

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

**КОРОТКИЙ ОЛЕКСАНДР ГРИГОРОВИЧ**

УДК 616.72-018.3:615.2/.3:577.121

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

03.00.04 – біохімія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України

**Науковий консультант:** доктор біологічних наук, професор  
**Остапченко Людмила Іванівна,**  
Київський національний університет  
імені Тараса Шевченка МОН України,  
директор ННЦ «Інститут біології та медицини»

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Калачнюк Лілія Григорівна,**  
Національний університет біоресурсів і  
природокористування України МОН України,  
професор кафедри біохімії і фізіології тварин  
імені академіка М.Ф. Гулого

доктор біологічних наук, професор  
**Калінін Ігор Васильович,**  
Національний педагогічний університет  
імені М.П. Драгоманова МОН України,  
завідувач кафедри хімії

доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Король Леся Вікторівна,**  
Державна установа «Інститут нефрології  
НАМН України», завідувач лабораторії біохімії

Захист дисертації відбудеться «14» травня 2021 року о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці імені М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала 12  
Автореферат розісланий «13» квітня 2021 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24

Н.Г. Ракша

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**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 основі ОА лежить ураження всіх компонентів суглобу: в першу чергу, хряща, а також субхондральної кістки, синовіальної оболонки, зв'язок, капсули та навколосуглобових м'язів. Розвиток ОА безпосередньо пов'язаний з неконтрольованими запальними процесами та порушеннями метаболізму, наслідком яких є біль та інвалідність [Favazzo L., et al., 2020].

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 [Boer S.G., et al., 2019]. ОА є найпоширенішою причиною хронічного болю в Європі (34%), що обумовлює значні економічні та соціальні витрати для суспільства [Sánchez Romero E.A., et al., 2021]. 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 [Ghourī A., et al., 2019]. 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 [Bishnoi M., et al., 2016]. Саме зі зниженням вмісту ХС, який виконує не тільки структурну функцію в суглобі, а й виявляє антиоксидантні та протизапальні властивості [Lila A., et al., 2018], 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 [Li Y., et al., 2016]. Незважаючи на те, що в останні роки значно розширилися уявлення щодо участі

дисбіозу кишкової мікробіоти в ревматоїдному артриті [Wells P.M., et al., 2020], 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 [Boer C.G., et al., 2019; Нао Х., et al., 2021]. 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 [Янковський Д.С. та ін., 2018; Xu С., et al., 2019].

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 NFκB запального шляху.

**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 та 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 суглобу 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 за експериментального остеоартриту при введенні хондроїтин 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, розчинних форм Toll-подібних рецепторів, концентрації простагландину E<sub>2</sub>, матриксних металопротеїназ (ММП) 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 локального 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 у регуляцію TLR-2/4-опосередкованим запальним шляхом NF-κB, що активує катаболічні процеси, зі збільшенням прозапальних медіаторів і металопротейназ, а також призводить до окисного стресу 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 та TLR-2/4-опосередкованого NFκB-залежного запального шляху в ремоделюванні хрящової тканини за експериментального ОА, а також запропоновано на основі доведеної експериментальної ефективності методичні рекомендації 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: 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), XVII Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience Advances» (Київ, 2019), VII Всеукраїнській науково-практичній 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.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Матеріали та методи досліджень

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 положень Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV «Про захист тварин від жорсткого поводження», 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). Результати роботи 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. Усі прилади та обладнання, використані для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

*Схема експерименту.* Усіх тварин було розподілено на вісім експериментальних груп по 14 у кожній. Тваринам I контрольної групи (Контроль) в перший день вводили в колінну зв'язку 0,05 мл 0,9% розчину NaCl та щоденно протягом 14 діб з 8-ої по 22-гу добу вводили перорально 1 мл питної води в перерахунку на 1 кг маси тіла тварини; 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 терапевтичну дозу, 3 мг/кг, препарату «Драстоп» («World Medicine», Велика Британія), діючою речовиною якого є ХС. Щурам III групи (ПБ) протягом 14 діб з 8-ої по 21-шу добу експерименту перорально вводили у дозі 140 мг/кг мультипробіотик «Симбітер<sup>®</sup> ацидофільний концентрований» («О.Д.Пролісок», Україна), розведений у 1 мл питної води на 1 кг маси тварини. ПБ «Симбітер<sup>®</sup>» містить біомасу живих клітин симбіозу 17 штамів фізіологічних для травного тракту ссавців мікроорганізмів, що належать до 10 видів: *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *P. acidipropionici*, *Lactococcus lactis*, *Acetobacter aceti*, *Streptococcus salivarius*. 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: одноразово в перший день досліджень введено у колінний суглоб (в інфрапателлярний лігамент) правої задньої кінцівки 1 мг натрію моноіодацетат (МІА) («Sigma», Франція), розчиненого у 0,05 мл 0,9% розчину NaCl [Baragi V.M., 2009] та щоденно протягом 14 діб з 8-ої по 22-гу добу вводили

перорально 1 мл питної води в перерахунку на 1 кг маси тіла тварини; з 2-го дня щоденно протягом 28 діб внутрішньом'язево вводили фізіологічний розчин. Тваринам I-IV груп (окреме та комбіноване введення ПБ і ХС) замість МЙА одноразово в перший день досліджень вводили в колінний суглоб (у інфрапателлярний лігамент) правої задньої кінцівки рівний об'єм 0,9% розчину NaCl. Щурам VI групи (ОА+ХС) вводили в перший день експерименту МЙА, розчинений у 0,05 мл 0,9% розчину NaCl, та щоденно протягом 28 діб внутрішньом'язево в дозі 3 мг/кг ХС. Щурам VII групи (ОА+ПБ) вводили в перший день експерименту МЙА, розчинений у 0,05 мл 0,9% розчину NaCl, та щоденно протягом 14 діб з 8-ої по 22-гу добу ПБ в дозі 140 мг/кг. Тваринам VIII групи (ОА+ХС+ПБ) вводили в перший день експерименту МЙА, розчинений у 0,05 мл 0,9% розчину NaCl, та щоденно з 2-го дня протягом 28 діб ХС внутрішньом'язево в дозі 3 мг/кг, і щоденно протягом 14 діб з 8-ої по 22-гу добу перорально в дозі 140 мг/кг ПБ. Евтаназію тварин проведено на 30 добу після початку експерименту методом декапітації згідно протоколу етичного комітету, після чого швидко зроблено забір крові та хрящової тканини колінних суглобів на холоді для подальших досліджень. Загальна кількість тварин, залучених до експериментальної роботи в чотирьох серіях, становила 448 особин.

Видовий та кількісний склад мікробіоти товстої кишки визначено шляхом висіву відповідних розведень на диференційно-діагностичні середовища. Ідентифікацію виділених мікроорганізмів здійснено за морфологічними, тинкторіальними та фізіолого-біохімічними властивостями. Гістологічний аналіз хрящів колінних суглобів щурів проведено за стандартною методикою [Mescher A.L., 2009]. Для фарбування мікропрепаратів зрізів хрящів використано метод подвійного фарбування гематоксиліном і еозином за Бюмером [Лили Р., 1969]. Мікрофотографії препаратів хрящової тканини (збільшення×200) отримано за допомогою мікроскопу Axioskop 40 з фотокамерою AxioCam MRc5 («Carl Zeiss», Німеччина). Імуногістохімічне (ІГХ) дослідження експресії TLR-2, TLR-4, та NF-κB проведено згідно стандартної методики з використанням відповідних специфічних первинних моноклональних антитіл [Sillat T., et al., 2013]. При інтерпретації результатів ІГХ аналізу враховувано компартмент, інтенсивність експресії маркерів та кількість імунопозитивних клітин. Вміст цитокінів (ІЛ-1β, ФНП-α, ІЛ-6, ІЛ-8, ІНФ-γ, ІЛ-4, ІЛ-10, ТФР-β, ІФР-1) та матриксних металопротеїназ (ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8), концентрації біохімічних маркерів метаболізму хрящової тканини (COMP, ACAN, CHI3L1, CTSK), простагландину E<sub>2</sub> та вміст розчинних форм TLR-2 і TLR-4 визначено методом імуноферментного аналізу з використанням комерційних наборів ELISA згідно інструкцій виробника [Towbin H., 1994; Crowther J.R., 2001; Buss H., 1997]. Вміст супероксидного радикалу визначено з використанням ХТТ (2,3-біс-(2-метокси-4-нітро-5-сульфофеніл)-2Н-тетразолій-5-карбоксамід) як акцептора електронів [Able K., 1998; Sutherland H., 1997]. Вміст пероксиду водню визначено у системі сорбітол-ксиленол оранж спектрофотометрично згідно з [Jiang Z., 1990; Nourooz-Zadeh J., 1994]. Вміст ДК

та ШО визначено в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометричним та флуориметричним методами [Гаврилов В., 1988; Колесова О., 1984]. Вміст ТБК-активних продуктів визначено за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [Орехович В., 1977]. Вміст продуктів ОМБ визначено за рівнем карбонільних похідних, які виявляються в реакції з 2,4-динітрофенілгідразином [Дубініна Е., 1995]. Супероксиддисмутазу (СОД) активність оцінено за здатністю ферменту конкурувати із нітросинім тетразолієм за супероксидні радикали [Чевари С., 1985]. Каталазу (КАТ) активність визначали за кількістю незруйнованого пероксиду водню у пробі, який при взаємодії з солями молібдену утворює стійкий забарвлений комплекс [Королюк М., 1988]. Активність глутатіонзалежних ферментів визначено згідно з [Власова С., 1990]. Вміст відновленого та окисненого глутатіону визначено флуориметричним методом з використанням ортофталевого альдегіду за різних значень рН середовищ [Hissin P., 1976; Mokrasch L., 1984]. Концентрацію білка визначено за методом Лоурі [Lowry O., 1951]. Експресію генів у сироватці крові та хрящовій тканині суглоба щурів проведено за допомогою методу кількісної ПЛР зі зворотною транскрипцією. РНК отримано за методом [Chomczynski P., 2006]. Синтез кДНК та ПЛР виконано в реальному часі (Real-time PCR, кПЛР). У реакціях використано послідовності праймерів, розроблені за допомогою онлайн ресурсів NCBI Primer BLAS. Статистичну обробку результатів досліджень проведено загальноприйнятими методами варіаційної статистики, з використанням програмних пакетів GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США) та Statistica 7.0. 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 досліджень та їх обговорення

**Видовий та кількісний склад мікробіоти кишечника щурів за умов експериментального остеоартриту.** Спираючись на значну кількість даних, які свідчать, що дисбіоз кишечника корелює з патогенезом ряду метаболічних та запальних захворювань, можна припустити, що зміни у мікробіоті кишечника можуть також бути пов'язані з прогресуванням ОА. В експериментальних дослідженнях нами визначено видовий та кількісний склад фекальної мікробіоти в щурів з експериментальним ОА та при введенні ХС і ПБ. Результати дослідження показали зниження кількості *Bifidobacterium* та *Lactobacillus* у 1,1 та 1,3 раза ( $p \leq 0,05$ ) відповідно, порівняно з контрольними значеннями, в групі щурів з експериментальним ОА, підвищення кількості *Clostridium spp.* та лактозо-негативної *Escherichia coli* в 1,9 раза ( $p \leq 0,05$ ), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, умовно патогенних ентеробактерій та дріжджоподібних грибів

роду *Candida* – в 1,6; 1,4; 8 та 1,7 раза ( $p \leq 0,05$ ) відповідно, порівняно з контрольними значеннями (рис.1). Отримані дані можуть свідчити про дисбіотичний стан товстої кишки в щурів за умов розвитку ОА, як результат хронічного системного запального процесу, пов'язаного з місцевими дегенеративними змінами хряща. Введення ХС та ПБ сприяло відновленню мікробіоти товстої кишки: збільшувалася кількість *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* та зменшувалася кількість патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів. Показано синергічний позитивний ефект комбінованого застосування ХС та ПБ за умов експериментального ОА, який може бути пов'язаний як із безпосереднім впливом корисної мікробіоти та її метаболітів на перешкоджання розвитку дисбіозу товстої кишки та запального процесу, так і з можливим подальшим опосередковано регулюючим впливом на TLR-2/4-залежний NF-κB запальний шлях і метаболізм хрящової тканини.

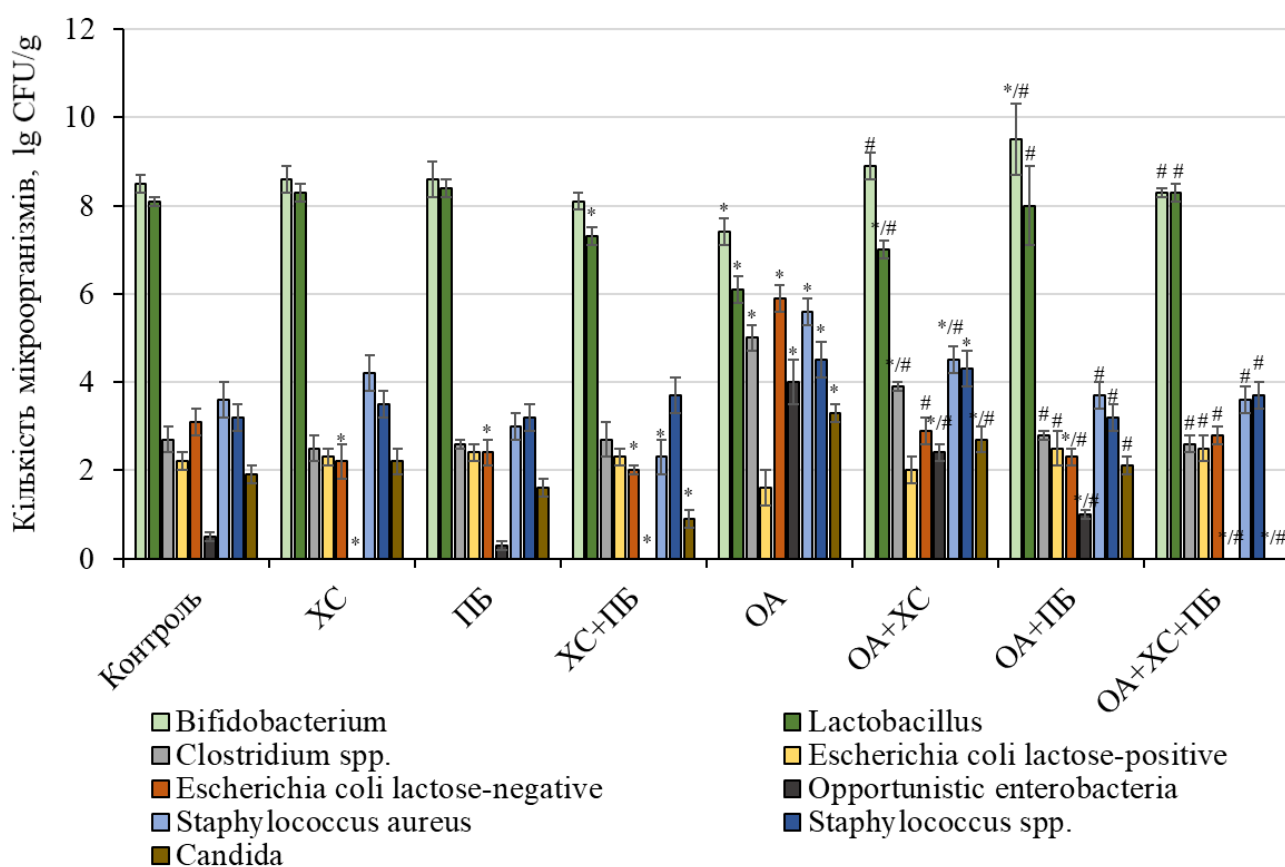


Рис. 1. Видовий та кількісний склад фекальної мікробіоти щурів за експериментального остеоартриту при введенні хондроїтин сульфату та пробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=14$ ; \* –  $p \leq 0,05$  відносно контрольних тварин; # –  $p \leq 0,05$  відносно тварин групи ОА)

**Гістологічний аналіз колінних суглобів.** У ході гістологічних досліджень колінних суглобів щурів з експериментальним ОА виявлено запальні, гіперпластичні та деструктивно-дистрофічні зміни у хрящовій та субхондральній кістковій тканинах. Хрящ втрачав волокнисту структуру, сполучна тканина повністю заміщувала його поверхню, кількість і розмір хондроцитів

зменшувалися, спостерігалися скупчення запального інфільтрату. Синовіальна тканина була гіперплазована з незначними фіброзними змінами (рис. 2Б). Введення ХС за умов ОА зменшувало вираженість дегенеративних змін суглоба (рис. 2В). За умов введення ПБ тваринам з ОА практично не відбувалося відновлення структури хряща, спостерігалися деструктивні зміни та постнекротичні дефекти, присутність хондроцитів глибокого шару. При цьому хрящова тканина заміщувала фіброзну, однак вона охоплювала меншу площу, порівняно з гістологічними зразками групи ОА (рис. 2Г). При сумісному введенні ХС та ПБ щурам з експериментальним ОА встановлено найбільш значимі гістологічні зміни: на мікрорізах тканини колінного суглоба не спостерігалися фіброзні елементи та постнекротичні дефекти хряща, кількість хондроцитів наближалася до норми, в глибокому шарі була відсутня їх гіпертрофія (рис. 2Д). Таким чином, гістологічні дослідження показали, що комбіноване введення препарату на основі ХС та ПБ найбільш виражено сприяють відновленню стану суглобових тканин щурів з експериментальним ОА.

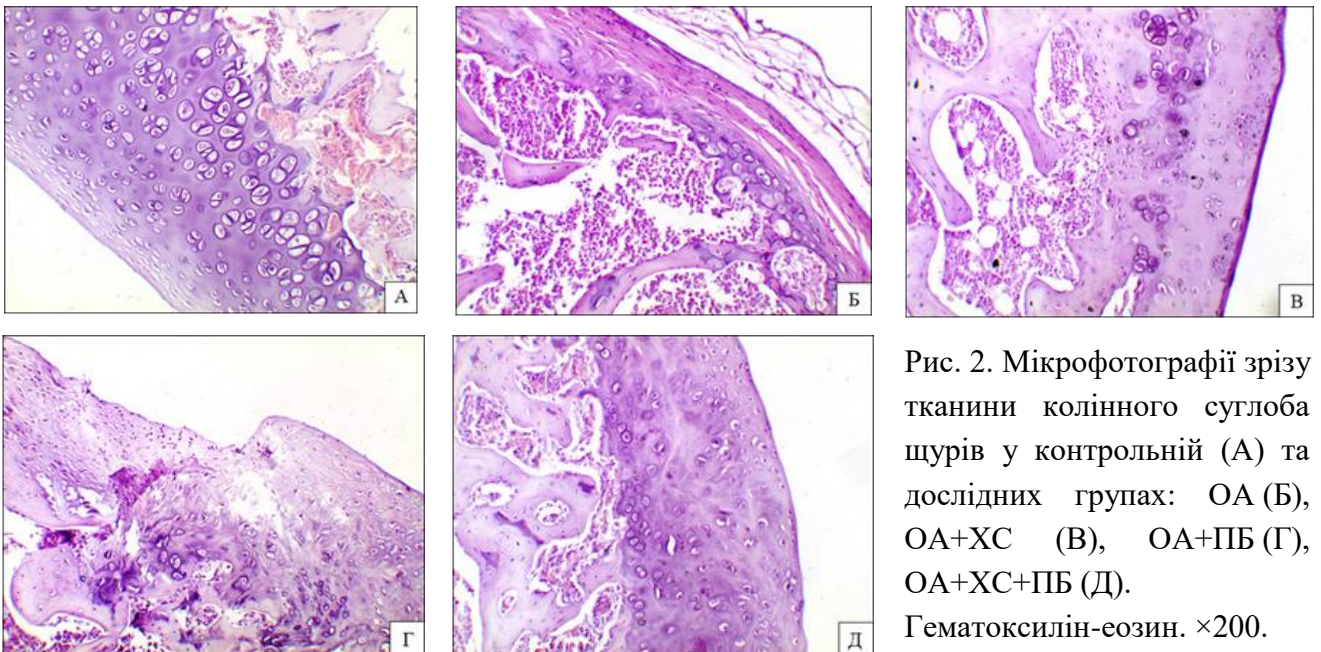


Рис. 2. Мікрофотографії зрізу тканини колінного суглоба щурів у контрольній (А) та дослідних групах: ОА (Б), ОА+ХС (В), ОА+ПБ (Г), ОА+ХС+ПБ (Д).

Гематоксилін-еозин.  $\times 200$ .

### **Визначення біохімічних маркерів метаболізму хрящової тканини.**

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 протеогліканів (в основному агрекану), гіалуронової кислоти, катіонів і води. Хондроцити регулюють ремоделювання хрящової тканини, синтез і деградацію агрекану та інших компонентів хрящового матриксу. У нормі ці процеси знаходяться у стані рівноваги, однак при ОА відбувається порушення обміну хрящової тканини у бік переважання катаболічних процесів над анаболічними. Тому визначення рівня компонентів хрящової тканини, серед яких олігомерний матриксний білок хряща COMP, агрекан, катепсин К (CTSK), UKL-40 – хрящовий глікопротеїн-39 (CHI3L1), MMP, які відіграють ключову

роль у процесах деградації та ремоделювання хряща, може слугувати важливим маркером метаболічних змін, які відбуваються в хрящовому матриксі, зокрема на ранніх стадіях розвитку захворювання.

У ході дослідження показано, що концентрація COMP, ACAN, CTSK та CHI3L1 у сироватці крові щурів з експериментальним ОА зростала в 3,4; 3; 2,5 та 2,2 раза ( $p \leq 0,05$ ) відповідно, порівняно з контрольними значеннями (рис. 3). За умов введення ХС концентрація відповідних білків зменшувалася в 1,9; 1,5; 1,5, та в 1,4 раза ( $p \leq 0,05$ ) відповідно відносно групи тварин з ОА, однак лишалася значимо вищою за контроль. При введенні ПБ тваринам з експериментальним ОА концентрація COMP, ACAN, CHI3L1 та CTSK була нижчою в 1,5; 1,3; 1,4; та 1,4 раза ( $p \leq 0,05$ ) відповідно, ніж у тварин групи ОА, але значення перебували вище контролю. За комбінованої дії ХС та ПБ у щурів із експериментальним ОА концентрація відповідних білків зменшувалася у 2,5; 2,3; 2; та в 1,8 раза ( $p \leq 0,05$ ) відповідно відносно тварин з ОА, однак лишалася достовірно вищою за контрольні значення (рис. 3). Отже, ХС та ПБ здатні відновлювати, при сумісній дії більш виражено, рівень структурних компонентів хрящової тканини у сироватці крові щурів з експериментальною патологією.

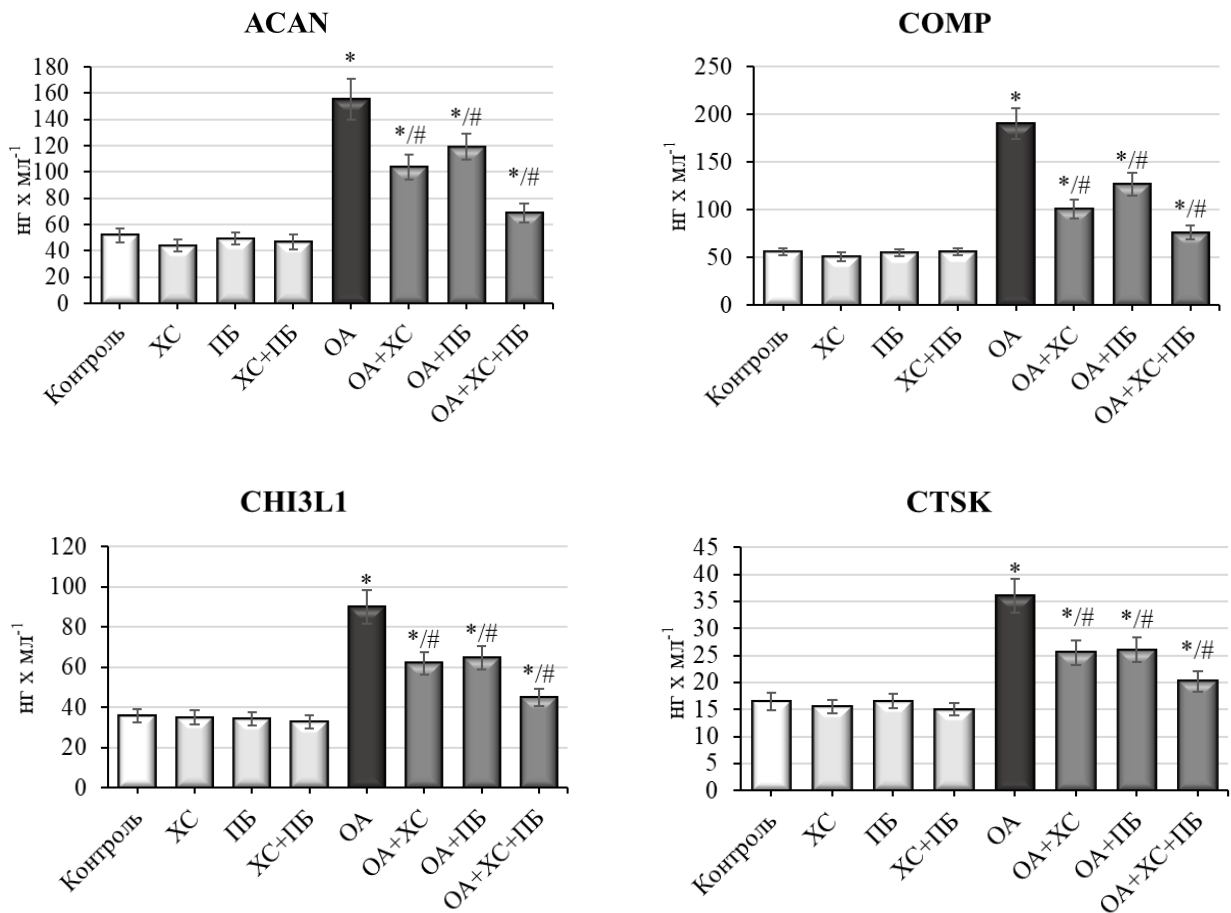


Рис. 3. Концентрація ACAN, COMP, CHI3L1, CTSK у сироватці крові щурів за експериментального остеоартриту при введенні хондроїтин сульфату та пробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=14$ ; \* –  $p \leq 0,05$  відносно контрольних тварин; # –  $p \leq 0,001$  відносно тварин групи ОА)

Функціональними представниками системи протеолізу є ММП, які безпосередньо впливають на метаболізм компонентів екстрацелюлярного матриксу суглобового хряща [Cui N., et al., 2017]. ММП продукуються переважно синовіоцитами, хондроцитами, фібробластами і остеобластами. Їх синтез та секреція відбувається під дією прозапальних цитокінів, факторів росту, інтегринів, ліпополісахаридів, простагландину  $E_2$  [Li H., et al., 2018; Malemud C., et al., 2017]. Встановлено, що за умов експериментального ОА у сироватці крові щурів вміст ММП зростає: 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. 4). При введенні тваринам з експериментальною патологією ХС 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 ( $p \leq 0,05$ ) відносно групи тварин з ОА, однак, значення вмісту усіх досліджуваних ММП перебували значимо вище контрольних показників. При введенні ПБ щурам з експериментальним ОА вміст ММП зменшувався: ММП-1 та ММП-8 – в 1,3 рази ( $p \leq 0,05$ ), ММП-3 – в 1,2 рази ( $p \leq 0,05$ ), порівняно з групою щурів з ОА, тоді як у випадку ММП-2 не відбувалось достовірних змін. За умов сумісної дії препаратів у тварин з експериментальним ОА відбувалось зниження вмісту ММП-1 в 1,3 рази ( $p \leq 0,05$ ), ММП-2, ММП-3 та ММП-8 – в 1,4 рази ( $p \leq 0,05$ ) відносно групи тварин з ОА, при чому показники вмісту ММП-8 статистично значимо досягали рівня контролю (рис. 4).

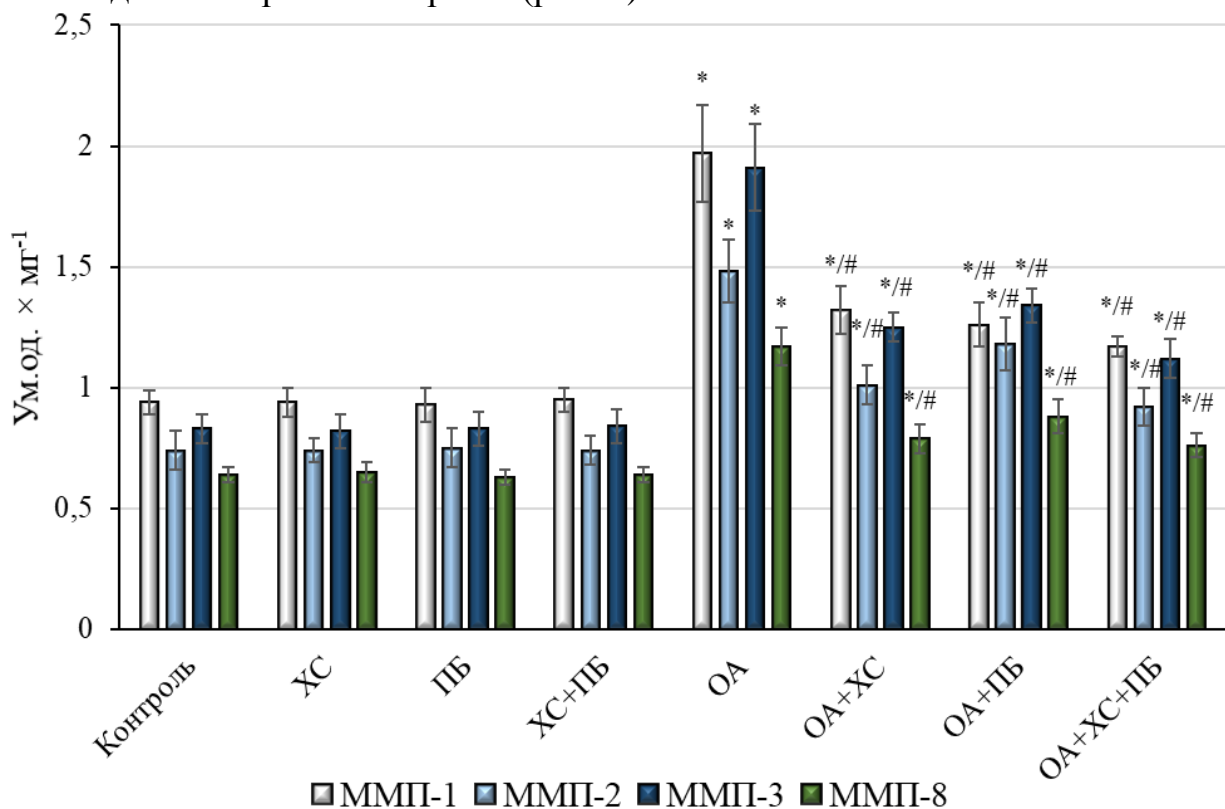


Рис. 4. Вміст матриксних металопротеїназ у сироватці крові щурів за експериментального остеоартриту при введенні хондроїтин сульфату та пробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=14$ ; \* –  $p \leq 0,05$  відносно контролю; # –  $p \leq 0,05$  відносно групи щурів з ОА)

У хрящовій тканині суглоба щурів 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). При введенні ХС тваринам з експериментальним ОА вміст досліджуваних ММП у хрящі 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 групи тварин з ОА. 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 ( $p \leq 0,05$ ), порівняно з групою щурів з ОА. За умов сумісної дії ХС і ПБ у тварин з експериментальним ОА знижувався вміст 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 всіх досліджуваних ММП у щурів з експериментальною патологією при окремому та комбінованому введенні ХС і ПБ перебували статистично значимо вище показників тварин контрольної групи (рис. 5).

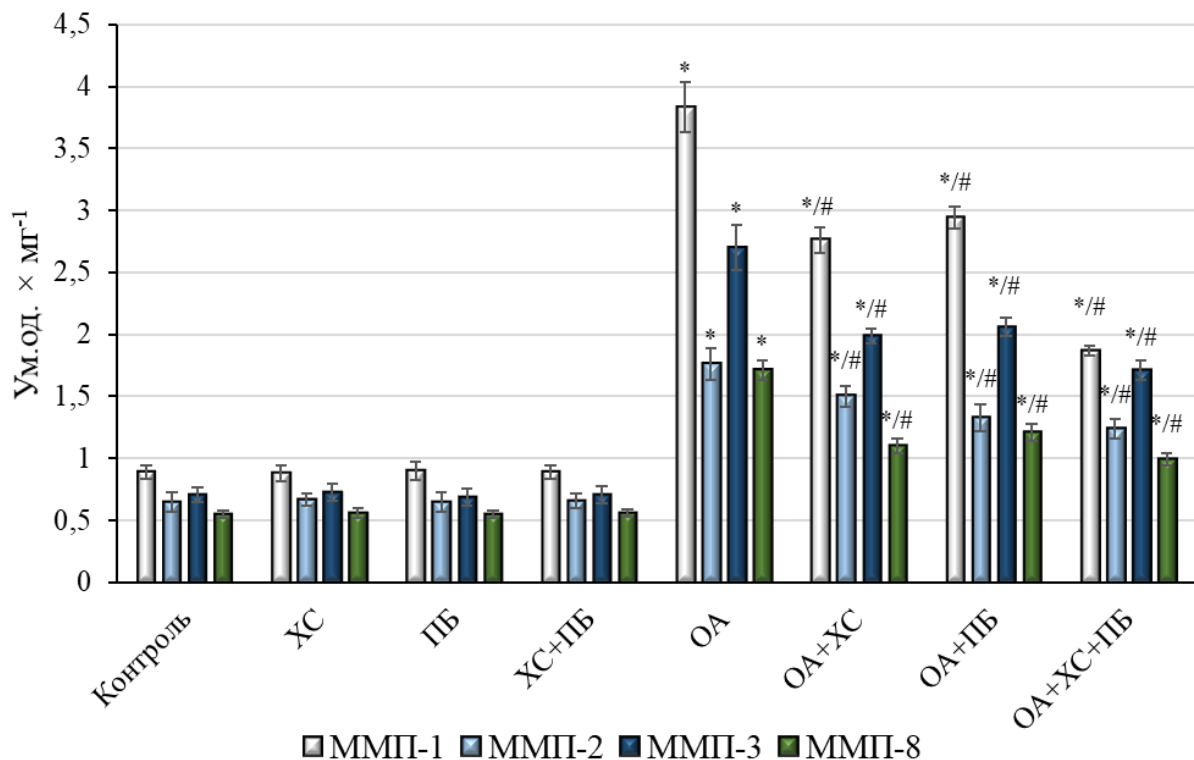


Рис. 5. Вміст матричних металопротеїназ у хрящовій тканині щурів за експериментального остеоартриту при введенні хондроїтин сульфату та пробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=14$ ; \* –  $p \leq 0,05$  відносно контролю; # –  $p \leq 0,05$  відносно групи щурів з ОА)

Таким чином, посилення синтезу 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 може корелювати з тяжкістю перебігу захворювання. Введення ХС та ПБ тваринам з експериментальним ОА, особливо їх комбінація, сприяли зменшенню розвитку деструктивних процесів у колінному суглобі щурів з експериментальним ОА.

### Рівень експресії структурних генів у хрящовій тканині суглоба щурів.

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. Зниження експресії генів колагену II та агрекану на фоні активації експресії генів, залучених до змін у проліферації, розвитку запалення та окисного стресу може підтримувати хронічну фазу захворювання та посилювати деградацію хрящової тканини.

За умов проведених експериментальних досліджень виявлено, що ОА супроводжувався зниженням рівня експресії структурних генів *Col2a1*, *Acan* та *Comp* у хрящі колінного суглоба щурів в 4,1; 2 та 2,2 рази відповідно, порівняно з контрольними тваринами ( $p \leq 0,001$ ) (рис. 6).

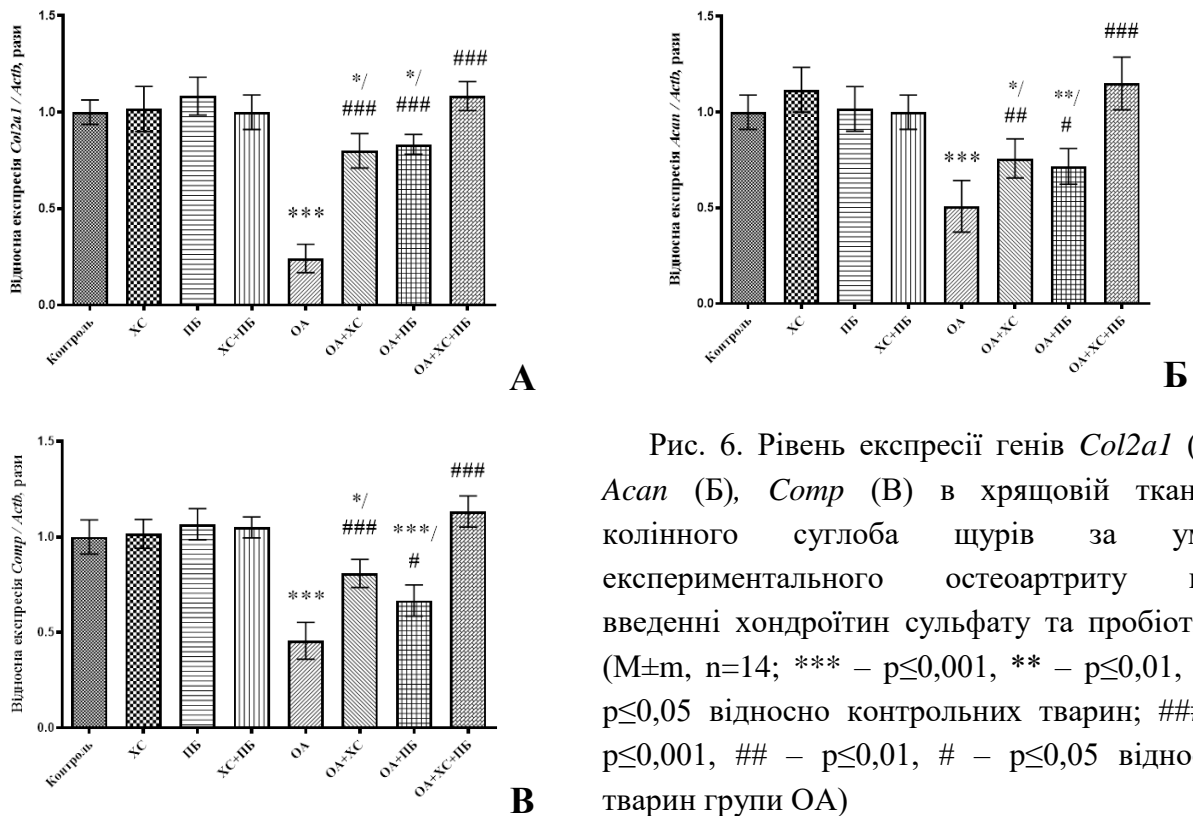


Рис. 6. Рівень експресії генів *Col2a1* (А), *Acan* (Б), *Comp* (В) в хрящовій тканині колінного суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтин сульфату та пробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=14$ ; \*\*\* –  $p \leq 0,001$ , \*\* –  $p \leq 0,01$ , \* –  $p \leq 0,05$  відносно контрольних тварин; ### –  $p \leq 0,001$ , ## –  $p \leq 0,01$ , # –  $p \leq 0,05$  відносно тварин групи ОА)

При введенні ХС щурам з експериментальним ОА рівень експресії генів зростав у 3,3 рази ( $p \leq 0,001$ ) у випадку *Col2a1*, *Acan* – в 1,5 рази ( $p \leq 0,01$ ) та *Comp* – 1,8 рази ( $p \leq 0,001$ ) відносно тварин з патологією. Однак, значення рівня експресії цих генів лишалися достовірно нижчими порівняно з контролем. Введення ПБ тваринам з експериментальним ОА мало подібну до введення ХС закономірність змін експресії структурних генів: рівень експресії *Col2a1* був вищим у 3,5 рази ( $p \leq 0,001$ ), *Acan* – в 1,4 рази ( $p \leq 0,05$ ), *Comp* – в 1,5 рази ( $p \leq 0,05$ ), ніж у тварин групи ОА, але лишався зниженим порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ ).

За комбінованої дії ХС та ПБ у щурів із експериментальним ОА рівень експресії всіх досліджуваних генів досягав контрольних значень (рис. 6).

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, що узгоджувалося з отриманими нами даними гістологічних досліджень, у яких показано деградацію міжклітинної речовини та втрату впорядкованого розташування колагенових волокон. Застосування ХС та ПБ у тварин з патологією суглобів у певній мірі відновлювало експресію структурних генів та сприяло активації анаболічних процесів при ремоделюванні хряща.

**Оцінка ступеню системного та локального запалення в щурів із експериментальним остеоартритом.** Інформативними показниками ступеню запалення та патогенетичних змін у організмі є рівень цитокінів. Серед цитокінів, які беруть участь у метаболізмі хряща, виділяють катаболічні прозапальні цитокіни, до яких належать ІЛ-1 $\beta$ , ФНП- $\alpha$ , ІЛ-6, ІЛ-8 та інтерферон- $\gamma$  (ІФН- $\gamma$ ), та анаболічні цитокіни – ІЛ-4, ІЛ-10, трансформуючий фактор росту (ТФР- $\beta$ ) й інсуліно-подібний фактор росту (ІФР-1). Прозапальні цитокіни, зокрема ІЛ-1 $\beta$  та ФНП- $\alpha$ , 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 циклооксигеназу 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. 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.

Проведені експериментальні дослідження показали, що за умов експериментального ОА зростав вміст катаболічних прозапальних цитокінів як у сироватці крові, так і хрящовій тканині щурів: у крові ІЛ-1 $\beta$  – у 2 рази ( $p \leq 0,05$ ), ФНП- $\alpha$  – в 1,9 рази ( $p \leq 0,05$ ), ІЛ-6 й ІЛ-8 – в 1,3 рази ( $p \leq 0,05$ ), та ІФН- $\gamma$  – в 1,6 рази ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 7А); у хрящовій тканині вміст цих цитокінів збільшувався у 2,5; 2,3; 1,9; 1,8 і 1,5 рази ( $p \leq 0,05$ ) відповідно, порівняно з контрольною групою тварин (рис. 7Б). При введенні ХС та ПБ щурам з експериментальною патологією вміст катаболічних прозапальних цитокінів у крові та хрящі знижувався, однак значення усіх досліджуваних показників перебували достовірно вищими контролю, за виключенням ІЛ-6 та ІЛ-8 у сироватці крові тварин у групі з експериментальним ОА за сумісної дії ХС та ПБ, де їх вміст достовірно перебував у межах контрольних значень (рис. 7А, 7Б).

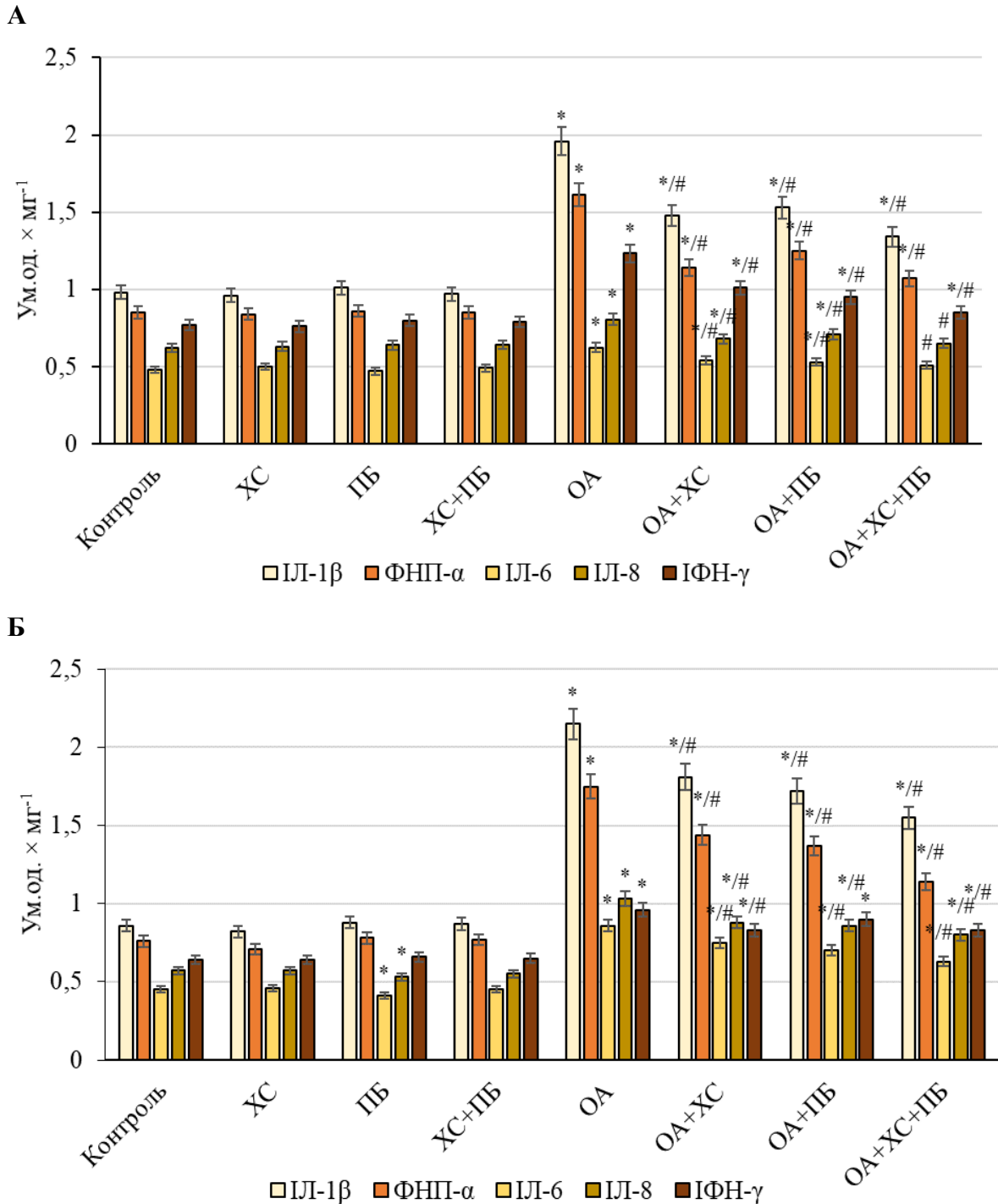


Рис. 7. Вміст прозапальних (катаболічних) цитокінів у сироватці крові (А) та хрящовій тканині суглоба (Б) щурів за експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=14$ ; \* –  $p < 0,05$  відносно контролю; # –  $p \leq 0,05$ , відносно групи щурів з ОА)

При дослідженні анаболічних показників цитокінового профілю, які мають супресивний модулюючий ефект на катаболічні цитокіни, у тварин з експериментальним ОА в сироватці крові встановлено зниження вмісту ІЛ-4 й ІЛ-10 в 1,3 раза ( $p \leq 0,05$ ) та ІФН-1 в 1,2 раза ( $p \leq 0,05$ ), при цьому спостерігалось підвищення вмісту ТФР- $\beta$  в 1,2 раза ( $p \leq 0,05$ ) відносно контрольних тварин

(рис. 8А). У хрящовій тканині суглоба щурів з експериментальним ОА спостерігалася подібна тенденція змін вмісту протизапальних цитокінів, зокрема: вміст ІЛ-4, ІЛ-10 та ІФР-1 знижувались у 2, 1,4; та 2,2 рази ( $p \leq 0,05$ ) відповідно, при цьому вміст ТФР- $\beta$  зростав у 1,5 рази ( $p \leq 0,05$ ), що може бути пов'язано з катаболічними ефектами ТФР- $\beta$  у суглобовому матриксі (рис. 8Б).

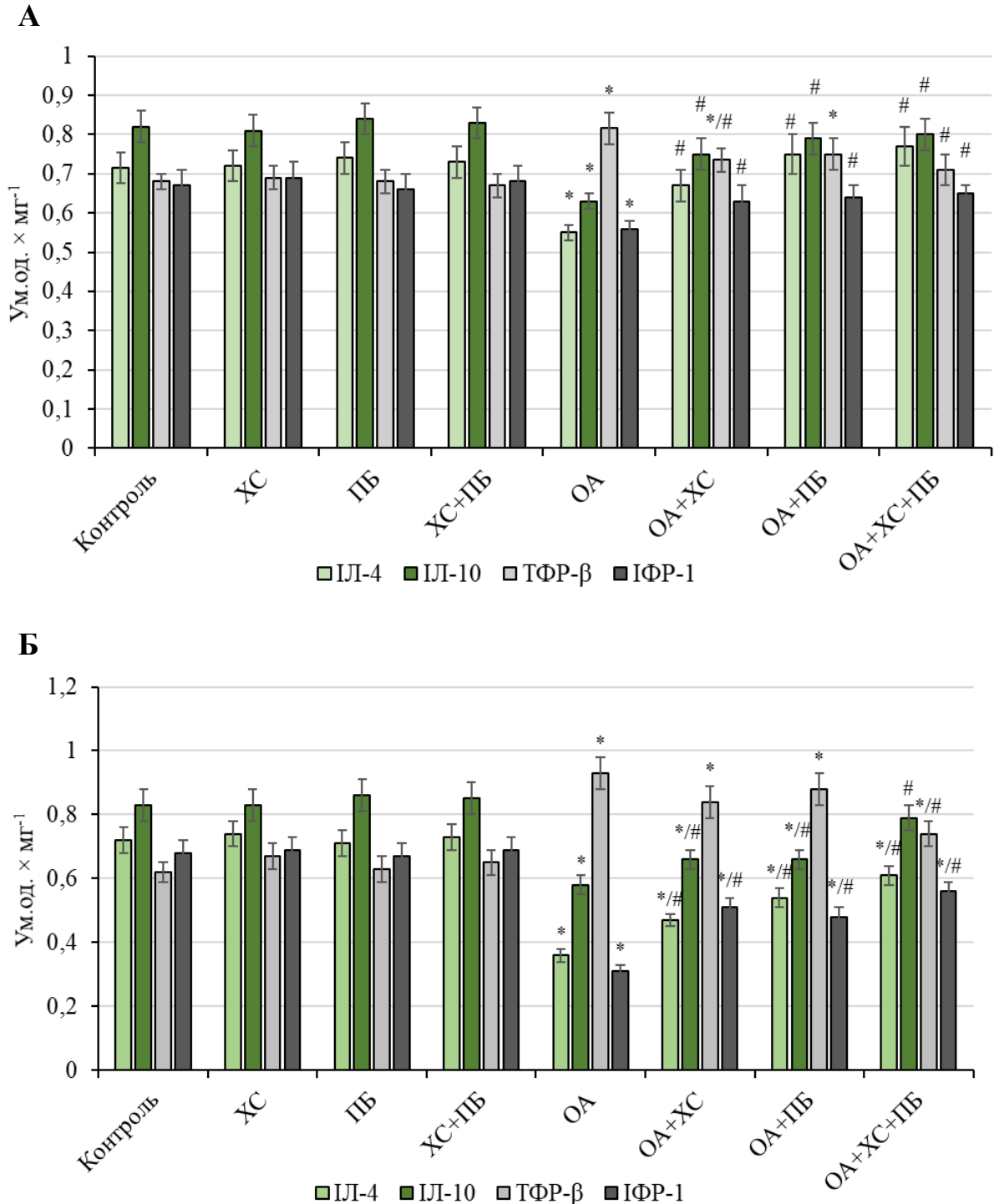


Рис. 8. Вміст протизапальних (анаболічних) цитокінів у сироватці крові (А) хрящовій тканині (Б) щурів за експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=14$ ; \* –  $p < 0,05$  відносно контролю; # –  $p < 0,05$ , відносно групи щурів з ОА)

Окреме введення ХС та ПБ тваринам з експериментальним ОА мало модулюючий вплив на вміст протизапальних цитокінів у сироватці крові, однак вміст ТФР- $\beta$  залишався підвищеним у 1,1 раза ( $p \leq 0,05$ ) відносно контрольних показників. Проте, сумісна дія препаратів мала результатом значиме відновлення вмісту всіх досліджуваних анаболічних параметрів у сироватці крові до рівня контролю (рис. 8А). У хрящовій тканині за таких умов введення ХС та ПБ мало лише частковий модулюючий ефект, більш виражений при сумісному введенні препаратів, при цьому вміст ІЛ-4 та ІФР-1 залишався достовірно зниженим відносно контролю, а вміст ТФР- $\beta$  – вищим в 1,3 раза ( $p \leq 0,05$ ) відносно показників контрольних тварин (рис. 8Б).

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. Частковий модулюючий ефект введення ХС та ПБ, 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 препаратів, зокрема ХС, який може активувати анаболічні процеси за рахунок стимуляції синтезу протеогліканів і колагену, а також інгібування синтезу ферментів деструкції хряща та інших факторів запалення [Jung Y., 2019].

Фізіологічно активною речовиною, що бере участь у розвитку запалення, є простагландин  $E_2$ . Встановлено, що при експериментальному ОА в сироватці крові концентрація простагландину  $E_2$  зростала в 1,6 раза ( $p \leq 0,05$ ) порівняно з контролем (рис. 9). При введенні ХС та ПБ тваринам з ОА концентрація простагландину  $E_2$  у сироватці крові зменшувався: при дії ХС – в 1,3 раза ( $p \leq 0,05$ ), при дії ПБ – в 1,4 раза ( $p \leq 0,05$ ) відповідно, порівняно з групою тварин з експериментальним ОА, при цьому значення наближалися до показників контрольної групи тварин. При сумісному введенні ХС та ПБ концентрація простагландину  $E_2$  у крові знижувалася в 1,4 раза ( $p \leq 0,05$ ), порівняно з групою тварин з патологією, та досягала рівня контрольних показників (рис. 9).

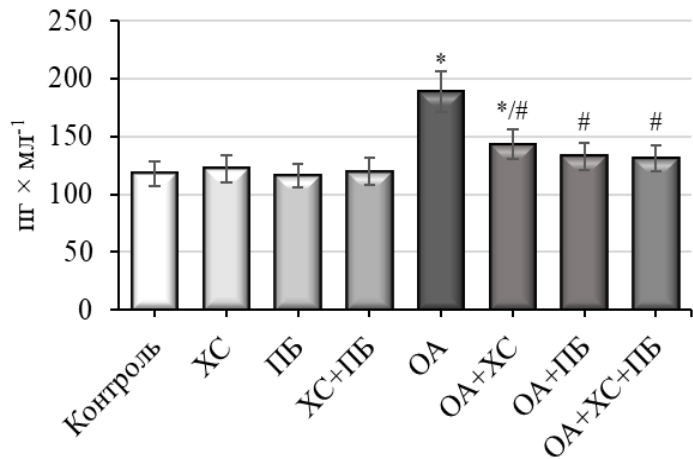
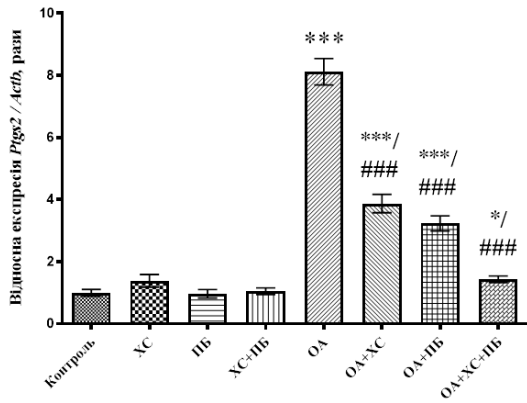


Рис. 9. Концентрація простагландину  $E_2$  у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтин сульфату та пробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=14$ ; \* –  $p \leq 0,05$  відносно контрольних тварин; # –  $p \leq 0,05$  відносно тварин групи ОА)

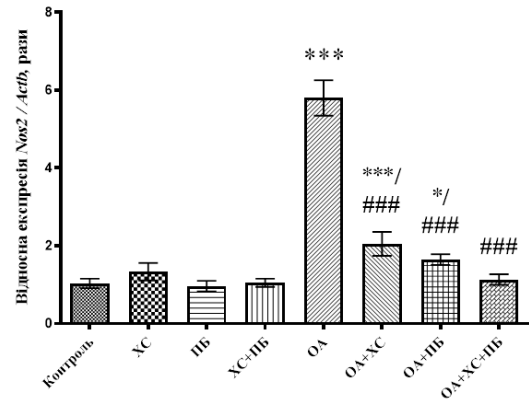
Отже, розвиток деструкції хряща за експериментального ОА призводив до активації імунних механізмів як на місцевому, так і на системному рівнях, які потенціювали патологічні зміни у тканинах суглоба щурів. Отримані результати свідчать про порушення балансу катаболічних та анаболічних показників цитокінового профілю у сироватці крові та хрящі щурів у бік розвитку запалення, що могло бути відповіддю організму на патогенні фактори. Введення ХС та ПБ мало сприятливий ефект, найбільш виражений при їх сумісному застосуванні, що виявлявся у зниженні вмісту катаболічних цитокінів та зростанні анаболічних цитокінів, які модулюють запальну відповідь, зменшуючи інтенсивність запалення в організмі, та, пригнічуючи деструктивні процеси в тканинах суглоба.

**Рівень експресії генів, які залучені у розвиток запалення.** Наступним етапом дослідження було визначення рівня експресії генів *Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*, які залучені у розвиток запалення, у крові та хрящовій тканині суглоба щурів. *Ptgs2* кодує циклооксигеназу-2 (ЦОГ-2), яка відповідає за синтез простагландину  $E_2$  та є мішенню дії НПЗП, які використовують у терапії ОА. *Nos2* кодує індуцибельну NO-синтазу, яка синтезує значну кількість оксиду азоту неспецифічної мікробіцидної дії, стимулює розвиток окисного стресу і пошкодження компонентів клітин, та є важливим медіатором запальної реакції [Lepetsos P., et al., 2016]. Кодований геном *Tgfb1* білок, який локалізований у позаклітинному матриксі, за функціями належить до факторів росту та мітогенів, у нормі регулює ріст хондроцитів, а за умов розвитку патології стимулює надмірну проліферацію клітин [Zhang G., et al., 2017]. Виявлено, що рівень експресії гена *Ptgs2* у хрящах колінного суглоба щурів у групі з експериментальним ОА був вищим у 8,1 раза порівняно з контрольними значеннями ( $p \leq 0,001$ ) (рис. 10А). При введенні ХС та ПБ за умов експериментального ОА рівень експресії відповідного гена знижувався (у 2,1 та 2,5 рази ( $p \leq 0,001$ ) відповідно) відносно тварин з ОА, проте лишався підвищеним порівняно з контрольними тваринами. За комбінованого введення ХС та ПБ у щурів із експериментальним ОА рівень експресії *Ptgs2* наближався до контрольних значень (рис. 10А). У крові щурів виявлено подібну тенденцію змін рівня експресії гена *Ptgs2* у групах тварин із експериментальним ОА та при введенні препаратів. За комбінованої дії ХС і ПБ у щурів із експериментальним ОА рівень експресії цього гена повертався до контрольних значень (рис. 11А).

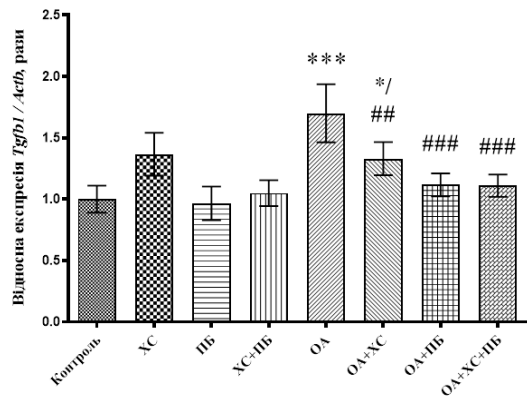
Показано, що рівень експресії гена *Nos2* у хрящах колінного суглоба щурів у групі з експериментальним ОА підвищувався у 5,8 раза порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ ) (рис. 10Б). При введенні щурам з експериментальною патологією ХС та ПБ рівень експресії гена *Nos2* знижувався (у 2,8 та 3,5 рази ( $p \leq 0,001$ ) відповідно) відносно значень тварин з ОА, однак лишався підвищеним відносно контролю. При комбінованому введенні ХС та ПБ щурам із експериментальним ОА рівень експресії *Nos2* знаходився в межах контрольних показників (рис. 10Б).



А

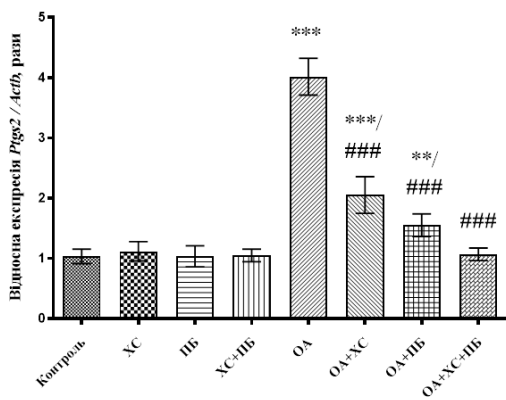


Б

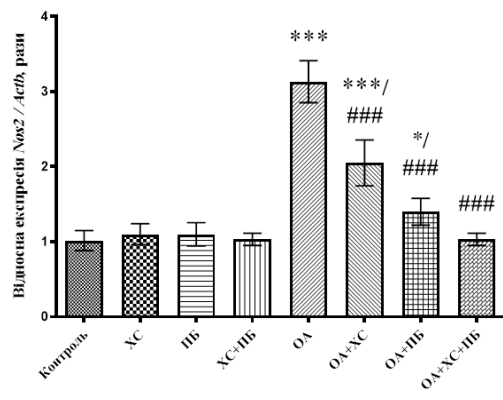


В

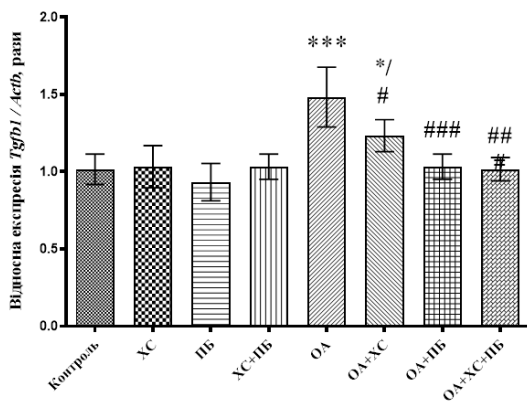
Рис. 10. Рівень експресії генів *Ptg2* (А), *Nos2* (Б), *Tgfb1* (В) в хрящах колінного суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=14$ ; \*\*\* –  $p \leq 0,001$ , \* –  $p \leq 0,05$  відносно контрольних тварин; ### –  $p \leq 0,001$ , ## –  $p \leq 0,01$  відносно тварин групи ОА)



А



Б



В

Рис. 11. Рівень експресії генів *Ptg2* (А), *Nos2* (Б), *Tgfb1* (В) у крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=14$ ; \*\*\* –  $p \leq 0,001$ , \*\* –  $p \leq 0,01$ , \* –  $p \leq 0,05$  відносно контрольних тварин; ### –  $p \leq 0,001$ , ## –  $p \leq 0,01$ , # –  $p \leq 0,05$  відносно тварин групи ОА)

Подібна тенденція змін рівня експресії гена *Nos2* відбувалася у цільній крові тварин контрольної та дослідних груп (рис. 11Б).

Рівень експресії гена *Tgfb1* у хрящах колінного суглоба (рис. 10В) та крові (рис. 11В) щурів з експериментальним ОА та тварин, яким вводили ХС і ПБ, мав подібну тенденцію змін. За умов експериментальної патології експресія даного гена зростала, порівняно з контрольними тваринами, що узгоджувалося з підвищенням вмісту ТФР- $\beta$  у сироватці крові та хрящі тварин з ОА, при цьому введення ХС та ПБ супроводжувалося суттєвим зниженням показників відносно значень групи тварин ОА. Слід зазначити, що комбіноване введення ХС і ПБ щурам із експериментальним ОА сприяло поверненню рівня експресії гена *Tgfb1* до контрольних значень.

Таким чином, показане зростання експресії прозапальних генів у хрящовій тканині та крові щурів з експериментальним ОА може свідчити про розвиток патологічних процесів у тканинах суглоба та організмі в цілому, зокрема й про запалення та дегенеративні зміни в хрящі. Введення ХС та ПБ сприяло пригніченню експресії генів, що кодують ЦОГ-2, іNOS і фактор росту ТФР- $\beta$ , зниженню розвитку запальних процесів в організмі, та відповідно структурному відновленню хрящової тканини щурів з експериментальним ОА. Особливо виражений ефект препаратів виявлений при сумісній їх дії.

Отже, за умов розвитку експериментального ОА суглобів щурів спостерігалися ознаки посилення запальних процесів та деградації хряща: в сироватці крові та хрящовій тканині зростав вміст катаболічних цитокінів та простагландину  $E_2$ , знижувався вміст анаболічних цитокінів, відбувалося підвищення експресії генів *Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*, що може свідчити про активацію імунної відповіді на запалення та зміну гомеостазу хондроцитів. Введення як ХС, так і ПБ сприяло зниженню розвитку запальних процесів в організмі та відповідно структурному відновленню хрящової тканини щурів з ОА.

**Окисно-антиоксидантний гомеостаз в сироватці крові та хрящовій тканині щурів за умов експериментального остеоартриту.** Провідну роль у виникненні та прогресуванні ОА відіграє інтенсифікація реакцій вільнорадикального окиснення, що призводить до структурних та функціональних змін у хондроцитах і позаклітинному матриксу, запальних і дегенеративних змін хряща й оточуючих тканин [Drevet S., et al., 2018]. У ході проведених експериментів встановлено, що у групі щурів з експериментальним ОА вміст супероксидного радикалу та пероксиду водню в сироватці крові зростав у 2,3 та 2,4 рази ( $p \leq 0,05$ ) відповідно, порівняно з контролем (табл. 1). При введенні ХС тваринам з експериментальним ОА значення вмісту зазначених АФК знижувалися в 1,5 рази ( $p \leq 0,05$ ) відносно відповідних показників групи ОА. При введенні ПБ тваринам з експериментальною патологією вміст супероксидного радикалу та  $H_2O_2$  знижувався в 1,6 та 1,7 рази ( $p \leq 0,05$ ) відповідно відносно показників групи ОА. За комбінованої дії ХС та ПБ у щурів із експериментальним ОА вміст АФК у сироватці крові зменшувався майже в 2 рази ( $p \leq 0,05$ ) відносно тварин з патологією, які не отримували терапію, однак значення залишалися вищими за рівень контролю в 1,2 рази ( $p \leq 0,05$ ) (табл. 1).

Таблиця 1

**Вміст активних форм кисню в сироватці крові й хрящовій тканині колінного суглоба щурів за експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика (M±m, n=14)**

Показник Групи тварин	Кров		Хрящ	
	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , мкмоль ХТТ формазану × мг <sup>-1</sup> білка	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , мкмоль × мг <sup>-1</sup> білка	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , мкмоль ХТТ формазану × мг <sup>-1</sup> білка	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , мкмоль × мг <sup>-1</sup> білка
Контроль	4,79 ± 0,43	0,36 ± 0,03	7,95 ± 0,71	12,45 ± 1,09
ХС	4,85 ± 0,45	0,37 ± 0,03	8,82 ± 0,83	12,65 ± 1,21
ПБ	4,64 ± 0,42	0,34 ± 0,03	7,47 ± 0,72	11,98 ± 1,07
ХС+ПБ	4,98 ± 0,52	0,41 ± 0,88	9,02 ± 0,04	13,45 ± 1,45
ОА	11,03 ± 1,07*	0,87 ± 0,08*	25,36 ± 2,19*	23,02 ± 2,24*
ОА+ХС	7,59 ± 0,69*/#	0,59 ± 0,05*/#	16,48 ± 1,61*/#	17,05 ± 1,57*/#
ОА+ПБ	6,74 ± 0,51*/#	0,51 ± 0,04*/#	13,85 ± 1,21*/#	15,36 ± 1,42*/#
ОА+ХС+ПБ	5,87 ± 0,54*/#	0,44 ± 0,04*/#	12,04 ± 1,18*/#	14,21 ± 1,11#

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

У хрящовій тканині щурів з експериментальним ОА зростав вміст O<sup>2-</sup> у 3,1 раза (p≤0,05), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – в 1,8 раза (p≤0,05) порівняно з контрольними значеннями (табл. 1). При введенні ХС щурам з експериментальним ОА вміст O<sup>2-</sup> знижувався в 1,5 рази (p≤0,05), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – в 1,4 раза (p≤0,05) відносно відповідних показників групи ОА. При введенні ПБ тваринам з ОА вміст O<sup>2-</sup> знижувався в 1,8 раза (p≤0,05), пероксиду водню – в 1,5 рази (p≤0,05) відносно відповідних показників групи ОА. Комбіноване введення ХС та ПБ щурам із експериментальним ОА викликало зниження вмісту O<sup>2-</sup> та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у хрящовій тканині колінного суглоба в 2,1 та 1,6 раза (p≤0,05) відповідно відносно значень групи ОА, при цьому вміст H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> досягав рівня контрольних значень, а вміст O<sup>2-</sup> лишився вище рівня контролю в 1,5 рази (p≤0,05) (табл. 1).

Таким чином, згідно отриманих результатів експериментальних досліджень за умов ОА в сироватці крові та хрящовій тканині щурів зростав рівень АФК, що свідчить про активацію вільнорадикальних процесів як безпосередньо у суглобі, так і на системному рівні в організмі тварин. Введення ХС та ПБ сприяло зниженню вмісту АФК при експериментальному ОА, не порушуючи окисного балансу в нормі.

Одним із наслідків дії АФК на компоненти клітини є інтенсифікація процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), у результаті чого відбувається окиснення ненасичених жирних кислот, що може бути причиною порушення цілісності та властивостей біологічних мембран. Його інтенсивність оцінюють за вмістом продуктів ПОЛ – ДК, ТБК-активних продуктів та ШО. Згідно проведених

експериментальних досліджень встановлено, що при експериментальному ОА в організмі активуються процеси ПОЛ, про що свідчить підвищення у сироватці крові та хрящовій тканині щурів відповідно вмісту ДК в 2,6 та 2 рази ( $p \leq 0,05$ ), ТБК-активних продуктів у 2 та 2,5 рази ( $p \leq 0,05$ ) та ШО в 1,8 та 2,2 рази ( $p \leq 0,05$ ) відносно значень тварин контрольної групи (табл. 2).

Таблиця 2

**Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у сироватці крові й хрящовій тканині колінного суглоба щурів за експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=14$ )**

Показник Групи тварин	Дієнові кон'югати, нмоль $\times$ мг <sup>-1</sup> білка	ТБК-активні продукти, нмоль $\times$ мг <sup>-1</sup> білка	Шиффові основи, ум. од. $\times$ мг <sup>-1</sup> білка
Кров			
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*/#
Хрящ			
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 групи щурів з ОА

При введенні ХС щурам з експериментальним ОА в сироватці крові та хрящовій тканині відповідно знижувався вміст: ДК – в 1,4 та 1,5 рази ( $p \leq 0,05$ ), ТБК-активних продуктів – в 1,5 та 1,4 рази ( $p \leq 0,05$ ), та ШО – в 1,2 та 1,4 рази ( $p \leq 0,05$ ) відносно тварин групи ОА (табл. 2). При введенні ПБ тваринам з експериментальним ОА у сироватці крові та хрящовій тканині відповідно знижувався вміст: ДК – в 1,7 та 1,4 рази ( $p \leq 0,05$ ), ТБК-активних продуктів – в 1,6 та 1,3 рази ( $p \leq 0,05$ ), ШО – в 1,3 та 1,4 рази ( $p \leq 0,05$ ) відносно тварин групи ОА. При сумісному введенні щурам із експериментальною патологією ХС та ПБ у крові та суглобовому хрящі відповідно спостерігалось зниження вмісту: ДК – в 1,6 рази ( $p \leq 0,05$ ), ТБК-активних продуктів – в 1,7 рази ( $p \leq 0,05$ ), ШО – в 1,4 та 1,6 рази ( $p \leq 0,05$ ) відносно тварин групи ОА, при цьому всі досліджувані показники

залишалися достовірно вищими порівняно значень тварин контрольної групи (табл. 2).

За умов окисного стресу й надмірної генерації АФК розвиваються процеси неконтрольованої ОМБ, які спричиняють зміни фізико-хімічних властивостей протеїнів: фрагментацію, агрегацію та протеоліз, що призводить до втрати їх біологічної активності, порушення процесів обміну, та може бути як одним із факторів ініціації патологічного процесу, так і сприяти подальшому руйнуванню хряща та субхондральної кістки. Основними структурними білками хрящової тканини, які модифікуються в окисних реакціях є протеоглікани. У ході проведених експериментальних досліджень встановлено, що в групі щурів з експериментальним ОА в сироватці крові вміст продуктів ОМБ зростає. Так, для продуктів нейтрального характеру: альдегідних – в 1,7 раза ( $p \leq 0,05$ ) і кетонних – в 1,9 раза ( $p \leq 0,05$ ), та 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 (табл. 3).

Таблиця 3

**Вміст продуктів окисної модифікації білків у сироватці крові й хрящовій тканині колінного суглоба щурів за експериментального остеоартриту при введенні хондроїтин сульфату та пробіотика, ( $M \pm m$ ,  $n=14$ )**

Показники Групи тварин	Продукти нейтрального характеру, ум.од. $\times$ $mg^{-1}$ білка		Продукти основного характеру, ум.од. $\times$ $mg^{-1}$ білка	
	альдопохідні	кетопохідні	альдопохідні	кетопохідні
<b>Кров</b>				
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#
<b>Хрящ</b>				
Контроль	0,048 $\pm$ 0,004	0,052 $\pm$ 0,005	0,045 $\pm$ 0,005	0,039 $\pm$ 0,004
ХС	0,051 $\pm$ 0,005	0,049 $\pm$ 0,004	0,042 $\pm$ 0,004	0,041 $\pm$ 0,005
ПБ	0,049 $\pm$ 0,005	0,051 $\pm$ 0,004	0,043 $\pm$ 0,004	0,037 $\pm$ 0,004
ХС+ПБ	0,052 $\pm$ 0,005	0,054 $\pm$ 0,005	0,047 $\pm$ 0,005	0,043 $\pm$ 0,005
ОА	0,088 $\pm$ 0,008*	0,076 $\pm$ 0,008*	0,064 $\pm$ 0,006*	0,067 $\pm$ 0,006*
ОА+ХС	0,071 $\pm$ 0,007#	0,052 $\pm$ 0,005#	0,048 $\pm$ 0,005#	0,052 $\pm$ 0,005#
ОА+ПБ	0,066 $\pm$ 0,006#	0,058 $\pm$ 0,005#	0,051 $\pm$ 0,003#	0,051 $\pm$ 0,004#
ОА+ХС+ПБ	0,062 $\pm$ 0,006#	0,049 $\pm$ 0,005#	0,043 $\pm$ 0,003#	0,046 $\pm$ 0,004#

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

При введенні ХС щурам з експериментальною патологією в сироватці крові вміст нейтральних та альдо- і кетопохідних основного характеру знижувався у 1,3 та 1,2 раза ( $p \leq 0,05$ ) відповідно відносно показників групи тварин з ОА, при цьому значення продуктів ОМБ основного характеру досягали рівня контролю. За умов дії ПБ у тварин з експериментальним ОА та при сумісній дії ХС й ПБ вміст продуктів ОМБ значимо не відрізнявся від такого у тварин контрольної групи (табл. 3).

У хрящовій тканині тварин з експериментальним ОА вміст продуктів ОМБ зростав: для альдегідних і кетонних продуктів нейтрального характеру – в 1,8 і 1,5 рази ( $p \leq 0,05$ ), та для основного характеру – в 1,4 та 1,7 рази ( $p \leq 0,05$ ) відповідно, порівняно з контролем. При введенні як ХС так і ПБ, а також при їх сумісному використанні у тварин з експериментальним ОА, вміст нейтральних та основних альдегідних і кетонних продуктів у хрящовій тканині перебував у межах контрольних значень (табл. 3).

Отже, при експериментальному ОА в крові та хрящовій тканині зростав вміст продуктів ОМБ, що свідчило про зсув окисно-антиоксидантної рівноваги у прооксидантний бік. Введення ХС та 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 препаратів.

**Стан антиоксидантної системи у сироватці крові та хрящовій тканині щурів за умов експериментального остеоартриту.** Захист клітин від ушкоджуючої дії вільних радикалів і пероксидних сполук, а також підтримання окисного балансу в організмі забезпечує багатокомпонентна антиоксидантна система. Першою ланкою захисту клітин від кисневих вільних радикалів є ферменти СОД (ЕС 1.15.1.1) та КАТ (ЕС 1.11.1.6). У ході досліджень встановлено, що за умов експериментального ОА в сироватці крові щурів СОД активність знижувалася в 2 рази ( $p \leq 0,05$ ), тоді як КАТ активність зростала в 1,7 рази ( $p \leq 0,05$ ) порівняно з контролем (рис. 12).

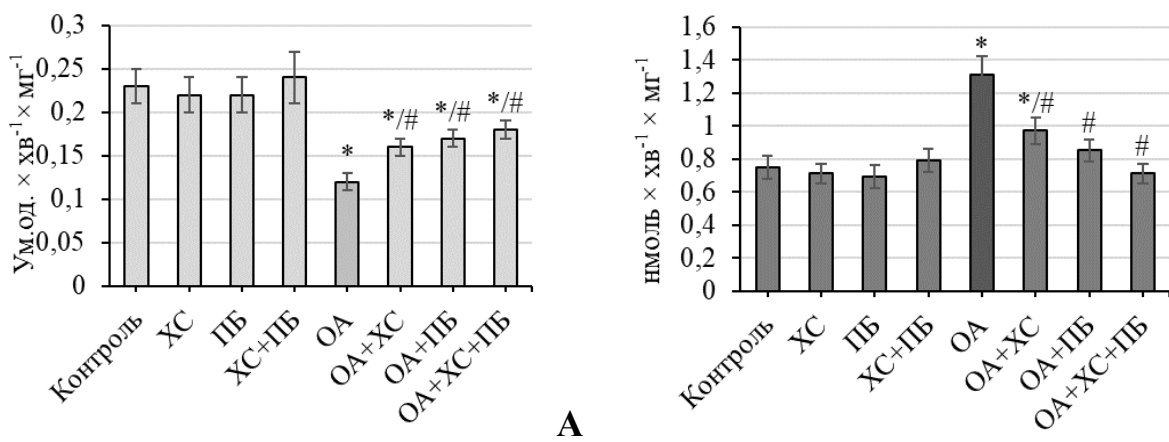


Рис. 12. Супероксиддисмутазна (А) та каталазна (Б) активності в сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=14$ ; \* –  $p \leq 0,05$  відносно контролю; # –  $p \leq 0,05$  відносно групи щурів з ОА)

Після введення ХС тваринам з експериментальним ОА СОД активність зростала в 1,3 раза ( $p \leq 0,05$ ), КАТ активність знижувалася в 1,4 раза ( $p \leq 0,05$ ) порівняно з групою щурів з ОА. При введенні ПБ тваринам з експериментальним ОА СОД активність у сироватці крові зростала в 1,4 раза ( $p \leq 0,05$ ), порівняно з тваринами групи ОА, а КАТ активність знижувалася в 1,5 рази ( $p \leq 0,05$ ) та досягала рівня контролю. Сумісна дія ХС та ПБ за експериментального ОА супроводжувалася зростанням СОД активності у 1,5 рази ( $p \leq 0,05$ ) та зниженням КАТ активності в 1,8 раза ( $p \leq 0,05$ ) відносно тварин групи ОА, при цьому значення останньої досягали рівня тварин контрольної групи (рис. 12).

У хрящовій тканині за умов експериментального ОА відбувалось підвищення СОД та КАТ активностей в 4 та в 4,9 рази ( $p \leq 0,05$ ) відповідно відносно контролю (рис. 13). Введення ХС та ПБ тваринам з експериментальним ОА супроводжувалося зниженням СОД (в 1,8 та в 1,7 рази ( $p \leq 0,05$ ) відповідно) та КАТ (в 1,7 та в 1,8 рази ( $p \leq 0,05$ ) відповідно) активностей порівняно з групою щурів з ОА. Комбіноване введення ХС і ПБ у тварин з експериментальним ОА викликало в хрящовій тканині зниження СОД активності – в 2 рази ( $p \leq 0,05$ ) та КАТ активності – в 2,3 рази ( $p \leq 0,05$ ) порівняно з групою щурів з ОА, однак ці показники достовірно залишались вищими тварин контрольної групи (рис. 13).

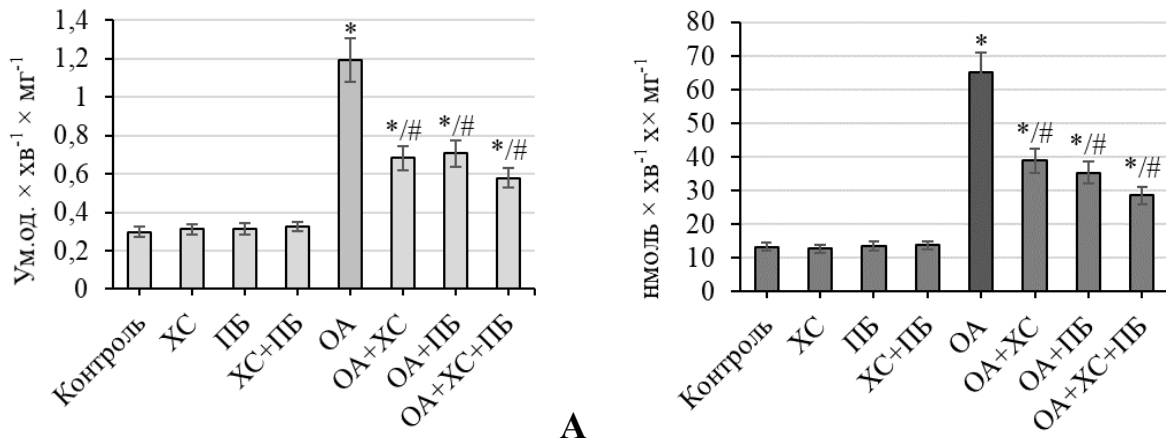


Рис. 13. Супероксиддисмутаза (А) та каталазна (Б) активності в хрящовій тканині суглоба щурів за експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=14$ ; \* –  $p \leq 0,05$  відносно контролю; # –  $p \leq 0,05$  відносно групи щурів з ОА)

Невід'ємною ланкою антиоксидантного захисту є відновлений глутатіон та комплекс ензимів: глутатіонпероксидаза (ГП) (ЕС 1.11.1.9), глутатіон-S-трансфераза (ГТ) (ЕС 2.5.1.18) і глутатіонредуктаза (ГР) (ЕС 1.8.1.7), які інгібують більшість вільнорадикальних реакцій, захищаючи організм від окиснювального пошкодження, що відбувається при різних патологічних станах, в тому числі й при ОА. Пригнічення відновлення глутатіону та розвиток окисного стресу в організмі призводить до зниження синтезу компонентів матриксу хряща – протеогліканів та гіалуронової кислоти [Shaah R., et al., 2015]. У ході досліджень показано зміни вмісту глутатіону, порушення співвідношення його окисненої (GSSH) і відновленої (GSH) форм та виснаження глутатіон-залежних ферментів у сироватці крові та хрящовій тканині щурів з експериментальним ОА. Так, за

експериментального ОА вміст GSH в сироватці крові знижувався у 1,4 раза ( $p \leq 0,05$ ), тоді як вміст GSSH зростав у 1,3 раза ( $p \leq 0,05$ ) порівняно з контрольною групою (рис. 14).

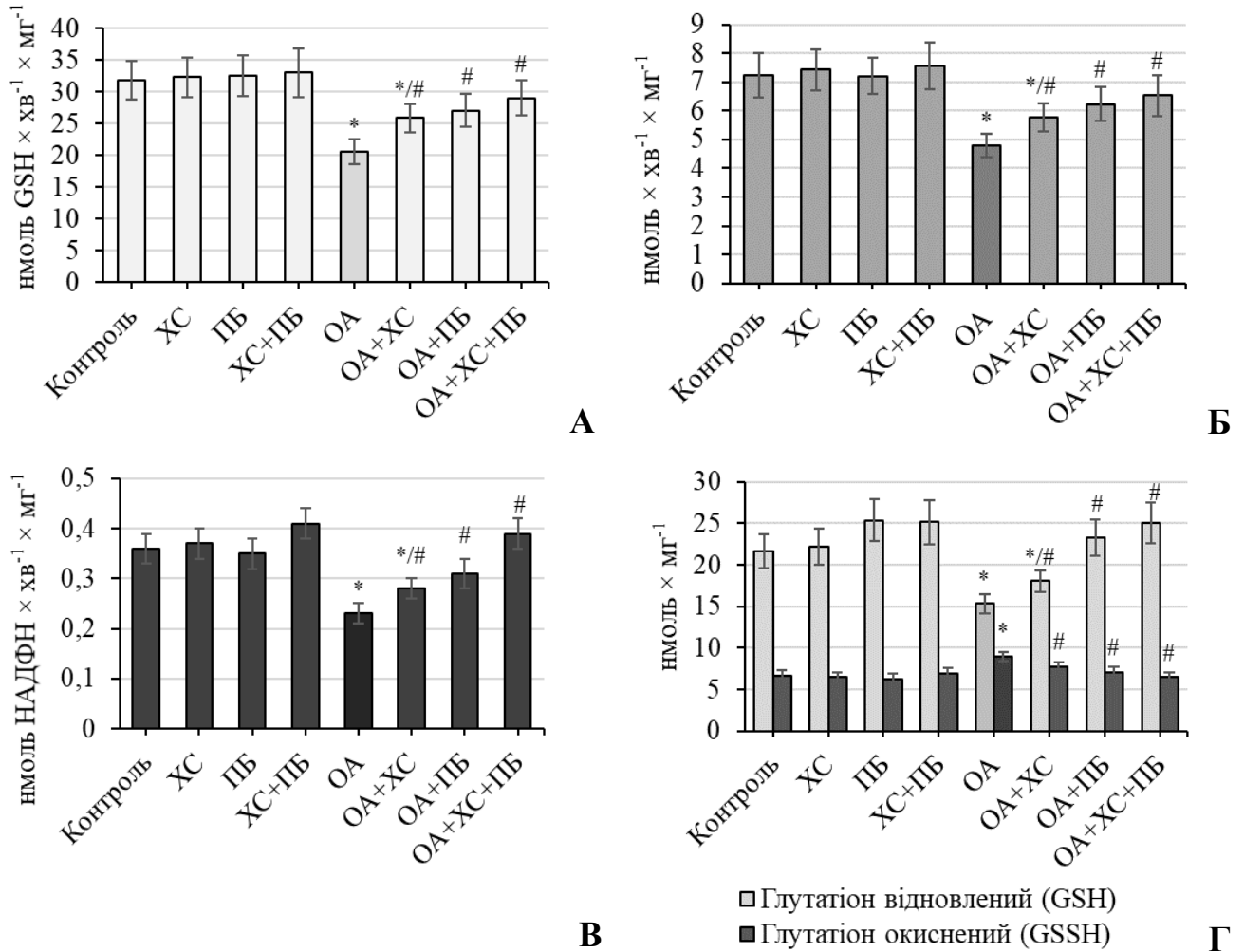


Рис. 14. Глутоксидопероксидазна (А), глутоксидотрансферазна (Б), глутоксидоредуктазна (В) ферментативні активності та вміст глутоксидону (Г) в сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=14$ ; \* –  $p \leq 0,05$  відносно контролю; # –  $p \leq 0,05$  відносно групи щурів з ОА)

Одночасно зі змінами вмісту глутоксидону в умовах експериментального ОА спостерігалось зниження у сироватці крові щурів: ГП та ГТ – в 1,5 рази ( $p \leq 0,05$ ), ГР – в 1,6 раза ( $p \leq 0,05$ ) активностей порівняно з контролем (рис. 14). При введенні ХС тваринам з експериментальним ОА концентрація в сироватці крові GSH підвищувалася в 1,5 рази відносно показників тварин групи ОА, при цьому вміст GSSH достовірно перебував на рівні значень контрольної групи. На тлі змін вмісту глутоксидону дія ХС супроводжувалася змінами ферментативних активностей глутоксидонової системи: ГП – зростала в 1,3 раза ( $p \leq 0,05$ ), ГТ та ГР – в 1,2 раза ( $p \leq 0,05$ ) відповідно відносно тварин групи ОА. За умов введення ПБ щурам з експериментальною патологією, а також при його поєднанні з ХС, рівень глутоксидону в сироватці крові достовірно не змінювався порівняно з контролем, тоді

як глутатіонзалежна ферментативна активність наближалася до контрольних значень (рис. 14).

У хрящовій тканині за умов експериментального ОА зміни в системі глутатіону відбувалися більш виражено: вміст GSH знижувався в 1,9 раза ( $p \leq 0,05$ ), тоді як вміст GSSH – зростав в 1,9 раза ( $p \leq 0,05$ ) відносно показників тварин контрольної групи; при цьому знижувалася глутатіонзалежна ферментативна активність: ГП та ГТ – в 1,9 раза ( $p \leq 0,05$ ), ГР – в 2,5 рази ( $p \leq 0,05$ ) відносно контролю (рис. 15). Встановлено, що окреме та поєднане введення ХС та ПБ тваринам з експериментальним ОА достовірно сприяло відновленню співвідношення GSH і GSSH у хрящі щурів з експериментальним ОА та підвищенню ферментативної активності глутатіонової системи, відносно показників тварин групи ОА (рис. 15).

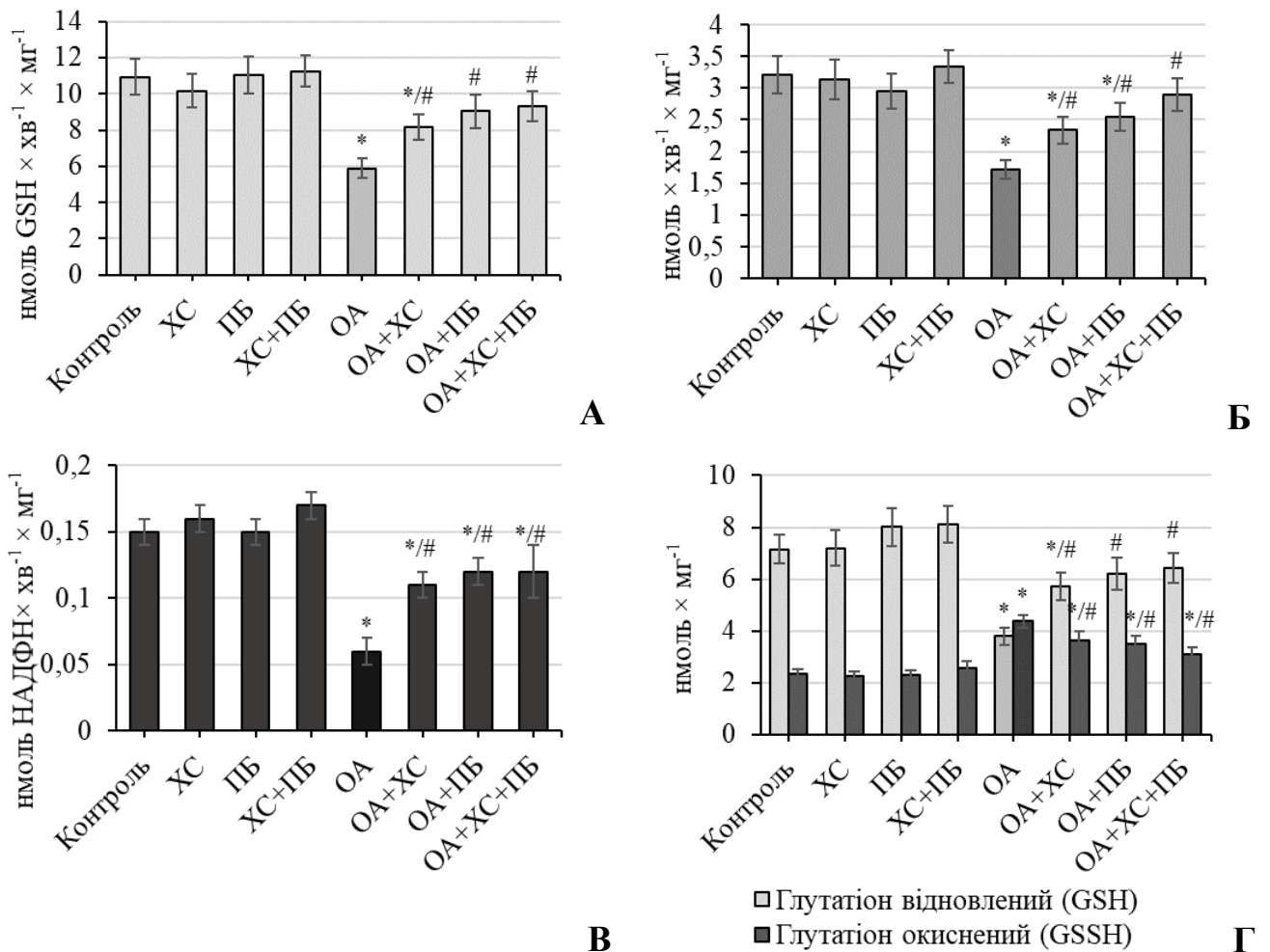


Рис. 15. Глутатіонпероксидазна (А), глутатіонтрансферазна (Б), глутатіонредуктазна (В) ферментативні активності та вміст глутатіону (Г) в хрящовій тканині щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=14$ ; \* –  $p \leq 0,05$  відносно контролю; # –  $p \leq 0,05$  відносно групи щурів з ОА)

Отже, за умов експериментального ОА в сироватці крові та хрящовій тканині щурів розвивався окисний стрес, що характеризувався зростанням АФК, продуктів ПОЛ та ОМБ, відбувалися зміни активності антиоксидантних ензимів, спостерігалася виснаження глутатіонової системи. Застосування ХС та 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.

**Механізми сигнальної регуляції ремоделювання хрящової тканини при експериментальному остеоартриті.** 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 простагландину E<sub>2</sub> і NO, активацією ММП, що має наслідком прогресуюче пошкодження екстрацелюлярного матриксу та деструкцію хряща, а також відіграє ключову роль у патогенезі ОА [Chow Y., et al., 2020; Wang F., 2020].

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 та ПБ, проведено ІГХ дослідження експресії TLR-2, TLR-4 та NF-κB. При ІГХ аналізі тканин суглобів тварин контрольної групи та груп шурів, які отримували ХС та ПБ за відсутності експериментальної патології, встановлено негативну реакцію щодо експресії TLR-2, TLR-4 та NF-κB (рис. 16). У хондроцитах у межах усіх зон суглобового хряща спостерігалася негативна реакція на експресію TLR-2 та TLR-4. Позитивну реакцію виявлено лише на експресію NF-κB в окремих вакуолізованих хондроцитах глибокої зони суглобового хряща, а також в остеобластах у ділянках активного енхондрального остеогенезу (рис. 16В).



Рис. 16. Експресія TLR-2 (А), TLR-4 (Б) і NF-κB (В) у клітинах суглобового хряща контрольних груп шурів. Імуногістохімічне забарвлення з використанням МАТ до TLR-2, TLR4, NF-κB. Збільшення  $\times 200$

ІГХ дослідження показало, що деструктивні зміни, ознаки загибелі хондроцитів та деградації матриксу в щурів з експериментальним ОА асоційовані з вираженою 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 (рис. 17А, Б). Реакція на експресію TLR-2 була найбільш вираженою у клітинах поверхневих шарів у ділянках деструктивних змін (рис. 17А). При аналізі експресії NF-κB було визначено наявність імунопозитивних клітин як у межах суглобового хряща, так і в субхондральній кістці (рис. 17В). У хрящі експресія NF-κB визначалася у більшості клітин зі збереженою структурою (рис. 17В).

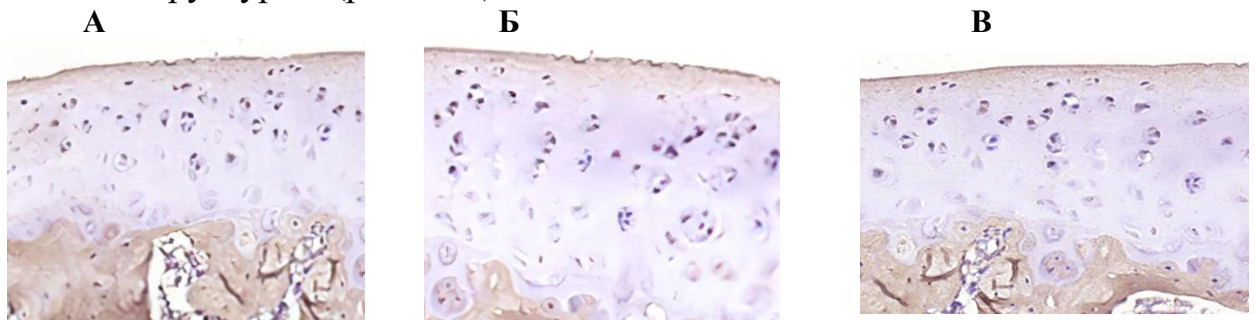


Рис. 17. Експресія TLR-2 (А), TLR-4 (Б) і NF-κB (В) у клітинах суглобового хряща щурів за експериментального остеоартриту. Імуногістохімічне забарвлення з використанням МАТ до TLR-2, TLR-4, NF-κB. Збільшення  $\times 200$

За окремого введення ХС та ПБ тваринам з експериментальним ОА виявлено зниження ІГХ експресії TLR-2, TLR-4 та NF-κB у межах хондроцитів хряща, порівняно з тваринами групи ОА (рис. 18). 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. В межах хряща до 25% хондроцитів зберігали ознаки експресії NF-κB, зберігалася експресія NF-κB й у межах субхондральної кістки, що може свідчити про інтенсивне продовження процесів ремоделювання хрящової та кісткової тканин за умов експериментального ОА (рис. 18).

Зміни рівня експресії Toll-подібних рецепторів TLR-2 та TLR-4 у хрящі за умов експериментальної патології та при введенні ХС та ПБ корелювали з встановленими змінами вмісту їх розчинних форм у сироватці крові. Встановлено, що вміст розчинних форм TLR-2 та TLR-4 у сироватці крові щурів з експериментальним ОА підвищувався в 1,2 рази ( $p \leq 0,05$ ) порівняно з контролем, що може свідчити не лише про асоціацію розвитку патологічного процесу з індуцибельною надекспресією патернрозпізнавальних рецепторів у хрящовій тканині, а й бути наслідком їх шедінгу. Окреме та комбіноване введення ХС та ПБ тваринам з експериментальною патологією усувало збільшення вмісту розчинних форм TLR2 та TLR4 у сироватці крові до значень, які значимо не відрізнялись від показників контрольної групи тварин (рис. 19).

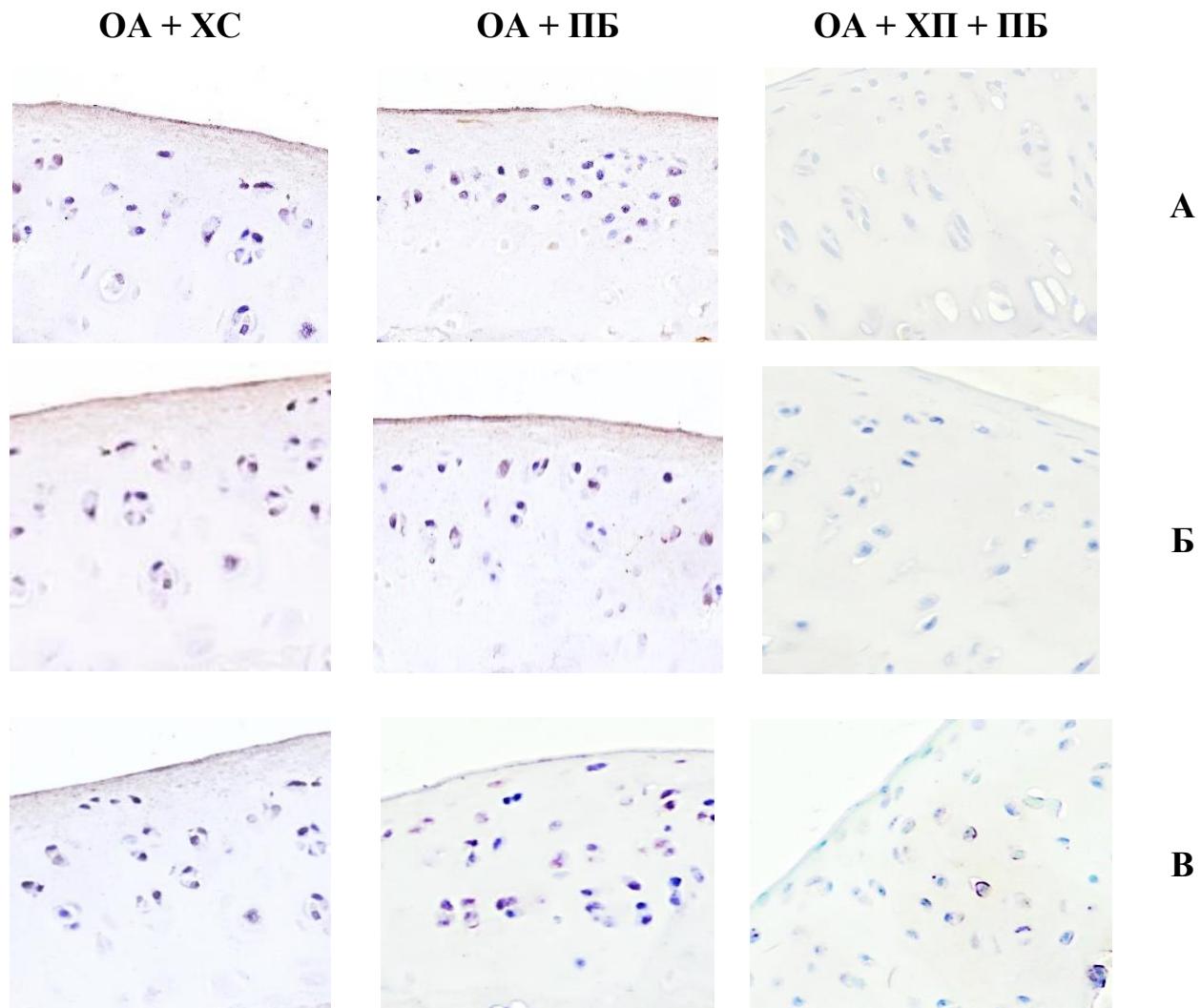


Рис. 18. Експресія TLR-2 (А), TLR-4 (Б) і NF-kB (Б) у хондроцитах суглобового хряща тварин з експериментальним остеоартритом при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика. Імуногістохімічне забарвлення з використанням МАТ TLR-2, TLR-4, NF-kB. Збільшення  $\times 200$

Наступним етапом досліджень було визначення рівнів експресії генів *Tlr2*, *Tlr4*, *Nfkb1*, які кодують відповідні Toll-подібні рецептори – TLR-2, TLR-4 та транскрипційний фактор NF-kB, і залучені в шляхи сигнальної трансдукції, модуляції імунної відповіді та ремоделювання в хрящовій тканині щурів при ОА. Виявлено, що рівень експресії гена *Tlr2* у хрящах колінного суглоба щурів з експериментальним ОА був вищим у 3,2 раза ( $p \leq 0,001$ ) порівняно з контрольними тваринами (рис. 20А). При введенні

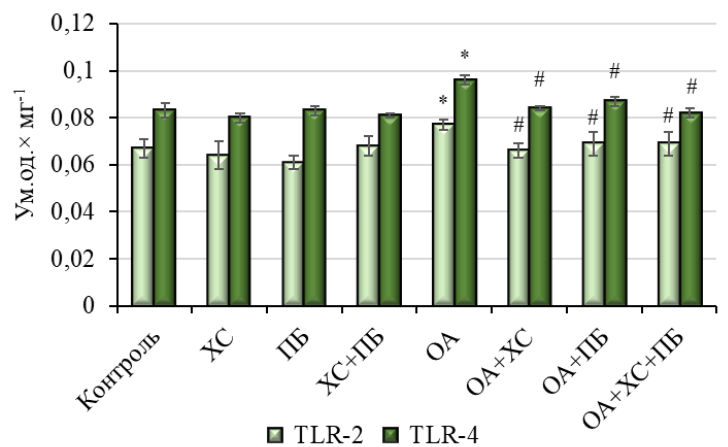
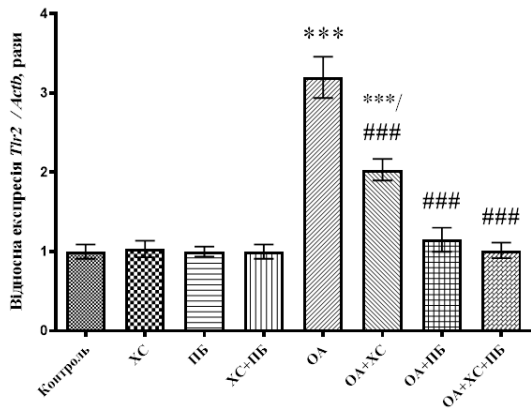
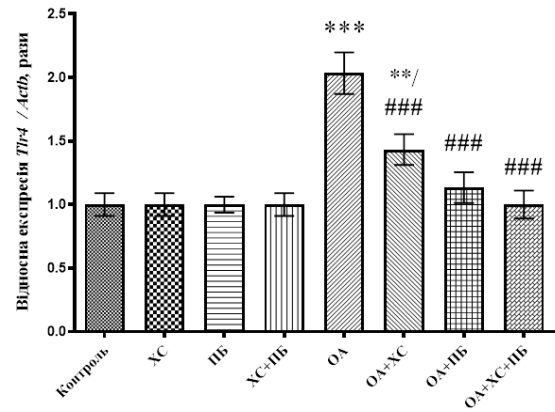


Рис. 19. Вміст розчинних форм TLR-2 та TLR-4 у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтин сульфату та пробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=14$ ; \* –  $p \leq 0,05$  відносно контрольних тварин; # –  $p \leq 0,05$  відносно тварин групи ОА)

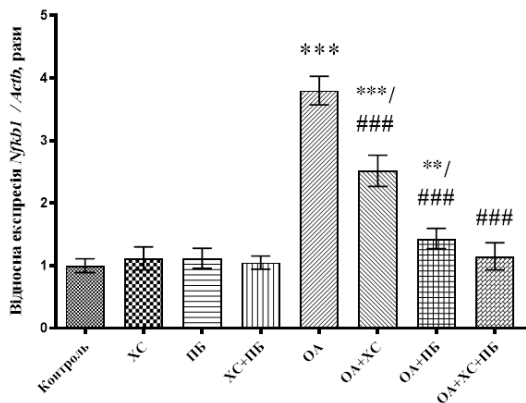
ХС щурам з експериментальним ОА рівень експресії гена *Tlr2* знижувався в 1,6 раза ( $p \leq 0,001$ ) відносно тварин з ОА, проте був підвищеним у 2 рази ( $p \leq 0,001$ ) порівняно з контрольними тваринами. При введенні ПБ окремо та разом з ХС щурам з експериментальним ОА рівень експресії цього гена значимо повертався до контрольних значень (рис. 20А).



А



Б



В

Рис. 20. Рівень експресії генів *Tlr2* (А), *Tlr4* (Б) і *Nfkb1* (В) в хрящовій тканині колінного суглоба щурів за умов експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=14$ ; \*\*\* –  $p \leq 0,001$ , \*\* –  $p \leq 0,01$  відносно контрольних тварин; ### –  $p \leq 0,001$  відносно тварин групи ОА)

Рівень експресії гена *Tlr4* у хрящах колінного суглоба щурів у групі тварин за експериментального ОА був вищим у 2 рази ( $p \leq 0,001$ ) порівняно з контролем (рис. 20Б). При введенні ХС за умов експериментальної патології рівень експресії гена *Tlr4* в хрящовій тканині знижувався в 1,4 раза ( $p \leq 0,001$ ) відносно тварин з ОА, проте був підвищеним в 1,4 раза порівняно з контрольними тваринами ( $p \leq 0,01$ ). При введенні ПБ окремо та разом з ХС у щурів із експериментальним ОА рівень експресії гена *Tlr4* значимо не відрізнявся від контрольних значень (рис. 20Б).

У результаті подальших досліджень показано, що рівень експресії гена *Nfkb1* у хрящах колінного суглоба щурів у групі тварин з патологією був вищим у 3,8 раза ( $p \leq 0,001$ ) порівняно з контрольними тваринами (рис. 20В). У той же час, при окремому введенні ХС і ПБ щурам з експериментальним ОА рівень експресії гена *Nfkb1* знижувався в 1,5 рази ( $p \leq 0,001$ ) та в 2,7 рази ( $p \leq 0,001$ ) відповідно, відносно тварин з ОА. Однак, дані показники були вище контрольного рівня (в 2,5 ( $p \leq 0,001$ ) та 1,4 раза ( $p \leq 0,01$ ) відповідно) (рис. 20В). За умов комбінованого введення ХС і ПБ при експериментальному ОА рівень експресії гена *Nfkb1* значимо не відрізнявся від показників у тварин контрольної групи (рис. 20В).

Отже, встановлені зміни експресії генів *Tlr2*, *Tlr4* та *Nfkb* у хрящовій тканині щурів за умов експериментального ОА можуть свідчити про їх суттєву роль у розвитку катаболічних і запальних процесів у суглобі та залучення хондроцитів до імунної відповіді. 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.

На основі отриманих даних експериментальних досліджень нами запропонована узагальнююча концептуальна схема біохімічних механізмів ремоделювання хрящової тканини за умов експериментального ОА при введенні ХС та ПБ (рис. 21).

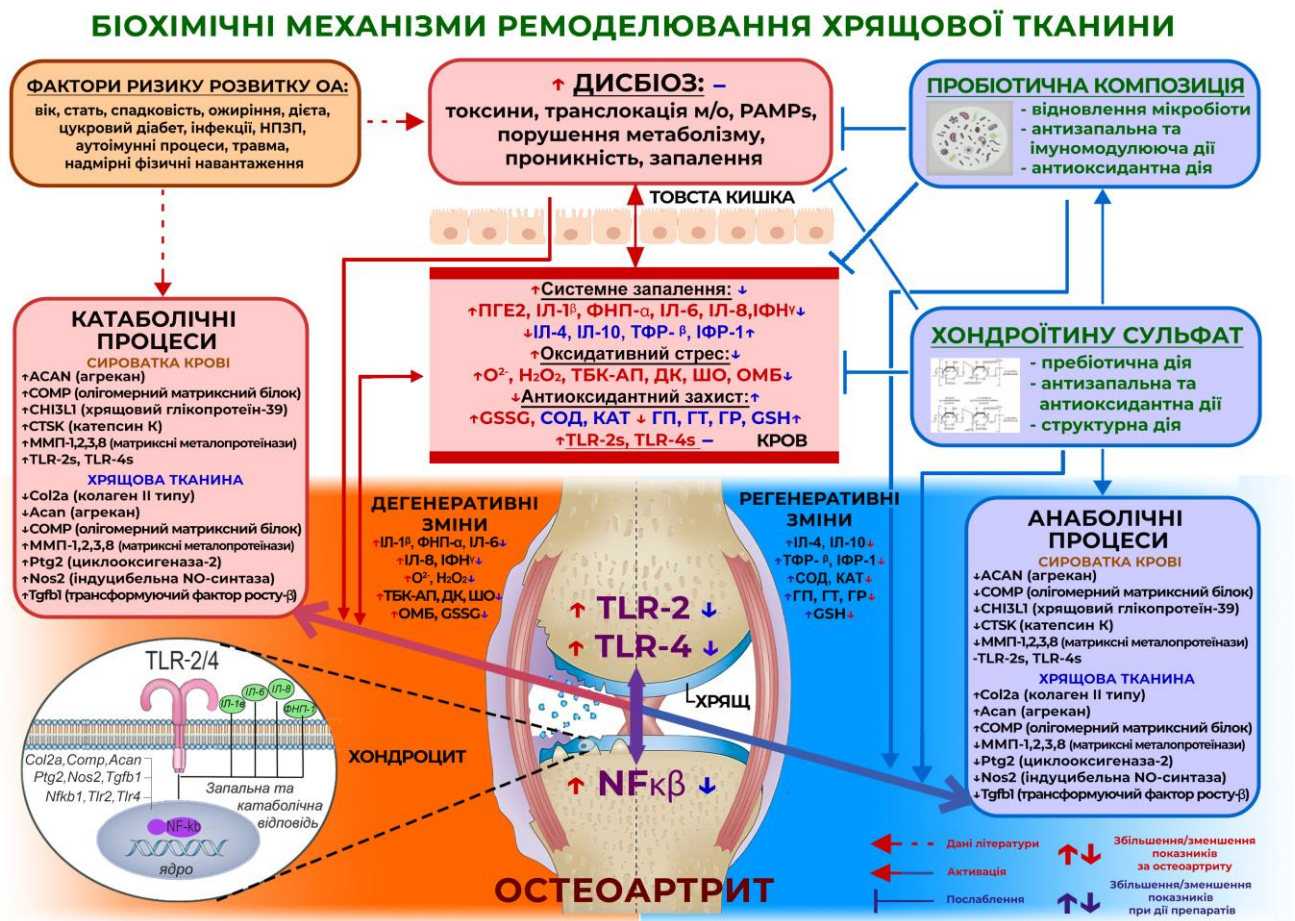


Рис. 21. Узагальнююча схема біохімічних механізмів ремоделювання хрящової тканини за експериментального остеоартриту при введенні хондроїтину сульфату та пробіотика.

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, локальним/системним запаленням і порушенням оксидантно-антиоксидантної рівноваги (рис. 21). Хоча різні фактори ризику розвитку ОА,

такі як вік, стать, ожиріння, цукровий діабет, травми, надмірні фізичні навантаження, аутоімунні та інфекційні процеси були запропоновані етіологічними для патогенезу ОА, основні зв'язки між цими факторами та перебігом ОА все ще залишаються невідомими [Li Y., et al., 2019]. 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. 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.

## 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 окисного 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 моноацетат-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, лактонегативної *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 тварин контрольної групи.

4. Встановлено, що за умов експериментального остеоартриту в сироватці крові та хрящовій тканині колінного суглоба щурів зростає вміст прозапальних (катаболічних) цитокінів ІЛ-1 $\beta$ , ФНП- $\alpha$ , ІЛ-6, ІЛ-8, ІФН- $\gamma$  та ТФР- $\beta$ , збільшувались концентрація простагландину E<sub>2</sub> 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) маркерів 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 супероксиддисмутаза 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 супероксиддисмутаза 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- $\kappa$ B. Показано позитивну імуногістохімічну експресію Toll-подібних рецепторів -2, -4, транскрипційного фактору NF- $\kappa$ B 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 TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B в хрящовій тканині та відсутність розчинних форм TLR2 і TLR-4 у сироватці крові.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### *Статті у наукових фахових виданнях України:*

1. 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 (*Особистий внесок здобувача – планування експерименту, відтворення моделі, дослідження окисної модифікації білків, аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку*).

2. 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. (*Особистий внесок здобувача – відтворення експериментальної моделі, визначення перекисного окиснення ліпідів у хрящовій тканині, узагальнення результатів, аналіз літературних джерел, написання тексту статті*)

3. 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. (*Особистий внесок здобувача – планування та проведення досліджень, аналіз і узагальнення отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку*).

4. Вовк А, Короткий О, Янковський Д, Торгалло 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. (*Особистий внесок здобувача – планування схеми досліджень, відбір експериментального матеріалу, визначення ферментативних активностей та вмісту ТБК-активних сполук, аналіз результатів, написання тексту статті виконано у співавторстві*).

5. Драницина АС, Блохіна ОГ, Короткий ОГ, Дворщенко КО, Остапченко ЛЛ. 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. (*Особистий внесок здобувача – планування досліджень, відтворення експериментальної моделі та відбір матеріалу для дослідження, участь у проведенні досліджень експресії генів, аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку*).

6. 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.

*(Особистий внесок здобувача – планування схеми та участь у проведенні досліджень, узагальнення отриманих результатів, написання тексту статті виконано у співавторстві).*

7. 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. *(Особистий внесок здобувача – планування схеми експерименту, участь у проведенні досліджень вільнорадикальних процесів, узагальнення отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку виконано у співавторстві).*

8. Короткий ОГ, Воєйков АІ, Фалалєєва ТМ, Берегова ТВ. Дослідження підгострої токсичності хондроїтин сульфату натрію за показниками морфофункціонального стану печінки у щурів та кролів. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2016;74(2):66-72. *(Особистий внесок здобувача – пошук та аналіз літератури за темою досліджень, відбір зразків експериментального матеріалу, участь у проведенні досліджень, аналіз результатів, написання тексту статті).*

9. 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. *(Особистий внесок здобувача – планування експерименту, участь у проведенні досліджень, аналіз отриманих результатів, написання тексту статті, підготовка матеріалів до друку).*

**Статті у наукових фахових виданнях України,  
які входять до міжнародних наукометричних баз даних:**

1. 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. **(Scopus)** *(Особистий внесок здобувача – планування експерименту, дослідження антиоксидантного балансу та визначення вмісту металопротеїназ, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

2. 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. **(Scopus)** *(Особистий внесок здобувача – планування експерименту, участь у проведенні досліджень, узагальнення отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).*

3. Korotkyi OH, Vovk AA, Galenova TI, Vovk TB, Dvorschenko KO, Falalyeyeva TM, Ostapchenko LI. Cytokines profile in knee cartilage of rats during monoiodoacetate-induced osteoarthritis and administration of probiotic. Biopolym Cell. 2020;36(1):23-35. **(Scopus)** *(Особистий внесок здобувача – планування схеми досліджень, відбір експериментальних зразків, проведення визначення вмісту цитокінів, аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).*

4. 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. (**Web of Science; Scopus**) (Особистий внесок здобувача – планування та участь у проведенні досліджень експресії генів, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку).

5. 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 osteoarthritis. *Ukr Biochem J.* 2019;91(6):49-58 (**Scopus**) (Особистий внесок здобувача – планування та проведення досліджень, аналіз результатів, участь у написанні тексту статті, підготовка матеріалів до друку).

6. Dranitsina AS, Dvorshchenko KO, Korotkiy AH, Grebinyk DM, Ostapchenko LI. Expression of *Ptgs2* and *Tgfb1* genes in rat cartilage cells of the knee under conditions of osteoarthritis. *Cytol Genet.* 2018;52(3):192-197. (**Web of Science; Scopus**) (Особистий внесок здобувача – планування експерименту, відбір матеріалу для досліджень, участь у проведенні досліджень експресії генів, аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).

#### **Статті в іноземних виданнях:**

1. Korotkyi O, Huet A, Dvorshchenko K, Kobyljak N, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Probiotic composition and chondroitin sulfate regulate TLR-2/4-mediated NF-κB inflammatory pathway and cartilage metabolism in experimental osteoarthritis. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2021; <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09735-7>. (**Web of Science; Scopus**) (Особистий внесок здобувача – планування, розробка концепції та проведення досліджень, аналіз результатів, участь у написанні тексту статті, підготовка матеріалів до друку).

2. Korotkyi O, Kyriachenko Y, Kobyljak N, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Crosstalk between gut microbiota and osteoarthritis: A critical view. *J Funct Foods.* 2020;68:103904. (**Web of Science; Scopus**), (оглядова стаття) (Особистий внесок здобувача – пошук та аналіз літератури з теми дослідження, розробка теоретичної концепції, участь у написанні тексту статті, підготовка матеріалів до друку).

3. Korotkyi O, Dvorshchenko K, Falalyeyeva T, Sulaieva O, Kobyljak 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. (**Web of Science; Scopus**) (Особистий внесок здобувача – планування та участь у проведенні досліджень, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку).

4. Korotkyi O, Vovk A, Galenova T, Vovk T, Dvorschenko K, Lizza F, Abenavoli L, Kobyljak 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. (**Web of Science; Scopus**) (Особистий внесок здобувача – планування схеми експерименту, дослідження

цитокинового та металопротеїназного профілів, аналіз отриманих результатів, участь у написанні тексту статті).

5. Korotkyi OH, Vovk AA, Dranitsina AS, Falalyeyeva TM, Dvorshchenko 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 (**Web of Science; Scopus**) (Особистий внесок здобувача – планування та участь у проведенні досліджень, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).

6. Korotkyi O, Vovk A, Blokhina O, Dvorshchenko 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; Scopus**) (Особистий внесок здобувача – планування експерименту, участь у проведенні досліджень, аналіз і узагальнення отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).

7. 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 (**Scopus**) (Особистий внесок здобувача – розробка схеми досліджень, відтворення експериментальної моделі, відбір матеріалу, участь у проведенні досліджень, аналіз результатів, участь у написання тексту статті, підготовка матеріалів до друку).

8. 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 sulfate. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Science.* 2017;8(4):994-1001 (**Web of Science**) (Особистий внесок здобувача – планування схеми та участь у проведенні досліджень, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку спільно).

#### **Методичні рекомендації:**

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-наукового 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. (Особистий внесок здобувача — пошук наукової літератури, планування та проведення експерименту, аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку)

#### **Тези наукових доповідей:**

1. Yurchenko O, Vovk A, Korotkyi O, Dvorshchenko 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: КПП ім. Ігоря Сікорського, вид-во «Політехніка»; 2020. С.102.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. 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. (**Web of Science**)

7. Nehrai D, Blokhina O, Korotkyi O, Dranitsina A, Dvorshchenko K. The effect of chondroitin sulfate on levels of IL-1 $\beta$ , TGF- $\alpha$  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.

8. Vovk A, Korotkyi O, Tikhova Ye, Dranitsina A, Dvorshchenko K. Effect of chondroprotector 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.

9. Тіхова ЄВ, Ашпін МК, Короткий ОГ, Тимошенко МО. Дія хондропротекторного препарату на стан глутатіонової системи у сироватці крові щурів з експериментальним артрозом. *IV Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих вчених «Інновації та перспективи сучасної*

медицини», *ВМСО 2017*. 5-7 квітня 2017 року; Чернівці, Україна. Всеукраїнський медичний журнал студентів і молодих вчених «Хист». 2017;19:57.

10. 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 вісцеральні 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.

11. 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.

12. Tikhova Y, Korotkiy 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.

13. Korotkiy 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. (**Web of Science**).

## АНОТАЦІЯ

**Короткий О.Г. Біохімічні механізми ремоделювання хрящової тканини при експериментальному остеоартриті - Рукопис.**

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

Дисертація 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 виникають дисбіотичний стан товстої кишки та дегенеративно-дистрофічними зміни у хрящовій тканині колінних суглобів, в сироватці крові зростають концентрації ключових біохімічних маркерів метаболізму хряща: олігомерного матричного білка хряща, агрекану, катепсину К, хрящового глікопротеїну-39 та матричних металопротеїназ (ММП-1,2,3,8). Крім того, в хрящовій тканині та крові за експериментального ОА виявлено підвищення концентрації простагландину E<sub>2</sub>, збільшення рівня експресії залучених до розвитку запалення генів (*Ptgs2*, *Nos2*,

*Tgfb1*), вмісту катаболічних показників прозапального цитокинового профілю (ІЛ-1 $\beta$ , ФНП- $\alpha$ , ІЛ-6, ІЛ-8, ІФН- $\gamma$ ) та ТФР- $\beta$  при одночасному зниженні вмісту анаболічних протизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10) та ІФР-1; інтенсифікацію вільнорадикальних процесів: зростання вмісту супероксидних радикалів, перекису водню, продуктів окиснення ліпідів та білків; порушення функціонування антиоксидантної системи, що свідчило про розвиток запалення та окисного стресу як на локальному, так і на системному рівнях. Показано зниження рівнів експресії генів основних компонентів хрящового матриксу (*Col2a1*, *Acan*, *Comp*) та підвищення експресії залучених в шляхи сигнальної трансдукції генів (*Tlr2*, *Tlr4*, *Nfkb1*) у хрящовій тканині щурів з експериментальним ОА. За умов введення ХС та ПБ тваринам з експериментальним ОА спостерігалися корекція дисбіотичних порушень мікробіоти товстої кишки, часткове відновлення морфо-гістологічного стану суглобів і показників структурної будови матриксу хрящової тканини, досліджуваних біохімічних маркерів метаболізму хрящової тканини та запалення, прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, зниження експресії TLR-2, TLR-4 і NF $\kappa$ b. Виявлено, що ХС і ПБ проявляють протизапальну, антиоксидантну та регенеруючу дію шляхом як нормалізації кишкової мікробіоти, так і активації анаболічних процесів у хрящовій тканині за умов експериментального ОА. 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- $\kappa$ B-залежний запальний шлях.

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

## АННОТАЦІЯ

**Короткий А.Г. Биохимические механизмы ремоделирования хрящевой ткани при экспериментальном остеоартрите - Рукопись.**

Дисертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, 2021.

Дисертационная работа посвящена выяснению биохимических механизмов ремоделирования хрящевой ткани крыс с экспериментальным моноиодоацетатом-индуцированным остеоартритом (ОА) при введении хондроитина сульфата (ХС) и пробиотика (ПБ). Установлено, что у крыс в условиях экспериментального ОА возникают дисбиоз толстой кишки и дегенеративно-дистрофические изменения в хрящевой ткани коленных суставов, в сыворотке крови растут концентрации ключевых биохимических маркеров метаболизма хряща: олигомерного матриксного белка хряща, агрекана, катепсина К, хрящового гликопротеина-39 и матриксных металлопротеиназ (ММП-1,2,3,8). Кроме того, в хрящевой ткани и крови при экспериментальном ОА выявлено повышение концентрации

простагландина E<sub>2</sub>, увеличение уровней экспрессии вовлеченных в развитие воспаления генов (*Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*), рост содержания катаболических показателей провоспалительного цитокинового профиля (ИЛ-1β, ФНО-α, ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН-γ) и ТФР-β при одновременном снижении содержания анаболических противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10) и ИФР-1; интенсификацию свободнорадикальных процессов: рост содержания супероксидных радикалов, перекиси водорода, продуктов окисления липидов и белков; нарушение функционирования антиоксидантной системы, что свидетельствовало о развитии воспаления и окислительного стресса как на локальном, так и на системном уровне. Показано снижение уровней экспрессии генов основных компонентов хрящевого матрикса (*Col2a1*, *Acan*, *Comp*) и повышение экспрессии вовлеченных в пути сигнальной трансдукции генов (*Tlr2*, *Tlr4*, *Nfkb1*) в хрящевой ткани крыс с экспериментальным ОА. При введении ХС и ПБ животным с экспериментальным ОА наблюдались устранение дисбиотических нарушений микробиоты толстой кишки, частичное восстановление морфо-гистологического состояния суставов и показателей структурного строения матрикса хрящевой ткани, исследуемых биохимических маркеров метаболизма хрящевой ткани и воспаления, прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза, снижение экспрессии TLR-2, TLR-4 и NFκB. Выявлено, что ХС и ПБ проявляют противовоспалительное, антиоксидантное и регенерирующее действие путем как нормализации кишечной микробиоты, так и активации анаболических процессов в хрящевой ткани при экспериментальном ОА. По результатам экспериментальных исследований предложена концептуальная схема вовлечения микробиоты толстой кишки в биохимические механизмы ремоделирования хрящевой ткани суставов при экспериментальном ОА через TLR-2/4-опосредованный NF-κB-зависимый воспалительный путь.

**Ключевые слова:** остеоартрит, ремоделирование хрящевой ткани, хондроитин сульфат, пробиотик, воспаление, оксидативный стресс, антиоксидантная система, регуляторные механизмы.

## 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). We conducted a comprehensively evaluated gut microbiota status; histological changes in knee articular cartilages; changes of blood serum metabolic biochemical markers and expression of main genes responsible for cartilage matrix remodeling; biochemical markers and expression of genes responsible for the development of inflammatory responses, maintenance of prooxidant-antioxidant balance; and changes of signal transduction pathways in

cartilage tissue in monoiodoacetate-induced experimental osteoarthritis 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 and subchondral bone of knee joints. We also registered the increase in blood levels of main biochemical markers of cartilage metabolism, which play an important role in cartilage degradation and remodeling: cartilage oligomeric matrix protein, aggrecan, cathepsin K, chitinase-3-like-protein-1 and matrix metalloproteinases-1, 2, 3, 8. At the same time, we detected changes in rat cartilage and blood serum under experimental OA: increased levels of prostaglandin E<sub>2</sub>; upregulation of *Ptgs2* (cyclooxygenase-2), *Nos2* (inducible nitric oxide synthase) and *Tgfb1* (transforming growth factor beta 1), which are involved in the development of inflammatory responses; increased levels of catabolic pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ ) and TGF- $\beta$  with simultaneous decrease in anabolic anti-inflammatory IL-4, IL-10 and IGF-1; intensification of free radical production: increase in the amount of superoxide anion, hydrogen peroxide and products of lipid and protein oxidation; antioxidative defense disorders: increased activity of superoxide dismutase and catalase with elevated levels of oxidized glutathione, simultaneous downregulation of glutathione peroxidase, glutathione transferase and glutathione reductase combined with decrease in reduced glutathione, which was interpreted as both systemic and local inflammation and oxidative stress. We also detected downregulation of main cartilage matrix genes *Col2a1*, *Acan*, *Comp*, and upregulation of *Tlr2*, *Tlr4*, *Nfkb1* involved in signaling, in the cartilage of rats upon the experimental OA.

Administration of CS and PB to the experimental animals with induced OA resulted in correction of colon microbiota; partial recovery of morphological and functional state of joints, structural elements of cartilage matrix, biochemical markers of cartilage metabolism and inflammation, prooxidant-antioxidant homeostasis. Colon microbiota appeared to participate in biochemical mechanisms of articular cartilage remodeling in experimental OA model through TLR-2/4-mediated NF- $\kappa$ B inflammatory pathway. We found that chondroitin sulfate and probiotic show anti-inflammatory, anti-oxidative and pro-regenerative activity both through the normalization of gut microbiota and the activation of cartilage anabolism in rats upon monoiodoacetate-induced experimental osteoarthritis.

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 osteoarthritis.

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