Res*. 2013;7:132-138.
22. Остапченко ЛІ, Дворщенко КО, Короткий ОГ, Фалалєєва ТМ, Кот ЛІ, Драницина АС. Методичні рекомендації «Використання хондропротекторів та мультипробіотиків для корекції патології суглобів». К: ТОВ «Kh&Sh НМ», 2020. 30с.
23. Akhondi H, Gupta N. Polyarticular Arthritis. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [Internet]; 2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537170/>.
24. Rider SM, Mizuno S, Kang JD. Molecular mechanisms of intervertebral disc degeneration. *Spine Surgery Related Res*. 2018;3(1):1-11.
25. Mathiessen A, Slatkowsky-Christensen B, Kvien TK, Haugen IK, Berner Hammer H. Ultrasound-detected osteophytes predict the development of radiographic and clinical features of hand osteoarthritis in the same finger joints 5 years later. *RMD Open*. 2017;3(2):e000505.
26. Aspden RM, Saunders FR Osteoarthritis as an organ disease: from the cradle to the grave. *Eur Cell Mater*. 2019;37:74-87. doi: 10.22203/eCM.v037a06.
27. Findlay DM, Kuliwaba JS. Bone-cartilage crosstalk: a conversation for understanding osteoarthritis. *Bone Res*. 2016;4:16028.
28. Findlay DM. Vascular pathology and osteoarthritis. *Rheumatol*. 2007;46(12):1763-1768.
29. Schaible H-G. Mechanisms of chronic pain in osteoarthritis. *Cur Rheumatol Reports*. 2012;14(6):549-556.
30. Курята ОВ, Нода ОЮ, Лисунець ТК. Особливості хронічного больового синдрому при запальних захворюваннях суглобів та ефективність контролю болю на тлі корекції тривожно-депресивних розладів. *Укр Ревматол Журн*. 2017;2(68):52-57.

31. Гуменюк МЯ. Підвищення ефективності лікування хворих на остеоартроз у поєднанні з абдомінальним ожирінням на підставі вивчення їх патогенетичних ланок розвитку та обґрунтування фармакологічної корекції. Дис. на здоб. наук. ступ. к.м.н. Івано-Франківськ. 2017:147.
32. Eitner A, Hofmann GO, Schaible H-G. Mechanisms of osteoarthritic pain. Studies in humans and experimental models| *frontiers in molecular neuroscience*. 2017;10:349.
33. Chen D, Shen J, Zhao W, Wang T, Han L, Hamilton JL, Im H-J. Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone Res*. 2017;5:16044.
34. Castañeda S, Vicente EF. Osteoarthritis: more than cartilage degeneration. *Clinic Rev Bone Miner Metab*. 2017;15:69-81.
35. Grässel S, Muschter D. Recent advances in the treatment of osteoarthritis. *F1000Res*. 2020;9:F1000 Faculty Rev-325.
36. Dong TS, Gupta A. Influence of early life, diet, and the environment on the microbiome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(2):231-242.
37. John GK, Mullin GE. The gut microbiome and obesity. *Cur Oncol Rep*. 2016;7:45.
38. Bose M, Mukherjee P. Role of microbiome in modulating immune responses in cancer. *Mediat Inflamm*. 2019:4107917.
39. Barko PC, McMichael MA, Swanson KS, Williams DA. The gastrointestinal microbiome: A review. *J Veter Intern Med*. 2018;32(1):9-25.
40. Старовойтова СО, Горчаков ВЮ. Пробиотики – промотори життя XXI століття. *Наук вісті НТУУ "КПІ"*. 2006;2:104-114.
41. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015;21(29):8787-8803.
42. Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*. 2018;361:k2179.

43. Старовойтова СО. Вивчення факторів, які впливають на спектрально динамічні характеристики молочнокислих бактерій. *Наук вісті НТУУ "КПІ"*. 2006;4:145-149.
44. Bravo-Blas A, Wessel H, Milling S. Microbiota and arthritis: correlations or cause? *Cur Opin Rheumat*. 2016;28(2):161-167.
45. Zhong D, Wu C, Zeng X, Wang Q. The role of gut microbiota in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Clin Rheumatol*. 2018;37(1):25-34.
46. Maeda Y, Takeda K. Role of gut microbiota in rheumatoid arthritis. *J Clin Med*. 2017;6(6):E60.
47. Behera J, Ison J, Tyagi SC, Tyagi N. The role of gut microbiota in bone homeostasis. *Bone*. 2020;135:115317.
48. Hernandez CJ, Guss JD, Luna M, Goldring SR. Links between the microbiome and bone. *J Bone Mineral Res*. 2016;31(9):1638-1646.
49. Levy M, Thaiss CA, Zeevi D, Dohnalová L, et al. Microbiota-modulated metabolites shape the intestinal microenvironment by regulating NLRP6 inflammasome signaling. *Cell*. 2015;163(6):1428-43.
50. Hand TW, Vujkovic-Cvijin I, Ridaura VK, Belkaid Y. Linking the microbiota, chronic disease, and the immune system. *Trends Endocrinol Metab*. 2016;27(12):831-843.
51. Liu Y, Ding W, Wang HL, et al. Gut microbiota and obesity-associated osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2019;9:1257-1265.
52. Lorenz W, Buhrmann C, Mobasher A, Lueders C, Shakibaei M. Bacterial lipopolysaccharides form procollagen-endotoxin complexes that trigger cartilage inflammation and degeneration: implications for the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(5):R111.
53. Moritake A, Kawao N, Okada K., et al. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency enhances subchondral osteopenia after induction of osteoarthritis in mice. *BMC Musculoskelet Disord*. 2017;18:392.

54. Hu F, Li Y, Zheng L, Shi L, et al. Toll-like receptors expressed by synovial fibroblasts perpetuate Th1 and th17 cell responses in rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2014;9(6):e100266.
55. Губська ОЮ, Кузьмінець АА, Гуцул ВМ, Лавренчук ІО. Кишковий мікробіом й остеоартрит. *Gastroenterol*. 2019;53(2):132-137.
56. Huang ZY, Stabler T, Pei FX, Kraus VB. Both systemic and local lipopolysaccharide (LPS) burden are associated with knee OA severity and inflammation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(10):1769-1775.
57. Picchianti-Diamanti A, Rosado MM, D'Amelio R. Infectious agents and inflammation: the role of microbiota in autoimmune arthritis. *Frontiers in Microbiol*. 2018;8:2696.
58. Zhong D, Wu C, Zeng X, Wang Q. The role of gut microbiota in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Clin Rheumatol*. 2018;37(1):25-34.
59. Sakkas LI, Bogdanos DP. Multiple hit infection and autoimmunity: the dysbiotic microbiota–ACPA connection in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2018;30(4):403-409.
60. Alipour B, Homayouni-Rad A, Vaghef-Mehrabany E, et al. Effects of *Lactobacillus casei* supplementation on disease activity and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: a randomized double-blind clinical trial. *Intern J Rheumatic Dis*. 2014;17(5):519-527.
61. Korotkyi OH, Luhovska TV, Serhiychuk TM, Dvorshchenko KO, Falalyeyeva TM, Ostapchenko LI. The gut microbiota of rats under experimental osteoarthritis and administration of chondroitin sulfate and probiotic. *Mikrobiol Z*. 2020;82(6):64-73.
62. Korotkyi O, Huet A, Dvorshchenko K, Kobylak N, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Probiotic composition and chondroitin sulfate regulate TLR-2/4-mediated NF- κ B inflammatory pathway and cartilage metabolism in experimental osteoarthritis. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2021. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09735-7>.

63. Kijowski R, Demehri S, Roemer F, Guermaz A. Osteoarthritis year in review 2019: imaging. *Osteoarthritis Cartilage*. 2020;28(3):285-295.
64. Ng HY, Alvin Lee KX, Shen YF. Articular cartilage: structure, composition, injuries and repair. *JSM Bone Joint Dis*. 2017;1(2):1010.
65. Akkiraju H, Nohe A. Role of chondrocytes in cartilage formation, progression of osteoarthritis and cartilage regeneration. *J Develop Biol*. 2015;3(4):177-192.
66. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008;22(2):351-84.
67. Kim H, Kang D, Cho Y, Kim J-H. Epigenetic regulation of chondrocyte catabolism and anabolism in osteoarthritis. *Molecules and Cells*. 2015;38(8):677-684.
68. Pomin VH, Mulloy B. Glycosaminoglycans and proteoglycans. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2018;11(1):27.
69. Luo Y, Sinkeviciute D, He Y, Karsdal M, Henrotin Y, Mobasher A, Önnerrfjord P, Bay-Jensen A. The minor collagens in articular cartilage. *Protein Cell*. 2017;8:560-572.
70. Mehana E-SE, Khafaga AF, El-Blehi SS. The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: an updated review. *Life Sci*. 2019;234:116786.
71. Yamamoto K, Wilkinson D, Bou-Gharios G. Targeting dysregulation of metalloproteinase activity in osteoarthritis. *Calcif Tissue Int*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00223-020-00739-7>.
72. Liang HPH, Xu J, Xue M, Jackson CJ. Matrix metalloproteinases in bone development and pathology: current knowledge and potential clinical utility. *Metalloproteinases Med*. 2016;3:93-102.
73. Головач ИЮ. Остеоартрит: фундаментальные и прикладные аспекты этиопатогенеза заболевания. Ничего не стоит на месте. *Укр Ревматол Журн*. 2014;2:4-11.

74. Hu Q, Ecker M. Overview of MMP-13 as a promising target for the treatment of osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(4):1742.
75. Nummenmaa E, Hämäläinen M, Moilanen T, Vuolteenaho K, Moilanen E. Effects of FGF-2 and FGF receptor antagonists on MMP enzymes, aggrecan, and type II collagen in primary human OA chondrocytes. *Scand J Rheumatol.* 2015;44(4):321-30.
76. Scanzello CR. Role of low-grade inflammation in osteoarthritis. *Cur Opin Rheumatol.* 2017;29(1):79-85.
77. Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, et al. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Rev Rheumatol.* 2016;12(10):580-92.
78. Liao CR, Wang SN, et al. Advanced oxidation protein products increase TNF- α and IL-1 β expression in chondrocytes via NADPH oxidase 4 and accelerate cartilage degeneration in osteoarthritis progression. *Redox Biology.* 2019;28:101306.
79. Roman-Blas JA, Stokes DG, Jimenez SA. Modulation of TGF-beta signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15(12):1367-77.
80. Siebuhr AS, Bay-Jensen AC, Jordan JM, Kjelgaard-Petersen CF, Christiansen C, et al. Inflammation (or synovitis) - driven osteoarthritis: an opportunity for personalizing prognosis and treatment? *Scand J Rheumatol.* 2016;45(2):87-98.
81. Hamilton JA., Cook AD, Tak PP. Anti-colony-stimulating factor therapies for inflammatory and autoimmune diseases. *Nature Rev Drug Discovery.* 2017;16(1):53-70.
82. Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:561459.
83. Mathiessen A, Conaghan PG. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Res Ther* 2017;19:18.

84. Tu M, Yang M, Yu N, Zhen G, Wan M, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity in subchondral bone modifies a subtype of osteoarthritis. *Bone Research*. 2019;7:29.
85. Yang M, Chen Y, Ma J, Chen J, Wan S. Expression of COX-2 in different types of arthritis. *Int J Clin Experim Pathol*. 2016;9(6):6543-6548.
86. de Andrés MC, Maneiro E, Martín MA, Arenas J, Blanco FJ. Nitric oxide compounds have different effects profiles on human articular chondrocyte metabolism. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(5):R115.
87. Abramson SB, Attur M, Amin AR, Clancy R. Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Cur Rheumatol Reports*. 2001;3(6):535-41.
88. Zhuang C, Wang Y, Zhang Y, Xu N. Oxidative stress in osteoarthritis and antioxidant effect of polysaccharide from angelica sinensis. *Intern J Biol Macromol*. 2018;115:281-286.
89. Lepetsosa P, Papavassiliou AG. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta (BBA) – Mol Basis Dis*. 2016;1862(4):576-591.
90. Domingues RM, Domingues P, Melo T, Pérez-Sala D, Reis A, Spickett CM. Lipoxidation adducts with peptides and proteins: deleterious modifications or signaling mechanisms? *J Proteomics*. 2013;92:110-131.
91. Иманаева АЯ, Залялютдинова ЛН. Патогенетическое обоснование применения антиоксидантов в лечении ревматоидного артрита. *Совр Пробл науки и образования*. 2013;№2.
92. Yui N, Yudoht K, Fujiya H, Musha H. Mechanical and oxidative stress in osteoarthritis. *J Phys Fitness Sports Med*. 2016;5(1):81-86.
93. Kelly RA, Leedale J, Calleja D, Enoch SJ, Harrell A, Chadwick AE, Webb S. Modelling changes in glutathione homeostasis as a function of quinone redox metabolism. *Scientific Reports*. 2019;9(1):6333.

94. Кулинский ВИ, Колесниченко ЛС. Система глутатиона 1. Синтез, транспорт глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы. Биомед Химия. 2009;55(3):255-277.
95. Ryan LM, Cheung HS. The role of crystals in osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North America*. 1999;25:257-267.
96. Дедух НВ. Экспериментальное моделирование артроза, осложненного синовитом. Укр Мед Альманах. Луганськ. 2003;2:61-65.
97. Li MH, Xiao R, Li JB, Zhu Q. Regenerative approaches for cartilage repair in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2017;25:1577-1587.
98. Chubinskaya S, Hurtig M, Rueger DC. OP-1/BMP-7 in cartilage repair. *Intern Orthop*. 2007;31(6):773-781.
99. Loeser RF, Gandhi U, Long DL, Yin W, Chubinskaya S. Aging and oxidative stress reduce the response of human articular chondrocytes to insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(8):2201-9.
100. Mobasheri A, Bay-Jensen A-C, van Spil WE, Larkin J, Levesque MC. Osteoarthritis Year in Review 2016: biomarkers (biochemical markers). *Osteoarthritis and Cartilage*. 2017;25:199-208.
101. Kohn MD, Sassoon AA, Fernando ND. Classifications in Brief: Kellgren-Lawrence Classification of Osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 2016;474(8):1886-1893.
102. Laslett LL, Pelletier JP, Cicuttini FM, Jones G, Martel-Pelletier J. Measuring disease progression in osteoarthritis. *Curr Treat Options in Rheum*. 2016;2:97-110.
103. Hosnijeh FS, Runhaar J, van Meurs JBJ, Bierma-Zeinstra SM. Biomarkers for osteoarthritis: Can they be used for risk assessment? A systematic review. *Maturitas*. 2015;82(1):36-49.
104. Bauer DC, Hunter DJ, Abramson SB, Attur M, Corr M, et al. Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14:723-727.

105. Saberi Hosnijeh F, Bierma-Zeinstra SM, Bay-Jensen AC. Osteoarthritis year in review 2018: biomarkers (biochemical markers). *Osteoarthritis and Cartilage*. 2019;27:412e423.
106. Mabey T, Honsawek S. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis. *World J Orthop*. 2015;6(1):95-105.
107. Бондаренко СЄ, Леонтьєва ФС, Висоцький ОВ, та ін. Біохімічні маркери сироватки крові у хворих на різних стадіях остеоартрозу кульшового і колінного суглобів. *Укр Журн Мед Біол та спорту*. 2020;5(3):25.
108. Cooke ME, Lawless BM, Jones SW, Grover LM. Loss of proteoglycan content primes articular cartilage for mechanically induced damage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2018;26(1):S371.
109. Bertrand J, Held A. Role of Proteoglycans in Osteoarthritis. *Cartilage*. 2017;2:63-80.
110. Roughley PJ, Mort JS. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *J Experim Orthop*. 2014;1:8.
111. Wang Q, Yang Y-Y, Niu H-J, Zhang W-J, Feng Q-J, Chen W-F. An ultrasound study of altered hydration behaviour of proteoglycan-degraded articular cartilage. *BMC Musculoskeletal Dis*. 2013;14:289.
112. Pearle AD, Warren RF, Rodeo SA. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clin Sports Medicine*. 2005;24(1):1-12.
113. Charlier E, Deroyer C, Ciregia F, Malaise O, Neuville S, Plener Z, Malaise M, de Seny D. Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA). *Biochem Pharmacol*. 2019;165:49-65.
114. Eyre D. Articular cartilage and changes in arthritis: collagen of articular cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2001;4-30.
115. Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research*. 2001;3(2):107-113.
116. Mort JS, Beaudry F, et al. Early cathepsin K degradation of type II collagen in vitro and in vivo in articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2016;24:1461-1469.

117. Lorenzo P, Bayliss MT, Heinegård D. Altered patterns and synthesis of extracellular matrix macromolecules in early osteoarthritis. *Matrix Biology*. 2004;23(6):381-391.
118. Nguyen LT, Sharma AR, Chakraborty, SaibabaB, Ahn M-E, Lee S-S. Review of prospects of biological fluid c biomarkers in osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3):601.
119. Duan Y, Hao D, Li M, Wu Z, Li D, Yang X, Qiu G. Increased synovial fluid visfatin is positively linked to cartilage degradation biomarkers in osteoarthritis. *Rheumatol Int*. 2012;32:985-990.
120. Munjal A, Bapat S, Hubbard D, Hunter M, Kolhe R, Fulzele S. Advances in molecular biomarker for early diagnosis of osteoarthritis. *Biomol Concepts*. 2019;10(1):111-119.
121. Henrotin Y, Sanchez C, Bay-Jensen AC, Mobasher A. Osteoarthritis biomarkers derived from cartilage extracellular matrix: current status and future perspectives. *Annals Phys Rehabil Med*. 2016;59(3):145-148.
122. Acharya C, Yik JHN, Kishore A, Dinh VV, Cesare PEDi, Haudenschild DR. Cartilage oligomeric matrix protein and its binding partners in the cartilage extracellular matrix: Interaction, regulation and role in chondrogenesis. *Matrix Biology*. 2014;37:102-111.
123. Lac P, Racapé M, Barra L, Bell DA, Cairns E. Relatedness of antibodies to peptides containing homocitrulline or citrulline in patients with Rheumatoid Arthritis *J Rheumatol*. 2018;45(3):302-309.
124. Kirkham GR, Cartmell SH. Genes and proteins involved in the regulation of osteogenesis. *Topics in Tissue Engineering*. 2007;3:1-22.
125. Maruotti N, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast role in osteoarthritis pathogenesis. *J Cel Physiol*. 2017;232(11):2957-2963.
126. Legrand C, Ahmed U, Anwar A, Rajpoot K, Pasha S, et al. Glycation marker glucosepane increases with the progression of osteoarthritis and correlates with morphological and functional changes of cartilage in vivo. *Arthritis Res. Ther*. 2018;20(1):131.

127. Pérez Vertti RDA, Argüello Astorga JR, Morán-Martínez J, García-Marín AY, Guzmán DD, Aguilar Muñiz LS, Gonzalez-Galarza FF, et al. Biochemical markers in osteoarthritis. *Intern J Bone Rheumatol Res*. 2015;2(2):11-17.
128. Sokolov J, Lepus CM. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Therapeutic Adv Musculoskel Dis*. 2013;5(2):77-94.
129. Monemdjou R, Fahmi H, Kapoor M. Synovium in the pathophysiology of osteoarthritis. *Therapy*. 2010;7(6):661-668.
130. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenetic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature Rev Rheumatol*. 2016;12:49-62.
131. Stannus O, Jones G, Cicuttini F, Parameswaran V, Quinn S, Burgess J, Ding C. Circulating levels of IL-6 and TNF-alpha are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18:1441-1447.
132. Артеменко НА, Чвамания МО. Клинические и лабораторные особенности различных форм остеоартроза. *Клин мед*. 2009;2:45-50.
133. Шевченко НС, Лебець ИС, Нелина ИН, Кашкалда ДА., Матвиенко ЕВ, Летяго АВ. Патологическая значимость воспаления при остеоартрозе у подростков с инициальными стадиями заболевания. *Укр Ревматол Журн*. 2010;1:62-64.
134. Сміян СІ, Масик ОМ, Слаба УС. Синдром ендогенної інтоксикації як маркер запального процесу при ревматичних захворюваннях суглобів. *Вісник Наук Досл*. 2000;1:40-42.
135. Корпан МІ, Бур'янов ОА, Чекман ІС. Застосування тіотріазоліну для корекції порушень окислювального гомеостазу при експериментальному остеоартрозі. *Запорожский мед журн*. 2010;12(5):181-183.
136. Golovach IYu. Strategic decisions for safe and potential long-term therapy of osteoarthritis with NSAIDs. *Trauma*. 2017;18(4):27-34.

137. Деримедвідь ЛВ, Вереїтинова ВП. Комбіновані хондропротектори при лікуванні остеоартриту. *Практична медицина*. 2018;8(1):31-36.
138. Bruyere O, Cooper C, Pelletier J-P, Brandi ML, Guillemin F, et al. Рекомендації щодо алгоритму ведення пацієнтів із остеоартрозом колінного суглоба в Європі та по всьому світу: звіт спеціальної комісії Європейського товариства з вивчення клінічних та економічних аспектів остеопорозу та остеоартрозу (ESCEO). *Укр Ревматол Журн*. 2016;3:15-29.
139. Деримедвідь ЛВ. Роль препаратів, що впливають на метаболізм хряща, при комплексній терапії остеоартриту. *Семейная мед*. 2016;2:39-43.
140. Malemud CJ. Prospects for drug discovery in osteoarthritis. *Future Drug Discovery*. 2019;1(2):FDD13.
141. Badokin VV. Multifactoriness of the mechanisms of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in osteoarthrosis. *Sovrem Revmatol*. 2009;4:81-87.
142. Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol*. 2020;180:114147.
143. Nakata K, Hanai T, Take Y, Osada T, Tsuchiya T, Shima D, Fujimoto Y. Disease-modifying effects of COX-2 selective inhibitors and non-selective NSAIDs in osteoarthritis: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018;26(10):1263-1273.
144. Zhang R, Brennan M, Shen Z, MacPherson J, Schmitt D, Molenda C, Hazen S. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(1):S17-23.
145. Largo R, Roman-Blas J, Moreno-Rubio J. Chondroitin sulfate improves synovitis in rabbits with chronic antigen induced arthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(1):17-23.
146. Volpi N. Chondroitin sulfate safety and quality. *Molecules*. 2019;24:1447.

147. Бур'янов ОА, Омельченко ТМ. Остеоартроз: генезис, діагностика, лікування. Ленвіт. 2009:208.
148. Бур'янов ОА., Бруско АТ, Омельченко ТМ, Соболевський ЮЛ. Морфогістологічне дослідження регенерації суглобового хряща в експерименті та в клініці. Укр Журн Екстрем Мед ім ГО Можаяєва. 2009;10(2):42-46.
149. Martel-Pelletier J, Roubille C, Raynauld J-P. The long-term effects of SYSADOA treatment on knee osteoarthritis symptoms and progression of structural changes: participants from the osteoarthritis initiative progression cohort. *Osteoarthritis and cartilage*. 2013;21(2):63-312.
150. Kolasinski SL, Neogi T, Hochberg MC, et al. American college of rheumatology/arthritis foundation guideline for the management of osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care and Research (Hoboken)*. 2020;72(2):149-162.
151. Honvo G, Reginster JY, Rabenda V, et al. Safety of symptomatic slow-acting drugs for osteoarthritis: outcomes of a systematic review and meta-analysis. *Drugs Aging*. 2019;36(1):65-99.
152. Носівець ДС. Фармакологія хондропротекторів (Огляд фармацевтичного ринку України). *Вісник проблем біол і мед*. 2013;4(1):57-63.
153. Корж НА, Дедух НВ, Зупанец ІА. Остеоартроз: консервативная терапия: Монографія. Золотые страницы. 2007:424.
154. Honvo G, Bruyere J, Geerinck A, et al. Efficacy of chondroitin sulfate in patients with knee osteoarthritis: a comprehensive meta-analysis exploring inconsistencies in randomized, placebo-controlled trials. *Adv Ther*. 2019;36:1085-1099.
155. Reginster J, Dudler J, Blicharski T, et al. P Pharmaceutical-grade Chondroitin sulfate is as effective as celecoxib and superior to placebo in symptomatic knee osteoarthritis: the chondroitin versus celecoxib versus Placebo Trial (Concept). *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2017;76:1537-1543.

156. du Souich P. Absorption, distribution and mechanism of action of SYSADOAS. *Pharmacol Ther.* 2014;142(3):362-74.

157. Singh JA, Noorbaloochi S, MacDonald R, Maxwell LJ. Chondroitin for osteoarthritis. *Cochrane database of systematic reviews.* 2015;28(1):1168-1179.

158. Stoppoloni D, Politi L, Leopizzi M, Gaetani S, Guazzo R, et al. Effect of glucosamine and its peptidyl-derivative on the production of extracellular matrix components by human primary chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015;23(1):103-113.

159. Charles J. Malemud Prospects for drug discovery in osteoarthritis. *Future Drug Discovery.* 2019;1(2):FDD13.

160. Северин ЕС. Биохимия: учебник. 5-е изд, испр и доп. Москва:ГЭОТАР-Медиа, 2016. 768 с.

161. Iovu M, Dumais G, du Souich P. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;16:3:S14-8.

162. Philp AM, Davis ET, Jones SW. Developing anti-inflammatory therapeutics for patients with osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2017;56(6):869-881.

163. Salazar J, Bello L, Chavez M, et al. Glucosamine for osteoarthritis: biological effects, clinical efficacy, and safety on glucose metabolism. *Arthritis.* 2014;2014:432463.

164. Вовк ЕИ. Остеоартрит в общей практике: лечим боль или болезнь? *Consilium Medicum.* 2015;17(9):88-96.

165. Зупанець МВ. Пошук нових протизапальних препаратів в ряду нітро- та оксамоїлзаміщених N-фенілантранілових кислот. Автореферат дисертації кандидата фармацевтичних наук. Харків. 2015:20.

166. Зупанець ІА. Феномен синергізму сучасних хондропротекторів. *Новости медицины и фармации.* 2009;(289):1-2.

167. Al-Saadi HM, Pang K-L, Ima-Nirwana S, Chin K-Y. Multifaceted protective role of glucosamine against osteoarthritis: review of its molecular mechanisms. *Scientia Pharmaceutica.* 2019;87,34:124.

168. Guelfi G, Stefanetti V, Zampini D. Gold nanoparticles approach to detect chondroitin sulphate and hyaluronic acid urothelial coating. *Scientific Reports*. 2017;7(1):10355.

169. Зайченко ГВ, Горчакова НО, Стрига ОА, Яковлева НЮ, Рубан ОІ. Аспекти фармакодинаміки та клінічної фармакології гіалуронової кислоти. *Вісник проблем біол і мед*. 2017;1(135):33-42.

170. Eriksen P, Bartels EM, Altman RD, Bliddal H, Juhl C, Christensen R. Risk of bias and brand explain the observed inconsistency in trials on glucosamine for symptomatic relief of osteoarthritis: a meta-analysis of placebo-170 controlled trials. *Arthritis Care and Research (Hoboken)*. 2014;66(12):844-855.

171. Лукьянчук Е. Симптоматическая и хондропротекторная терапия при остеоартрозе (дайджест). *Укр Ревматол Журн*. 2014;1:35-38.

172. Hochberg MC, Martel-Pelletier J, Monfort J, Möller I, Castillo JR, et al. Combined chondroitin sulfate and glucosamine for painful knee osteoarthritis: a multicentre, randomised, double-blind, non-inferiority trial versus celecoxib. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(1):37-44.

173. Vasiliadis H.S, Tsikopoulos K. Glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis. *World J Orthop*. 2017;8(1):1-11.

174. Wang Q, Huang S-Q, Li C-Q, Xu Q, Zeng Q-P. *Akkermansia muciniphila* may determine chondroitin sulfate ameliorating or aggravating osteoarthritis. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:1955.

175. Shang Q, Shi J, Song G, Zhang M, Cai C, Hao J, Li G, Yu G. Structural modulation of gut microbiota by chondroitin sulfate and its oligosaccharide. *Intern. J Biol Macromol*. 2016;89:489-498.

176. Gubska OYu, Kuzminets AA. NSAID-enterotoxicity: focus on the problem. *Modern Gastroenterology*. 2018;103(5):50-59.

177. Yoshikawa K, Kurihara C, Furuhashi H, Takajo T, Maruta K, et al. Psychological stress exacerbates NSAID-induced small bowel injury by inducing changes in intestinal microbiota and permeability via glucocorticoid receptor signaling. *J Gastroenterol*. 2017;52(1):61-71.

178. Shmagel A, Demmer R, Knights D, Butler M, Langsetmo L, Lane NE, Ensrud K. The effects of glucosamine and chondroitin sulfate on gut microbial composition: a systematic review of evidence from animal and human studies. *Nutrients*. 2019;11:294.
179. Benjdia A, Berteau O. Sulfatases and radical SAM enzymes: emerging themes in glycosaminoglycan metabolism and the human microbiota. *Biochem Soc Trans*. 2016;44 (1):109-115.
180. Sicard J-F, Vogeleeer P, Le Bihan G, Olivera YR, Beaudry F, Jacques M, Harel J. N-Acetyl-glucosamine influences the biofilm formation of *Escherichia coli*. *Gut Pathogens*. 2018;10:26.
181. Nagalingam NA, Lynch SV. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflam Bowel Dis*. 2012;2(1):889-98.
182. Старовойтова СО, Скроцька ОІ, Пенчук ЮМ, Дорошко ЮМ. Технологічні аспекти одержання пробіотиків. *Наук праці Нац універ харч. техн*. 2014;20(4):69-77.
183. Sanders ME. Probiotics in 2015: their scope and use. *J Clin Gastroenterol*. 2015;49(1):S2-6.
184. Антоненко АВ, Берегова ТВ, Свінцицький АС. Особливості перебігу гастропатії, індукованої застосуванням нестероїдних протизапальних препаратів у хворих на остеоартроз. *Клін Експ Досл*. 2014;57(3):68-72.
185. Кордон ТІ. Принципи створення, механізм дії та клінічне застосування пробіотиків. *Annals of Mechnikov Institute*. 2014;2:8-16.
186. Ashraf R, Shah NP. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit Rev Food Sci Nutrition*. 2014;54(7):938-956.
187. Bondarenko VM. Molecular cellular mechanisms of therapeutic action of probiotic drugs. *J Farmateka*. 2010;196:26-32.
188. Shevyakov MA, Sobolev AV. Immunomodulation by using probiotics: range of clinical applications and conditions for effectiveness. *The difficult patient*. 2013;1(11):43-47.

189. Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition*. 2019;10:S49-S66.
190. Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, Gibson GR, Rastall RA. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16,605-616.
191. Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol*. 2018;11(1):1-10.
192. Lei M, Guo C, Wang D, Zhang C, Hua L, The effect of probiotic *Lactobacillus casei* Shirota on knee osteoarthritis: a randomised double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Benef Microbes*. 2017;8(5):697-703.
193. Coulson S, Butt H, Vecchio P, Gramotnev H, Vitetta L. Green-lipped mussel extract (*Perna canaliculus*) and glucosamine sulphate in patients with knee osteoarthritis: therapeutic efficacy and effects on gastrointestinal microbiota profiles. *Inflammopharmacology*. 2013;21(1):79-90.
194. Vitetta L, Coulson S, Linnane AW, Butt H. The gastrointestinal microbiome and musculoskeletal diseases: a beneficial role for probiotics and prebiotics. *Pathogens*. 2013;2:606-626.
195. Amdekar S, Singh V, Kumar A, Sharma P, Singh R. *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* regulate inflammatory pathway and improve antioxidant status in collagen-induced arthritic rats. *J Interferon Cytokine Res*. 2013;33(1):1-8.
196. Ohlsson C, Engdahl C, Fåk F, Andersson A, Windahl SH, Farman HH, Movérare-Skrtic S, Islander U, Sjögren K. Probiotics protect mice from ovariectomy-induced cortical bone loss. *PLoS One*. 2014;9(3):e92368.
197. Zaidi M, Yuen T, Sun L, Rosen CJ. Regulation of skeletal homeostasis. *Endocrine Rev*. 2018;39(5):701-718.
198. Sun M, He C, Cong Y, Liu Z. Regulatory immune cells in regulation of intestinal inflammatory response to microbiota. *Mucosal Immunology*. 2015;(8)5:969-78.

199. D'Amelio P, Sassi F. Gut microbiota, immune system, and bone. *Calcified Tissue Intern.* 2017;102(4):415-25.
200. Hug H, Mohajeri MH, Fata GL. Toll-like receptors: regulators of the immune response in the human gut. *Nutrients.* 2018;10(2):203.
201. Elshabrawy HA, Chen Z, Volin MV, Ravella S, Virupannavar S, Shahrara S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis.* 2015;18(4):433-48.
202. Miller PL, Carson TL. Mechanisms and microbial influences on CTLA-4 and PD-1-based immunotherapy in the treatment of cancer: a narrative review. *Gut Pathog.* 2020;12:43.
203. Korotkyi O, Kyriachenko Y, Kobylak N, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Crosstalk between gut microbiota and osteoarthritis: A critical view. *J Funct Foods.* 2020;68:103904.
204. Steves CJ, Bird S, Williams FMK, Spector TD. The microbiome and musculoskeletal conditions of aging: a review of evidence for impact and potential therapeutics. *J Bone Mineral Res.* 2016;2:261-9.
205. Korotkyi O, Vovk A, Galenova T, Vovk T, Dvorschenko K, Lizza F, Abenavoli L, Kobylak N, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Effect of probiotic on serum cytokines and matrix metalloproteinases profiles during monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *Minerva Biotechnol.* 2019;31(2):68-73.
206. Короткий ОГ, Воєйков АІ, Фалалєєва ТМ, Берегова ТВ, Остапченко ЛІ. Дослідження підгострої токсичності хондроїтинпротектора «Драстоп» за показниками аналізу та лейкоцитарної формули крові у щурів. *Вісник пробл біол і мед.* 2016;126(1):84-87.
207. Короткий ОГ, Воєйков АІ, Фалалєєва ТМ, Берегова ТВ. Дослідження підгострої токсичності хондроїтин сульфату натрію за показниками морфо-функціонального стану печінки у щурів та кролів. *Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки.* 2016;74(2):66-72.

208. Baragi VM, Becher G, Bendele AM, Biesinger R, Bluhm H, et al. A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models. *Arthritis Rheum.* 2009;60(7):2008-2018.
209. Гарбузова ВЮ. Фізіологія крові. Суми: Вид-во Сум. ДУ; 2007. С. 26-48, 104-111.
210. Данилова ЛА. Справочник по лабораторным методам исследования. СПб: Питер; 2003. 736 с.
211. Меркулов АБ. Курс патогистологической техники. Л: Медицина; 1969. 237 с.
212. Putnikov A, Holota Yu, Sergeychuk T, Ostapchuk A, Zakordonets L, Ostapchenko L, Tolstanova G. Quantitative and functional characteristics of rat intestinal microbiota. *Microbiol Biotech.* 2015;2:89-100. Ukrainian.
213. Mescher A. Junqueira's basic histology: text and atlas. McGraw-Hill. 2009;12:480.
214. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. Мир; 1969:102-108:157-167.
215. Able AJ, Guest DI, Sutherland MW. Use of a new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *phytophthora parasitica varnicotianae*. *Plant Physiol.* 1998;117(2):491-499.
216. Sutherland MW, Learmonth BA. The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase. *Free Radical Res.* 1997;27(3):283-289.
217. Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *Febs Letters.* 1990;268(1):69-71.
218. Nourooz-Zadeh J, Tajaddinisarmadi J, Wolff SP. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem.* 1994;220(2):403-409.

219. Гаврилов ВБ, Гаврилова АР, Хмара НФ. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов. Лаб Дело. 1988;2:60-63.

220. Колесова ОЕ, Маркин АА, Федорова ТН. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах. Лаб Дело. 1984;9:540-546.

221. Орехович ВН. Современные методы в биохимии. Медицина. 1977:62-68.

222. Дубинина ЕЕ, Бурмистров СО, Ходов ДА, Поротов ИГ. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения. Вопр Мед Химии. 1995;41(1):24-26.

223. Чевари С, Чаба И, Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. Лаб. Дело. 1985;11:678-680.

224. Королюк МА, Иванова ЛК, Майорова ИГ, Токарева ВА. Метод определения активности каталазы. Клини Лаб Диагн. 1988;4:44-47.

225. Власова СН, Шабунина ЕИ, Переслегина ИА. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей. Лаб. Дело. 1990;8:19-22.

226. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. Anal Biochem. 1976;74(1):214-226.

227. Mokrasch LC, Teschke EJ. Glutathione content of cultured cells and rodent brain regions: a specific fluorometric assay. Anal Biochem. 1984;140(2):506-509.

228. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-275.

229. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987;162(1):156-159.

230. Livak EJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*. 2001;25:402-408.
231. McBurney MI, Davis C, Fraser CM, Schneeman BO, Huttenhower C, Verbeke K, Walter J, Latulippe ME. Establishing what constitutes a healthy human gut microbiome: state of the science, regulatory considerations, and future directions. *J Nutr*. 2019;149(11):1882-1895.
232. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017;474(11):1823-1836.
233. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research*. 2020;3:492-506.
234. Guss JD, Ziemian SN, Luna M, Sandoval TN, Holyoak DT, et al. The effects of metabolic syndrome, obesity, and the gut microbiome on load-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019;27:129-39.
235. Hernandez CJ. Musculoskeletal microbiology: The utility of the microbiome in orthopedics. *J Orthop Res*. 2021;39(2):251-257.
236. Zindel J, Kubes P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in immunity and sterile inflammation. *Annu Rev Pathol*. 2020;15:493-518.
237. McKernan DP. Pattern recognition receptors as potential drug targets in inflammatory disorders. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2020;119:65-109.
238. Huang ZY, Stabler T, Pei FX, Kraus VB Both systemic and local lipopolysaccharide (LPS) burden are associated with knee OA severity and inflammation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(10):1769-1775.
239. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev*. 2017;279(1):70-89.
240. Liao CR, Wang SN, Zhu SY, Wang YQ, Li ZZ, Liu ZY, Jiang WS, Chen JT, Wu Q. Advanced oxidation protein products increase TNF- α and IL-1 β expression in chondrocytes via NADPH oxidase 4 and accelerate cartilage degeneration in osteoarthritis progression. *Redox Biol*. 2020;28:101306.

241. Li X, Liu L, Cao Z, Li W, Li H, Lu C, Yang X, Liu Y. Gut microbiota as an "invisible organ" that modulates the function of drugs. *Biomed Pharmacother.* 2020;121:109653.

242. Mantovani V, Maccari F, Volpi N. Chondroitin sulfate and glucosamine as disease modifying anti-osteoarthritis drugs (MOADs). *Curr Med Chem.* 2016;23(11):1139-51.

243. Paone P, Cani PD. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut.* 2020;69(12):2232-2243.

244. Shang Q, Shi J, Song G, Zhang M, Cai C, Hao J, Li G, Yu G. Structural modulation of gut microbiota by chondroitin sulfate and its oligosaccharide. *Int J Biol Macromol.* 2016;89:489-98.

245. Roth C, Petricevic M, John A, Goddard-Borger ED, Davies GJ, Williams SJ. Структурные и механистические исследования *Bacteroides vulgatus*, сохраняющие N-ацетил-бета-галактозаминидазу, которая использует участие соседней группы. *Chem Commun.* 2016;52:11096-11099.

246. Wang S, Sugahara K, Li F. Chondroitin sulfate/dermatan sulfate sulfatases from mammals and bacteria. *Glycoconj J.* 2016;33(6):841-851.

247. Biver E, Berenbaum F, Valdes AM, Carvalhoda AI, et al. Gut microbiota and osteoarthritis management: An expert consensus of the European society for clinical and economic aspects of osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases (ESCEO). *Ageing Res Rev.* 2019;55:1-8.

248. Korotkyi O, Vovk A, Dranitsina A, Falalyeyeva T, Dvorshchenko K, Fagoonee S, Ostapchenko L. The influence of probiotic diet and chondroitin sulfate administration on *Ptgs2*, *Tgfb1* and *Col2a1* expression in rat knee cartilage during monoiodoacetate-induced osteoarthritis. *Minerva Medica.* 2019;110(5):419-424.

249. Liu F, Zhang N, Li Z, Wang X, Shi H, Xue C, Li RW, Tang Q. Chondroitin sulfate disaccharides modified the structure and function of the murine gut microbiome under healthy and stressed conditions. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-14.

250. Barko PC, McMichael MA, Swanson KS, Williams DA. The gastrointestinal microbiome: a review. *J Vet Intern Med.* 2018;32(1):9-25.
251. Korotkyi O, Dvorshchenko K, Falalyeyeva T, Sulaieva O, Kobylak N, Abenavoli L, Fagoonee S, Pellicano R, Ostapchenko L. Combined effects of probiotic and chondroprotector during osteoarthritis in rats. *Panminerva Medica.* 2020;62(2):93-101.
252. Dranitsina AS, Dvorshchenko KO, Korotkyi OH, Vovk AA, Falalyeyeva TM, Grebinyk DM, Ostapchenko LI. Expression of Nos2 and Acan genes in rat knee articular cartilage in osteoarthritis. *Cytol Genet.* 2019;53(6):481-488.
253. Korotkyi OH, Luhovska TV, Serhiychuk TM, Dvorshchenko KO, Falalyeyeva TM, Ostapchenko LI. The gut microbiota of rats under experimental osteoarthritis and administration of chondroitin sulfate and probiotic. *Mikrobiol Zh.* 2020;82(6):64-73.
254. Man GS, Mologhianu GJ. Osteoarthritis pathogenesis – a complex process that involves the entire joint. *Med Life.* 2014;7(1):37-41.
255. Grässel S, Muschter D. Recent advances in the treatment of osteoarthritis. *F1000Res.* 2020;9:325.
256. Bruyère O, Cooper C, Pelletier J-P, Maheu E, Rannou F, et al. A consensus statement on the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) algorithm for the management of knee osteoarthritis-From evidence-based medicine to the real-life setting. *Semin Arthritis Rheum.* 2016;45(1):S3-11.
257. Zólkiewicz J, Marzec A, Ruszczynski M, Feleszko W. Postbiotics – a step beyond pre- and probiotics. *Matrix Biol.* 2014;0:25-32.
258. Wilusz RE, Sanchez-Adams J, Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Nutrients.* 2020;12:2189.
259. Wien SI. Osteoarthritis: histology and pathogenesis. *Med Wochenschr.* 2013;163(9-10):212-9.

260. Moti L, Sabaawy HE. Cartilage regeneration for treatment of osteoarthritis: a paradigm for nonsurgical intervention. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2015;7(3):76-87.

261. Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Monoiodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicologic pathology.* 2003;31(6):619-24.

262. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, et al. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primer.* 2016;13;2:16072.

263. Kozhemyakina E, Lassar AB, Zelzer E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development.* 2015;142(5):817-31.

264. Sanchez C, Bay-Jensen AC, Pap T, Dvir-Ginzberg M, Quasnichka H, Barrett-Jolley R, Mobasher A, Henrotin Y. Chondrocyte secretome: a source of novel insights and exploratory biomarkers of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2017;25(8):1199-209.

265. Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1824(1):133-45.

266. Mobasher A, Rayman MP, Gualillo O, Sellam J, Kraan P, Fearon U. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13(5):302-311.

267. Zhu L, Tang Y, Li X-Y, Keller ET, Yang J, Cho J-S, Feinberg TY, Weiss SJ. Osteoclast-mediated bone resorption is controlled by a compensatory network of secreted and membrane-tethered metalloproteinases. *Sci Transl Med.* 2020;12(529):eaaw6143.

268. Oinas J, Ronkainen AP, Rieppo L, Finnilä MAJ, Iivarinen JT, et al. Composition, structure and tensile biomechanical properties of equine articular cartilage during growth and maturation. *Scientific Reports.* 2018;8:11357.

269. Gao Y, Liu S, Huang J, Guo W, Chen J, et al. The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes. *Biomed Res Int.* 2014;2014:648459.

270. Dunn CM, Velasco C, Rivas A, Andrews M, Garman C, Jacob PB, Jeffries MA. Identification of cartilage microbial DNA signatures and associations with knee and hip osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2020;72(7):1111-22.

271. Тіхова ЄВ, Дворщенко КО, Короткий ОГ, Фалалєєва ТМ, Берегова ТВ. Стан суглобових хрящів при артрозі та після введення тест-зразка «Драстоп». *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки.* 2017;1:99-105.

272. Korotkyi O, Vovk A, Kuryk O, Dvorshchenko K, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Co-administration of live pro-biotics with chondroprotector in management of experimental knee osteoarthritis. *Georgian Med News.* 2018;279:191-196.

273. Korotkyi O, Falalyeyeva T, Dvorshchenko K, Savchuk O, Bereгова T, Ostapchenko L. Chondroprotector “Drastop” suppression of inflammatory responses in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats. *Eur J Clin Investig.* 2017;47(1):167.

274. Xu HG, Zheng Q, Song JX, Li J, Wang H, Liu P, Wang J, Wang C-d, Zhang X-l. Intermittent cyclic mechanical tension promotes endplate cartilage degeneration via canonical Wnt signaling pathway and E-cadherin/ β -catenin complex cross-talk. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016; 24(1):158-168.

275. Cancel M, Grimard G, Thuillard-Crisinel D, Moldovan F, Villemure I. Effects of in vivo static compressive loading on aggrecan and type II and X collagens in the rat growth plate extracellular matrix. *Bone.* 2009;44(2):306-315.

276. Blasioli DJ, Kaplan DL. The roles of catabolic factors in the development of osteoarthritis. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20(4):355-363.

277. Laronha H, Caldeira J. Structure and function of human matrix metalloproteinases cells. 2020;9(5):1076.

278. Amara S, Smitha L, Fieldsab GB. Matrix metalloproteinase collagenolysis in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2017;1864(11):1940-1951.
279. Kraus VB, Hargrove DE, Hunter DJ, Renner JB, Jordan JM. Establishment of reference intervals for osteoarthritis-related soluble biomarkers: the FNIH/OARSI OA Biomarkers Consortium *Ann Rheum Dis*. 2017;76(1):179-185.
280. Gahunia HK, Pritzker KPH. Articular cartilage metabolism: biochemical markers and dynamic loading. *Articular Cartilage of the Knee*. 2020:123-171.
281. Flowers SA, Kalamajski S, Ali L, Björkman LI., Raj JR, Aspberg A, Karlsson NG, Jin C. Cartilage oligomeric matrix protein forms protein complexes with synovial lubricin via non-covalent and covalent interactions. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017;25(9):1496-1504.
282. Riegger J, Rehm M, Büchele G, Brenner H, Günther K-P, Rothenbacher D, Brenner RE. Serum cartilage oligomeric matrix protein in late-stage osteoarthritis: association with clinical features, renal function, and cardiovascular biomarkers. *J Clin Med*. 2020;9(1):268.
283. Lorenzo P, Aspberg A, Saxne T, Önerfjord P. Quantification of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and a COMP neoepitope in synovial fluid of patients with different joint disorders by novel automated assays. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017;25(9):1436-1442.
284. Guilak F, Nims RJ, Dicks A, Wu CL, Meulenbelt I. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. *Matrix Biol*. 2018;71-72:40-50.
285. Luo Y, Sinkeviciute D, He Y, Karsdal M, Henrotin Y, Mobasheri A, Önerfjord P, Bay-Jensen A. The minor collagens in articular cartilage. *Protein Cell*. 2017;8(8):560-572.
286. Winsz-Szczotka K, Kuźnik-Trocha K, Gruenpeter A, Wojdas M, Dąbkowska K, Olczyk K. Association of circulating comp and ykl-40 as markers of metabolic changes of cartilage with adipocytokines in juvenile idiopathic arthritis. *Metabolites*. 2020;10(2):61.

287. Zhao T, Su Z, Li Y, Zhang X, You Q. Chitinase-3 like-protein-1 function and its role in diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):201.
288. Kozawa E, Cheng XW, Urakawa H, Arai E, Yamada Y, Kitamura S, Sato K, Kuzuya M, Ishiguro N, Nishida Y. Increased expression and activation of cathepsin K in human osteoarthritic cartilage and synovial tissues. *J Orthop Res.* 2016;34(1):127-34.
289. Soki FN, Yoshida R, Paglia DN, Duong LT, Hansen MF, Drissi H. Articular cartilage protection in *ctsk* *-/-* mice is associated with cellular and molecular changes in subchondral bone and cartilage matrix. *J Cell Physiol.* 2018;233(11):8666-8676.
290. Saberi Hosnijeh F, Siebuhr AS, Uitterlinden AG, Oei EH, Hofman A, et al. Association between biomarkers of tissue inflammation and progression of osteoarthritis: evidence from the Rotterdam study cohort. *Arthritis Res Ther.* 2016;18:81.
291. Li Y. Combined detection of serum CTX-II and COMP concentrations in osteoarthritis model rabbits: an effective technique for early diagnosis and estimation of disease severity. *J Orthop Surg Res.* 2016;11:149.
292. Mishra A, Awasthi S, Raj S, Mishra P, Srivastav RN. Identifying the role of ASPN and COMP genes in knee osteoarthritis development. *Orthop Surg Res.* 2019.14(1):337.
293. Luc-Harkey BA, Safran-Norton CE, Mandl LA, Katz JN, Losina E. Associations among knee muscle strength, structural damage, and pain and mobility in individuals with osteoarthritis and symptomatic meniscal tear. *BMC Musculoskelet Disord.* 2018;19(1):258.
294. Svoboda SJ, Harvey TM, Owens BD, Brechue WF, Tarwater PM, Cameron KL. Changes in serum biomarkers of cartilage turnover after anterior cruciate ligament injury. *Am J Sports Med.* 2013;41:2108-16.
295. Verma P, Dalal K. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in knee osteoarthritis: a novel diagnostic and prognostic biomarker. *J Orthop Res.* 2013;31(7):999-1006.

296. Karsdal MA, Madsen SH, Christiansen C, Henriksen K, Fosang AJ, Sondergaard BC. Cartilage degradation is fully reversible in the presence of aggrecanase but not matrix metalloproteinase activity. *Arthritis Res Ther.* 2008;10:6.

297. Hao H, Zhang J, He Q, Wang Z. Cartilage oligomeric matrix protein, C-terminal cross-linking telopeptide of type II collagen, and matrix metalloproteinase-3 as biomarkers for knee and hip osteoarthritis (OA) diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis and cartilage.* 2019;27(5):726-736.

298. Sun Z, Yin Z, Liu C, Liang H, Jiang M, Tian J. IL-1 β promotes ADAMTS enzyme-mediated aggrecan degradation through NF- κ B in human intervertebral disc. *J Orthop Surg Res.* 2015;10:1-9.

299. Hayami T, Zhuo Y, Wesolowski GA, Pickarski M, Duong LT. Inhibition of cathepsin K reduces cartilage degeneration in the anterior cruciate ligament transection rabbit and murine models of osteoarthritis. *Bone.* 2012;50(6):1250-9.

300. Liu Y-X, Wang G-D, Wang X, Zhang Y-L, Zhang T-L. Effects of TLR-2/NF- κ B signaling pathway on the occurrence of degenerative knee osteoarthritis: an in vivo and in vitro study. *Oncotarget.* 2017;19(1):722-728.

301. Di Rosa M, Malaguarnera L. Chitinase 3 like-1: an emerging molecule involved in diabetes and diabetic complications. *Pathobiology.* 2016;83:228-242.

302. Mizoguchi E. Chitinase 3-like-1 exacerbates intestinal inflammation by enhancing bacterial adhesion and invasion in colonic epithelial cells. *Gastroenterology.* 2006;130:398-411.

303. De Ceuninck F, Gauffillier S, Bonnaud A, Sabatini M, Lesur C, Pastoureaux P. YKL-40 (cartilage gp-39) induces proliferative events in cultured chondrocytes and synoviocytes and increases glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;285:926-931.

304. De Ceuninck F, Pastoureaux P, Bouet F, Bonnet J, Vanhoutte PM. Purification of guinea pig YKL40 and modulation of its secretion by cultured articular chondrocytes. *J Cell Biochem.* 1998;69:414-424.

305. Di Rosa M, Szychlinska MA, Tibullo D, Malaguarnera L, Musumeci G. Expression of CHI3L1 and CHIT1 in osteoarthritic rat cartilage model. A morphological study. *Eur J Histochem*. 2014;58(3):2423.

306. Szychlinska MA, Trovato FM, Di Rosa M, Malaguarnera L, Puzzo L, Leonardi R, Castrogiovanni P, Musumeci G. Co-expression and co-localization of cartilage glycoproteins CHI3L1 and lubricin in osteoarthritic cartilage: morphological, immunohistochemical and gene expression profiles. *Int J Mol Sci*. 2016;17(3):359.

307. Kawasaki M, Hasegawa Y, Kondo S, Iwata H. Concentration and localization of YKL-40 in hip joint diseases. *J Rheum*. 2001;28(2): 341-345.

308. Шевченко ЮА, Лянна ОЛ, Бразалук ОЗ, Боренко ОЮ, Хворостенко ЮМ, Хворостенко МІ. Активність лізосомних цистеїнових катепсинів у сироватці крові дітей за наявності гострого неспецифічного запалення. *Наукові праці. Техногенна безпека*. 2014;238(226):55-58.

309. Korotkyi O, Dvorshchenko K, Vovk A, Dranitsina A, Tymoshenko M, Kot L, Ostapchenko L. Effect of probiotic composition on oxidative/antioxidant balance in blood of rats under experimental osteoarthriti. *Ukr Biochem J*. 2019;91(6):49-58.

310. Lu J, Wang M, Wang Z, Fu Z, Lu A, Zhang G. Advances in the discovery of cathepsin K inhibitors on bone resorption. *Res Paper*. 2018:890-904.

311. Basu A, Kunduru KR, Abtey E, Domb AJ, Polysaccharide-based conjugates for biomedical applications. *Bioconjugate Chem*. 2015;26(8):1396-1412.

312. Opoka-Winiarska V, Jurecka A, Emeryk A, Tyłki-Szymanska A. Osteoimmunology in mucopolysaccharidoses type I, II, VI and VII. Immunological regulation of the osteoarticular system in the course of metabolic inflammation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21:1813-1823.

313. Liu F, Zhang N, Li Z, Wang X, Shi H, Xue C, Li R, Tang Q. Chondroitin sulfate disaccharides modified the structure and function of the murine gut microbiome under healthy and stressed conditions. *Sci Rep*. 2017;7(1):67-83.

314. Abdollahi-Roodsaz S, Abramson SB, Scher JU. The metabolic role of the gut microbiota in health and rheumatic disease: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12:446-455.
315. Rossi E, Cimmins A, Luthje P, Brauner A, Sjoling Å, Landini P, Romling U. “It’s a gut feeling” – *Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment. *Crit Rev Microbiol*. 2018;44(1):1-30.
316. Zhang A, He Y, Wei G, Zhou J, Dong W, Chen K. Molecular characterization of a novel chitinase CmChi1 from *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1 and its use in N-acetyl-d-glucosamine production. *Biotechnol Biofuels*. 2018;11:179.
317. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl. Sci*. 2017;147:1-73.
318. Oliviero F, Ramonda R, Scanu A, Galozzi P, Favero M, Punzi L. Levels of inflammatory cytokines and metalloproteinases are increased in knee synovial fluid of patients with concomitant erosive hand osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2020;38(4):800.
319. Thorson C, Galicia K, Burleson A, Bouchard O, Hoppensteadt D, Fareed J, Hopkinson W. Matrix metalloproteinases and their inhibitors and proteoglycan 4 in patients undergoing total joint arthroplasty. *Clin .Appl Throm Hemost*. 2019;25:1076029619828113.
320. Brown Lobbins ML, Shivakumar BR, Postlethwaite AE, Hasty KA. Chronic exposure of interleukin-13 suppress the induction of matrix metalloproteinase-1 by tumour necrosis factor α in normal and scleroderma dermal fibroblasts through protein kinase B/Akt. *Clin Exp Immunol*. 2018;191(1):84-95.
321. Li H, Xie S, Qi Y, Li H, Zhang R, Lian Y. TNF- α increases the expression of inflammatory factors in synovial fibroblasts by inhibiting the PI3K/AKT pathway in a rat model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Exp Ther Med*. 2018;16(6):4737-4744.

322. David RK, Waters JG, Kevorkian L, Darrah C, Cooper A, Donell ST, Clark IM. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage. *Arthritis Research Therapy*. 2006;8:R124.

323. Tchetverikov I, Lohmander L, Verzijl N, Huizinga T, TeKoppele J, Hanemaaijer R, DeGroot J. MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(5):694-698.

324. Dai R, Wu Z, Chu HY, Lu J, Lyu A, Liu J, Zhang G. Cathepsin K: the action in and beyond bone. *Fron. Cell Dev Biol*. 2020;8:433.

325. Носівець ДС, Мамчур ВЙ, Опришко ВІ. Зміни вмісту металопротеїназ сироватки крові щурів під впливом нестероїдних протизапальних засобів і парацетамолу на фоні експериментального остеоартрозу та гіпотиреозу. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2020;14(1):36-42.

326. Nielsen MK, Subhi Y, Molbech CR, Nilsson LL, Nissen MH, Sørensen TL. Imbalances in tissue inhibitors of metalloproteinases differentiate choroidal neovascularization from geographic atrophy. *Acta Ophthalmol*. 2019;97(1):84-90.

327. Nikolov A, Popovski N, Hristova I. Collagenases MMP-1, MMP-13, and tissue inhibitors TIMP-1, TIMP-2: their role in healthy and complicated pregnancy and potential as preeclampsia biomarkers – a brief review. *Appl Sci*. 2020;10(21):7731.

328. Sun S, Bay-Jensen A-C, Karsdal MA, Siebuhr AS, Zheng Q, Maksymowych WP, Christiansen TG, Henriksen K. The active form of MMP-3 is a marker of synovial inflammation and cartilage turnover in inflammatory joint diseases. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014;15:93.

329. Young DA, Barter MJ, Wilkinson DJ. Recent advances in understanding the regulation of metalloproteinases. *F1000Res*. 2019;8:F1000.

330. Kapoor C, Vaidya S, Wadhwan VH, Kaur G, Pathak A. Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *J Cancer Res Ther*. 2016;12:28-35.

331. Breznik B, Motaln H, Lah Turnšek T. Proteases and cytokines as mediators of interactions between cancer and stromal cells in tumours. *Biol Chem* 2017;398(7):709-719.

332. Sounni NE, Paye A, Host L, Noël A. MT-MMPs as regulators of vessel stability associated with angiogenesis. *Frontiers in Pharmacology*. 2011;2:111.

333. Springman EB, Angleton EL, Birkedal Hansen H, van Wart HE. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active site zinc complex in latency and a «cysteine switch» mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(1):364-8.

334. Kennedy AM, Inada M, Krane SM, Christie PT, Harding B, et al. MMP13 mutation causes spondyloepimetaphyseal dysplasia, Missouri type (SEMD(MO)). *J Clin Invest*. 2005;115(10):2832-42.

335. Громова ОА, Торшин ИЮ, Ли́ла АМ, Алексе́ева ЛИ, Таскина ЕА. Стандартизированные формы хондроитина сульфата как патогенетическое средство лечения остеоартрита в контексте постгеномных исследований. *Совр Ревматол*. 2021;15(1):136-143.

336. So JS, Kwon HK, Lee CG, Yi HJ, Park JA, et al. *Lactobacillus casei* suppresses experimental arthritis by down-regulating T helper 1 effector functions. *Mol Immunol*. 2008;45:2690-9.

337. Kothari D, Patel S, Kim SK. Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: A review. *Biomed Pharmacother*. 2019;111:537-47.

338. Di Cerbo A, Palmieri B, Aponte M, Morales-Medina JC, Iannitti T. Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. *J Clin Pathol*. 2016;69:187-203.

339. Kobyliak N, Falalyeyeva T, Mykhalchyshyn G, Kyriienko D, Komissarenko I. Effect of alive probiotic on insulin resistance in type 2 diabetes patients: randomized clinical trial. *Diabetes Metab Syndr*. 2018;12:617-24.

340. Kobyliak N, Falalyeyeva T, Beregova T, Spivak M. Probiotics for experimental obesity prevention: focus on strain dependence and viability of composition. *Endokrynol Pol*. 2017;68:659-67.

341. Kobyliaik N, Abenavoli L, Falalyeyeva T, Mykhalchyshyn G, Boccuto L, et al. Beneficial effects of probiotic combination with omega-3 fatty acids in NAFLD: a randomized clinical study. *Minerva Med.* 2018;109:418-28.

342. Kobyliaik N, Abenavoli L, Falalyeyeva T, Beregova T. Efficacy of probiotics and smectite in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol.* 2018;17:153-61.

343. Kobyliaik N, Abenavoli L, Mykhalchyshyn G, Kononenko L, Boccuto L, et al. A multi-strain probiotic reduces the fatty liver index, cytokines and aminotransferase levels in NAFLD patients: evidence from a randomized clinical trial. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2018;27:41-9.

344. Abdollahi-Roodsaz S, Abramson SB, Scher JU. The metabolic role of the gut microbiota in health and rheumatic disease: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12:446-455.

345. Ala-Kokko L, Baldwin CT, Moskowitz RW, Prockop DJ. Single base mutation in the type II procollagen gene (COL2A1) as a cause of primary osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87(17):6565-6568.

346. Sahlman J, Pitkänen MT, Prockop DJ, Arita M, Li S-W, Helminen HJ, Långsjö TK, Puustjärvi K, Lammi MJ. A human COL2A1 gene with an Arg519Cys mutation causes osteochondrodysplasia in transgenic mice *Arthritis Rheum.* 2004;50(10):3153-60.

347. So JS, Song MK, Kwon HK, Lee CG, Chae CS. *Lactobacillus casei* enhances type II collagen/glucosamine-mediated suppression of inflammatory responses in experimental osteoarthritis. *Life Sci.* 2011;88(7):358-66.

348. Yang R-C, Chen M-H, Chen P-Y, Chen C-Y, Tsai S-F, Cheng C-K, Sun J-S. A mutation of the Col2a1 gene (G1170S) alters the transgenic murine phenotype and cartilage matrix homeostasis. *J Form Med Assoc.* 2014;113(11):803-812.

349. Mishra A, Awasthi S, Raj S, Mishra P, Srivastava RN. Identifying the Role of ASPN and COMP genes in knee osteoarthritis development. *J Orthop Surg Res.* 2019;14(1):337.
350. Schmal H, Salzmann GM, Langenmair ER, Henkelmann R, Südkamp NP, Niemeyer P. Biochemical characterization of early osteoarthritis in the ankle. 2014:434802.
351. Basu A, Kunduru KR, Abtey E, Domb AJ. Polysaccharide-based conjugates for biomedical applications. *Bioconjugate Chem.* 2015;26(8):1396-1412.
352. Chan PS, Caron JP, Rosa GJ, Orth MW. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E(2) in articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(5):387-394.
353. Posey KL, Coustry F, Hecht JT. Cartilage oligomeric matrix protein: COMPathies and beyond. *Matrix Biol.* 2018;71-72:161-173.
354. Löfgren M, Svala E, Lindahl A, Skiöldebrand E, Ekman S. Time-dependent changes in gene expression induced in vitro by interleukin-1 β in equine articular cartilage. *Res Vet Sci.* 2018 118:466-476.
355. Chen Q, Wu S, Wu Y, Chen L, Pang Q. miR-149 suppresses the inflammatory response of chondrocytes in osteoarthritis by down-regulating the activation of TAK1/NF- κ B. *Biomed Pharmacother.* 2018. 101:763-768.
356. Korotkyi O, Dvorshchenko K, Kot L, Vovk T, Tymoshenko M, Ostapchenko L. Oxidative/antioxidant balance and matrix metalloproteinases level in the knee cartilage of rats under experimental osteoarthritis and probiotic administration. *Ukr Biochem J.* 2020;92(6):126-136.
357. Korotkyi O, Vovk A, Dranitsina A, Dvorshchenko K, Grebinyk D, Falalyeyeva T, Beregova T, Ostapchenko L. The combined effect of probiotic and chondroprotector on genes expression *Ptgs2*, *Tgfb1* and *Col2a1* in the cartilage of rats with monoiodoacetate-induced osteoarthritis. *FEBS OPEN BIO.* 2018;8(1):249.

358. Korotkyi O, Vovk A, Halenova T, Dvorshchenko K, Savchuk O, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. The combined effect of probiotic and chondroitin sulfate on the levels of cytokines and matrix metalloproteinases in the serum of rats with monoiodoacetate-induced osteoarthritis. The 5th European Congress of Immunology, ECI 2018, 2-5 september 2018; Amsterdam, The Netherlands. 2018. P.435.

359. Chow YY, Chin K-Y. The role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm.* 2020;2020:8293921.

360. Orłowski EW, Kraus VB. The role of innate immunity in osteoarthritis: when our first line of defense goes on the offensive. *J Rheumatol.* 2015;42(3):363-71.

361. Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem.* 2016;60(3):275-301.

362. Luchetti MM, Benfaremo D, Gabriell A. Biologics in inflammatory and immunomediated arthritis. *Curr Pharm Biotechnol.* 2017;18(12):989-1007.

363. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier J-P, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature.* 2011;7:33-42.

364. Журавльова ЛВ, Олійник МО. Роль прозапальних цитокінів у розвитку остеоартрозу та цукрового діабету II типу. *Укр Ревматол Журн.* 2015;2(60):31-35.

365. Mukhamedshina YO, Akhmetzyanova ER, Martynova EV, Khaiboullina SF, Galieva LR, Rizvanov AA. Systemic and local cytokine profile following spinal cord injury in rats: a multiplex analysis. *Front Neurol.* 2017;8:581.

366. Leong DJ, Choudhury M, Hirsh DM, Hardin JA, Cobelli NJ, Sun HB. Nutraceuticals: potential for chondroprotection and molecular targeting of osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2013;14(11):23063-23085.

367. Levy M, Thaiss CA, Elinav E. Metabolites: messengers between the microbiota and the immune system. *Genes Dev.* 2016;30(14):1589-1597.

368. Collins KH, Paul HA, Reimer RA, Seerattan RA, Hart DA, Herzog W. Relationship between inflammation, the gut microbiota, and metabolic osteoarthritis development: studies in a rat model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(11):1989-98.

369. Liu G, Huang Y, Reis FS, Song D, Ni H. Impact of nutritional and environmental factors on inflammation, oxidative stress, and the microbiome 2019. *Editorial Biomed Res Int*. 2019;2019:5716241.

370. Shen CJ, Abu-Amer Y, O'Keefe RJ, McAlinden A. Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis. *Connect Tissue Res*. 2017;58(1):49-63.

371. Griffin TM, Scanzello CR. Innate inflammation and synovial macrophages in osteoarthritis pathophysiology. *Clin Exp Rheumatol*. 2019;37(5):57-63.

372. Xue J, Wang J, Liu Q, Luo A. Tumor necrosis factor- α induces ADAMTS-4 expression in human osteoarthritis chondrocytes. *Molecular Medicine Reports*. 2013;8(6):1755-1760.

373. Yang C-Y, Chanalaris A, Troeberg L. ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis – looking beyond the ‘usual suspects’ [Author links open overlay panel](#). *Osteoarthritis and cartilage*. 2017;25(7):1000-1009.

374. Tabeian H, Betti BF, Cirqueira CDS, de Vries TJ, Lobbezoo F, et al. IL-1beta damages fibrocartilage and upregulates MMP-13 expression in Fibrochondrocytes in the condyle of the temporomandibular joint. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9):2260.

375. Palmer G, Guerne PA, Mezin F, Maret M, Guicheux J, Goldring MB, Gabay C. Production of interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes *Arthritis Res*. 2002;4(3):226-231.

376. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. 2014;2014:ID 561459.

377. Page Thomas DP, King B, Stephens T, Dingle JT. In vivo studies of cartilage regeneration after damage induced by catabolin/interleukin-1. *Ann Rheum Dis*. 1991;50(2):75-80.

378. Ansari MY, Ahmad N, Haqqi TM. Butein activates autophagy through AMPK/TSC2/ULK1/mTOR pathway to inhibit IL-6 expression in IL-1beta stimulated human chondrocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(3):932-946.

379. Haseeb A, Ansari MY, Haqqi TM. Harpagoside suppresses IL-6 expression in primary human osteoarthritis chondrocytes. *J Orthop Res*. 2017;35(2):311-320.

380. Favero M, Belluzzi E, Trisolino G, Goldring MB, Goldring SR, et al. Inflammatory molecules produced by meniscus and synovium in early and end-stage osteoarthritis: a coculture study. *J Cell Physiol*. 2019;234(7):11176-11187.

381. Wu Y, Li Z, Jia W, Li M, Tang M. Upregulation of stanniocalcin-1 inhibits the development of osteoarthritis by inhibiting survival and inflammation of fibroblast-like synovial cells. *J Cell Biochem*. 2019;120(6):9768-9780.

382. Page CE, Smale S, Carty SM., Amos N, Lauder SN, et al. Interferon-gamma inhibits interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase production by synovial fibroblasts and protects articular cartilage in early arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(2):R49.

383. Kak G, Raza M, Tiwari BK. Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomol Concepts*. 2018;30;9(1):64-79.

384. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark Res*. 2020;29;8:49.

385. Muhl H, Pfeilschifter J. Anti-inflammatory properties of proinflammatory interferon- γ . *Int Immunopharmacol*. 2003;3:1247-1255.

386. Ahmad R, Mabrouk ME, Sylvester J, Zafarullah M. Human osteoarthritic chondrocytes are impaired in matrix metalloproteinase-13 inhibition by IFN-gamma due to reduced IFN-gamma receptor levels. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(8):1049-55.

387. Shan Y, Qi C, Liu Y, Gao H, Zhao D, Jiang Y. Increased frequency of peripheral blood follicular helper T cells and elevated serum IL-21 levels in patients with knee osteoarthritis. *Molecular Medicine Reports*. 2017;15(3):1095-1102.

388. Jomphe C, Gabriac M, Hale TM, Heroux L, Trudeau LE, et al. Chondroitin sulfate inhibits the nuclear translocation of nuclear factor-kappaB in interleukin-1beta-stimulated chondrocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008;102:59-65.

389. Торшин ИЮ, Громова ОА, Нечаева ГИ, Рейер ИА. Систематический анализ молекулярно-биологических механизмов поддержки хондроитина сульфатом метаболизма соединительной ткани. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2021;13(1):154-162.

390. Terencio MC, Ferrándiz ML, Carceller MC, Ruhí R, Dalmau P, Vergés J, Montell E, Torrent A, Alcaraz MJ. Chondroprotective effects of the combination chondroitin sulfate-glucosamine in a model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament transection in ovariectomised rats. *Biomed Pharmacother*. 2016;79:120-8.

391. Azad AK, Sarker M, Wancorresponding D. Immunomodulatory effects of probiotics on cytokine profiles. "Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: Immunomodulation by *Oenococcus oeni*". *Biomed Res Int*. 2018;2018:8063647.

392. Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AMA, Schiffrin EJ, Blum S. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut*. 2000;47(10):79-87.

393. Karamese M, Aydin H, Sengul E, Gelen V, Sevim C, Ustek D, Karakus E. The immunostimulatory effect of lactic acid bacteria in a rat model. *Iranian J Immunol*. 2016;13(3):220-228.

394. Hammarén HM, Virtanen AT, Raivola J, Silvennoine O. The regulation of JAKs in cytokine signaling and its breakdown in disease. *Cytokine*. 2019;18:48-63.

395. Bhattacharjee A, Shukla M, Yakubenko VP, Mulya A, Kundu S, Cathcart MK. IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages. *Free Radical Biol Med.* 2013;54:1-16.
396. Jayakumar T, Bhavan SP, Sheu J-R. Molecular targets of natural products for chondroprotection in destructive joint diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14):4931.
397. Wang Y, Lou S. Direct protective effect of interleukin-10 on articular chondrocytes in vitro. *Chinese Med J.* 2001;114(7):723-725.
398. Behrendt P, Preusse-Prange A, Klüter T, Haake M, Rolauffs B, Grodzinsky AJ, Lippross S, Kurz B. IL-10 reduces apoptosis and extracellular matrix degradation after injurious compression of mature articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2016;24(11):1981-1988.
399. van der Kraan PM. differential role of transforming growth factor-beta in an osteoarthritic or a healthy joint. *J Bone Metab.* 2018;25(2):65-2.
400. Crane JL, Cao XJ. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF-beta signaling in bone remodeling. *Clin Invest.* 2014;124:466-472.
401. Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Cur Opin Rheumatol.* 2011;23(5):471-478.
402. Raeeszadeh-Sarmazdeh M, Do LD, Hritz BG. metalloproteinases and their inhibitors: potential for the development of new therapeutics. *Cells.* 2020;9:1313.
403. Travis MA, Sheppard D. TGF- β activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:51-82.
404. Blasioli DJ, Kaplan DL, Jung Y. The roles of catabolic factors in the development of osteoarthritis. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20(4):355-363.
405. Monfort J, Pelletier J-P, Garcia-Giralt N, Martel-Pelletier J. Biochemical basis of the effect of chondroitin sulfate on osteoarthritis articular tissues. *Ann Rheum.* 2008;67(6):735-40.

406. Ding Y-H, Qian L-Y, Pang J, Lin J-Y, Xu Q, Wang L-H, Huang D-S, Zou H. The regulation of immune cells by Lactobacilli: a potential therapeutic target for anti-atherosclerosis therapy. *Oncotarget*. 2017;8(35):59915-59928.

407. Jensen GS, Benson KF, Carter SG, Endres JR. GanedenBC30 cell wall and metabolites: anti-inflammatory and immune modulating effects in vitro. *BMC Immunol*. 2010;11:15.

408. Brochhausen-Delius C. Prostaglandin E2: innovative approaches for tissue engineering of articular cartilage. *Pathologie*. 2014;35(2):264-70.

409. Tu M, Yang M, Yu N, Zhen G, Wan M, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity in subchondral bone modifies a subtype of osteoarthritis. *Bone Res*. 2019;7:29.

410. Amin AR, Dave M, Attur M, Abramson SB. COX-2, NO, and cartilage damage and repair. *Curr Rheumatol Rep*. 2000;2(6):447-53.

411. Ruscitti P, Cipriani P, Carubbi F, Liakouli V, Zazzeroni F, et al. The role of IL-1 β in the bone loss during rheumatic diseases. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:782382.

412. Kapoor M, Mineau F, Fahmi H, Pelletier J-P, Martel-Pelletier J. Glucosamine sulfate reduces prostaglandin E(2) production in osteoarthritic chondrocytes through inhibition of microsomal PGE synthase-1. *J Rheumatol*. 2012;39(3):635-44.

413. Agard M, Asakrah S, Morici LA. PGE2 suppression of innate immunity during mucosal bacterial infection. *Front. Cell. Infect Microbiol*. 2013;3:45.

414. Takeuchi K, Amagase K. Roles of cyclooxygenase, prostaglandin E2 and EP receptors in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des*. 2018;24(18):2002-2011.

415. Musumeci G, Aiello FC, Szychlinska MA, Di Rosa M, Castrogiovanni P, Mobasher A, Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):6093-6112.

416. Sandell LJ, Xing X, Franz C, Davies S, Chang L-W, Patra D. Exuberant expression of chemokine genes by adult human articular chondrocytes in response to IL-1 β . *Osteoarthritis and Cartilage*. 2008;16:1560-1571.

417. Lepetsos P, Papavassiliou AG. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2016;1862(4):576-591.

418. Lo V, Meadows SE, Saseen J. When should COX-2 selective NSAIDs be used for osteoarthritis and rheumatoid arthritis? *J Fam Pract*. 2006;55(3):260-2.

419. Benito MJ, Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(9):1263-1267.

420. Forni C, Facchiano F, Bartoli M, Pieretti S, Facchiano A, et al. Beneficial role of phytochemicals on oxidative stress and age-related diseases. *Biomed Res Int*. 2019;2019:8748253.

421. Zhang X, Mei Y, Wang T, Liu F, Jiang N, Zhou W, Zhang Y. Early oxidative stress, DNA damage and inflammation resulting from subcutaneous injection of sulfur mustard into mice. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017;55:68-73.

422. Amin AR, Di Cesare PE, Vyas P, Attur M, Tzeng E, Billiar TR, Stuchin SA, Abramson SB. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J Exp Med*. 1995;182(6):2097-102.

423. Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, Evans C. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;15;200(1):142-8.

424. Hsu C-C, Lin C-L, Jou I-M, Wang P-H, Lee J-S. The protective role of nitric oxide-dependent innate immunosuppression in the early stage of cartilage damage in rats. *Role of nitric oxide in cartilage damage*. *Bone Joint Res*. 2017;6(4):253-258.

425. Cao M, Westerhausen-Larson A, Niyibizi C, Kavalkovich K, Georgescu HI, Rizzo CF, Hebda PA, Stefanovic-Racic M, Evans CH. Nitric oxide inhibits the synthesis of type-II collagen without altering Col2A1 mRNA

abundance: prolyl hydroxylase as a possible target. *Biochem J.* 1997;324(1):305-10.

426. Rediske JJ, Koehne CF, Zhang B, Lotz M. The inducible production of nitric oxide by articular cell types. *Osteoarthritis Cartilage.* 1994;2(3):199-206.

427. Manfield L, Jang D, Murrell GA. Nitric oxide enhances cyclooxygenase activity in articular cartilage. *Inflamm Res.* 1996;45(5):254-8.

428. Korsakova SS, Danilov AB, Grigorenko NV. An antinociceptive effect of chondroprotectors: a myth or a reality? *Zh Nevrol Psikhiatr Im.* 2015;115(9):84-89.

429. Zhang Y, Alexander PB, Wang X-F. Tgf- β family signaling in the control of cell proliferation and survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;3;9(4):a022145.

430. Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne RW, Wolf G. TGF- β and fibrosis in different organs – molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta (BBA).* 2009;1792(8):746-756.

431. Maldonado M, Nam J. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis. *Biomed Res Int.* 2013;2013:284873.

432. Sharma AR, Jagga S, Lee S-S, Nam J-S. Interplay between cartilage and subchondral bone contributing to pathogenesis of osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2013;14(10):19805-19830.

433. Hayer S, Bauer G, Willburger M, Sinn K, Alasti F, et al. Cartilage damage and bone erosion are more prominent determinants of functional impairment in longstanding experimental arthritis than synovial inflammation. *Dis Model Mech.* 2016;9(11):1329-1338.

434. Robbins PD, Evans CH, Chernajovsky Y. Gene therapy for arthritis. *Gene Therapy.* 2003;10:902-911.

435. Sarkar S, Cooney LA, Fox DA. The role of T helper type 17 cells in inflammatory arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2010;159(3):225-237.

436. Buhrmann C, Popper B, Aggarwal BB, Shakibaei M. Resveratrol downregulates inflammatory pathway activated by lymphotoxin α (TNF- β) in articular chondrocytes: comparison with TNF- α . PLoS One. 2017;2;12(11):e0186993.

437. Li J, Dong S. Stem cells in cartilage regeneration. Stem Cells Int. 2016;2016:2470351.

438. Haringman JJ, Smeets TJM, Reinders-Blankert P, Tak PP. Chemokine and chemokine receptor expression in paired peripheral blood mononuclear cells and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and reactive arthritis. Ann Rheum Dis. 2006;65(3):294-300.

439. Liu Y-Z, Wang Y-X, Jiang C-L. Inflammation: the common pathway of stress-related diseases. Front Hum Neurosci. 2017;20;11:316.

440. Henrotin Y, Marty M, Mobasheri A. What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis? Maturitas. 2014;78(3):184-7.

441. Vasiliadis HS, Tsikopoulos K. Glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis. World J Orthop. 2017;18;8(1):1-11.

442. Chan PS, Caron JP, Rosa GJM, Orth MW. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E2 in articular cartilage explants. Osteoarthritis Cartilage. 2005;13(5):387-94.

443. Kwan S, Laval T, Pelletier J-P, Vergés J, Lajeunesse D. Chondroitin and glucosamine sulfate in combination decrease the pro-resorptive properties of human osteoarthritis subchondral bone osteoblasts: a basic science study. Arthritis Res Ther. 2017;9(6):R117.

444. Драницина АС, Блохіна ОГ, Короткий ОГ, Дворщенко КО, Остапченко ЛІ. Експресія гена *PTGS2* у клітинах хрящової тканини колінного суглоба щурів за умов остеоартрозу та при введенні біологічно-активних речовин. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2018;24(1):36-42.

445. Dranitsina AS, Dvorshchenko KO, Korotkiy AH, Grebinyk DM, Ostapchenko L.I. Expression of *Ptgs2* and *Tgfb1* genes in rat cartilage cells of the knee under conditions of osteoarthritis. *Cytol Genet.* 2018;52(3):192-197.

446. Korotkyi OH, Vovk AA, Galenova TI, Vovk TB, Dvorschenko KO, Falalyeyeva TM, Ostapchenko LI. Cytokine profile in knee cartilage of rats during monoiodoacetate-induced osteoarthritis and administration of probiotic. *Biopolym Cell.* 2020;36(1):23-35.

447. Tikhova YV, Dvorshchenko KO, Dranitsina AS, Grebinyk DM, Korotkyi OH, Ostapchenko LI. Prooxidant-antioxidant status and *Ptgs2*, *Nos2* genes expression in rat cartilage with osteoarthritis and after the treatment of chondroitin sulphate. *Res J Pharm Biol Chem Sci.* 2017;8(4):994-1001.

448. Korotkyi O, Vovk A, Blokhina O, Dvorschenko K, Falalyeyeva T, Abenavoli L, Ostapchenko L. Effect of chondroitin sulfate on blood serum cytokine profile during carrageenan-induced edema and monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *Rev Recent Clin Trials.* 2019;14(1):50-55.

449. Bolduc JA, Collins JA, Loeser RF. Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis. *Free Radic Biol Med.* 2019;132:73-82.

450. Drevet S, Gavazzi G, Grange L, Dupuy C, Lardy B. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis. *Exp Gerontol.* 2018;111:107-117.

451. Zahan O-M, Serban O, Gherman C, Fodor D. The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis. *Med Pharm Rep.* 2020;93(1):12-22.

452. Poulet B, Beier F. Targeting oxidative stress to reduce osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2016;18:32

453. Chang P-S, Yen C-H, Huang Y-Y, Chiu C-J, Lin P-T. Associations between coenzyme Q10 status, oxidative stress, and muscle strength and endurance in patients with osteoarthritis. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(12):1275.

454. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015;30(1):11-26.

455. Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:755-776.
456. Barnes RP, Fouquerel E, Opresko PL. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mech Ageing Dev.* 2019;177:37-45.
457. Fragkiadaki P, Nikitovic D, Kalliantasi K, Sarandi E, Thanasoula M, et al. Telomere length and telomerase activity in osteoporosis and osteoarthritis. *Exp Ther Med.* 2020;19(3):1626-1632.
458. Egea G, Jiménez-Altayó F, Campuzano V, Na JY. Reactive oxygen species and oxidative stress in the pathogenesis and progression of genetic diseases of the connective tissue. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(10):1013.
459. Fan Z, Wang X, Wang X, Zhang M, Zhao C. MAPK pathway inhibitors attenuated hydrogen peroxide induced damage in neural cells. *BioMed Research International.* 2019;(3):1-10.
460. Gaschlera MM, Brent R. Stockwellb Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;482(3):419-425.
461. Ostalowska A, Birkner E, Wiecha M, Kasperczyk S, Kasperczyk A, Kapolka D, Zon-Giebel A. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(2):139-45.
462. Hajeyah AA, Griffiths WJ, Wang Y, Finch AJ, O'Donnell1 VB. The biosynthesis of enzymatically oxidized lipids. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:591819.
463. Xia Y, Liu X, Zhang L, Zhang J, Li C, Zhang N, Xu H, Li Y. A new Schiff base coordinated copper(II) compound induces apoptosis and inhibits tumor growth in gastric cancer. *Cancer Cell Intern.* 2019;19:81.
464. Ratneswaran A, Sun M-G, Dupuis H, Sawyez C, Borradaile N, Beie F. Nuclear receptors regulate lipid metabolism and oxidative stress markers in chondrocytes. *J Mol Med.* 2017;95:431-444.

465. Pattappa G, Johnstone B, Zellner J, Docheva D, Angele P, YEH. The importance of physioxia in mesenchymal stem cell chondrogenesis and the mechanisms controlling its response. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3):484.

466. Galeano Garces C. Molecular mechanisms modulating chondrogenesis. 2019. University of Twente. <https://doi.org/10.3990/1.9789036548144>.

467. Tiku ML, Allison GT, Naik K, Karry SK. Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003;11(3):159-66.

468. Paździor M, Kiełczykowska M, Kurzepa J, Luchowska-Kocot D, Kocot J, Musik I. The oxidative stress in knee osteoarthritis patients. An attempt of evaluation of possible compensatory effects occurring in the disease development. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(5):150.

469. Campo GM, Avenoso A, Campo S, Ferlazzo AM, Calatroni A. Antioxidant activity of chondroitin sulfate. *Adv Pharmacol*. 2006;3:417-31.

470. Campo GM, Avenoso A, Campo S, Nastasi G, Traina P, D'Ascola A, Rugolo CA, Calatroni A. The antioxidant activity of chondroitin-4-sulphate, in carbon tetrachloride-induced acute hepatitis in mice, involves NF- κ B and caspase activation. *Br J Pharmacol*. 2008;155(6):945-956.

471. Ajisaka K, Oyanagi Y, Miyazaki T, Suzuki Y. Effect of the chelation of metal cation on the antioxidant activity of chondroitin sulfates. *Food Nutrition Science*. 2016:1179-1185.

472. Feng T, Wang J. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. *Gut Microbes*. 2020;12(1):1801944.

473. Перевозкина МГ. Кинетические модели для тестирования антиоксидантов. *Естественные и математические науки в современном мире*. 2013;(9):75-101.

474. Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:6501046.

475. Rehder DS, Borges CR. Cysteine sulfenic acid as an intermediate in disulfide bond formation and nonenzymatic protein folding. *Biochemistry*. 2010;7;49(35):7748-55.

476. Gonos ES, Kapetanou M, Sereikaite J, Bartosz G, Naparło K, Grzesik M, Sadowska-Bartosz I. Origin and pathophysiology of protein carbonylation, nitration and chlorination in age-related brain diseases and aging. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(5):868-901.

477. Höhn A, Jung T, Grune T. Pathophysiological importance of aggregated damaged proteins. *Free Radic Biol Med*. 2014;71:70-89.

478. Carbone DL, Doorn JA, Kiebler Z, Petersen DR. Cysteine modification by lipid peroxidation products inhibits protein disulfide isomerase. *Chemical research in toxicology*. 2005;18(8):1324-1331.

479. Casale J, Crane JS. *Biochemistry, Glycosaminoglycans*. StatPearls [Internet]. 2020. PMID:31335015.

480. Ighodaro OM, Akinloye A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med*. 2018;54(4):287-293.

481. Ostalowska A, Nowak D, Świąchowiec S. Assessment of knee function and biochemical parameters of articular fluid and peripheral blood in gonarthrosis patients following intra-articular administration of hyaluronic acid. *Pol Orthop Traumatol*. 2013;78:173-181.

482. Demicheli V, Moreno DM, Radi R. Human Mn-superoxide dismutase inactivation by peroxynitrite: A paradigm of metal-catalyzed tyrosine nitration: in vitro and in vivo. *Metallomics*. 2018;10(5):679-695.

483. Schiller J, Fuchs B, Arnhold J, Arnold K. Contribution of reactive oxygen species to cartilage degradation in rheumatic diseases: molecular pathways, diagnosis and potential therapeutic strategies. *Curr Med Chem*. 2003;10(20):2123-45.

484. Sumbayev VV, Yasinska IM. Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: implication of reactive oxygen and nitrogen species. *Arch Biochem Biophys*. 2005;15;436(2):406-12.

485. Jallali N, Ridha H, Thrasivoulou C, Butler P, Cowen T. Modulation of intracellular reactive oxygen species level in chondrocytes by IGF-1, FGF, and TGF-beta1. *Connect Tissue Res*. 2007;48(3):149-58.

486. Yui N, Yudoh K, Fujiya H, Musha H. Mechanical and oxidative stress in osteoarthritis. *J Physical Fitness Sports Med*. 2016;5(1):81-86.

487. Ulricha K, Jakoba U. The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radic Biol Molecules*. 2015;20(5):8742-8758.

488. Aoyama K, Nakaki T. Glutathione in cellular redox homeostasis: association with the excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). *Molecules*. 2015;20(5):8742-8758.

489. Wojdas M, Dąbkowska K, Winsz-Szczotka K. Alterations of extracellular matrix components in the course of juvenile idiopathic arthritis. *Metabolites*. 2021;11(3):132.

490. Tappel A. Selenium-glutathione peroxidase: properties and synthesis. *Current topics in cellular regulation*. 2014;24:87-96.

491. Александрова ЛА, Филиппова НА, Субботина ТФ, Алексеевская ЕС, Жлоба АА, Трофимов ВИ. Оценка проявлений окислительно-нитрозильного стресса при системных заболеваниях соединительной ткани. *Ученые записки СПбГМУ им. акад. ИП Павлова*. 2016;23(1):26-28.

492. Singhal SS, Singh SP, Singhal P, Horne D, Singhal J, Awasthi S. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicology and applied pharmacology*. 2015;289(3):361-370.

493. Csala M, Kardon T, Legeza B, Lizák B, Mandl J, et al. On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(5):826-38.

494. Kullich W, Fagerer N, Schwann H. Effect of the NSAID nimesulide on the radical scavenger glutathione S-transferase in patients with osteoarthritis of the knee. *Curr Med Res Opin.* 2007;23(8):1981-6.

495. Bolduc JA, Collins JA, Loesera RF. Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis. *Free Radic Biol Med.* 2019;132:73-82.

496. Carlo MD, Loeser RF. Increased oxidative stress with aging reduces chondrocyte survival: correlation with intracellular glutathione levels. *Arthritis Rheumatol.* 2003;48(12):3419-3430.

497. Zhu S, Makosa D, Miller B, Griffin TM. Glutathione as a mediator of cartilage oxidative stress resistance and resilience during aging and osteoarthritis. *Connective Tissue Research,* 2020;61:1,34-47.

498. Тіхова ЄВ, Дворщенко КО, Короткий ОГ, Верещака ВВ. Дія хондроїтинсульфату натрію на вільнорадикальні процеси у хрящовій тканині щурів при остеоартрозі. *ScienceRise Biol Science.* 2017;7(4):26-30.

499. Вовк А, Короткий О, Янковський Д, Торгалю Є, Дворщенко К. Вміст ТБК-активних сполук і активність антиоксидантних ферментів у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартрозу і тривалого введення мультипробіотика. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій.* 2018;25(2):46-49.

500. Вовк А, Короткий О, Кот Л, Дворщенко К. Окисна модифікація білків у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартрозу та тривалого введення мультипробіотика. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій.* 2019;26(1):50-54.

501. Короткий О, Кот Л, Дворщенко К. Перекисне окиснення ліпідів у хрящовій тканині щурів за умов експериментального остеоартриту та при введенні мультипробіотика. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія.* 2020;80(1):41-44.

502. Короткий О, Кот Л, Дворщенко К, Остапченко Л. Окисна модифікація білків у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту та сумісного введення хондропротектора та мультипробіотика. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. 2020;81(2):64-68.

503. Vovk A, Tymoshenko M, Korotkyi O, Dvorshchenko K, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Effect of probiotic on parameters of glutathione system and lipid oxidation in serum of rats with monoiodoacetate-induced osteoarthritis. *Ukr Biochem J*. 2018;90:118.

504. Fang T, Zhou X, Jin M, Nie J, Li X. Molecular mechanisms of mechanical load-induced osteoarthritis. *International Orthopaedics (SICOT)*. 2021. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00264-021-04938-1>.

505. Mariani E, Pulsatelli L, Facchini A. Signaling pathways in cartilage repair. *Int J Mol Sci*. 2014;15(5):8667-8698.

506. Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signaling. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:672395.

507. Kumavat R, Kumar V, Malhotra R, Pandit H, Jones E, Ponchel F, Biswas S. Biomarkers of joint damage in osteoarthritis: current status and future directions. *Mediators Inflamm*. 2021;2021:5574582.

508. Jayakumar T, Bhavan PS, Sheu J-R. Molecular targets of natural products for chondroprotection in destructive joint diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(14):4931.

509. Choi M-C, Jo J, Park J, Kang HK, Park Y. NF- κ B signaling pathways in osteoarthritic cartilage destruction chemically conjugating polyethylenimine with chondroitin sulfate to promote CD44-mediated endocytosis for gene delivery. *Cells*. 2019;8(7):734.

510. Legendre F, Bauge C, Roche R, Saurel AS, Pujol JP. Chondroitin sulfate modulation of matrix and inflammatory gene expression in IL-1 β -stimulated chondrocytes – study in hypoxic alginate bead cultures. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;6(1):105-14.

511. Campo GM, Avenoso A, Campo S, Traina P, D'Ascola A, Calatroni A. Glycosaminoglycans reduced inflammatory response by modulating Toll-like receptor-4 in LPS-stimulated chondrocytes. *Arch Biochem Biophys*. 2009;491(1-2):7-15.

512. Frey H, Schroeder N, Manon-Jensen T, Iozzo RV, Schaefer L. Biological interplay between proteoglycans and their innate immune receptors in inflammation. *FEBS J*. 2013;280(10):2165-79.

513. Jin M, Iwamoto T, Yamada K, Satsu H, Totsuka M, Shimizu M. Effects of chondroitin sulfate and its oligosaccharides on toll-like receptor-mediated IL-6 secretion by macrophage-like J774.1 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2011;75(7):1283-9.

514. Mukherjee S, Karmakar S, Babu SPS. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *Diseases*. 2016;20(2):193-204.

515. El-Zayat SR, Sibaii H, Mannaa FA. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Nation Res Centre*. 2019;43:187.

516. Lee SI, Kim HS, Koo JM, Kim IH. *Lactobacillus acidophilus* modulates inflammatory activity by regulating the TLR4 and NF- κ B expression in porcine peripheral blood mononuclear cells after lipopolysaccharide challenge. *Br J Nutr*. 2016;115(4):567-75.

517. Shimazu T, Villena J, Tohno M, Fujie H, Hosoya S, et al. Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* elicits anti-inflammatory activity in porcine intestinal epithelial cells by modulating negative regulators of the Toll-like receptor signaling pathway. *Infect Immun*. 2012;80:276-288.

518. Langjahr P, Díaz-Jiménez D, De la Fuente M. Metalloproteinase-dependent TLR 2 ectodomain shedding is involved in soluble Toll-like receptor 2 (sTLR 2) production. *Plos ONE*. 2014;9(12):e104624.

519. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(6):446-58.

520. Dhaouadi T, Sfar I, Haouami Y, Abdelmoula L, Turki S, et al. Polymorphisms of Toll-like receptor-4 and CD14 in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Biomark Res.* 2013;16;1(1):20.

521. Hossain J, Morandi E, Tanasescu R, Frakich N, Caldano M, et al. The soluble form of Toll-like receptor 2 is elevated in serum of multiple sclerosis patients: a novel potential disease biomarker. *Front Immunol.* 2018;14;9:457.

522. Barreto G, Sandelin J, Salem A, Nordström DC, Waris E. Toll-like receptors and their soluble forms differ in the knee and thumb basal osteoarthritic joints. *Acta Orthop.* 2017;88(3):326-333.

523. Kharashy GE, Gowily A, Okda T, Houssen M. Association between serum soluble Toll-like receptor 2 and 4 and the risk of breast cancer. *Mol Clin Oncol.* 2021;14(2):38.

524. Ten Oever J, Kox M, van de Veerdonk FL, Mothapo KM, Slavcovici A, et al. The discriminative capacity of soluble Toll-like receptor (sTLR)2 and sTLR4 in inflammatory diseases. *BMC Immunol.* 2014;15:55.

525. Dulay AT, Buhimschi CS, Zhao G, Oliver EA, Mbele A, Jing S, Buhimschi IA. Soluble TLR2 is present in human amniotic fluid and modulates the intraamniotic inflammatory response to infection. *J Immunol.* 2009;182:7244-7253.

526. Houssen ME, El-Mahdy RH, Shahin DA. Serum soluble Toll-like receptor 2: a novel biomarker for systemic lupus erythematosus disease activity and lupus-related cardiovascular dysfunction. *Int J Rheum Dis.* 2016;19(7):685-92.

527. Frosali S, Pagliari D, Gambassi G, Landolfi R, Pandolfi F, Cianci R. How the intricate interaction among Toll-like receptors, microbiota, and intestinal immunity can influence gastrointestinal pathology. *J Immunol Res.* 2015;2015:489821.

528. Mueller MB, Tuan RS. Anabolic/Catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. *PMR.* 2011;3(6):S3-11.

529. Neish AS. The gut microflora and intestinal epithelial cells: A continuing dialogue. *Microbes and Infection.* 2002;4(3):309-317.

530. Jaruvongvanich V, Sanguankeo A, Jaruvongvanich S, Upala S. Association between *Helicobacter pylori* infection and multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord*. 2016;7:92-7.

531. Gao W, Xiong Y, Li Q, Yang H. Inhibition of toll-like receptor signaling as a promising therapy for inflammatory diseases: a journey from molecular to nano therapeutics. *Front Physiol*. 2017;8:508.

532. Dorrington MG, Fraser IDC. NF- κ B signaling in macrophages: dynamics, crosstalk, and signal integration. *Front Immunol*. 2019;9:10:705.

533. Левченко ЛЮ, Ізмайлова ОВ, Шликова ОА, Кайдашев ІП. поліморфізм 896a/g гена TLR4, а не 1196c/t гена TLR4 та 2258g/a гена TLR2 визначає тяжкий та ускладнений перебіг atopічного дерматиту у дітей. *Цитологія і генетика*. 2013;7:46-53.

534. Moaaz M, Youssry S, Moaz A, Abdelrahman M. Study of Toll-like receptor 4 gene polymorphisms in colorectal cancer: correlation with clinicopathological features. *Immunol Invest*. 2020;49(5):571-584.

535. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 2007;13(9):1050-9.

536. Prohinar P, Rallabhandi P, Weiss JP, Gioannini TL. Expression of functional D299G.T399I polymorphic variant of TLR4 depends more on coexpression of MD-2 than does wild-type TLR4. *J Immunol*. 2010;184(8):4362-7.

537. Singh K, Singh VK, Agrawal NK, Gupta SK, Singh K. Association of Toll-like receptor 4 polymorphisms with diabetic foot ulcers and application of artificial neural network in dfu risk assessment in type 2 diabetes patients. *Biomed Res Int*. 2013;2013:318686.

538. Sillat T, Barreto G, Clarijs P, Soininen A, Ainola M, Pajarinen J, et al. Toll-like receptors in human chondrocytes and osteoarthritic cartilage. *Acta Orthop*. 2013;84:585-592.

539. Lepetsos P, Papavassiliou KA, Papavassiliou AG, Choi M-Cg. Redox and NF- κ B signaling in osteoarthritis. *Free Radic Biol Med*. 2019;132:90-100.

540. Boyce BF, Xiu Y, Li J, Xing L, Yao Z. NF- κ B-mediated regulation of osteoclastogenesis. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2015;27;30(1):35-44.

541. Zhou Y, Cui C, Ma X, Luo W, Zheng SG, Qiu W. Nuclear factor κ B (NF- κ B)–mediated inflammation in multiple sclerosis. *Front Immunol*. 2020;11:391.

542. Natarajan K, Abraham P, Kota R, Isaac B. NF- κ B-iNOS-COX2-TNF α inflammatory signaling pathway plays an important role in methotrexate induced small intestinal injury in rats. *Food Chem Toxicol*. 2018;118:766-783.

543. Milstone DS, Iiyama M, Chen M, O'Donnell P, Davis VM, et al. Differential role of an NF- κ B transcriptional response element in endothelial versus intimal cell VCAM-1 expression. *Circ Res*. 2015;3;117(2):166-77.

544. Головач ИЮ. Ядерный фактор κ B (NF- κ B) как важный патогенетический фактор и новая мишень в лечении ревматических заболеваний. *Рациональна фармакотерапія*. 2012;3(24):46-51.

545. Rigoglou S, Papavassiliou AG. The NF- κ B signalling pathway in osteoarthritis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(11):2580-4.

546. Stabler TV, Huang Z, Montell E, Vergés J, Kraus V.B. Chondroitin sulphate inhibits NF- κ B activity induced by interaction of pathogenic and damage associated molecules. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017;25(1):166-174.

547. Duan L, Ma B, Liang Y, Chen J, Zhu W, Li M, Wang D. Cytokine networking of chondrocyte dedifferentiation in vitro and its implications for cell-based cartilage therapy. *Am J Transl Res*. 2015;15;7(2):194-208.

548. van Baarlen P, Wells JM, Kleerebezem M. Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. *Trends Immunol*. 2013; 34(5):208-15.

549. Asgari F, Falak R, Teimourian S, Pourakbari B, Ebrahimnezhad S, Shekarabi M. Effects of oral probiotic feeding on Toll-like receptor gene expression of the chicken's Cecal Tonsil. *Rep Biochem Mol Biol*. 2018;6(2):151-157.

550. Magnusson K, Turkiewicz A, Englund M. Nature vs nurture in knee osteoarthritis - the importance of age, sex and body mass index. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019;27(4):586-592.

551. Vina ER, Kwok CK. Epidemiology of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2018;30:160-167.

552. Castañeda S, Vicente EF. Osteoarthritis: more than cartilage degeneration. *Clinic Rev Bone Miner Metab*. 2017;15:69-81.

553. Ashkavand Z, Malekinejad H, Vishwanath BS. The pathophysiology of osteoarthritis. *J Pharmacy Research*. 2013;7:132-138.

554. Zhang B, Zhang Y, Wu N, Li J, Liu H, Wang J. Integrated analysis of COL2A1 variant data and classification of type II collagenopathies. *Clinical Genetics*. 2020;97(3):383-395.

555. Chen A, Fertala A, Abboud J, Wang M, Rivlin M, Beredjikian PK. The molecular basis of genetic collagen disorders and its clinical relevance. *J Bone Joint Surg Am*. 2018;100(11):976-986.

556. Barreto G, Manninen M, Eklund KK. Osteoarthritis and Toll-Like receptors: when innate immunity meets chondrocyte apoptosis. *Biology (Basel)*. 2020;9(4):65.

557. Dieterich W, Schink M, Zopf Y. Microbiota in the gastrointestinal tract. *Med Sci (Basel)* 2018;6(4):116.

558. Mobasheri A, Rayman MP, Gualillo O, Sellam J, van der Kraan P, Fearon U. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(5):302-311.

559. Kandahari AM, Yang X, Dighe AS, Pan D, Cui Q. Recognition of immune response for the early diagnosis and treatment of osteoarthritis. *J Immunol Res*. 2015;2015:192415.

560. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in inflammatory disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):6008.

561. El-Zayat SR, Sibaii H, Manna FA. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent*. 2019;43:187.

562. Lambert C, Zappia J, Sanchez C, Florin A, Dubuc J-E, Henrotin Y. The damage-associated molecular patterns (DAMPs) as potential targets to treat osteoarthritis: perspectives from a review of the literature. *Front Med (Lausanne)*. 2021;7:607186.

563. Blasioli DJ, Kaplan DL. The roles of catabolic factors in the development of osteoarthritis. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014;20(4):355-363.

564. Hall AC. The role of chondrocyte morphology and volume in controlling phenotype – implications for osteoarthritis, cartilage repair, and cartilage engineering. *Curr Rheumatol Rep*. 2019;21:38.

565. HeY, Li Z, Alexander PG, Ocasio-Nieves BD, Yocum L, Lin H, Tuan RS. Pathogenesis of osteoarthritis: risk factors, regulatory pathways in chondrocytes, and experimental models. *Biology (Basel)*. 2020;9(8):194.

ДОДАТОК А

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. **Короткий ОГ**, Воейков АІ, Фалалєєва ТМ, Берегова ТВ. Дослідження підгострої токсичності хондроїтин сульфату натрію за показниками морфо-функціонального стану печінки у щурів та кролів. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2016;74(2):66-72.
2. **Короткий ОГ**, Воейков АІ, Фалалєєва ТМ, Берегова ТВ, Остапченко ЛІ. Дослідження підгострої токсичності хондроїтинпротектора «Драстоп» за показниками аналізу та лейкоцитарної формули крові у щурів. Вісник проблем біології і медицини. 2016;126(1):84-87.
3. Тіхова ЄВ, Дворщенко КО, **Короткий ОГ**, Фалалєєва ТМ, Берегова ТВ. Стан суглобових хрящів при артрозі та після введення тест-зразка «Драстоп». Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. 2017;1:99-105.
4. Тіхова ЄВ, Дворщенко КО, **Короткий ОГ**, Верещака ВВ. Дія хондроїтинсульфату натрію на вільнорадикальні процеси у хрящовій тканині щурів при остеоартрозі. Scientific Journal «ScienceRise: Biological Science». 2017;7(4):26-30.
5. Драницина АС, Блохіна ОГ, **Короткий ОГ**, Дворщенко КО, Остапченко ЛІ. Експресія гена *PTGS2* у клітинах хрящової тканини колінного суглоба щурів за умов остеоартрозу та при введенні біологічно-активних речовин. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2018;24(1):36-42.
6. Вовк А, **Короткий О**, Янковський Д, Торгалю Є, Дворщенко К. Вміст ТБК-активних сполук і активність антиоксидантних ферментів у

сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартрозу і тривалого введення мультипробіотика. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2018;25(2):46-49.

7. Вовк А, **Короткий О**, Кот Л, Дворщенко К. Окисна модифікація білків у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартрозу та тривалого введення мультипробіотика. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2019;26(1):50-54.

8. **Короткий О**, Кот Л, Дворщенко К. Перекисне окиснення ліпідів у хрящовій тканині щурів за умов експериментального остеоартриту та при введенні мультипробіотика. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. 2020;80(1):41-44.

9. **Короткий О**, Кот Л, Дворщенко К, Остапченко Л. Окисна модифікація білків у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту та сумісного введення хондропротектора та мультипробіотика. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. 2020;81(2):64-68.

*Статті у наукових фахових виданнях України,
які входять до міжнародних наукометричних баз даних:*

10. Dranitsina AS, Dvorshchenko KO, **Korotkiy AH**, Grebinyk DM, Ostapchenko L.I. Expression of Ptgs2 and Tgfb1 genes in rat cartilage cells of the knee under conditions of osteoarthritis. Cytol Genet. 2018;52(3):192-197. (**Q4 – JCR; Web of Science; Q4 – CJR; Scopus**).

11. **Korotkiy O**, Dvorschenko KO, Vovk A, Dranitsina A, Tymoshenko M, Kot L, Ostapchenko L. Effect of probiotic composition on oxidative/antioxidant balance in blood of rats under experimental osteoarthritis. Ukr Biochem J. 2019;91(6):49-58 (**Q4 – CJR; Scopus**).

12. Dranitsina AS, Dvorschenko KO, **Korotkiy OH**, Vovk AA, Falalyeyeva TM, Grebinyk DM, Ostapchenko LI. Expression of Nos2 and Acan

genes in rat knee articular cartilage in osteoarthritis. *Cytol Genet.* 2019;53(6):481-488. (**Q4 – JCR; Web of Science; Q4 – CJR; Scopus**).

13. **Korotkyi OH**, Vovk AA, Galenova TI, Vovk TB, Dvorschenko KO, Falalyeyeva TM, Ostapchenko LI. Cytokine profile in knee cartilage of rats during monoiodoacetate-induced osteoarthritis and administration of probiotic. *Biopolym Cell.* 2020;36(1):23-35. (**Q4 – CJR; Scopus**).

14. **Korotkyi OH**, Luhovska TV, Serhiychuk TM, Dvorschenko KO, Falalyeyeva TM, Ostapchenko LI. The gut microbiota of rats under experimental osteoarthritis and administration of chondroitin sulfate and probiotic. *Microbiol. Zh.* 2020;82(6):64-73. (**Scopus**).

15. **Korotkyi O**, Dvorshchenko K, Kot L, Vovk T, Tymoshenko M, Ostapchenko L. Oxidative/antioxidant balance and matrix metalloproteinases level in the knee cartilage of rats under experimental osteoarthritis and probiotic administration. *Ukr Biochem J.* 2020;92(6):126-136. (**Q4 – CJR; Scopus**).

Статті в іноземних виданнях:

16. Tikhova YV, Dvorshchenko KO, Dranitsina AS, Grebinyk DM, **Korotkyi OH**, Ostapchenko LI. Prooxidant-antioxidant status and *Ptgs2*, *Nos2* genes expression in rat cartilage with osteoarthritis and after the treatment of chondroitin sulphate. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Science.* 2017;8(4):994-1001. (**Q3 – JCR; Web of Science**).

17. **Korotkyi O**, Vovk A, Kuryk O, Dvorschenko K, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Co-administration of live pro-biotics with chondroprotector in management of experimental knee osteoarthritis. *Georgian Med News.* 2018;279:191-196. (**Q4 – CJR; Scopus**).

18. **Korotkyi O**, Vovk A, Blokhina O, Dvorschenko K, Falalyeyeva T, Abenavoli L, Ostapchenko L. Effect of chondroitin sulfate on blood serum cytokine profile during carrageenan-induced edema and monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *Rev Recent clin Trials.* 2019;14(1):50-55. (**Web of Science; Q3 – CJR; Scopus**).

19. **Korotkyi OH**, Vovk AA, Dranitsina AS, Falalyeyeva TM, Dvorschenko KO, Fagoonee S, Ostapchenko LI. The influence of probiotic diet and chondroitin sulfate administration on *Ptgs2*, *Tgfb1* and *Col2a1* expression in rat knee cartilage during monoiodoacetate-induced osteoarthritis. *Minerva Med.* 2019;110(5):419-424. (**Q1 – JCR; Web of Science; Q3 – CJR; Scopus**).

20. **Korotkyi O**, Vovk A, Galenova T, Vovk T, Dvorschenko K, Luzzi F, Abenavoli L, Kobyliak N, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Effects of probiotic on serum cytokines and matrix metalloproteinases profiles during monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *Minerva Biotechnol.* 2019;31(2):68-73. (**Q4 – JCR; Web of Science; Q4 – CJR; Scopus**).

21. **Korotkyi O**, Kyriachenko Y, Kobyliak N, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Crosstalk between gut microbiota and osteoarthritis: A critical view. *J Funct Foods.* 2020;68:103904. (**Q1 – JCR; Web of Science; Q1 – CJR; Scopus**) (*оглядова стаття*).

22. **Korotkyi O**, Dvorshchenko K, Falalyeyeva T, Sulaieva O, Kobyliak N, Abenavoli L, Fagoonee S, Pellicano R, Ostapchenko L. Combined effects of probiotic and chondroprotector during osteoarthritis in rats. *Panminerva Med.* 2020;62(2):93-101. (**Q1 – JCR; Web of Science; Q3 – CJR; Scopus**).

23. **Korotkyi O**, Huet A, Dvorschenko K, Kobyliak N, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Probiotic composition and chondroitin sulfate regulate TLR-2/4-mediator NF- κ B inflammatory pathway and cartilage metabolism in experimental osteoarthritis. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2021; <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09735-7>. (**Q2 – JCR; Web of Science; Q3 – CJR; Scopus**).

Методичні рекомендації:

24. Остапченко ЛІ, Дворщенко КО, **Короткий ОГ**, Фалалеева ТМ, Кот ЛІ, Драницина АС. Методичні рекомендації «Використання хондропротекторів та мультипробіотиків для корекції патології суглобів» [Затверджено на засіданні Вченої ради Навчально-накового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса

Шевченка, протокол №6 від 14 грудня 2020 року], К: ТОВ «Kh&Sh НМ», 2020. 30 с.

Тези наукових доповідей:

25. Тіхова ЄВ, Ашпін МК, **Короткий ОГ**, Тимошенко МО. Дія хондропротекторного препарату на стан глутатионової системи у сироватці крові щурів з експериментальним артрозом. *IV Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих вчених «Інновації та перспективи сучасної медицини», ВІМСО 2017. 5-7 квітня 2017 року; Чернівці, Україна. Всеукраїнський медичний журнал студентів і молодих вчених «Хист». 2017;19:57.*

26. Tikhova Y, **Korotkyi O**, Kovelska Y, Dvorshchenko K. Positive effect of chondroitin sulfate on prooxidant-antioxidant balance in rat cartilage tissue in the treatment of osteoarthritis. *XIII міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 25-27 квітня 2017 року; Львів, Україна. Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка; 2017. С.73.*

27. **Korotkyi O**, Falalyuyeyeva T, Dvorshchenko K, Savchuk O, Beregova T, Ostapchenko L. Chondroprotector “Drastop” suppression of inflammatory responses in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats. *51th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, 17-20 May 2017; Genoa, Italy. European Journal of Clinical Investigation. 2017;47(1):167. (Q2 – JCR; Web of Science).*

28. Вовк АА, **Короткий ОГ**, Блохіна ОГ, Фалалєєва ТМ, Дворщенко КО, Берегова ТВ, Остапченко ЛІ. Показники вільно радикального окислення ліпідів та білків у хрящовій тканині щурів за умов експериментального остеоартриту. *Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання медицини і біології», 1 червня 2017 року; Полтава, Україна. Полтава: Астроя; 2017. С.6-7.*

29. Vovk A, **Korotkyi O**, Tikhova Ye, Dranitsina A, Dvorshchenko K. Effect of chodroprotector on cartilage tissue repairing during experimental

osteoarthritis in rats. *Third Kyiv International Symposium Smooth Muscles Physiology, Biophysics & Pharmacology: from genes and molecules to functions, disorders and their novel treatment opportunities*. 18-22 september 2017; Kyiv - Lutsk, Ukraine. Taras Shevchenko National University of Kyiv, 2017. P.74.

30. Вовк АА, **Короткий ОГ**, Хілько ВВ, Дворщенко КО, Остапченко ЛІ. Стан антиоксидантних ферментативних ферментів в хрящовій тканині суглобів щурів за умов експериментального остеоартриту. *VIII Міжнародна наукова конференція «Психофізіологічні та функції в нормі і патології», присвячена 175-річчю кафедри фізіології та анатомії людини та тварин Київського національного університету імені Тараса Шевченка*, 17-20 жовтня 2017 року; Київ, Україна. Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка; 2017. С.28.

31. Nehrai D, Blokhina O, **Korotkyi O**, Dranitsina A, Dvorshchenko K. The effect of chondroitin sulfate on levels of IL-1 β , TGF- α and Ptgs2 in the serum of rats during MIA-induced osteoarthritis. *XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine*, 16-18 May 2018; Kyiv, Ukraine. *Biopolymers and Cell*. 2018;34(2):158.

32. **Korotkyi O**, Vovk A, Dranitsina A, Dvorshchenko K, Grebinyk D, Falalyeyeva T, Beregova T, Ostapchenko L. The combined effect of probiotic and chondroprotector on genes expression Ptgs2, Tgfb1 and Col2a1 in the cartilage of rats with monoiodoacetate-induced osteoarthritis. *The 43rd FEBS Congress*, 7-12 july 2018; Prague, Czech Republic. *FEBS OPEN BIO*. 2018;8(1):249. (**Q2 – JCR; Web of Science**)

33. **Korotkyi O**, Vovk A, Halenova T, Dvorshchenko K, Savchuk O, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. The combined effect of probiotic and chondroitin sulfate on the levels of cytokines and matrix metalloproteinases in the serum of rats with monoiodoacetate-induced osteoarthritis. *The 5th European Congress of Immunology, ECI 2018*, 2-5 september 2018; Amsterdam, The Netherlands. 2018. P.435.

34. Vovk A, Tymoshenko M, **Korotkyi O**, Dvorshchenko K, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Effect of probiotic on parameters of glutathione system and lipid oxidation in serum of rats with monoiodoacetate-induced osteoarthritis. *FEBS3+ Meeting XI International Parnas Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”*, 3-5 September 2018; Kyiv, Ukraine. *The Ukr Biochem J.* 2018;90:118.

35. Вовк А, Янковський Д, **Короткий О**, Дворщенко К. Дія пробіотику на вільнорадикальні процеси у хрящовій тканині щурів за умов експериментального остеоартриту. *XVII Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience Advances»*, 23-25 квітня 2019 року; Київ. Україна. Київ: СПОЛОМ; 2019. С.53-54.

36. Yurchenko O, Vovk A, **Korotkyi O**, Dvorschenko K. The effect of probiotic composition and chondroitin sulfate on the process of lipid peroxidation in blood serum of rats with experimental osteoarthritis. *XIV Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття»*, 20 травня 2020 року; Київ. Україна. Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, вид-во «Політехніка»; 2020. С.102.

37. Івасишина МТ, Сергійчук ТМ, **Короткий ОГ**. Мікробіота товстої кишки щурів за модельованого остеоартрозу. *VII Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень»*, 12-13 листопада 2020 року; Київ. Україна. Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка; 2020. С.131-134.