

УДК 517.25

К. Дворщенко, д-р біол. наук, М. Ашпін, асп.,
А. Воєйков, асп., О. Короткий, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ДІЯ ХОНДРОЇТИНУ СУЛЬФАТУ НАТРІЮ НА ОКИСНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ БАЛАНС У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ З КАРРАГІНАН-ІНДУКОВАНИМ ЗАПАЛЕННЯМ ЗАДНЬОЇ КІНЦІВКИ

Встановлено суттєве порушення окисно-антиоксидантного балансу у сироватці крові щурів за умов каррагінанового набряку кінцівки. При цьому спостерігалось значне підвищення вмісту пероксиду водню та продуктів ліпідної пероксидації, зниження супероксиддисмутази та зростання каталазної активності. Показано, що при сумісному введенні препарату "Драстоп" та каррагінану щурам вищевказані показники суттєво відновлювались до контрольних значень.

Ключові слова: каррагінан-індуковане запалення, хондропротектор, сироватка, окисно-антиоксидантний баланс.

Вступ. Згідно даних медичної статистики третина населення світу має порушення опорно-рухового апарату, серед яких провідне місце займають хвороби суглобів. Патології кістково-суглобового апарату супроводжуються больовим синдромом, локальною гіпотрофією м'язової тканини, порушенням функціональної активності, втратою вільного руху, що знижує якість життя та може призвести до втрати працездатності та розвитку інвалідності. В зв'язку з цим вивчення патогенетичних механізмів захворювань опорно-рухового апарату та розробка методів їх лікування і профілактики є актуальним питанням сучасної біомедичної науки [1].

Патогенез ряду захворювань суглобів (ревматоїдний артрит, реактивний артрит, інфекційний артрит, ідіопатичний анкілозуючий спондилоартрит, подагричний артрит, деформуючий остеоартроз) пов'язаний з розвитком запалення. Невід'ємним компонентом запальної реакції є порушення окисно-антиоксидантної рівноваги клітин у прооксидантний бік, що призводить до розвитку окисного стресу в організмі [2, 3, 4]. Тривалі запальні процеси у суглобі здатні призводити до дегенеративних змін хрящової тканини та формуванню артрозів. В зв'язку з цим важливим є пошук препаратів, які б володіли регенераційними та протизапальними властивостями. На сьогоднішній день встановлено, що дистрофічні зміни хрящової тканини пов'язані зі зниженням вмісту специфічного компоненту хряща – хондроїтин сульфату, який забезпечує його пружність та щільність [5]. Тому дослідження властивостей засобів, основу яких складає хондроїтин сульфат, є перспективним у профілактиці та лікуванні захворювань суглобів. До таких медикаментів належить препарат "Драстоп", основною складовою частиною якого є хондроїтин сульфат.

В зв'язку з цим метою роботи було дослідити дію хондроїтину сульфату натрію (препарату "Драстоп") на окисно-антиоксидантний баланс у сироватці крові при гострому локальному запаленні задньої кінцівки щурів.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180-240 г з дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. За добу до проведення експерименту тварин піддавали харчовій депривації з вільним доступом до води.

Усіх тварин розділяли на три експериментальні групи. Моделювання набряку лапи щурів викликали субплантарним введенням 0,1 мл 1% розчину каррагінану у задню праву кінцівку тварини [6]. Третій групі тварин за одну годину до введення каррагінану внутрішньом'язово вводили у терапевтичній дозі 3 мг/кг препарат "Драстоп" (об'єм речовини складав 1 мл/кг). Контрольна група щурів отримувала еквівалентну кількість фізіологічного розчину.

Вміст пероксиду водню вимірювали у системі сорбції-тол-ксиленол оранж [7]. Вміст дієнових кон'югатів визначали в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометричним методом, шиффових основ – флуориметричним методом [8, 9]. Вміст ТБК-активних сполук визначали по реакції з тіобарбітуровою кислотою [10]. Оцінку активності супероксиддисмутази проводили з використанням нітросинього тетразолію [11], каталази – за зменшенням кількості H_2O_2 у розчині після інкубації за оптимальних умов [12]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [13]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за t-критерієм Ст'юдента.

Результати та їх обговорення. Запалення є основним фактором прогресування захворювань суглобів. Однією з найбільш важливих еферентних ланок запального процесу є активація вільнорадикальних процесів. Ступінь інтенсивності окисного стресу значною мірою визначає важкість перебігу та в цілому результат патології запального генезу [14, 15]. Тому нами була проведена оцінка дії препарату "Драстоп" на рівень пероксиду водню, продуктів переокисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та активність антирадикальних ферментів у сироватці крові при гострому запаленні задньої кінцівки щурів.

Процеси ПОЛ у сироватці крові щурів оцінювали за вмістом первинних продуктів ліпідної пероксидації – дієнових кон'югатів, проміжних продуктів ПОЛ – ТБК-активних сполук та кінцевих продуктів ПОЛ – шиффових основ. Вміст дієнових кон'югатів є біохімічним показником кількості первинних продуктів ПОЛ, утворюваних за участі активних форм кисню (АФК) та вільних радикалів $L^{\cdot}$, $LO^{\cdot}$ та $LOO^{\cdot}$. Вторинні продукти ліпідної пероксидації, утворювані у ході реакцій ланцюгового переокиснення, також проявляють високу реакційну здатність. Так, ТБК-активні сполуки (малоновий діальдегід та його похідні) викликають модифікацію білків та зміни у ліпідному шарі мембрани. Внаслідок окисної полімеризації модифікованих ліпідів і білків та їх зшивок утворюються кінцеві продукти ПОЛ – шиффові основи, які проявляють флюорисцентні властивості. Таким чином, за накопиченням дієнових кон'югатів можна оцінювати первинні ефекти окисного стресу, тоді як вміст шиффових основ відбиває ефективність нейтралізації продуктів вільнорадикального переокиснення у ліпідах [16].

Встановлено, що у щурів при експериментальному гострому запаленні задньої кінцівки у сироватці крові вміст пероксиду водню збільшується в 1,2 раза відносно контролю. За даних експериментальних умов, у щурів у сироватці крові вміст продуктів пероксидації ліпідів зростає: дієнових кон'югатів – в 1,6 раза, ТБК-активних сполук – в 1,4 раза та шиффових основ – в 1,3 раза порівняно з показниками контрольних тварин (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст перексиду водню та продуктів перекисного окиснення ліпідів у сироватці крові щурів при гострому запаленні задньої кінцівки та при введенні хондропротектора ($M \pm m$, $n = 4$)

Показник \ Групи тварин	Контроль	Карраганан	Карраганан + хондропротектор
Пероксид водню, $\mu\text{моль} \times \text{мг білка}^{-1}$	$0,344 \pm 0,026$	$0,413 \pm 0,042^*$	$0,327 \pm 0,031^\#$
Дієнові кон'югати, $\text{нмоль} \times \text{мг білка}^{-1}$	$43,78 \pm 4,16$	$71,03 \pm 7,24^*$	$55,04 \pm 5,49^{*/\#}$
ТБК-активні сполуки, $\text{нмоль} \times \text{мг білка}^{-1}$	$17,75 \pm 1,71$	$25,18 \pm 2,46^*$	$18,23 \pm 1,85^\#$
Шиффові основи, $\text{ум. од.} \times \text{мг білка}^{-1}$	$3,71 \pm 0,34$	$4,81 \pm 0,48^*$	$3,52 \pm 0,36^\#$

* – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p < 0,05$ відносно групи тварин, яким вводили хондропротектор

При введенні препарату "Драстоп" щурам з експериментальною моделлю гострого локального запалення в сироватці крові спостерігається відновлення до контрольних значень досліджуваних показників: знижується вміст перексиду водню та дієнових кон'югатів – в 1,3 раза, ТБК-активних сполук та шиффових основ – в 1,4 раза відносно групи тварин з карраганан-індукованим локальним запаленням (табл. 1).

Встановлене надмірне утворення продуктів ПОЛ свідчить про зниження роботи антиоксидантної системи. Першою лінією антиоксидантного захисту є кооператив-

на робота антирадикальних ферментів – супероксиддисмутази та каталази, які функціонують сумісно, забезпечуючи підтримку стаціонарного рівня концентрації вільних радикалів. Супероксиддисмутаза каталізує дисмутацію аніон-радикалу кисню в пероксид водню, а каталаза здійснює розщеплення перексиду водню до води.

При оцінці антиоксидантної системи у сироватці крові щурів при експериментальному гострому запаленні задньої кінцівки показано зниження супероксиддисмутазної активності – в 1,2 раза та зростання каталазної активності – в 3,4 раза відносно групи контрольних щурів (табл. 2).

Таблиця 2. Активність антирадикальних ферментів у сироватці крові щурів при гострому запаленні задньої кінцівки та при введенні хондропротектора ($M \pm m$, $n = 4$)

Показник \ Групи тварин	Контроль	Карраганан	Карраганан + хондропротектор
Супероксиддисмутазна активність, $\text{ум. од.} \times \text{хв}^{-1} \times \text{мг білка}^{-1}$	$0,083 \pm 0,008$	$0,067 \pm 0,006^*$	$0,072 \pm 0,007$
Каталазна активність, $\text{нмоль} \times \text{хв}^{-1} \times \text{мг білка}^{-1}$	$2,09 \pm 0,23$	$7,15 \pm 0,74^*$	$4,08 \pm 0,39^{*/\#}$

* – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p < 0,05$ відносно групи тварин, яким вводили хондропротектор

Виявлено, що у групі щурів, яким вводили хондропротектор, у сироватці крові активність досліджуваних ферментів відновлюється: супероксиддисмутазна активність – в межах контрольних значень, а каталазна активність знижується в 1,8 раза порівняно з групою тварин з експериментальною моделлю гострого локального запалення (табл. 2).

Згідно отриманих результатів експериментальних досліджень показано, що при гострому запальному процесі у сироватці крові щурів спостерігається зсув окисно-антиоксидантної рівноваги у прооксидантний бік, що призводить до розвитку окисного стресу, який в свою чергу сприяє пошкодженню тканин організму. Оскільки відомо, що продукти ПОЛ є маркерами екссудативно-деструктивного запалення, які з одного боку, виконують роль регуляторів запального процесу, а з іншого – цитотоксичних факторів, що роблять внесок у розвиток гнійно-запальних ускладнень.

Висновки. Таким чином, за результатами досліджень розвиток гострого локального запалення задньої кінцівки, індукованого введенням флогогену карраганану, у сироватці крові супроводжується активацією процесів вільнорадикального окиснення, про що свідчить посилення утворення АФК (перексиду водню) та накопичення продуктів ліпідної пероксидації на фоні змін супероксиддисмутазної і каталазної активностей.

Виявлено, що введення хондропротектора "Драстоп" щурам з експериментальною моделлю гострого локального запалення сприяє відновленню окисно-антиоксидантної рівноваги в сироватці крові, що вказує на антизапальні та антиоксидантні властивості досліджуваного препарату. Протекторна ефективність пре-

парату "Драстоп" потребує подальших досліджень, для встановлення молекулярних механізмів його дії на організм в умовах розвитку запальних процесів опорно-рухового апарату.

Список використаної літератури

1. Poole A.R. Osteoarthritis as a whole joint disease // Hospital for Special Surgery Journal. – 2012. – Vol. 8, №1. – P. 4–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
2. Goldring M.B. Inflammation in osteoarthritis / Goldring M.B., Otero M. // Current Opinion Rheumatology – 2011. – Vol. 23, №5. – P. 471–478. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
3. Moon S.J. Rebamipide attenuates pain severity and cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis by downregulating oxidative damage and catabolic activity in chondrocytes / Moon S.J., Woo Y.J., Jeong J.H. et al // Osteoarthritis Cartilage. – 2012. – Vol. 20, №11. – P. 1426–1438. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
4. Orlowsky E.W. The role of innate immunity in osteoarthritis: when our first line of defense goes on the offensive / Orlowsky E.W., Kraus V.B. // Journal Rheumatology. – 2015. – Vol. 42, №3. – P. 363–371. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
5. Ishimaru D. Alterations in the chondroitin sulfate chain in human osteoarthritic cartilage of the knee / Ishimaru D., Sugiura N., Akiyama H. et al. // Osteoarthritis Cartilage. – 2014. – Vol. 22, №2. – P. 250–258. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
6. Morris C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse / Morris C.J. // Methods Molecular Biology – 2003. – Vol. 225. – P. 115–121. Available from: <http://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-374-7%3A115>
7. Nourooz-Zadeh J. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation – Xylenol Orange assay / J. Nourooz-Zadeh, J. Tajaddini-Sarmadi, S.P. Wolff // Analytical Biochemistry – 1994. – Vol. 220. – P. 403–409. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269784713571>
8. Гаврилов В.Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов / Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. // Лабораторное дело. – 1988. – № 2. – С. 60–63.
9. Колесова О.Е. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах / Ко-

сова О.Е., Маркин А.А., Федорова Т.Н. // Лабораторное дело. – 1984. – № 9. – С. 540-546.

10. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68. Available from: <http://www.twirpx.com/file/254926/>

11. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, И. Секей // Лабораторное дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.

12. Королюк М.А. Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы/ Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. // Лабораторное дело. – 1988. – Вып 1. – С. 16-18.

13. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Информполиграф, 2002. – 305 с. Available from: <http://www.twirpx.com/file/1440496/>

14. Меньщикова Е.Б. и др. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. – М.: Directmedia, 2013. – 215 с.

15. Lugin J. et al. The role of oxidative stress during inflammatory processes/ Lugin J. et al. // Biological chemistry. – 2014. – Т. 395. – №2. – С. 203-230. Available from: <http://www.ff.uil.pt/FCT/PTDC/BIM-MET/3262/2014/7.pdf>

16. Higdon A. Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms/ Higdon A., Diers A.R., Oh J.Y. et al. // Biochemistry Journal. – 2012. – Vol. 442, Pt. 3. – P. 453–464. Available from: <http://www.biochemj.org/content/442/3/453.long>

Надійшла до редколегії 16.09.15

Е. Дворщенко, д-р биол. наук, Н. Ашпин, асп., А. Воейков, асп., А. Короткий, канд. биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ДЕЙСТВИЕ ХОНДРОИТИНА СУЛЬФАТА НАТРИЯ НА ОКИСЛИТЕЛЬНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС С КАРРАГИНАН-ИНДУЦИРОВАННЫМ ВОСПАЛЕНИЕМ ЗАДНЕЙ КОНЕЧНОСТИ

Установлено существенное нарушение окислительно-антиокислительного равновесия в сыворотке крови крыс при каррагинановом отеке лапы. При этом наблюдалось значительное повышение содержания перекиси водорода и продуктов липидной перекисидации, понижение супероксиддисмутазной активности, а также возрастание каталазной активности. Показано, что при одновременном введении препарата "Драстоп" и каррагинана крысам вышеуказанные показатели существенно восстанавливались до контрольных значений.

Ключевые слова: каррагинан-индуцированное воспаление, хондропротектор, сыворотка, окислительно-антиокислительный баланс.

K. Dvorshchenko, DSc., M. Ashpin, PhD stud., A. Voeikov, PhD stud., O. Korotkyi, PhD.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE EFFECT CHONDROITIN SODIUM SULFATE ON OXIDATION-ANTIOXIDANT BALANCE IN THE BLOOD SERUM OF CARRAGEENAN-INDUCED INFLAMMATION IN THE RAT HINDPAW

The significant violation of pro-/antioxidative balance in serum of carrageenan-induced inflammation in the rat paw was established. It was associated with increased levels of hydrogen peroxide and lipid peroxidation products, as well as with elevated catalase and decreased superoxide dismutase activity. All above mentioned indices was closer to control values in animals treated simultaneously with carrageenan and drug "Drastop".

Keywords: carrageenan-induced inflammation, chondroprotector, serum, oxidative-antioxidant balance.

УДК 575.17

О. Утевская, канд. биол. наук, Л. Атраментова, д-р биол. наук
Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Харьков,
Е. Балановская, д-р биол. наук
ФГБНУ "Медико-генетический научный центр", Москва, Россия,
О. Балановский, д-р биол. наук
Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва, Россия

ИЗМЕНЧИВОСТЬ STR ЛОКУСОВ Y-ХРОМОСОМЫ В ПОПУЛЯЦИЯХ УКРАИНЦЕВ

Получены частоты гаплотипов по 17 STR локусам Y-хромосомы для 1151 образца ДНК коренных украинцев из 13 областных популяций, представляющих основные территориальные подразделения Украины. Межпопуляционные различия по совокупности исследованных Y-STR маркеров незначительны. Внутриукраинская дифференциация наиболее выражена между группами популяций, представляющих Полесье, левобережную и правобережную лесостепь. Наиболее высокая дисперсия микросателлитных повторов наблюдается по краям этнического украинского ареала – на Закарпатье, Буковине, Слобожанщине, наиболее низкая – в Полесье. Значения гаплотипического разнообразия в среднем выше в степной и лесостепной зонах, чем в Полесье или Карпатах. Общее гаплотипическое разнообразие $HD = 0,998855$, вероятность совпадения гаплотипов у двух случайно взятых из популяции неродственных мужчин $MP = 0,00114508$, мощность дискриминации $DC = 0,89400521$.

Ключевые слова: украинцы, Y-хромосома, STR маркеры, гаплотипическое разнообразие.

Введение. Микросателлитные ДНК маркеры изучаются как для решения фундаментальных процессов эволюции, так и прикладных вопросов, находя практическое применение в медицине, криминалистике и генеалогии. В популяционной и эволюционной генетике человека широко используются STR маркеры (Short Tandem Repeats), локализованные на Y-хромосоме. Благодаря наследованию по мужской линии, отсутствию рекомбинаций и высокой вариабельности они находят применение для прослеживания миграций и других демографических событий в истории популяций, для изучения популяционной структуры, для филогенетического анализа Y-хромосомы [1-7]. Y-STR профили используются также в генеалогическом анализе для выявления родословных, поиска родственников, изучении древних образцов ДНК [8, 9]. В криминалистической генетике Y-STR маркеры являются дополнительным источником доказательств при обнаружении биологических следов преступников, поиске пропавших

людей, идентификации биологических останков, тестировании отцовства [10].

В данном исследовании была поставлена цель проанализировать структуру украинского генофонда по Y-STR маркерам, протестировав большую выборку из населения Украины по стандартной 17-локусной STR панели Y-filer. Выполненное нами ранее изучение структуры украинских популяций, не выявившее географической подразделенности в пределах Украины [11], проводилось по однонуклеотидным SNP маркерам (Single Nucleotide Polymorphism). Настоящее исследование опирается на факт, что, обладая более высокой мутационной скоростью по сравнению с однонуклеотидными SNP маркерами [12], микросателлитные STR маркеры за то же время накапливают большую изменчивость, что в ряде случаев позволяет с их помощью более тонко разграничить структуру популяций.

Y-хромосомные STR маркеры в украинских популяциях изучались и ранее, но в меньшем масштабе. В