

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ТІХОВА ЄЛИЗАВЕТА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 616.7:615.2/.3:577.125.8

**ДИСЕРТАЦІЯ
БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
ОСТЕОАРТРОЗУ ЩУРІВ**

03.00.04 – біохімія

09 - Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

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

_____Є.В. Тіхова

Науковий керівник: **Дворщенко Катерина Олександрівна**, д. б. н., с. н. с.

Київ – 2018

АНОТАЦІЯ

Тіхова Є.В. Біохімічні показники розвитку експериментального остеоартрозу щурів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2018.

Серед порушень опорно-рухового апарату важливе місце займають дегенеративно-дистрофічні захворювання суглобів, основним з яких є остеоартроз. Серед механізмів формування остеоартрозу сьогодні обговорюється розвиток окисного стресу в хрящовій тканині та загальний запальний аспект патогенезу цього захворювання, які можуть призвести до порушення метаболізму сполучної тканини, запальних і дегенеративних змін хряща. Наукові дослідження про взаємозв'язок між розвитком остеоартрозу та станом окисно-антиоксидантної рівноваги у хрящовій тканині є обмеженими та фрагментарними. Зокрема, не досліджено комплексно глутатіонову систему, окисну модифікацію білків та ліпідів при МІА – індукованому остеоартрозі щурів.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню біохімічних змін в сироватці крові та хрящовій тканині щурів з експериментальним моноіодацетат-індукованим остеоартрозом та відновлювальних процесів у хрящі при дії хондропротектора. В ході роботи вперше було досліджено комплексне порушення окисно-антиоксидантного балансу в сироватці крові та хрящовій тканині, проведено аналіз експресії генів, пов'язаних зі структурою матриксу та розвитком окисного стресу, доведено відновлення біохімічних показників окиснення-відновлення хрящової тканини у щурів з моноіодацетат-індукованим остеоартрозом після терапії хондроїтина сульфатом. В роботі було становлено позитивний вплив препарату на основі хондроїтина сульфату на вміст продуктів окиснення ліпідів, білків, рівень активних форм кисню, активність

антиоксидантних систем та експресію мРНК генів, пов'язаних зі структурою матриксу та функціонуванням клітин хрящової тканини.

Результати роботи розширюють уявлення про молекулярні та біохімічні механізми ураження та відновлення хрящової тканини колінного суглобу за умов експериментального остеоартрозу. Доведено ефективність застосування хондропротекторного препарату «Драстоп» для відновлення окисно-антиоксидантного гомеостазу хрящової тканини. Результати дисертації можуть бути використані у практичній травматології і ортопедії та у навчальному процесі під час підготовки студентів біологічних та медичних спеціальностей.

Ключові слова: остеоартроз, хондроїтина сульфат, вільнорадикальні процеси, антиоксидантна система.

SUMMARY

Tikhova Ye.V. Biochemical indices of development of experimental osteoarthritis of rats. - Manuscript.

A dissertation submitted to acquire the degree of Candidate of Science in Biology (PhD), specialty 03.00.04 – Biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

Among the disorders of the locomotor system, an important place is occupied by degenerative-dystrophic diseases of the joints, the main of which is osteoarthritis. Among the mechanisms of formation of osteoarthritis today is the development of oxidative stress in cartilage tissue and the general inflammatory aspect of the pathogenesis of this disease, which can lead to a disruption of the metabolism of connective tissue, inflammatory and degenerative changes in the cartilage. Scientific research on the relationship between the development of osteoarthritis and the state of oxidative-antioxidant balance in cartilage tissue are limited and fragmentary. In particular, a complex glutathione system, an oxidation modification of proteins and lipids in MIA-induced osteoarthritis in rats has not been investigated.

The dissertation is devoted to the study of biochemical changes in blood serum and cartilage tissues of rats with experimental monoiodacetate induced osteoarthritis and restorative processes in cartilage under the action of chondroprotector. It was established that free radical processes are involved in the biochemical mechanisms of damaging the cartilage tissue of the knee joint of the rats under the conditions of monoiodacetate-induced osteoarthritis in the background of inflammation, which is manifested by the growth of the content of active forms of oxygen, xanthine oxidase activity, products of peroxidation of lipids and proteins against the background of an antioxidant defense (growth of superoxide dismutase and catalase activity, decrease of glutathione peroxidase, glutathione transferase, glutathione reductase active dren, reduced glutathione content and increased levels of oxidized glutathione). In the course of work for the first time complex disturbance of oxidative-antioxidant balance in serum of blood and cartilaginous tissue was investigated, an analysis of expression of genes related to the structure of the matrix and the development of oxidative stress was performed. The restoration of biochemical indices of oxidation-restoration of cartilage tissue in monoiodacetate-induced rats osteoarthritis after chondroitin sulfate therapy. The effect of the chondroitin sulfate preparation on the content of the lipid and protein oxidation products, the level of active forms of oxygen, the activity of antioxidant systems and the expression of mRNA genes associated with the matrix structure and the functioning of the cartilage tissue cell were positive.

The results of the work broaden the understanding of the molecular and biochemical mechanisms of lesion and restoration of the cartilage tissue of the knee joint under conditions of experimental osteoarthritis. The efficiency of the chondroprotective drug «Drastop» for the restoration of oxidative antioxidant homeostasis of cartilage tissue has been proved. The results of the dissertation can be used in practical traumatology and orthopedics and in the educational process during the preparation of students of biological and medical specialties.

Key words: osteoarthritis, chondroitin sulfate, free radical processes, antioxidant system.

Список опублікованих праць за темою дисертації

1. Дворщенко К, Берник О, Тіхова Є, Вовк А, Короткий О. Окисна модифікація білків сироватки крові щурів за умов експериментального запалення задньої кінцівки щурів. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. 2015;2(19):76-78.
2. Тіхова ЄВ, Берник ОО, Савчук ОМ, Дворщенко КО, Остапченко ЛІ. Інтенсивність вільнорадикальних процесів у хрящовій тканині щурів з колаген-індукованим артритом. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. 2016;2(21):27-30.
3. 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;4(7):26-30.
4. Tikhova Y, Dvorshchenko KO, Dranitsina AS, Grebinyk DM, Korotkyi OG, and 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 sciences. 2017;8(4):994-1001.
5. Тіхова Є, Тимошенко М, Ковельська Ю, Дворщенко К. Стан глутатіонової системи у сироватці крові щурів при експериментальному артозі та при введенні хондроїтина сульфату. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2017;1(22):47-50.
6. Тіхова ЄВ, Дворщенко КО, Короткий ОГ, Фалалєєва ТМ, Берегова Т.В. Стан суглобових хрящів при артозі та після введення тест-зразка «Драстоп». Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. 2017;1(30):99-101.
7. Тіхова ЄВ, Ашпін МК, Воєйков АІ, Табурець ОВ, Дворщенко КО. Перекисне окиснення ліпідів у сироватці крові щурів при гострому запаленні

у суглобах. В: XIII Міжнародна наукова конференція молодих науковців «Шевченківська весна 2015: Біологія». Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка. 2015:22.

8. Тіхова ЄВ, Дворщенко КО, Ашпін МК, Воєйков АІ, Короткий ОГ, Остапченко Л.І. Дія хондропротектора на окисно-антиоксидантний баланс у сироватці крові за умов каррагінан-індукованого запалення задньої кінцівки щурів. В: Науково-практична конференція «Мультипробіотики в профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань». Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка. 2015:21.

9. Тіхова ЄВ, Берник ОО, Вовк АА, Проценко ЮА, Компанець ІВ, Дворщенко КО. Окисна модифікація білків сироватки крові щурів при гострому запаленні суглобів. В: Міжнародна міждисциплінарна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна 2016». Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка. 2016:194-195.

10. Тіхова ЄВ, Вовк АА, Короткий ОГ, Дворщенко КО. Окисна модифікація білків у сироватці крові щурів при експериментальному артриті. В: XI Международная научно-практическая конференция «Фундаментальная и прикладная наука – 2016». Sheffield, Science and education ltd. 2016:30-32.

11. Tikhova Ye, Korotkyi O, Kovelska Y, Dvorshchenko K. Positive effect of chondroitin sulfate on prooxidant-antioxidant balance in rat cartilage tissue in the treatment of osteoarthritis. XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 25 – 27 квітня 2017: матер.конф. Львів, Україна. 2017:73.

12. Тихова ЕВ, Ашпин НК, Короткий АГ, Дворщенко ЕА. Окислительная модификация белков в суставе крыс с коллаген- индуцированным артритом. XII Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Наука и образование - 2017». Астана. Евразийский национальный университет имени Л. Н. Гумилёва. 2017:1042-1046.

13. 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 «Іновації та перспективи сучасної медицини» ВІМСО, 5 – 7 квітня, 2017: матер.конф. Чернівці, Україна. 2017:58.
14. Tikhova Y, Vovk A, Korotkyi O, Dranitsina A, Dvorshchenko K. Effect of chondroprotector on cartilage tissue repairing during experimental osteoarthritis in rats. In: Third Kyiv International Symposium Smooth Muscles Physiology, Biophysics & Pharmacology: from genes and molecules to functions, disorders and their novel treatment opportunities. Kyiv – Lutsk, Taras Shevchenko National University of Kyiv. 2017:74.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	12
ВСТУП.....	14
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури.....	20
1.1. Етіологія та патогенез остеоартрозів.....	20
1.2. Біохімічні зміни у суглобі за умов розвитку остеоартрозу.....	23
1.3. Сучасні підходи лікування та профілактики остеоартрозів.....	28
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	36
2.1. Використані матеріали та реактиви.....	36
2.2. Умови проведення експерименту.....	37
2.3. Гістологічний аналіз зрізів гіалінового хряща колінних суглобів щурів.....	38
2.4. Отримання гомогенату хрящової тканини.....	39
2.5. Отримання сироватки крові щурів.....	40
2.6. Визначення вмісту цитокінів та факторів росту у хрящовій тканині урів.....	40
2.7. Визначення концентрації простагландину E2 в сироватці крові...	41
2.8. Визначення концентрації молекул низької та середньої молекулярної маси у сироватці крові.....	42
2.9. Визначення вмісту супероксидного радикалу в сироватці крові та хрящовій тканині.....	42
2.10. Визначення ксантиноксидазної активності в сироватці крові та хрящовій тканині.....	43
2.11. Визначення вмісту пероксиду водню в сироватці крові та хрящовій тканині.....	44

2.12.	Визначення вмісту дієнових кон'югатів та шиффових основ ненасичених жирних кислот в сироватці крові та хрящовій тканині.....	45
2.13.	Визначення вмісту ТБК-активних продуктів в сироватці крові та хрящовій тканині.....	46
2.14.	Визначення вмісту продуктів окисної модифікації білків в сироватці крові та хрящовій тканині	46
2.15.	Визначення вмісту загальних, білок-зв'язаних та небілкових SH-груп в сироватці крові та хрящовій тканині.....	47
2.16.	Визначення каталазної активності в сироватці крові та хрящовій тканині.....	48
2.17.	Визначення супероксиддисмутазної активності в сироватці крові та хрящовій тканині.....	49
2.18.	Визначення глутатіонпероксидазної активності в сироватці крові та хрящовій тканині.....	50
2.19.	Визначення глутатіонтрансферазної активності в сироватці крові та хрящовій тканині.....	50
2.20.	Визначення глутатіонредуктазної активності в сироватці крові та хрящовій тканині.....	50
2.21.	Визначення вмісту відновленого та окисленого глутатіону в сироватці крові та хрящовій тканині.....	51
2.22.	Визначення концентрації білка за методом Лоурі.....	52
2.23.	Кількісна ЗТ-ПЛР.....	52
2.23.1.	Виділення загальної РНК з хрящів щурів.....	52
2.23.2.	Оцінка рівня експресії генів.....	53
2.24.	Статистична обробка отриманих результатів.....	54

РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їх обговорення.....	55
3.1. Оцінка ступеню запалення у щурів за умов моноіодацетат-індукованого остеоартрозу та при дії хондропротектора.....	55
3.1.1. Морфометричні параметри колінного суглобу.....	55
3.1.2. Гістологічний аналіз тканини колінного суглобу.....	58
3.1.3. Концентрація цитокінів у сироватці крові (ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-12Вр40, ІЛ-4, ІЛ-10).....	61
3.1.4. Концентрація простагландину Е2 у сироватці крові.....	68
3.1.5. Рівень молекул низької та середньої молекулярної маси у сироватці крові.....	71
3.1.6. Рівень експресії мРНК генів Ptgs2 (COX-2), Nos2, Tgfb1 у хрящовій тканині суглобу.....	74
3.2. Інтенсивність вільнорадикальних процесів у сироватці крові та хрящовій тканині щурів при експериментальному остеоартрозі та при дії хондропротектора.....	84
3.2.1. Вміст активних форм кисню у сироватці крові та хрящовій тканині щурів.....	84
3.2.2. Ксантиноксидазна активність у хрящовій тканині колінних суглобів щурів.....	87
3.2.3. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у сироватці крові та хрящовій тканині щурів.....	89
3.2.4. Вміст продуктів окисної модифікації білків у сироватці крові та хрящовій тканині щурів.....	94
3.2.5. Ферменти антирадикального захисту в сироватці крові та хрящовій тканині щурів.....	99
3.2.6. Глутатіонова антиоксидантна система в сироватці крові та хрящовій тканині щурів.....	102
3.2.7. Вміст загальних, білок-зв'язаних та небілкових SH-груп у сироватці крові та хрящовій тканині щурів.....	110

3.3. Показники структурної будови хрящової тканини у щурів за умов експериментального остеоартрозу та при дії хондропротектора:.....	115
3.3.1. Рівень експресії мРНК гену Col2a1 (колаген тип II альфа1)	115
3.3.2. Рівень експресії мРНК гену Acan (агрекану).....	118
РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	121
ВИСНОВКИ.....	132
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	134
Додаток 1.....	166

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АОС — антиоксидантна система
АФК — активні форми кисню
ГЛП — глутатіонпероксидаза
ГЛР — глутатіонредуктаза
ГЛТ — глутатіонтрансфераза
ДК — дієнові кон'югати
ДНФГ — динітрофенілгідрозин
ДТНБК — 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойна кислота
ЕІ — ендогенна інтоксикація
ІІ — інтерлейкін
КАТ — каталаза
КД — ксантиндегідрогеназа
КО — ксантинооксидаза
МІА — моноіодацетат натрію
ММП — матриксні металопротеїнази
МНСММ — молекули низької та середньої молекулярної маси
МСК — мезенхімальні стовбурові клітини
МСМ — молекул середньої маси
НАД⁺ — нікотинамідаденіндинуклеотид окиснений
НАДН — нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений
НАДФН — нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
НПЗП — нестероїдні протизапальні препарати
НСТ — нітросиній тетразолій
ОА — остеоартроз
ОМБ — окисна модифікація білків
ОП — олігопептиди
ОС — окисний стрес
Пг — простагландин

- ПЛР — полімеразна ланцюгова реакція
- ПОЛ — перекисне окиснення ліпідів
- СОД — супероксиддисмутаза
- ТБК — тіобарбітурова кислота
- ТНФА — тїонїтрофенїльний аніон
- ФНП- α — фактор некрозу пухлин α
- ХС — хондроїтина сульфат
- ЦОГ — циклооксигеназа
- ШО — шиффові основи
- COMP — cartilage oligomeric matrix protein
- GSH — reduced glutathione
- GSSG — oxidized glutathione
- HCl — гїдрохлоридна кислота
- H₂O₂ — пероксид водню
- iNOS — inducible nitric oxide synthase
- NF- κ B — nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
- NK — natural killer
- NKSF — natural killer cell stimulatory factor
- NO — монооксид азоту
- NOS — nitric oxide synthase
- O₂⁻ — супероксид аніон радикал
- PTGS2 — prostaglandin-endoperoxide synthase 2
- RANKL — receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
- SNP — single-nucleotide polymorphism
- TGF- β ₁ — transforming growth factor beta 1
- TLR — toll-like receptors
- TNF- α — tumor necrosis factor-alpha
- XTT — 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

ВСТУП

Актуальність теми. За даними статистики Всесвітньої організації охорони здоров'я захворювання опорно-рухового апарату займають третє місце за розповсюдженням серед населення та перше місце – серед причин тимчасової непрацездатності людей. Згідно даних літератури [1-3] ці хвороби зустрічаються у кожній четвертій людині, а після 60-ти років – у 97% населення. Серед порушень опорно-рухового апарату важливе місце займають дегенеративно-дистрофічні захворювання суглобів, основним з яких є остеоартроз (ОА). Основною причиною хвороби є порушення обмінних процесів у суглобі через травми, вроджені вади розвитку опорно-рухового апарату, дисплазії, мутації в генах колагену 2 типу, запальні захворювання суглобів, зайву вагу, виконання роботи, що пов'язана з важкою фізичною працею і ряд інших чинників [4-8].

Сформованій суглобовій патології передують місцеві біохімічні порушення внутрішньосуглобових структур, які суттєво випереджають клінічні прояви остеоартрозу. Серед механізмів формування остеоартрозу сьогодні обговорюється розвиток окисного стресу в хрящовій тканині та загальний запальний аспект патогенезу цього захворювання, які можуть призвести до порушення метаболізму сполучної тканини, запальних і дегенеративних змін хряща [16-20]. Наукові дослідження про взаємозв'язок між розвитком остеоартрозу та станом окисно-антиоксидантної рівноваги у хрящовій тканині є обмеженими та фрагментарними. Зокрема, не досліджено комплексно глутатіонову систему, окисну модифікацію білків та ліпідів при МІА – індукованому остеоартрозі щурів.

Дегенеративні порушення суглобів в першу чергу пов'язані зі змінами структури хрящової тканини суглобової поверхні та недостатністю основного полісахариду хряща – хондроїтина сульфату (ХС). Тому застосування препаратів, які містять сульфатовану форму хондроїтина є

доцільним при захворюваннях суглобів. Однак, біодоступність цієї речовини при пероральному вживанні досягає лише 13% [21]. В зв'язку з цим викликають інтерес ін'єкційні форми лікарських препаратів на основі хондроїтина сульфату. Вивчення цих питань, їх експериментальне обґрунтування є надзвичайно важливим для теорії і практики лікування остеоартрозів, запобігання ускладнень захворювання.

Дана дисертація присвячена комплексному вивченню інтенсивності протікання вільнорадикальних процесів при моноіодацетат-індукованому остеоартрози у хрящовій тканині суглоба та крові, а також дослідженню дії на ці процеси хондропротектора на основі хондроїтина сульфату.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота була виконана у науково-дослідній лабораторії «Біохімії» відділення біологічних і біомедичних технологій Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках бюджетних науково-дослідних тем №11БФ036-01 «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакції організму за умов розвитку різних патологій» (2011-2015 рр., № д/р 0111U004648) та № 16БФ036-01 «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (2016-2018 рр. № д/р 0116U002527).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було вивчити біохімічні механізми розвитку пошкодження хрящової тканини щурів за умов моноіодацетат-індукованого остеоартрозу та при дії хондропротектора на основі хондроїтина сульфату.

Відповідно до мети дисертаційного дослідження поставлено наступні завдання:

1. Оцінити ступінь розвитку запалення у щурів при остеоартрози.
2. Визначити інтенсивність вільнорадикальних процесів у хрящовій тканині та сироватці крові щурів за умов остеоартрозу.

3. Оцінити стан антиоксидантної системи у хрящовій тканині та сироватці крові щурів при експериментальному остеоартрозі.
4. Дослідити рівень експресії мРНК генів, залучених у деградацію хрящової тканини за умов остеоартрозу.
5. З'ясувати механізми корегуючої дії хондропротектора (на прикладі препарату на основі ХС) щодо відновлення хрящової тканини колінного суглобу щурів при моноацетат-індукованому остеоартрозі.

Об'єкт дослідження: біохімічні механізми пошкодження хрящової тканини щурів з експериментальним моноацетат-індукованим остеоартрозом та відновлювальні процеси в хрящі при дії хондропротектора.

Предмет дослідження: маркери запалення, стан окисно-антиоксидантної системи, рівень експресії мРНК генів у хрящовій тканині колінного суглобу щурів за умов експериментального остеоартрозу та при введенні хондропротекторного препарату і його антирадикальні, протизапальні, імуномодулюючі властивості.

Методи дослідження: гістологічні, імуноферментні – визначення вмісту цитокінів, простагландину E₂, спектрофотометричні – визначення молекул низької та середньої молекулярної маси (МНСММ), вмісту супероксидного радикалу, пероксиду водню, продуктів перекисного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків, каталазної (КАТ), супероксиддизмутазної (СОД), глутатіонпероксидазної, глутатіонтрансферазної і глутатіонредуктазної активності, тіолових (SH-) груп; спектрофлюориметричні – визначення вмісту шиффових основ, відновленого та окисненого глутатіону; молекулярно-біологічні – ПЛР-аналіз експресії генів циклооксигенази (*Ptgs2*), індукцбельної нітрооксидсинтази (*Nos2*), трансформуючого фактора росту бета (*Tgfb1*), колагену тип II альфа 1 (*Col2a1*), агрекану (*Acan*) та методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено комплексне дослідження біохімічних показників взаємозв'язку запалення з процесами вільнорадикального окиснення та функціонуванням системи антиоксидантного захисту у хрящовій тканині колінного суглобу щурів на моделі моноіодацетат-індукованого (МІА) остеоартрозу. Виявлено, що при МІА-індукованому ОА у крові активується імунітокінова система: зростає рівень прозапальних (ІЛ-1 β , ФНП- α) та антизапального (ІЛ-10) цитокінів, що супроводжується зростанням простагландину Е2 та вмісту молекул низької і середньої молекулярної маси, які є індикатором розвитку ендогенної інтоксикації та проявом прогресії запалення. Показано зсув окисно-антиоксидантної рівноваги в напрямку інтенсифікації прооксидантних процесів та розвитку окисного стресу на фоні зниження антиоксидантних властивостей хрящової тканини щурів при експериментальному ОА. Зокрема, у хрящовій тканині при МІА-індукованому ОА зростає вміст супероксидного радикалу, перекису водню, підвищується ксантиноксидазна активність, зростає вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів (дієнових кон'югатів, ТБК-активних сполук, шиффових основ) та збільшується рівень продуктів окисної модифікації білків (альдо- і кетопохідних нейтрального та основного характеру). Встановлено, що при експериментальному ОА у хрящовій тканині зростає супероксиддисмутазна та каталазна активності та знижується активність глутатіон-залежних ферментів (глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази, глутатіонредуктази) та вміст відновленого глутатіону на фоні зростання вмісту окисненого глутатіону. Також інтенсифікація вільнорадикальних процесів виявлена у сироватці крові щурів з експериментальним ОА, а саме, зростання активних форм кисню, продуктів перекисного окиснення ліпідів і окисної модифікації білків, порушення роботи антиоксидантної системи. Доведено збільшення рівня експресії генів, що залучені до розвитку запалення (*Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*) та зниження рівня експресії генів, що відповідають за будову матриксу (*Col2a1*, *Acan*) хрящової

тканини у щурів за умов експериментального ОА. Розширено наукові дані про особливості імуномодельючої та антиоксидантної дії хондропротекторного препарату на основі хондроїтина сульфату в регенерації хрящової тканини при МІА-індукованому остеоартрозі.

Практичне значення одержаних результатів. Результати роботи розширюють уявлення про молекулярні та біохімічні механізми ураження та відновлення хрящової тканини колінного суглобу за умов остеоартрозу. Експериментально доведено ефективність застосування хондропротекторного препарату на основі хондроїтина сульфату для відновлення окисно-антиоксидантного гомеостазу хрящової тканини та крові щурів при МІА-індукованому остеоартрозі. Результати дисертації можуть бути використані у практичній травматології і ортопедії та у навчальному процесі під час підготовки студентів біологічних та медичних спеціальностей.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто здійснено пошук та опрацювання фахової літератури за темою дослідження, аналіз сучасного стану проблеми, проведення експериментів, обробка, статистичне та теоретичне обґрунтування результатів дослідження. Формування ідеї та мети роботи, постановка завдань, моделювання експерименту, планування методичних підходів, узагальнення результатів дослідження та редагування дисертаційної роботи здійснено спільно з науковим керівником. Автор висловлює глибоку вдячність д.б.н., проф. Л.І. Остапченко та д.б.н., проф. Т.М. Береговій з ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка за консультативну допомогу в проведенні даних досліджень. Всі дані, отримані у співавторстві, відображені у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові положення дисертаційної роботи були представлені на XIII міжнародній науковій конференції молодих науковців «Шевченківська весна» (Київ, 2015), XIV

міжнародній науковій конференції молодих науковців «Шевченківська весна» (Київ, 2016), The XII international scientific and practical conference «Fundamental and applied science» (Sheffield, England, 2016), XIII міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2017), XII Международной научной конференции студентов и молодых ученых «Наука и образование - 2017» (Астана, Казахстан, 2017), IV Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих учених «Інновації та перспективи сучасної медицини» (Чернівці, 2017), Third Kyiv International Symposium Smooth Muscles Physiology, Biophysics & Pharmacology (Київ – Львів, 2017).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 14 наукових праць, з яких 5 наукових статей у фахових виданнях, що входять до переліку, затвердженому МОН України, стаття у виданні, що входить до міжнародної наукометричної бази, а також 8 матеріалів і тез доповідей на всеукраїнських та міжнародних наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, опису результатів власних досліджень та їх обговорення, розділу з узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, що включає 262 найменування та додатку. Дисертаційна робота викладена на 169 сторінках машинописного тексту (з яких основна частина займає 133 сторінки), ілюстрована 14 рисунками та містить 14 таблиць.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Етіологія та патогенез остеоартрозів

Остеоартроз (ОА) - хронічне дегенеративно-дистрофічне захворювання суглобів, що характеризується прогресуючою деструкцією суглобового хряща, проліферативної реакцією хрящової і кісткової тканини і часто супутнім вторинним синовітом (запаленням суглоба). В Україні поширеність ОА складає 497,0 на 100 тис. населення. За статистикою цей показник нижчий, ніж в США, але вищий, ніж у Великобританії. За прогнозом ВООЗ на 2020 у порівнянні з 1990 роком кількість хворих після 50 років збільшиться удвічі, артроз стане четвертим по важкості захворюванням [1]. Така поширеність зумовлена недостатніми профілактичними заходами та як наслідок, діагностикою вже на пізніх стадіях, повільним впровадженням сучасних методів діагностики та лікування. Перші помітні ознаки хвороби: біль, набряк та обмежена рухливість можуть початися в будь-якому віці, але найчастіше люди звертаються за допомогою у 30 – 50 років. Останнім часом спостерігається зниження віку хворих. Встановлено, що у молодому віці більше страждають чоловіки, а в старшому – жінки [2].

Виділяють первинний і вторинний ОА. Первинним або ідіоматичним є ОА, причина розвитку якого не встановлена. Вторинний ОА має встановлену причину: він розвивається після травми, при порушеннях метаболізму, ендокринних захворюваннях, як результат дегенеративно-некротичного процесу (асептичний некроз головки стегнової кістки, остеохондрит (хвороба Кеніга, хвороба Пертеса), як результат запального процесу (гнійне запалення суглоба, ревматоїдний артрит, артрит при системному червоному вовчаку, при туберкульозі) [3].

В узагальненому вигляді механізм розвитку артрозу можна звести до двох процесів: по-перше, остеоартроз може виникати, коли механічні

навантаження на суглоб не надмірні, але неадекватні структурі хрящової тканини. Суглоби можуть бути вразливі, якщо у них є генетично слабкий суглобовий хрящ, субхондральна кістка, зв'язки або м'язи. По-друге, артроз може розвинутися в результаті сукупного впливу повторних надмірних механічних напружень при генетично нормальних хрящі та інших структурах суглобів. По-третє, ОА виникає внаслідок несприятливих факторів середовища: переохолодження, дії екзогенних токсичних речовин, погіршення екологічної рівноваги, мікротравми внаслідок умов праці. Незалежно від механізму розвитку артрозу, фізіологічний обмін в суглобах порушується, процеси руйнування хряща починають переважати над процесами відновлення. З часом це призводить до незворотних змін у хрящовій тканині, субхондральній кістці, м'язово-зв'язковому апарату [4].

Генетичними факторами розвитку ОА є спадкові порушення колагену II (COL2A1) [5], мутації колагенів IX, X типів, фактора росту та проліферації FGD-5, низька продукція IL-10, зміни в генах α -ланцюга рецептора IL-4R та IL-1, що регулюють диференціювання хондроцитів, інша спадкова патологія кісток і суглобів (дисплазія головки стегнової кістки, гіпермобільний синдром) [6]. Негенетичні – постійні фізичні перевантаження (на шийно-плечову та попереково-крижову ретикулопатії страждають офісні працівники, медсестри з великим стажем роботи, робітники промисловості та сільського господарства, водії вантажівок, спортсмени), похилий вік, надлишкова маса тіла, зниження рівня жіночих статевих гормонів у постменопаузі, гормональні зміни (естроген може викликати підвищену щільність кісток у жінок, що є фактором ризику для виникнення артрозу колінного та стегнового суглобів) [7] травма, мікротравми через вплив вібрацій, набуті захворювання кісток і суглобів, хірургічні втручання на суглобах. Але найчастіше причинами розвитку дегенеративно-дистрофічного процесу в суглобі є травма, на другому місці – вроджена дисплазія, що порушує біомеханіку суглоба або запалення внаслідок аутоімунних захворювань,

інфекційного процесу (гостре гнійне запалення викликане стафілококом, гонореєю, сифілісом, кліщовим енцефалітом) чи гемофілії (хронічні гемартрози) [8, 9].

За клініко-рентгенологічною класифікацією І. С. Касінської (1961 г.) виділено 3 стадії розвитку ОА [10]. На першій стадії немає виражених морфологічних порушень тканин суглоба, але інколи спостерігається потовщення хрящових поверхонь. Найчастіше зміни стосуються лише функції синовіальної оболонки та біохімічного складу синовіальної рідини. Суглоб втрачає здатність протистояти звичному для нього навантаженню, а перевантаження супроводжується запаленням і больовим синдромом, який зникає у стані спокою. М'язи, що оточують суглоб, ослаблені, але в цілому їх структура не змінена [11]. Друга стадія характеризується руйнуванням суглобного хряща і менісків, звуженням суглобової щілини. Хрящ стає м'яким і пухким, на ньому з'являються глибокі виразки, але тільки в місцях найбільшого фізичного навантаження. На поверхні епіфізів кісток виникають крайові розростання – остеофіти як компенсаторне обмеження рухливості суглоба для запобігання сильного травмування [12]. Функціонування м'язів змінюється за рахунок порушення рефлексорної нейро-трофічної регуляції. Третя стадія є стадією важкого артрозу. Її ознаки – виражена кісткова деформація, яка змінює вісь кінцівки. Неспроможність до виконання фізіологічних функцій, вкорочення зв'язок суглоба призводить до патологічної рухливості суглоба або в поєднанні з жорсткістю суглобової сумки - до різкого обмеження рухів - контрактур. На цій стадії спостерігається порушення осі кінцівки, змінюється амплітуда скорочення м'язів, змінюються точки прикріплення м'язово-сухожильного комплексу [13]. Це супроводжується укороченням або розтягуванням м'язів, зниженням здатності до повноцінного скорочення. Трофічні порушення при важкому ОА стосуються не тільки м'язів, але і всіх тканин кінцівки. Хронічне запалення і хронічний больовий синдром, який не зникає у спокої зазвичай

супроводжують 2 і 3 стадію [14]. Кінцевий результат артрозу - повне руйнування суглоба з формуванням анкілозу - повної нерухомості суглоба або неоартрозу з неприродною рухливістю (бокові патологічні нестабільності). Це супроводжується важким порушенням функції та вісі кінцівки, при анкілозі тазостегнових суглобів кінцівка частково змінює своє фізіологічне положення та вісь, вкорочується [15]. Останнім часом, не чекаючи результату захворювання, все частіше застосовують спеціальні операції із заміни суглоба протезом - ендопротезування суглоба [16].

Найчастіше при ОА уражаються суглоби кисті, перший плюснефаланговий суглоб стопи, суглоби шийного і поперекового відділів хребта, колінних і тазостегнових суглобів. Однак по тяжкості порушення функції опорно-рухового апарату перше місце займають тазостегновий, колінний і гомілковостопний суглоби, а також плечовий суглоб [17].

Таким чином, остеоартрози є групою захворювань суглобів, які проявляються прогресуючою дистрофією хрящової тканини з наступним пошкодженням зв'язочного апарату та кісткової тканини, що призводить до поступового погіршення якості життя хворих та їх інвалідизацій.

1.2. Біохімічні зміни у суглобі за умов розвитку остеоартрозу

На сьогодні вважається, що зміни в метаболізмі субхондральної кістки, зв'язках, синовіальній оболонці є первинними щодо хронічного запалення та болі в суглобі. Власне хрящ не має в своєму складі нервів та судин [18].

Синовіальна оболонка суглоба забезпечує захист, іннервацію, живлення хряща через екзоцитоз речовин в синовіальну рідину, забезпечує синтез компонентів синовіальної рідини (гіалуронової кислоти, хондроїтина сульфату). В нормі вона складається з 1-4 шарів клітин, що межують із рихлою сполучною тканиною, в складі якої наявні фіброколагенові волокна, адипоцити, фібробласти, тучні клітини та макрофаги. Клітини у складі синовіальної оболонки підтримують гомеостаз суглоба. В більшості випадків

артроз суглобів супроводжується хронічним запаленням синовіальної оболонки. Синовіт при остеоартрозі характеризується васкуляризацію, інфільтрацію лімфоцитами, моноцитами та потовщенням базальної мембрани синовіальної оболонки [19, 20].

При травмі, перенавантаженні (мікротравми) відбувається руйнування клітин синовіальної оболонки та хондроцитів. Це викликає збільшення вмісту медіаторів запалення в синовіальній оболонці через екзоцитоз в синовіальну рідину IL-1 з синовіоцитів, хондроцитів, моноклеарних фагоцитів та макрофагів. IL-1 посилює експресію TNF- α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8 [21]. посилюється вироблення колонієстимулюючого фактору активованими T клітинами та фібробластами. В пошкоджених клітинах TNF α активується через F спондин, викликає хемотаксис лейкоцитів, активує імунітет, сприяє процесам ремоделювання кістки, проліферації остеобластів з подальшим розростанням остеофітів [22]. Значне підвищення вмісту цитокінів спостерігається в синовіальній рідині і лише деякі (IL-1, IL-4, IL-6 та TNF- α) виходять у кров. Виникає запальна реакція, артроз переходить в стан остеоартриту [23].

В хондроцитах IL-1 β , IL-6 зв'язуються з тирозинпротеїнкіназами та активують передачу сигналу по MAPK, p38 та ERK1/2 каскадах, знімається інгібітор транскрипційного фактору NF- κ B, відбувається посилена експресія синтази азоту, циклооксигенази 2, матриксних металопротеїназ, активуються каспази 3, 7, розвивається апоптоз [24, 25].

В синовальній оболонці макрофагальні цитокіни IL-1 β та TNF- α через зв'язування з плазміногеном та перетворенням його на плазмін активують матриксні металопротеїнази [26] (колагенази 1, 2, 3, стромелізін 1, желатинази, агреканази) та ферменти лізосом. В синовіоцитах та макрофагах посилюється активність циклооксигенази 2, яка синтезує запальні простагландини, що призводить до болю та набряків [27].

Клітини хрящової тканини та матрикс розщеплюються, фрагменти клітин та глікозаміногліканів фагоцитуються лейкоцитами, знову виробляються прозапальні цитокіни, сенсibiliзуються Т- та В клітини, які починають синетзувати антитіла до хряща та синовіальної мембрани, виникає імунопатологія, процес стає хронічним [28], відбувається фіброз, порушуються вироблення синовіальної рідини та живлення хряща, пригнічується синтез молекул колагену, гіалуронової кислоти, протеогліканів, хондроцити гинуть, хрящ стоншується, оголюються епіфізи кісток. На фізіологічному рівні це проявляється набряком, біллю, втратою рухливості та недієздатністю суглобу [29].

В патогенезі запалення прозапальні IL-1 та TNF- α відіграють ключову роль, посилюючи дію один одного. Значний вміст обох було виявлено в синовіальній оболонці, рідині та хрящовій тканині у хворих на ОА. Показано, що використання антитіл проти IL-1 попереджає деструкцію кістки, а антитіл проти TNF- α зменшує вираженість синовіту [30].

В дослідях на тваринах було показано, що введення в суглоб аутосиновіоцитів з генами протизапального IL-10 та антагоністу рецептора до IL-1 (IL-1RA) проявляло хондропротекторний вплив [31]. У дослідях на культурі хондроцитів людини було встановлено, що речовина рослинного походження куркумін має вплив на IL-1 β /TNF- α сигнальний шлях, пригнічує синтез в хондроцитах циклооксигенази 2 та матриксної металопротеїнази 9 через інгібування IL-1 β -індукованої активації NF- κ B та кінази В Akt, посилює синтез колагену II [32].

При остеоартриті змінюється фенотип хондроцитів: вони дедиференціюються, починають виробляти колагени I, III, V типів замість II та агрекану. Відбувається посилений патологічний ріст клітин. Хондроцити посилено синтезують хондроїтина сульфат, глюкозаміни та гіалуронову кислоту [33].

Гіпертрофовані хондроцити експерсують колаген Х, хондрогеніторні клітини експресують колаген ІА, що сприяє утворенню остеофітів [34].

Надмірна маса тіла може сприяти мікротравмам та змінам у будові колінного та тазостегнового хрящів через їх перенавантаження. Жирова тканина виробляє адипокіни, що володіють місцевими та загальними ефектами. Як маркери артрозу розглядають адипонектин, лептин, вісфатин та резистин. Ці речовини виділяються адипоцитами та впливають на гомеостаз хряща та кістки. Вважається, що вони поєднують між собою ожиріння, запалення та остеоартроз [35]. Адипонектин пригнічує запалення, TNF- α , активність матриксних металопротеїназ, підвищує чутливість до інсуліну, активує протизапальні ІЛ-10 та ІЛ-1РА, синтез колагену ІІ типу, агрекану, поділ і проліферацію хондроцитів. При ожирінні та при остеоартриті спостерігається зниження вмісту адипонектину та зростання вмісту лептину, вісфатину та резистину в плазмі крові [36].

Вісфатин пригнічує синтез протеогліканів та колагену ІІ, активує прозапальні цитокіни ІЛ-1 β , ІЛ-6, TNF- α , матриксні металопротеїнази, синтез простагландину Е2, сприяє росту остеофітів. Вміст вісфатину корелює із вмістом С-реактивного білка. Вісфатин розглядають як можливий маркер синовіту.

Зростання вмісту резистину в сироватці та синовіальній рідині спостерігається після травм, він викликає ріст та проліферацію остеобластів в остеофітах, активує прозапальні цитокіни та матриксні металопротеїнази [37].

Лептин стимулює катаболізм хряща та компонентів синовіальної рідини, хемотаксис, запалення, ріст та проліферацію остеобластів, деградацію глікозамінгліканів, через взаємодію з інтерфероном γ та ІЛ-1 β активує NO-синтазу та циклооксигеназу 2. При остеоартриті його вміст в плазмі та синовіальній рідині зростає [38].

Центральне місце в процесі розвитку ОА на фоні ожиріння, також як і в фізіологічному обміні, належить хондроцитам. Під впливом різних факторів в них порушуються процеси обміну і синтетичної активності. Вони починають продукувати невласиві нормальній хрящовій тканини колаген і протеоглікани (короткий, що не утворює фібрил колаген і низькомолекулярні дрібні протеоглікани), нездатні формувати агрегати з гіалуроновою кислотою, що призводить до втрати біохімічних властивостей хряща [39].

Порушується стабільність структури колагенової мережі, розвивається процес втрати матриксом глікозаміногліканів – хондроїтина сульфата, кератансульфатів, гіалуронової кислоти - поверхневої, проміжної і глибокої зон. Крім того, має місце зменшення молекули протеогліканів, і вона стає здатною до виходу з матриксу хряща. Змінені протеоглікани здатні поглинати воду, але не здатні міцно її утримувати [40]. Надлишкова вода поглинається колагеном, він набухає, волокна втрачають структуру, що веде до зниження захисних властивостей хряща, він стає пухким і втрачає свою амортизуючу функцію. Відбуваються розриви колагенових волокон, вироджується основна речовина [41]. Вивільнені протеоглікани, продукти розпаду хондроцитів і колагену, які є антигенами, індукують запалення. Розвивається реактивний синовіт. Істотно змінюється і хімічний склад синовіальної рідини. У ній помітно знижується вміст гіалуронової кислоти, що забезпечує в'язкість, підвищується активність ферментів, що руйнують клітини і тканини. На цьому тлі підвищується інтенсивність вироблення прозапальних цитокінів (інтерлейкінів 1 і 2, фактора некрозу пухлин і ін.) [42]. Останні в свою чергу реалізують вивільнення ферментів, що ушкоджують колаген і протеоглікани - колагеназ, а також - стромелізіна, простагландинів, оксиду азоту і активаторів плазміногену. Під впливом цитокінів (інтерлейкін-1) пригнічується активність інсуліноподібного фактору росту, який грає важливу роль у підтримці гомеостазу в матриксі хряща [43].

Серед механізмів розвитку остеоартрозу обговорюються розвиток окисного стресу і запальний аспект патогенезу цього захворювання, які можуть призвести до порушення метаболізму сполучної тканини, запальних і дегенеративних змін хряща. Розвиток окисного стресу обумовлено різкою інтенсифікацією процесів вільнорадикального окислення і / або зниженням резерву антиоксидантного захисту, що призводить до значного накопичення активних форм кисню (АФК) [44].

Таким чином, остеоартрози характеризуються порушенням метаболізму хрящової тканини та розвитком запалення з подальшою деструкцією суглобового хряща та оточуючих тканин. Проте на сьогодні немає широких комплексних досліджень, які б одночасно охоплювали патологічні процеси деградації хрящового матриксу, розвитку системного запалення та окисного стресу в сироватці крові і в хрящовій тканині одночасно як при експериментальному ОА, так і при лікуванні хондропротектором. Таке дослідження може надати цілісну картину узгодженості процесів деструкції та довести ефективність застосування хондроїтина сульфату на всіх етапах розвитку захворювання.

1.3. Сучасні підходи лікування та профілактики остеоартрозів

Терапія хворих ОА проводиться з використанням системнодіючих лікарських препаратів, але при цьому виникають проблеми їх переносимості, взаємодії, протипоказань. Комплекс лікувальних заходів поділяється на 4 групи: I - нефармакологічне лікування (дієта для нормалізації маси тіла, лікувальна гімнастика, яка сприяє зміцненню певних груп м'язів і збільшення обсягу рухів, ортопедичні заходи (носіння бандажів і корсетів, використання устілок), психотерапія, санаторно-курортне лікування, вітамінно- та фітотерапія); II - фармакологічне лікування, яке включає препарати симптоматичної швидкої дії - нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП), опіюїди, глюкокортикостероїди, симптоматичної повільної дії - хондроїтина

сульфат, гіалуронова кислота, неомілювані сполуки авокадо, діацереїн, глюкозамін та препарати патогенетичної дії – антиоксидантна терапія, інгібітори протеаз, метаболічна терапія, препарати для покращення мікроциркуляції; III – інтраартикулярна терапія (хондропротектори для внутрішньосуглобового застосування, протизапальні препарати, глюкокортикостероїди, лаваж; IV – хірургічна корекція (ендопротезування, артроскопія, остеотомія, артродез) [45, 46]. При ОА в якості фармакотерапії найпоширенішими є НПЗП та хондропротектори. НПЗП пригнічують утворення простагландинів через інгібування ферменту циклооксигенази (ЦОГ), яка запускає механізм утворення медіаторів запалення.

Відомо 2 ізофермента циклооксигенази. Так перший ізофермент (ЦОГ-1) відповідає за синтез простагландинів, що контролюють цілісність слизових оболонок шлунка, кишечника і нирок. Другий аналог (ЦОГ-2) необхідний для вироблення медіаторів запалення при ушкодженні різних тканин. В нормі він відсутній, а утворюється тільки після виходу тканинних активаторів запалення (цитокіни, гістамін та інші). Внаслідок блокади ЦОГ-1 при застосуванні НПЗП виникають побічні дії препаратів. Набряклість та запалення знімається виключно за рахунок інгібування ЦОГ-2 [47].

Класифікація НПЗП ділить їх на чотири групи [48, 49] селективні інгібітори ЦОГ-1 (низькі дози ацетилсаліцилової кислоти);

- неселективні інгібітори ЦОГ (більшість «стандартних» НПЗП);
- переважно селективні інгібітори ЦОГ-2 (мелоксикам, німесулід);
- специфічні (високоселективні) інгібітори ЦОГ-2 (коксиби).

НПЗП часто викликають ускладнення зі сторони шлунково-кишкового тракту (гастроінтестинальний синдром), при якому уражуються верхні і нижні відділи травного тракту, виникають множинні ерозії і пептичні виразки шлунка, існує високий ризик розвитку шлунково–кишкових кровотеч та залізодефіцитної анемії [50].

За останній час встановлена роль токсичних дериватів кисню (супероксидного аніону кисню і гідроксильного радикала) у розвитку запальних змін в суглобі. Супероксидний аніон кисню нейтралізується ферментом супероксиддисмутазою, який в даний час виділено в чистому вигляді і застосовується в клінічній практиці під назвою орготеїну [51].

В якості препаратів симптоматичної повільної дії найчастіше використовують препарати на основі хондроїтина сульфату та гіалуронової кислоти [52]. Препарати глюкозамінів не викликають побічних ефектів з боку серцево-судинної системи, а після курсу лікування знеболюючий ефект зберігається, на відміну від ефекту нестероїдних протизапальних препаратів [53, 54].

ХС являє собою сульфатований глюкозаміноглікан, який складається з довгих нерозгалужених ланцюгів з повторюваними залишками Нацетилгалактозаміна і глюкуронової кислоти. Більшість Нацетилгалактозамінових залишків сульфатовані в 4-му і 6-му положеннях [55]. Молекули ХС беруть участь в процесах транспорту води, амінокислот і ліпідів в аваскулярних ділянках хряща, ініціюють процес фіксації сірки в процесі синтезу хондроїтин-сірчаної кислоти, що, в свою чергу, сприяє відкладенню кальцію в кістках, стимулюють синтез гіалуронової кислоти, уповільнюють резорбцію кісткової тканини і знижують втрату Ca^{2+} , пригнічують дію специфічних ферментів, що руйнують сполучну тканину, в тому числі лізосомальних ферментів, які вивільняються в результаті руйнування хондроцитів (еластаза, пептидаза, катепсину, інтерлейкін-1 та ін.) [56].

На сьогодні дослідженнями *in vivo* та *in vitro* показано, що ХС здатен проникати у суглобові хрящі та стимулювати синтез колагену II типу та протеогліканів: аутосинтез та синтез гіалуронової кислоти; може зв'язуватись з toll-подібним рецептором (TLR)-4 [57] та інгібувати синтез прозапальних цитокінів MyD88 та TRAF-6 через пригнічення ядерної

транслокації NF- κ B [58]; знижувати експресію ADAMTS-4 та 5 (агреканаз), інтерлейкінів IL-1 β та (IL)-6, активацію iNOS, матриксних металопротеїназ (MMP-1, -3 -9 та -13) [59], мікросомальної синтази простагландинів (mPGES)-1, циклооксигенази 2 та синтез простагландину (Пг) E2 [60]; знижувати швидкість апоптозу хондроцитів, пригнічення активності MAP-кіназного сигнального шляху через p38 та Erk1/2, інгібування експресії, вмісту та активностей каспаз 3 та 7. В дослідженнях на моделях хронічного ОА тварин було помічено, що ХС зменшував експресію генів і синтез циклооксигенази-2, ліганд 2 хемокінів в синовіальній мембрані. Відзначалося зниження інфільтрації імунними клітинами синовіальної мембрани і ступеня її проліферації. Прозапальний цитокін IL-1 β разом з ФНП α стимулює синтез IL-8 та -6, матриксних металопротеїназ 1, 8 та 13, що руйнують хрящовий колаген 2 типу, цитокіни активують циклооксигеназу 2 синовіоцитів та хондроцитів, яка генерує медіатори запалення простагландини, що посилює запальні процеси [61]. У деяких дослідженнях *in vivo* було виявлено, що ХС може знижувати концентрацію в тканинах суглоба IL-1 β та інших прозапальних медіаторів (IL-6, синтаза нітриту азоту, простагландин E2), а також інгібувати індуковану експресію матриксних металопротеїназ 3, 9 та 13 в хондроцитах [62]. Хондропротектори захищають клітини, інгібуючи процеси окиснення білків, ліпідів та синтез вільних радикалів. Деякі дослідження вказують на пригнічення процесів апоптозу хондроцитів. ХС пригнічує активацію NF κ B в хондроцитах та синовіоцитах. NF κ B, зв'язуючись з промотором відповідного гену, активує транскрипцію прозапальних цитокінів, синтази оксиду азоту, циклооксигенази 2, фосфоліпази A2, матриксних металопротеїназ, що поглиблює деструктивні процеси деформованих при остеоартрозі суглобів. ХС пригнічує експресію RANKL та активує синтез остеопротегрину, що регулює процеси ремоделювання субхондральної кістки [63].

Ефективним методом лікування виявилися глюкокортикоїди. Глюкокортикоїди знижують рівень клітинного метаболізму, пригнічують проліферативні процеси, продукцію металопротеїназ і інтерлейкіну-1, що беруть участь в деструкції хряща. Можливо введення при цьому анестетиків (новокаїну, лідокаїну), дія яких на тлі глюкокортикоїдів потенціюється [64]. Необхідно відзначити, що частота інтраартикулярного введення глюкокортикоїдів обмежена через можливе посилення остеопорозу і негативного впливу на хрящ. Відсутність ефекту при одноразовому (максимум двократному) введення глюкокортикоїду є протипоказанням для подальших внутрішньосуглобових ін'єкцій препарату через пошкодження хряща [65].

Широко застосовуються фізіотерапевтичні методи лікування ОА, що зменшують больовий синдром, м'язовий спазм, запальні процеси, покращують мікроциркуляцію і трофіку, сприятливо впливають на метаболічні процеси в тканинах суглоба [66]. У період загострення ОА, обумовленого реактивним синовітом використовують ультрафіолетове опромінення, електричне поле УВЧ, змінні магнітні поля низької частоти, електрофорез анальгін, новокаїну, тримекаїну, димексиду на ділянку ураженого суглоба. У період ремісії, а також в початковій стадії захворювання, коли явища синовіту слабо виражені або відсутні застосовуються вплив електромагнітними полями високих і надвисоких частот (індуктотермія, дециметровая і сантиметрова хвильова терапія), імпульсні струми низької частоти - синусоїдальні модульовані ідіадинамічні, магнітотерапія, фонофорез гідрокортизону [67].

Профілактика артрозів полягає у виявленні гіпермобільних осіб, сколіозу, дисплазій, вроджених деформацій опорно-рухового апарату в підлітковому віці і усунення факторів прогресування деформацій, а також оптимізації ергономічних показників робочого місця, в т. ч. і в офісних працівників [68]. В якості основних протипоказань при прийомі на роботу,

пов'язану з перенапруженням опорно-рухового апарату, шийного і поперекового відділів хребта, що провокують розвиток і прогресування больових феноменів, є захворювання опорно-рухового апарату з порушенням функції, хронічні захворювання периферичної нервової системи, облітеруючий ендартеріїт, синдром і хвороба Рейно, периферичні судинні ангіоспазми. У первинній профілактиці провідна роль належить експертизі професійної придатності (попереднім і періодичним медичним оглядам), дотримання медичних регламентів допуску до роботи [69]. На сьогодні немає ефективного лікування, яке б забезпечувало повне одужання пацієнтів з ОА. Дія більшості препаратів направлена на полегшення симптомів захворювання, а не на відновлення вже існуючих патологічних змін. Тому необхідним є пошук препаратів, які б покращували стан пацієнтів на всіх стадіях ОА з мінімальними побічними ефектами.

На сьогоднішній день встановлено, що дистрофічні зміни хрящової тканини пов'язані зі зниженням вмісту хондроїтина сульфату, який є природнім компонентом міжклітинної речовини хряща поряд з гіалуроновою кислотою та глюкозамін сульфатом. Хондроїтина сульфат являє собою сульфатований протеоглікан, в якому сульфат ковалентно приєднаний до молекули хондроїтина. Він підтримує пружність та щільність хряща [70]. Тому дослідження препаратів, основу яких складає хондроїтин сульфат, є перспективним у профілактиці та лікуванні захворювань суглобів. Хондропротектори на основі хондроїтина сульфату використовуються в медицині вже давно, але сировина для них являє собою суміш молекул хондроїтина сульфату різної довжини та варіаціями у позиції сульфатованих груп, а також різну ступінь очищення, що обумовлює різні ефекти, які потрібно мати на увазі при призначенні оригінальних препаратів та дженериків [71].

Одним з перспективних сучасних хондропротекторів є препарат «Драстоп». Він є розчином для ін'єкцій. Згідно інструкції 1 мл препарату

містить: активна речовина: хондроїтина сульфат натрію - 100 мг; допоміжні речовини: бензиновий спирт - 12 мг, 1% розчин натрію гідроксиду або 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти - до рН 6,5-6,8, вода для ін'єкцій - до 1 мл, за фармакотерапевтичною класифікацією відноситься до стимуляторів репарації тканин. За інструкцією рекомендується застосовувати його при дегенеративно-дистрофічних захворюваннях суглобів і хребта, а саме, остеоартрозах периферичних суглобів, міжхребцевому остеоартрозі та остеохондрозі. За фармакодинамікою препарат проявляє хондростимулюючу, регенеруючу, протизапальну і анальгезуючу дію. Хондроїтина сульфат бере участь у побудові основної речовини хрящової і кісткової тканини. Володіє хондропротекторними властивостями, підсилює обмінні процеси в гіаліновому і волокнистому хрящах, субхондріальній кістці; пригнічує ферменти, що викликають деградацію суглобового хряща; стимулює вироблення хондроцитами протеогліканів. Сприяє зниженню викиду в синовіальну рідину медіаторів запалення і больових факторів, пригнічує секрецію лейкотрієнів і простагландинів. Уповільнює резорбцію кісткової тканини і знижує втрати кальцію, прискорює процеси відновлення кісткової тканини. Хондроїтина сульфат уповільнює прогресування остеоартрозу та остеохондрозу. Сприяє відновленню суглобової сумки та хрящових поверхонь суглобів, перешкоджає колапсу сполучної тканини, нормалізує продукцію суглобної рідини.

При застосуванні препарату зменшується болючість і поліпшується рухливість уражених суглобів, при цьому терапевтичний ефект зберігається тривалий час після закінчення курсу терапії.

При лікуванні дегенеративних змін суглобів, що супроводжуються вторинним синовітом, ефект спостерігається вже через 2-3 тижні з моменту початку курсу.

Володіючи структурною схожістю з гепарином, потенційно може перешкоджати утворенню фібринових тромбів в синовіальному і субхондріальному мікроциркуляторному руслі [72].

Таким чином, згідно проведеного аналізу літературних даних остеоартроз є хронічним дегенеративно-дистрофічним захворюванням, яке супроводжується розвитком запалення, що призводить до загибелі клітин синовіальної оболонки та хондроцитів. Артрози є найбільш поширеними захворюваннями суглобів, частота їх збільшується з віком і пізні стадії хвороби здатні спричинити тяжкі порушення опорно - рухового апарату. Але це захворювання зустрічається не тільки у літніх людей, що й обумовлює його соціальну значимість. Всі ці встановлені факти і визначили загальну мету та завдання роботи. А саме: вивчити біохімічні процеси розвитку пошкодження хрящової тканини щурів за умов моноіодацетат-індукованого остеоартрозу та при дії хондропротектора на основі хондроїтина сульфату.

Відповідно до мети дисертаційного дослідження поставлено наступні завдання: провести гістологічний аналіз тканин колінних суглобів щурів з експериментальним остеоартрозом, оцінити ступінь запалення у щурів при моноіодацетат-індукованому остеоартрозі, визначити інтенсивність вільнорадикальних процесів у хрящовій тканині щурів за умов остеоартрозу, оцінити стан антиоксидантної системи у хрящовій тканині щурів при експериментальному остеоартрозі, дослідити рівень експресії мРНК генів, залучених у деградацію хрящової тканини за умов остеоартрозу, з'ясувати механізми корегуючої дії хондропротектора (на прикладі препарату «Драстоп») щодо відновлення хрящової тканини колінного суглобу щурів при моноіодацетат-індукованому остеоартрозі.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Використані матеріали та реактиви

У роботі були використані наступні реактиви: набір для ПЛР «Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix» («Thermo Scientific», Литва). Глутатіон окиснений, глутатіон відновлений, телячий сироватковий альбумін, ксантин, ХТТ, сорбітол, бутил гідрокситолуол, ксиленол оранж, ДСН, тіобарбітурова кислота, L-цистеїну гідрохлорид, L-аргінін, ЕДТА, ауротіомалат натрію, проназа *S. griseus*, 1-дезоксi,1-морфолінофруктоза («Sigma-Aldrich Co. LLC», США); БАЕЕ («Fluka AG», Швейцарія), трис-амінометан, трис-НСІ, НАДН, НАДФН, НЕРЕС, ДТНБК, гуанідин ізотіоціанат («Merck», Німеччина), комерційні набори для визначення ФНП- α , ІІ-1 β , ІІ-4, ІІ-10, ІІ-12Вр40 («GE Healthcare: Amersham», Великобританія); комерційний набір для визначення простагландину E_2 («R&D Systems», США); агароза LE («Gibco», Німеччина), етидіум бромід, Coomassie Brilliant Blue G250 («AppliChem», Німеччина); хлорид магнію, дНТФ, RiboLock, Taq ДНК-полімераза, RevertAid M-MLV зворотна транскриптаза («Fermentas», Литва). Інші реактиви (1-хлор-2,4-динітробензол, гептан, гідрофосфат натрію однозаміщений, гідрофосфат натрію двозаміщений, гідрофосфат калію одно заміщений, етиловий спирт, хлороформ, ізопропіловий спирт, β -меркаптоетанол, карбонат натрію, гідрокарбонат натрію, гідроксид натрію, гідрохлоридна кислота, сульфатна кислота, метанол, 2-хлоро-4-нітрофеніл- α -галактозилмальтозид, молібдат амонію, ортофталевий альдегід, 2,4-динітрофенілгідразин, пероксид водню, пропіловий спирт, реактив Фоліна, сіль Мора, сульфат міді, трихлороцтова кислота, нітросиній тетразолій, феназинметасульфат, формальдегід, хлорид натрію, хлорид калію, хлорид кальцію, цитрат натрію, сульфат амонію, сульфат феруму, діацетилмонооксим, ацетат кальцію, ацетат натрію,

фенолфталеїн, борна кислота, парафін, еозин, гематоксилін, гліцилгліцин, п-нітроанілін, оцтова кислота, γ -L-глутаміл-4-нітроанлід, перхлорат амонію, етилацетат, диметил сульфоксид, гліцерол, бромфеноловий синій, фенол) вітчизняного виробництва кваліфікації х.ч. та о.х.ч. Інші реактиви та органічні розчинники х.ч. або ч.д.а. («Хімлаборреактив», Україна).

Для приготування водних розчинів застосовували дистильовану воду. В якості терапевтичного засобу використовували препарат «Драстоп». 1 мл препарату містить: активна речовина: хондроїтина сульфат натрію - 100 мг.

2.2. Умови проведення експерименту

У дослідах використовували білих нелінійних статевозрілих щурів-самців із початковою масою 180-240 г, які утримувались в умовах акредитованого віварію ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка згідно зі «Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв) з дотриманням загальних принципів біоетики у відповідності до міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Тварини отримували стандартний корм для гризунів та дехлоровану водопровідну воду. Тварин поділяли на чотири експериментальні групи. Першій групі тварин, Контроль, в перший день вводили в коліно крізь колінну зв'язку 0,05 мл 0,9% розчину NaCl. Другій групі тварин, ХС (контроль на введення препарату), вводили в перший день в коліно крізь колінну зв'язку 0,05 мл 0,9% розчину NaCl і внутрішньом'язево препарат «Драстоп», основною складовою якого є хондроїтина сульфат натрію, 1 раз на добу протягом 25 діб. Дегенеративно-дистрофічні зміни колінного суглобу, група ОА (остеоартроз), моделювали шляхом введення щурам в перший день в коліно 3 мг моноіодацетату натрію (МІА), розчиненого у 0,05 мл 0,9% розчину NaCl [73, 74]. Четвертій групі тварин,

ОА+ХС, вводили в перший день в коліно 3 мг моноіодацетату натрію, розчиненого у 0,05 мл 0,9% розчину NaCl, та внутрішньом'язево препарат «Драстоп» 1 раз на добу протягом 25 діб. Введення МІА та 0,9% розчину NaCl в коліно проводили під наркозом тіопенталом натрію внутрішньочеревно в дозі 60 мг/кг в об'ємі 0,5 мл/тварину. При розрахунку дози препарату для тварин використовували коефіцієнти перерахунку доз ($\text{мг} \times \text{кг}^{-1}$) з тварин на людину, вводили препарат в дозі 8,4 мг/кг живої ваги щурів в м'яз стегна правої задньої лапи в об'ємі 100мкл, препарат розчиняли у 0,9% розчині NaCl [75]. Тварин умертвляли на 30 добу після початку експерименту згідно протоколу етичного комітету, після чого швидко робили забір крові та гіалінових хрящів колінних суглобів для подальших досліджень. Загальна кількість тварин, залучених до експериментальних досліджень, становить 112 особини. Всі дослідження виконано відповідно до Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21 лютого 2006 р. Прилади, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

2.3. Гістологічний аналіз зрізів гіалінового хряща колінних суглобів щурів

Гіалінові хрящі щурів фіксувалися за стандартною гістологічною методикою [76] із використанням 10% забуференого розчину формаліну в якості фіксатора. Зневоднення зразків проводилося шляхом почергового занурення у серію розчинів етанолу із зростаючою концентрацією (від 60% до 96%). Шматочки фіксованої тканини хряща після проводки заливали у парафін за загальноприйнятим методом [77]. На ротаційному мікротомі «Мікром» (Харків, Україна) виготовлялися гістологічні зрізи товщиною 5 мкм.

Для фарбування мікропрепаратів зрізів хряща використовували метод подвійного фарбування гематоксилином і еозином [78].

Зріз хряща на предметному склі занурювали в ксилол на 20 хв. до повного розчинення парафіну. З ксилолу зрізи переносили в ємність з 96,5% етиловим спиртом на 1 хв. Препарати просушували та поміщали на 5 хв. у ємність з незакисленим гематоксиліном. Після профарбовування препарати промивали у дистильованій воді та диференціювали у 0,1% розчині гідрохлоридної кислоти до слабкого фіолетового кольору зрізів. Далі мікропрепарати хряща занурювали на 15 хв. у лужну воду і потім фарбували в еозині 1 хв. Після профарбування гістологічних зрізів препарати тричі відмивали в 96,5% етиловому спирті та сушили у потоці теплого повітря. Для просвітлення препарати занурювали в ксилол на 10 хв. і заключали в «канадський» бальзам, покриваючи пофарбований препарат покрівним скельцем.

Умови проведення гістологічних досліджень були максимально стандартизовані: зрізи хряща тварин різних груп розташовували рядами на одне скло таким чином, що на першому склі були подані зрізи хряща всіх тварин під №1 кожної групи, на другому склі — всіх під №2 і так далі. Це дозволяло запобігти мінімальним варіаціям таких параметрів, як тривалість фарбування тощо.

Мікрофотографії препаратів хряща отримували за допомогою світлового мікроскопа фірми «Olympus» ВХ-41, гвинтовий окуляр-мікрометр (об'єктив $\times 100$). За допомогою морфометричної програми оцінювалися морфометричні параметри клітин хряща. Кількість вимірів на кожний параметр 50. Результати оброблялися статистично. Висновки щодо впливу експериментальних речовин робилися на основі гістологічного і морфометричного аналізу.

2.4. Отримання гомогенату хрящової тканини

Для отримання гомогенату хрящової тканини видаляли гіалінові хрящі колінних суглобів щурів, очищували їх від прилеглих тканин та

зв'язок. Хрящі подрібнювали лезом скальпеля та розм'якшували у фарфоровій ступці з використанням фізіологічного розчину. Гомогенат хрящової тканини отримували на автоматичному гомогенізаторі з використанням фізіологічного розчину. Всі процедури проводили при температурі +4°C.

2.5. Отримання сироватки крові щурів

Одразу після декапітації тварин кров збирали через скляну воронку у скляні центрифужні пробірки без антикоагулянту та лишали на 20-30 хв за кімнатної температури для повного утворення згустка. Після цього зразки крові центрифугували при 1000 g протягом 15 хв. Осад з форменими елементами та згусток відкидали, а супернатант (сироватку) відбирали в окремі одноразові мікропробірки, заморожували при -20°C та використовували для подальших досліджень.

2.6. Визначення вмісту цитокінів та факторів росту у сироватці крові щурів

Вміст цитокінів та факторів росту визначали методом хемілюмінесцентного імуноферментного аналізу (CLIA), що базується на принципі сандвіча [79, 80].

Лунки поділені на дискретні ділянки з тест іммобілізованими моноклональними (мишачими) антитілами до унікальних сайтів антигенних детермінант, які специфічні до різних цитокінів та факторів росту. Аліквоти зразків, що містили антигени до досліджуваних цитокінів та факторів росту інкубують у лунці з ферментним кон'югатом (антитіла мічені пероксидазою хрому). Вміст цитокінів і факторів росту у досліджуваних зразках визначали за кількістю зв'язаної пероксидази у системі люмінал – H₂O₂-пероксидаза. Окиснена форма люмінолу здатна до хемілюмінесценції при 425 нм, інтенсивність світіння якої пропорційна концентрації утворених

імунокомплексів. Для посилення сигналу використовують підсилювачі (люциферин, феноли), які збільшують люмінесценцію в 10-100 разів.

У лунку з антитілами вносили по 200 мкл фосфатного буфера, 100 мкл проби (або калібратора), не торкаючись країв, та переносили на термошейкер (37°C, 1 год., 100 g). Після інкубації залишки розчинів витрушували та проводили 6 циклів промивки 0,1% розчином Tween у фосфатному буфері (перші 2 промивки – швидкі, наступні 4 – протягом 1 хв кожна). Після цього у лунки вносили по 300 мкл кон'югату і знову проводили інкубацію та промивку за тих же умов. Надалі вносили 250 мкл субстрату (2% розчин люміналу + 3% розчин H₂O₂ 1:1) та визначали величину люмінесценції через 2 хв.

Вміст цитокінів та факторів росту виражали в пг × мл⁻¹.

2.7. Визначення концентрації простагландину E₂ в сироватці крові

Визначення рівня простагландину E₂ в сироватці крові щурів було проведено методом імуноферментного аналізу за допомогою тест-системи «PGE2» (R & D Systems, США) за стандартною методикою [81]. Цей метод ґрунтується на конкурентному зв'язуванні, де простагландин E₂, присутній у досліджуваному зразку, конкурує з фіксованою кількістю простагландину E₂, зв'язаному з пероксидазою хрому, за іммобілізовані моноклональні (мишачі) антитіла до унікальних сайтів простагландину E₂. Під час інкубації мишаче моноклональне антитіло зв'язується з антимишачим антитілом кози, що наноситься на мікропланшет. Після промивання, щоб видалити надлишок кон'югату та незв'язаного зразка, до лунок додають розчин субстрату для визначення активності зв'язаного ферменту. Розвиток забарвлення зупиняється, результат дослідження виражали в пг × мл⁻¹. Інтенсивність кольору обернено пропорційна концентрації простагландину E₂ у зразку. Облік концентрації проводили за допомогою аналізатора «Multiscan» (Thermo Scientific, США) при довжині хвилі 450 нм.

2.8. Визначення концентрації молекул низької та середньої молекулярної маси у сироватці крові

Концентрацію молекул низької та середньої молекулярної маси визначали за Габриелян [82] з модифікаціями. Метод базується на осадженні високомолекулярних пептидів і білків біологічних рідин з використанням трихлороцтової кислоти і кількісним визначенням в отриманому центрифугуванні супернатанті середньомолекулярних пептидів за поглинанням в монохромному потоці світла при довжині хвилі 254 нм.

У центрифужні пробірки вносили 1 мл сироватки та 0,5 мл розчину трихлороцтової кислоти ($100 \text{ г} \times \text{л}^{-1}$), перемішували та центрифугували протягом 30 хв. при 1500 g. Відбирали 0,5 мл супернатанту і переносили в пробірки з 4,5 мл дистильованої води. Вміст пробірки перемішували та проводили спектрофотометричне вимірювання при λ 254 нм. проти дистилляту, виражали в ум. од. \times мг білка⁻¹.

2.9. Визначення вмісту супероксидного радикалу в сироватці крові та хрящовій тканині

Вміст супероксидного радикалу у біологічному матеріалі визначають за накопиченням ХТТ-формазану [83, 84]. Принцип методу полягає у здатності супероксидних аніонів взаємодіяти із 2,3-біс(2-метокси-4-нітро-5-сульфофеніл)-2Н-тетразолій-5-карбоксианлідом (ХТТ) із утворенням розчинного забарвленого комплексу ХТТ-формазану, що має пік поглинання при 470 нм.

У дослідні проби вносять 0,15 М калій-фосфатний буфер (рН = 7,4), що містить 0,2 мМ НАДН, та аліквоту досліджуваного зразка (100-200 мкг загального білка) так, щоб загальний об'єм проби становив 1 мл. До усіх проб додають по 0,5 мл 10 мМ розчину ХТТ та ретельно перемішують, після чого одразу визначають екстинкцію дослідних проб при $\lambda=470$ нм. Надалі кожні 10 хвилин протягом півгодини проводиться повторне визначення

оптичної щільності дослідних проб та розраховується ΔE . В якості контролю використовують проби, що замість зразка містять відповідну кількість буфера. Для підтвердження ролі супероксидних радикалів у формуванні ХТТ-формазау до кожного зразка додається по 100 U супероксиддисмутази на відповідному буфері.

Вміст ХТТ-формазау у пробах розраховують за формулою:

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

де a – мг загального білка у пробі, а ε - коефіцієнт мілімолярної екстинкції, що становить $2,16 \times 10^4 \text{ см}^{-1} \times \text{M}^{-1}$ та виражають у моль ХТТ-формазау \times мг білка⁻¹.

2.10. Визначення ксантиноксидазної активності в сироватці крові та хрящовій тканині

Ксантиноксидазну активність оцінюють за накопиченням сечової кислоти – основного продукту ксантиноксидазної реакції, де в якості субстрату виступає ксантин [85].

У дослідні пробірки та у контроль вносять по 1,9 мл 50 мМ калій-фосфатного буфера (рН = 7,5). В усі проби додають по 1 мл 0,15 мМ нейтрального розчину ксантину (попередньо розчиненого в гідроксиді натрію та нейтралізованого 1 н гідрохлоридною кислотою) та ретельно перемішують, після чого пробірки прогрівають до 25°C. У дослідні пробірки вносять по 100 мкг білка та одразу визначають екстинкцію за допомогою спектрофотометра з термостатом при $\lambda = 290$ нм. Визначають приріст екстинкції протягом 5 хв. В якості альтернативи можна проводити визначення екстинкції дослідних проб через 5 хвилин інкубації, зупиняючи реакцію шляхом осадження білка 20% ТХО (три хлороцтова кислота).

Ксантиноксидазну активність розраховують за формулою:

$$A = \frac{(E_{\text{досл}} - E_{\text{конт.}})}{\varepsilon \times t_{\text{хв.}} \times a_{\text{мг білка}}}, \quad (2.2)$$

використовуючи значення коефіцієнту мілімолярної екстинкції сечової кислоти $12,2 \times 10^3 \text{ моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$, та виражають у моль ксантину $\times \text{хв.}^{-1} \times \text{мг білка}^{-1}$.

2.11. Визначення вмісту пероксиду водню в сироватці крові та хрящовій тканині

Визначення вмісту гідропероксидів у біологічному матеріалі базується на здатності пероксиду водню при взаємодії із сорбітолом перетворюватись на пероксильний радикал, який, в свою чергу, конвертує Fe^{2+} в Fe^{3+} за кислих значень рН. У розчині сульфатної кислоти іони Fe^{3+} утворюють забарвлений комплекс із барвником ксиленол оранжем, який має пік поглинання у діапазоні $\lambda = 540\text{-}580 \text{ нм}$ [86, 87].

Ex tempore готують робочий реагент шляхом змішування розчину А (25 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ на 2,5 М H_2SO_4) та розчину Б (100 мМ сорбітол + 125 мкМ ксиленол оранж) у співвідношенні 1:100. У дослідні пробірки, які містять розчин 50 мМ калій-фосфатного буфера (рН = 6,0) вносять аліквоту досліджуваного зразка (200-400 мкг загального білка) так, щоб загальний об'єм проби становив 400 мкл. У контрольну пробу вносять по 400 мкл буфера. До усіх проб додають по 2 мл робочого реагенту, ретельно перемішують та проводять інкубацію протягом 15-20 хв за кімнатної температури, після чого визначають оптичну щільність дослідних проб проти контролю при значеннях λ у діапазоні 540-580 нм.

Вміст гідропероксидів розраховують на основі попередньо побудованої калібрувальної кривої та перераховують на 1 мг загального білка.

2.12. Визначення вмісту дієнових кон'югатів та шиффових основ ненасичених жирних кислот в сироватці крові та хрящовій тканині

У щільно притертий скляний гомогенізатор Поттера вносять аліквоту, що містить 0,1 мл досліджуваного зразка, до аліквоти – додавали 5 мл суміші гептан/ізопропіловий спирт у співвідношенні 1:1 та гомогенізували 10 хв. Проби центрифугували (1000 g, 15 хв) у пробірках з притертою пробкою. Надосадову фракцію відбирали та додавали 0,5 мл дистильованої води для розшарування фаз гептану та ізопропілового спирту. Верхню гептанову фазу відбирали для визначення вмісту шиффових основ на флуориметрі RF-510, Shimadzu (Японія) за умов $\lambda_{збуд}$ =360 нм і $\lambda_{еміс}$ =420 нм. Вміст шиффових основ у пробі розраховували за формулою:

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

де C – вміст шиффових основ, A – екстинкція проб, a – вміст білку в пробі, мг.

Вміст шиффових основ виражали в умовних одиницях $\times 1 \text{ мг білка}^{-1}$ [88].

Для визначення дієнових кон'югатів у хімічні пробірки відбирали по 0,3 мл гептанової фази, додавали 1,5 мл 96% етилового спирту, проби перемішували, вимірювали поглинання при $\lambda=233$ нм на спектрофотометрі «Multiscan» (Thermo Scientific, США). Вміст дієнових кон'югатів у пробі розраховували, виходячи з величини молярного коефіцієнту екстинкції при $\lambda=233$ нм для спряжених дієнів 45поліненасичених вищих жирних кислот, що дорівнює $2,2 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$, та виражали в умовних одиницях $\times \text{мг білка}^{-1}$ [89]. Вміст дієнових кон'югатів у пробі розраховували за формулою:

$$C = \frac{A}{(\epsilon \times a)}, \quad (2.4)$$

де C – вміст дієнових кон'югатів, A – екстинкція проб, ϵ - молярний коефіцієнт екстинкції при $\lambda=233$ нм для спряжених дієнів поліненасичених вищих жирних кислот, a – вміст білку в пробі, мг.

2.13. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів в сироватці крові та хрящовій тканині

Вміст ТБК-активних продуктів оцінювали згідно методу Стальної [90]. У пробу вносили аліквоту досліджуваного зразка, який містив 0,5 мг білка, у трис-буфері (25 мМ трис-НСІ, 175 мМ КСІ, рН=7,4) та додавали 0,2 мл 17% трихлороцтової кислоти. Проби центрифугували при 1000 g 15 хв. До супернатанта (0,5 мл) додавали 0,25 мл 0,8% тіобарбітурової кислоти та інкубували на киплячій водяній бані 10 хв для розвитку забарвлення.

Визначення інтенсивності забарвлення проводили на спектрофотометрі при $\lambda=532$ нм.

Вміст ТБК-активних продуктів розраховували на основі значення молярного коефіцієнта екстинкції комплексу малонового діальдегіда з 2-тіобарбітуровою кислотою за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл}}}{a_{\text{мг}} \times 1,56 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1}}, \quad (2.5)$$

де С – вміст ТБК-активних продуктів, $E_{\text{досл}}$ - екстинція проби, а – вміст білка в пробі, мг. Вміст ТБК-активних продуктів визначали у $\text{нмоль} \times \text{мг}^{-1}$ білка.

2.14. Визначення вмісту продуктів окисної модифікації білків в сироватці крові та хрящовій тканині

Визначення рівня продуктів пероксидного окиснення білків проводили за методом Дубиніної [88], що ґрунтується на спектрофотометричному визначенні альдегідних та кетонних похідних 2,4 – динітрофенілгідразину (2,4-ДНФГ), які можуть утворюватись у результаті взаємодії альдегідних та кето-груп амінокислотних залишків білків з 2,4-ДНФГ. Для аліфатичних альдегід-динітрофенілгідразинів нейтрального характеру спектр поглинання знаходиться в діапазоні 230-558 нм, основного характеру – 258-270 і 428-530 нм. Для аліфатичних кетон-динітрофенілгідразинів нейтрального характеру спектр поглинання - 363-367 нм, основного характеру - 524-535 нм.

Використовувані нами довжини хвиль дозволяють оцінити кількість алифатичних альдегід- і кетон-динітрофенілгідразинів нейтрального і основного характеру. Аліквоту досліджуваного зразка, що містила 0,5 мг білка вміщували у фосфатний буфер (рН = 7,4) та 15 хв. інкубували в термостаті при температурі 37°C. Після інкубації вносили 1 мл розчину 2,4-динітрофенілгідразину (на 1-2М HCl) та знову поміщали на 45 хв. в термостат при температурі 37° С з періодичним перемішуванням вмісту пробірок. Після інкубації у проби додавали по 1,5 мл 20% ТХО та центрифугували при 1000 g 15 хв. Отриманий осад промивали в етанол-етилацетатній (1:1) суміші та підсушували. Надалі осад розчиняли в 8М сечовині та витримували 5 хв. на киплячій водяній бані.

Продукти окисної модифікації нейтрального характеру визначали при $\lambda = 356$ нм (альдегідні продукти) та $\lambda = 370$ нм (кетонні продукти). Продукти окисної модифікації основного характеру визначали при $\lambda = 430$ нм (альдегідні продукти) та $\lambda = 530$ нм (кетонні продукти). Вміст продуктів пероксидного окиснення білків виражали в ум.од. \times мг білка⁻¹.

2.15. Визначення вмісту загальних, білок-зв'язаних та небілкових SH-груп в сироватці крові та хрящовій тканині

Визначення вмісту сульфгідрильних (SH) груп проводилося за методом Елмана [91]. Метод ґрунтується на здатності 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойної кислоти (ДТНБК) взаємодіяти із білок-зв'язаними та вільними SH-групами із утворенням тіонітрофенільного аніону (ТНФА), вміст якого пропорційний вмісту сульфгідрильних груп у пробі. Його визначають спектрофотометрично при $\lambda = 412$ нм.

Для визначення загального вмісту сульфгідрильних груп в пробу, яка містить 30 мМ трис-HCl буфер з 1 мМ ЕДТА (рН = 8,0) вносять 0,3 мл білка та 0,2 мл 1,25% ДСН. Загальний об'єм проби становить 2,5 мл. Проби залишають на 15 хв при кімнатній температурі, після чого вносять 0,1 мл

ДТНБК. Через 30 хв визначають екстинкцію дослідних проб при $\lambda = 412$ нм проти проби, що містить 2,3 мл трис-НСІ буфера з 1 мМ ЕДТА, 0,2 мл 0,1% ДСН та 0,1 мл ДТНБК. Концентрація SH-груп розраховується за калібрувальною кривою та виражається в ммоль на 1 мг білка.

Визначення вмісту небілкових SH-груп проводиться наступним чином: до 0,3 мл білка додають 0,1 мл 10,5% ТХО, після чого перемішують та залишають на 10 хв при кімнатній температурі. Проби центрифугують протягом 15 хв при 1000 g. Супернатант переносять в інші пробірки та нейтралізують 1М розчином NaOH, після чого додають 2,1 мл 30 мМ трис-НСІ буфер з 1 мМ ЕДТА (рН = 8,0) та 0,1 мл ДТНБК. Визначають екстинкцію дослідних проб за тих же умов.

Вміст білок-зв'язаних SH-груп розраховується за формулою:

$$C (\text{білкові}) = C (\text{загальні}) - C (\text{небілкові}), \quad (2.6)$$

та виражається в ммоль на 1 мг білка.

2.16. Визначення каталазної активності в сироватці крові та хрящовій тканині

Каталазну активність визначали за Королук і співавторами [92]. Принцип методу полягає в тому, що каталаза руйнує субстрат H_2O_2 , незруйнована частина пероксиду водню при взаємодії з солями молібдену утворює стійкий забарвлений комплекс.

У пробірки вносили 2 мл 0,03% розчину пероксиду водню. Реакцію починали додаванням 0,1 мл досліджуваного зразка (0,1 мг білка). У холосту пробу замість суспензії додавали 0,1 мл дистильованої води. Проби витримували при кімнатній температурі 10 хв, реакцію зупиняли шляхом додавання 1 мл 4% молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі при $\lambda = 410$ нм проти контрольної проби, у яку замість пероксиду водню додавали 2 мл H_2O .

Каталазну активність розраховували за формулою:

$$E = (A_{\text{хол}} - A_{\text{досл}}) / a \times t \times K, \quad (2.7)$$

де E – каталазна активність, $A_{\text{хол}}$ і $A_{\text{досл}}$ - екстинція холостої та дослідної проб, a – вміст білка в пробі, мг, t – час інкубації (10 хв), K – коефіцієнт мілімолярної екстинції перекису водню, що дорівнює $22,2 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Активність виражали у $\text{нмоль H}_2\text{O}_2 \times \text{хв}^{-1} \times 1 \text{ мг білка}^{-1}$.

2.17. Визначення супероксиддисмутазної активності в сироватці крові та хрящовій тканині

Супероксиддисмутазну активність визначали за Чеварі і співавторами [93]. Метод базується на здатності супероксиддисмутази конкурувати з нітросинім тетразолієм (НСТ) за супероксидні аніони, що утворюються в результаті аеробної взаємодії відновленої форми нікотинамідаденіндинуклеотида (НАДН) та феназинметасульфата (ФМС). В результаті цієї реакції НСТ відновлюється з утворенням гідразинтетразолію. У присутності СОД відсоток відновлення НСТ зменшується. У дослідну пробірку, що містила 50 мкл досліджуваного зразка (0,5 мг білка), додавали 2 мл реагенту 1 (57 мкМ НСТ, 16 мкМ ФМС на 0,15 М фосфатному буфері з ЕДТА, рН=7,8). Одразу вимірювали поглинання проб при $\lambda=540$ нм на спектрофотометрі. Потім до кожної проби додавали 100 мкл реагенту 2 (98,5 мкМ НАДН на Трис-ЕДТА буфері, рН=8,0), проби витримували при 30°C та повторно визначали екстинцію через 10 хвилин за тих же умов.

За формулою розраховували відсоток пригнічення ступеню відновлення НСТ у пробі:

$$E = \frac{\Delta E_{\text{нул}} \times 50}{\Delta E_{\text{досл}} \times 100 \times t \times a}, \quad (2.8)$$

де E – супероксиддисмутазна активність, $\Delta E_{\text{нул}}$ - екстинція проби до додавання реагенту II, $\Delta E_{\text{досл}}$ - екстинція проби після додавання реагенту II, 50/100 – 50% блокування реакції відновлення НСТ, a – вміст білка в пробі,

мг, t – час інкубації 10 хв. Супероксиддисиутаазну активність визначали у умовних одиницях / (хв × мг білка).

2.18. Визначення глутатіонпероксидазної активності в сироватці крові та хрящовій тканині

Сумарну глутатіонпероксидаазну активність визначали за накопиченням окисненого глутатіону (GSSG). До складу реакційної суміші входили 1 мл 0,3 М фосфатного буферу, рН = 7,4; 12 мМ азид натрію; 6 мМ ЕДТА; 0,5 мл 2,5 мМ GSSG; 0,2 мл досліджуваного зразка; 0,5 мл 1,8 мМ H₂O₂. Реакцію запускали додаванням пероксиду водню, зупиняли через 5 хв додаванням 10% ТХО. Після центрифугування при 1500 g протягом 15 хв визначали екстинкцію окисненого глутатіону при довжині хвилі 260 нм. Ензиматичну активність виражали в мікромолях окисненого глутатіону на 1 мг білка за хв [94].

2.19. Визначення глутатіонтрансферазної активності в сироватці крові та хрящовій тканині

Для визначення ГЛТ-активності готували суміш: 1,5 мл 0,1М фосфатного буферу, рН = 6,5; 0,2 мл 10 мМ відновленого глутатіону (GSH); 0,1 мл лізату; 0,02 мл 0,1 М 1-хлор-2,4-динітробензолу; інкубація тривала 5 хв. Ензиматичну активність визначали при довжині хвилі 346 нм за накопиченням оптично активного кон'югату з 1-хлор-2,4-динітробензолом і виражали в мікромолях останнього на 1 мг білка за хв [94].

2.20. Визначення глутатіонредуктазної активності в сироватці крові та хрящовій тканині

Глутатіонредуктаазну активність визначали за Власовою та ін. [94], з модифікацією для вимірювання в мікрокуветі, із загальним об'ємом реакційної суміші 0,535 мл. До складу реакційної суміші входили 350 мкл

0,05 М фосфатного буферу, рН = 8,0; 35 мкл 1 мМ ЕДТА; 50 мкл 7,5 мМ GSSG; 50 мкл клітинного лізату; 50 мкл 1,2 мМ НАДФН + Н⁺; інкубація тривала 8 хв. Ензиматичну активність визначали по зменшенню кількості НАДФН + Н⁺ при 37°C за довжини хвилі 340 нм та виражали в нмолях НАДФН + Н⁺ на 1 мг білка за хв.

2.21. Визначення вмісту відновленого та окисленого глутатіону в сироватці крові та хрящовій тканині

Вміст відновленого та окисленого глутатіону визначали спектрофлюориметричним методом із використанням ортофталевого альдегіду за різних значень рН середовищ [95, 96].

До гомогенату клітин додавали 0,01 М мурашину кислоту (1:1) для осадження білків та центрифугували при 20 000 g протягом 30 хв (+4 °C) для отримання супернатанту, в якому визначали вміст відновленого та окисленого глутатіону.

Приготування проб для вимірювання концентрації відновленого глутатіону проходило за наступною схемою. До 50 мкл супернатанту додавали 450 мкл 0,1 М Na-фосфатного буферу з 5 мМ ЕДТА (рН=8,0) та перемішували. Кінцева суміш для аналізу містила: 10 мкл розведеного супернатанту, 180 мкл фосфат-ЕДТА буферу та 10 мкл ортофталевого альдегіду (готували перед дослідом у концентрації 1 мг/мл метанолу). Після 15-хвилинної інкубації при кімнатній температурі вимірювали інтенсивність флуоресценції при $\lambda_{em}=460$ нм за активації $\lambda_{ex}=360$ нм на мікропланшетному спектрофлюорофотометрі Synergy HT (BioTeck, США). Концентрацію відновленого глутатіону визначали за попередньо побудованим калібрувальним графіком.

Для вимірювання концентрації окисленого глутатіону до 50 мкл супернатанту додавали 20 мкл 0,04 М N-етилmaleїміду, який попереджав окислення GSH в GSSG, та інкубували 20 хв при кімнатній температурі. Далі

додавали 430 мкл 0,1 N NaOH (pH=12) та перемішували. Для аналізу відбиралась порція в 10 мкл цього розчину. Кінцева суміш для аналізу містила: 10 мкл розведеного супернатанту, 180 мкл 0,1 N NaOH та 10 мкл ортофталевого альдегіду (1 мг/мл метанолу). Після 15-хвилинної інкубації при кімнатній температурі вимірювали інтенсивність флуоресценції ($\lambda_{ex}=360$ нм, $\lambda_{em}=460$ нм) на мікропланшетному спектрофлюорофотометрі Synergy HT (БіоТеск, США). Концентрацію окисленого глутатіону визначали за попередньо побудованим калібрувальним графіком.

Вміст GSH та GSSG виражали в нмоль на 1 мг білка.

2.22. Визначення концентрації білка за методом Лоурі

Метод базується на утворенні забарвлених продуктів ароматичних амінокислот з реактивом Фоліну у поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки [97].

У дослідну пробірку вливали 400 мкл проби та 2 мл реактиву С: 10 мл реактиву А (2 г Na_2CO_3 + 400 мг NaOH на 100 мл dist H_2O) і 200 мкл реактиву В (500 мг $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ + 1 г $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ на 100 мл dist H_2O).

У контрольну пробу замість досліджуваного білкового матеріалу додавали 400 мкл дистильованої води. Через 10 хв у пробірки додавали 200 мкл реактиву Фоліна і залишали ще на 30 хв для розвитку забарвлення. Його інтенсивність вимірювали на спектрофотометрі при $\lambda=750$ нм. Кількість білка (мкг) визначали за допомогою калібрувального графіку.

2.23. Кількісна ЗТ-ПЛР

2.23.1. Виділення загальної РНК з хрящів щурів

РНК отримували за методом Chomczynski [98].

У фарфорову ступку вносили 100 мг тканини, після чого додавали невелику кількість рідкого азоту та ретельно розтирали до однорідної порошкоподібної консистенції. Після цього в ступку вносили 1 мл суміші D

(гуанідин ізотіоціанат + β -меркаптоетанол + лаурилсаркозинат натрію) та перемішували. До зразка додавали 100 мкл 2 М ацетату натрію та знову перемішували, після чого додавали 1 мл фенолу. Далі додавали 200 мкл суміші хлороформ:ізопропанол та ретельно перемішували. Проби лишали на льоду на 15 хв, після чого центрифугували при 10 000 g протягом 20 хв.

В окремі пробірки обережно відбирали супернатант, до якого додавали 1 мл ізопропанолу. Після перемішування, проби лишали на 1 год. на льоду.

Проби знов центрифугували за тих же умов, після чого супернатант декантували, а осад розчиняли у трикратному об'ємі суміші D і додавали до нього ізопропанол. Проби лишали на 1 год. на льоду, після чого повторювали центрифугування. Супернатант зливали, а до осаду обережно додавали відповідну кількість 70% етанолу, перемішували та центрифугували протягом 2 хв при 13000 g. Спирт зливали, осади підсушували у витяжній шафі. Сухі осади розчиняли у 100 мкл етилового спирту та вкривали 96% етанолом.

2.23.2. Оцінка рівня експресії мРНК

Синтез кДНК та кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (Real-time PCR, кПЛР) за допомогою комерційного набору «Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix» («Thermo Scientific», Литва), використовуючи по 0,4 мкмоль/л кожного праймера, проводили за таких, рекомендованих фірмою-виробником, температурних умов: синтез кДНК 50 °C – 30 хв; ініціююча денатурація 95 °C – 15 хв; далі 40 циклів: денатурація ДНК 95°C – 15 с; гібридизація праймерів 50°C – 35 с; побудова ланцюга 72 °C – 30 с.; елонгація ампліфікатів 72 °C – 5 хв.

У реакціях було використано такі послідовності праймерів: для Ptgs2 – прямий - TGCTGTTCCAACCCATGTCA та зворотний - TGTCAGAAACTCAGGCGTAGT; для Nos2 – прямий - GTGTTCCACCAGGAGATGTTG та зворотний -

CTCCTGCCCACTGACTTCGTC; для Tgfb1 – прямий –
 CTCAGCTCCACAGAGAAGAACTGC та зворотний –
 CACGATCATGTTGGACAACCTGCTCC; для Col2a1 – прямий –
 TGTCTCTGGTCCCATTGGTC та зворотний - AATCCACGAGCACCCCTGAG;
 для Actb (ген β -актину, що використовується в якості внутрішнього
 контролю реакції завдяки конститутивній експресії) – прямий –
 TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотний –
 ATTGCCGATAGTGATGACCT. Відтворюваність результатів ампліфікації
 було перевірено в паралельних експериментах шляхом повторення кПЛР на
 зразках РНК усіх тварин, із кожним праймером не менше трьох разів. Після
 кожного циклу ампліфікації зчитувалась флуоресценція барвника SYBR
 Green I, а по закінченні реакції будувалась крива плавлення для контролю
 утворення димерів праймерів та специфічності реакції. Початкову кількість
 мРНК обраховували за порівняльним СТ методом « $\Delta\Delta$ CT Method»,
 ефективність ПЛР реакцій була однаковою ($E_x = (10^{-1/\text{slope}})^{-1} \times 100\%$),
 $\text{slope} < 0,1$. Відносну кількість мРНК зазначених генів нормалізували до
 мРНК Actb.

2.24. Статистична обробка отриманих результатів

Математичну та статистичну обробку результатів досліджень
 проводили на комп'ютері з використанням програмного пакета Statistica
 («StatSoft»). Їх перевіряли на нормальне розподілення за допомогою тесту
 Шапіро-Уїлка. Подальший обрахунок відбувався за допомогою
 односпрямованого дисперсійного аналізу (one-way ANOVA) із пост-тестом
 Тукея. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного \pm
 середньоквадратичне відхилення (дисперсія) – SD. Результати вважали
 значущими, коли $p \leq 0,05$.

Побудову графіків виконували на комп'ютері з використанням
 прикладної програми «Microsoft Excel 2007».

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оцінка ступеню запалення у щурів за умов моноіодацетат-індукованого остеоартрозу та при дії хондропротектора

3.1.1. Морфометричні параметри колінного суглобу

Для моделювання артрозу у тварин в якості пошкоджуючого агента була обрана натрієва сіль моноіодоцтової кислоти, яка відтворює як симптоми, так і гістопатології артрозу суглобів людини – утворення виразок та фібрил на поверхні хрящів, гіперплазію синовіальної оболонки та деградацію протеогліканів [99, 100]. Моноіодоцтова кислота викликає дегенерацію, змінюючи метаболізм хондроцитів. Вона є класичним інгібітором гліколізу через пригнічення гліцеральдегід-3-дегідрогенази. Крім того модифікує цілий ряд субстратів в циклі Кребса (ізоцитрат, α -кетоглутарат, сукцинат, малат), а також пригнічує активність окремих ферментів в пентозофосфатному циклі. Моноіодоцтова кислота використовується при моделюванні артрозів у щурів, мишей та мурчаків [101].

При огляді зовнішнього стану колінного суглоба було виявлено почервоніння, гіперемія суглоба, патологічне розширення судин, симптоми запалення і набряклість м'яких оточуючих тканин (рис. 3.1). Після розтину суглобової сумки на поверхні епіфіза стегнової кістки були виявлені деформація хряща, борозни, тріщини, гіперемії, ерозії, спостерігалася наявність фібрильованих ділянок (початкові дегенеративні зміни при остеоартрозі, які діагностуються як розм'якшення суглобового хряща і розвитку вертикальних ущелин між групами його клітин) (рис. 3.2). Через 30 днів впливу моноіодацетату хрящ все ще повністю покривав епіфіз кістки, субхондральні ділянки не були оголеними, остеофітів не спостерігалось.



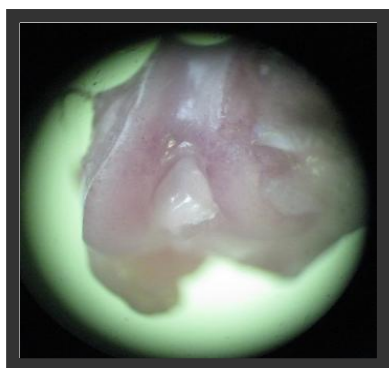
А



Б

Рис. 3.1. Фотографії колінного суглоба щурів при моноіодацетат-індукованому артрозі і в умовах введення препарату «Драстоп»: 1 – контроль; 2 – хондроїтина сульфат; 3 – остеоартроз; 4 – остеоартроз + хондроїтина сульфат

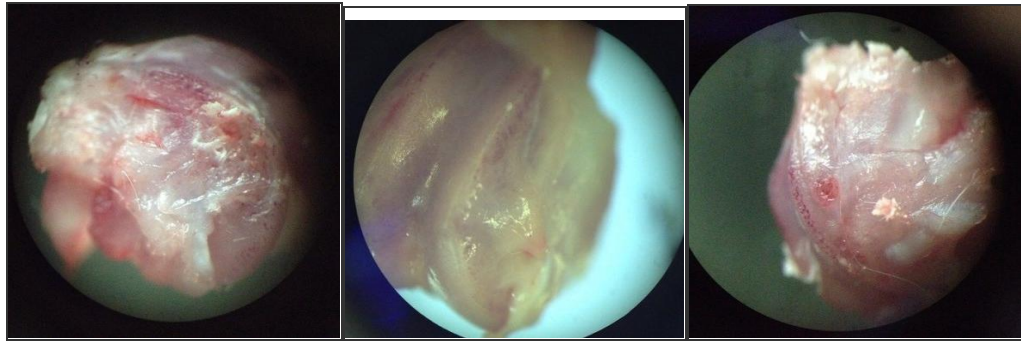
При введенні препарату на основі ХС протягом 25 діб гіперемія і дегенеративні зміни суглобів значно зменшилися, спав набряк м'яких тканин, колір тканин та розмір судин відповідав нормі, поверхня хряща стала менш фібрильована, виразки, глибокі борозни і щілини в хрящовій тканині не були виявлені. Дані макроскопічного аналізу підтверджують ефективність застосування препарату «Драстоп» у відновленні тканин суглоба при експериментальному ОА (рис. 3.1 та 3.2).



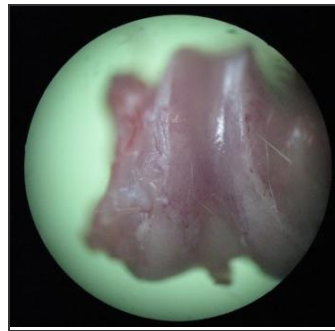
А



Б



В



Г

Рис. 3.2. Мікрофотографії епіфіза стегна щурів при введенні препарату «Драстоп» на моделі моноіодацетат-індукованого артрозу. $\times 8$. Стрілками вказані ущелини, виразки, гіперемії: 1 – контроль; 2 – хондроїтина сульфат; 3 – остеоартроз; 4 – остеоартроз + хондроїтина сульфат

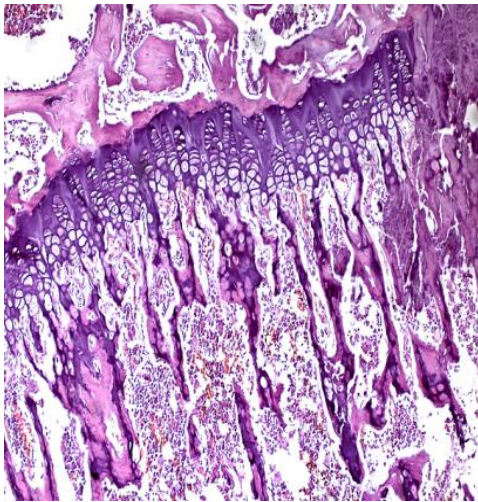
Відомо, що спочатку внаслідок зменшення обсягу суглобової рідини, відбуваються порушення функцій суглоба через погіршення живлення хрящової тканини. Відбувається запалення м'яких тканин, що оточують суглоб, в результаті чого в суглобі може зібратися рідина (випіт). Через руйнування хряща відбувається тертя кісток, що призводить до характерного хрускоту, поверхні хрящів стають нерівними і легко ушкоджуються при навантаженнях. Також при артрозі можлива деформація суглоба, внаслідок чого відбувається зміна його зовнішнього вигляду [102]. Зовнішні патології та зміни якості поверхні хряща можуть бути наслідком порушення

внутрішньої структури тканини, тому наступним етапом дослідження було зробити гістологічний аналіз тканини колінного суглобу.

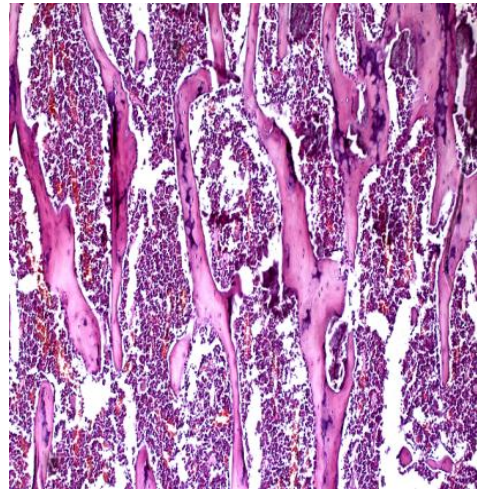
3.1.2. Гістологічний аналіз тканини колінного суглобу

Результати гістологічного аналізу підтвердили дані макроскопічного огляду. У групі контрольних щурів хрящова поверхня була гладкою і рівною, структура хрящової тканини відповідала нормі. При введенні моноіодацетату хрящова тканина і субхондральна кісткова тканина піддавалися деградації. Спостерігався розвиток гіперпластичних, запальних та деструктивно-дистрофічних змін, що відповідає загальним уявленням про патоморфологічні особливості розвитку артрозу. При цьому в синовіальній оболонці спостерігалось утворення розширених судин з великою кількістю лейкоцитів в просвіті. Зональна структура хрящової тканини при патології зникла, міжклітинна речовина піддавалася деградації, про що свідчить нерівномірне зафарбовування препарату, волокна матриксу втрачали впорядковане розташування. У суглобі були поширені скупчення запального інфільтрату. У кістковій тканині відкладалися солі кальцію (темно рожеві безструктурні маси на рисунку 3) та спостерігалися ділянки резорбції кістки остеокластами, кісткові трабекули руйнувалися. Синовіальна тканина була гіперплазована з незначними фіброзними змінами.

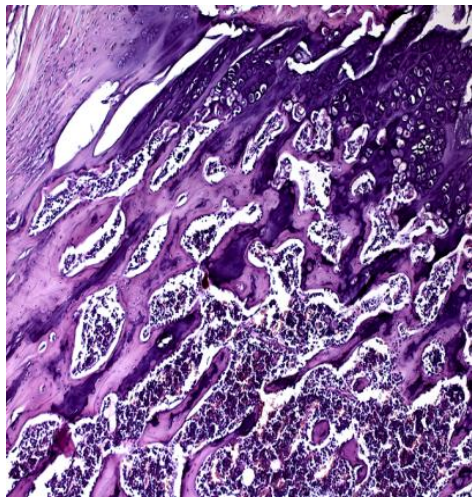
При введенні препарату «Драстоп» протягом 25 днів після ін'єкції моноіодацетатом вираженість дегенеративних змін суглоба була зменшена (рис. 3.3). Поверхні суглобів були гладкими, відновлювалася зональність хондроцитів та структура матриксу, зникав запальний інфільтрат, стан синовіальної тканини відповідав нормі.



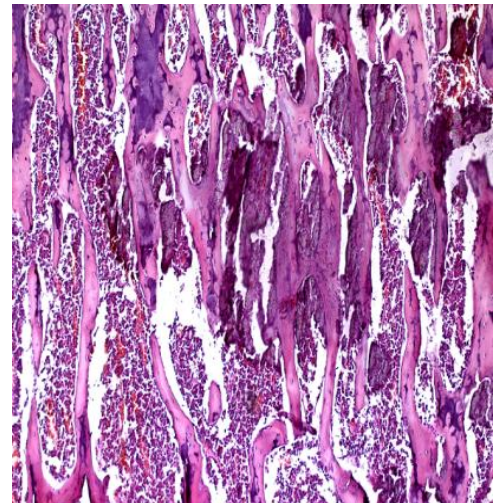
А



Б



В



Г

Рис. 3.3. Мікрофотографії тканини колінного суглоба у щурів з монойодацетат-індукованим артрозом. Фарб. Гематоксилін-еозин $\times 100$: 1 – контроль; 2 – хондроїтина сульфат; 3 – остеоартроз; 4 – остеоартроз + хондроїтина сульфат

Відомо, що при артрозі найбільше страждають гіалінові хрящові поверхні – зони суглобу з максимальним фізичним навантаженням. Хрящ стає шорстким, суглобові поверхні починають «чіплятися» одна за одну при рухах. Хрящ втрачає волокнисту структуру. Від нього відокремлюються невеликі частини, які потрапляють в порожнину суглоба і вільно знаходяться в суглобовій рідині, травмуючи синовіальну оболонку. У поверхневих зонах

хряща виникають дрібні вогнища звапнування. У глибоких шарах з'являються ділянки окостеніння. У центральній зоні утворюються кісти, сполучені з порожниною суглоба, навколо яких через тиск внутрішньосуглобової рідини також формуються зони окостеніння [103].

Хондроїтина сульфат є специфічним компонентом хряща, в складі протеогліканів матриксу він створює каркас для колагену та утримує воду в товщі тканини, що забезпечує еластичність та амортизацію при рухах, стимулює синтез гіалуронової кислоти, ініціює процес фіксації сірки при синтезі хондроїтинсірчаної кислоти, що сприяє кальцифікації кісток, пригнічує активності катаболічних ферментів: еластаз, пептидаз, катепсинів та прозапальних цитокінів [104].

Сьогодні використання препаратів на основі глікозаміногліканів для терапії захворювань суглобів стає більш розповсюдженим. Глікозаміноглікани здатні пригнічувати певні ферменти, присутні в синовіальній рідині, які викликають пошкодження суглобового хряща (еластази, гіалуронідази). До того ж, вони можуть виступати в якості протизапального лікарського засобу, оскільки здатні інгібувати систему комплементу. Дослідження показали, що препарати на основі глікозаміногліканів легко засвоюються організмом, діючі речовини концентруються в хрящовій тканині і не володіють токсичними чи тератогенними ефектами [105]. Глибоке ушкодження тканин, наявність запального інфільтрату в гістологічних зразках свідчить про активацію імунітету, про що може свідчити зростання рівнів цитокінів – невеликих пептидів, що посилено синтезуються лейкоцитами, мононуклеарними фагоцитами і іншими тканинними клітинами.

Отже, введення МІА викликає пошкодження хрящової тканини, характерні для ОА людини. Аналіз хрящових поверхонь та гістологічне дослідження показали, що у тварин розвинувся ОА. Також було доведено, що

препарат на основі хондроїтина сульфату є ефективним щодо відновлення стану хрящів щурів з МІА-індукованим ОА.

3.1.3. Концентрація цитокінів у сироватці крові (ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-12Вр40, ІЛ-4, ІЛ-10)

В умовах розвитку дегенеративних змін хряща спостерігаються зміни рівня цитокінів в крові [106]. Було досліджено концентрацію прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-12В р40, ФНП- α) та протизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10) в умовах розвитку ОА колінного суглоба на тлі застосування препарату на основі хондроїтина сульфату.

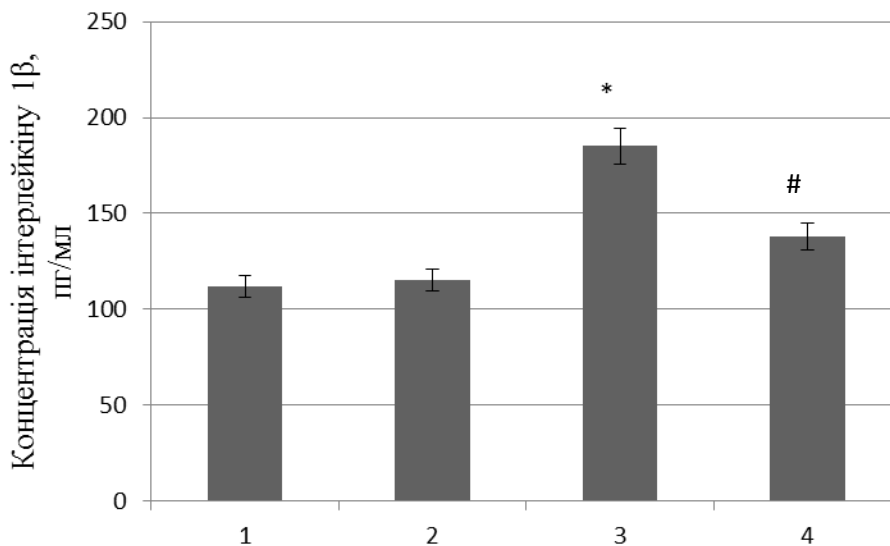


Рис. 3.4. Концентрація інтерлейкіну 1 β в сироватці крові щурів через 30 днів після введення МІА ($M \pm m$, $n = 7$): 1 – контроль; 2 – хондроїтина сульфат; 3 – остеоартроз; 4 – остеоартроз + хондроїтина сульфат

* - $p < 0,05$, відносно контролю;

- $p < 0,05$, відносно групи щурів з ОА.

Було встановлено, що в порівнянні з інтактними щурами, в сироватці крові щурів з артрозом, яким вводили воду для ін'єкцій, істотно збільшувався рівень прозапальних цитокінів: концентрація ІЛ-1 β зростала у 1,7 раза

($p \leq 0,05$), а ФНП- α – у 1,3 раза ($p \leq 0,05$) (рис. 3.4 – 3.5). При цьому порівняно з контролем змін в концентрації ІЛ-12В р40 виявлено не було (рис. 3.6).

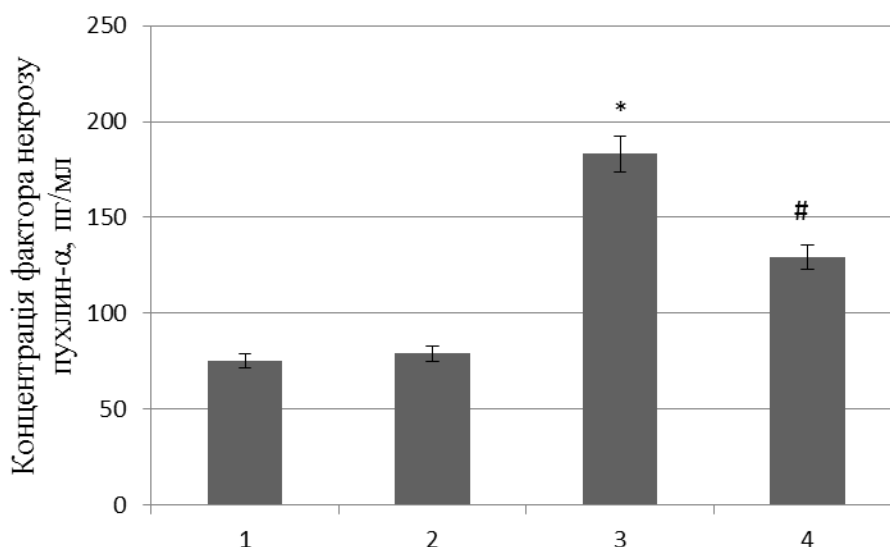


Рис. 3.5. Концентрація фактора некрозу пухлин- α в сироватці крові щурів через 30 днів після введення МІА ($M \pm m$, $n = 7$): 1 – контроль; 2 – хондроїтина сульфат; 3 – остеоартроз; 4 – остеоартроз + хондроїтина сульфат
* - $p < 0,05$, відносно контролю;
- $p < 0,05$, відносно групи щурів з ОА.

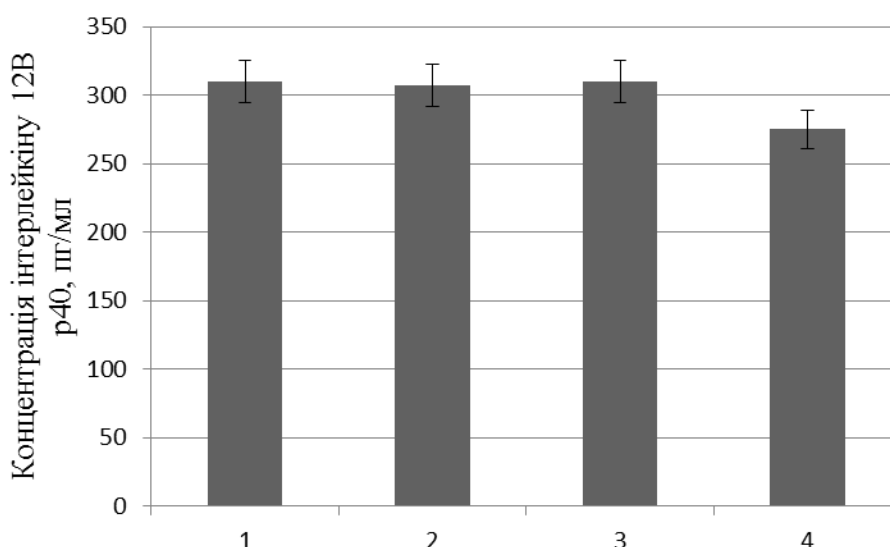


Рис. 3.6. Концентрація інтерлейкіну 12В р40 в сироватці крові щурів через 30 днів після введення МІА ($M \pm m$, $n = 7$): 1 – контроль; 2 – хондроїтина сульфат; 3 – остеоартроз; 4 – остеоартроз + хондроїтина сульфат

* - $p < 0,05$, відносно контролю;

- $p < 0,05$, відносно групи щурів з ОА.

В умовах введення препарату «Драстоп» концентрація ІЛ-1 β зменшувалася в 1,3 раза ($p \leq 0,05$) відповідно, щодо групи щурів з ОА (рис. 3.4.). Рівень ФНП- α в сироватці крові при застосуванні препарату «Драстоп» знижувався відповідно в 1,4 раза ($p \leq 0,05$) в порівнянні з щурами, яким вводили МІА (рис. 3.5). Змін концентрації ІЛ-12В р40 не було виявлено (рис. 3.6). Таким чином, під дією зазначеного препарату на основі ХС рівень прозапальних цитокінів частково зменшувався, але не досягав значень інтактних тварин.

Дослідження останніх років свідчать про роль прозапальних цитокінів ІЛ 1 β , ФНП- α в патогенезі ОА й імунному характері запалення. Обидва цитокіна в підвищених кількостях виявлені в синовіальній оболонці, синовіальної рідини і хрящі у хворих на ОА [107].

У хондроцитах ці цитокіни підвищують синтез протеаз, особливо металлопротеаз, знижують синтез колагена II і IX типів, протеогліканів, тканинного інгібітора металлопротеаз, стимулюють вироблення кисневих радикалів, оксиду азоту, що сприяє прогресуванню катаболічних процесів в хрящі. ІЛ 1 β стимулює вироблення інших прозапальних цитокінів (ІЛ 6, 8). У експерименті застосування антитіл до ІЛ -1 попереджало хрящову і кісткову деструкцію, а антитіл до ФНП α зменшувало вираженість синовіту [108].

Порушення гомеостазу активує в організмі людини систему захисту, в першу чергу клітини моноцит-макрофагальної системи, що передають сигнал Т- і В-лімфоцитів з подальшою гіперпродукцією ними прозапальних цитокінів ФНП α , ІЛ 1, 6 та ін., надлишкова продукція яких сприяє деградації хряща і порушує процеси ремоделювання субхондральної кістки [109]. В останні роки особлива увага прикута до ІЛ 1, який грає важливу роль в патогенезі ОА. В процесі розвитку хвороби хондроцити експресують рецептори до ІЛ 1, що підвищує їх чутливість до даного цитокіну, під

впливом якого хондроцити синтезують протеолітичні ферменти - матриксні протеази (МП), які є агресивними факторами деградації колагену і протеогліканів хряща, при цьому знижується експресія тканинного інгібітора МП. Характерною особливістю хондроцитів при ОА є і гіперекспресія ЦОГ 2, яка індукує синтез простагландинів, що беруть участь в розвитку запалення [110].

У досліджах *in vivo* на щурах з хірургічно викликаним ОА було показано, що хондроїтина сульфат захищає від деградації хрящі і знижує рівні медіаторів запалення, таких як інтерлейкін-1 β і фактор некрозу пухлини- α у вражених колінах. Крім того, в сироватці крові та хрящах значно знизилися рівні біомаркерів запалення та деградації кісткової тканини, включаючи матриксну металопротеїназу-3, С-телопептид колагену II типу та співвідношення рецептор-активатор ядерного фактора κ B-ліганд / остеопротегерин. Лікування також показало тенденцію до поліпшення деяких мікроструктурних параметрів кісток, але без досягнення статистичної значущості [111].

Інтерлейкін-12 (ІЛ-12), раніше відомий як цитотоксичний фактор дозрівання лімфоцитів або цитотоксичний фактор стимуляції природних клітин-кілерів (NKSF), являє собою прозапальний цитокін, який володіє плейотропною активністю, включаючи стимуляцію проліферації активованих клітин Т і природних кілерів (NK) [112, 113], - за допомогою мононуклеарних клітин периферійної крові і підвищення літичної активності клітин NK / LAK [114]. ІЛ-12 синтезується фагоцитами, В-клітинами і іншими антиген-презентувальними клітинами, які модулюють адаптивну імунну відповідь переважно стимулюючи продукцію Т-хелперів I типу [115].

ІЛ-12 являє собою гетеродимерну молекулу з приблизною молекулярною масою близько 70 кДа, вона складається з двох дисульфід-пов'язаних субодиниць: р35, що має приблизну молекулярну масу близько 35 кДа; і р40, який має приблизну молекулярну масу близько 40 кДа, (2, 4-6).

Субодиниця p40 гомологічна амінокислотним послідовностям рецептору інтерлейкіну-6 (IL-6R) і тому належить до родини рецепторів цитокінів, тоді як p35 має віддалений, але істотний зв'язок з цитокінами IL-6 / G-CSF. Мається на увазі, що гетеродимер P35 / p40 може представляти комплекс цитокіна (p35) і розчинного рецептора цитокіну (p40), причому клітинний рецептор IL-12 забезпечує функцію, аналогічної функції IL-6-сигналтрансдукуючого протеїну, gp130 [116]. Відомо, що в синовіальних мембранах людей, хворих на ОА виявляються високі рівні IL 12, транскрипти IL-12 (p40) були виявлені у більшості пацієнтів з ОА. Наявність білка IL-12 p70 у синовіальних мембранах пацієнтів показує, що IL-12 може відігравати важливу імунорегуляторну роль у розвитку захворювання шляхом переведення запалення в хронічну фазу [117]. Інтерлейкін 10 та IL-4 є модулюючими цитокінами, що мають супресивний ефект на фактор некрозу пухлин а та IL-1 *in vitro* [118, 119].

Вони пригнічують синтез цитокінів різними механізмами. IL-4 підвищує деструкцію мРНК, тоді як IL-10 гальмує ядерний фактор каппа В (NFκB). Було показано, що IL-4 та IL-10 стимулюють виробництво інгібіторів цитокінів, таких як антагоніст рецептора інтерлейкіну 1 (IL-1Ra), розчинний тип рецептора інтерлейкіну 1 II (sIL-1RII) і розчинний рецептор фактора некрозу пухлин (sTNFR) в моноцитах / макрофагах та нейтрофілах [120].

При вивченні концентрації протизапальних цитокінів в сироватці крові щурів було встановлено, що рівень цитокіну IL-4 у сироватці крові щурів з експериментальним ОА знаходився в межах контрольних значень (рис. 3.7). Досліджуваний препарат також не надавав впливу на рівень IL-4.

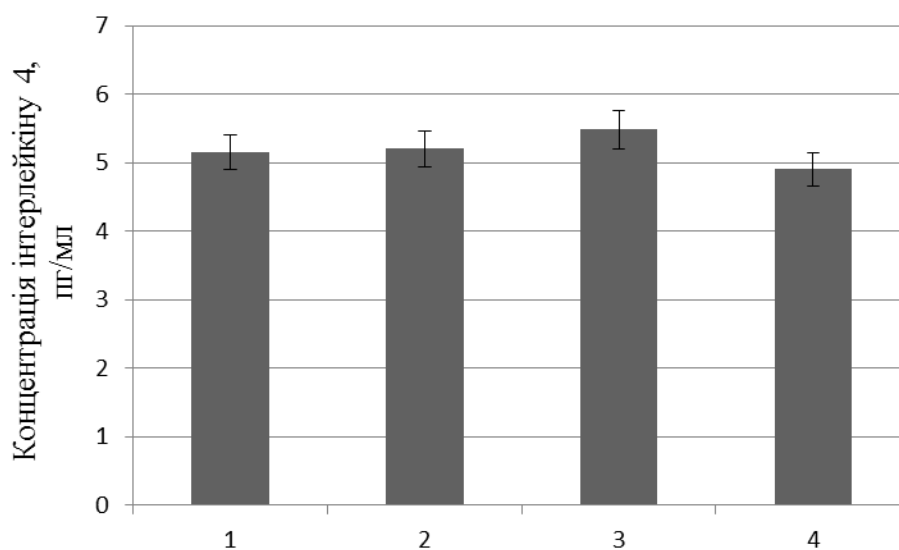


Рис. 3.7. Концентрація інтерлейкіну 4 в сироватці крові щурів через 30 днів після введення МІА ($M \pm m$, $n = 7$): 1 – контроль; 2 – хондроїтина сульфат; 3 – остеоартроз; 4 – остеоартроз + хондроїтина сульфат

* - $p < 0,05$, відносно контролю;

- $p < 0,05$, відносно групи щурів з ОА.

При цьому нами було встановлено підвищення концентрації ІЛ-10 в 1,8 раза ($p \leq 0,05$) в групі щурів, з експериментальним ОА (рис. 3.8). Це свідчить про компенсаторну активацію антизапальної системи при ОА колінного суглоба щурів. При введенні препарату на основі ХС концентрація ІЛ-10 в сироватці крові хоча і знижувалась в 1,3 раза порівняно з групою тварин з експериментальним ОА, але при цьому вона залишалась підвищеною відносно контролю.

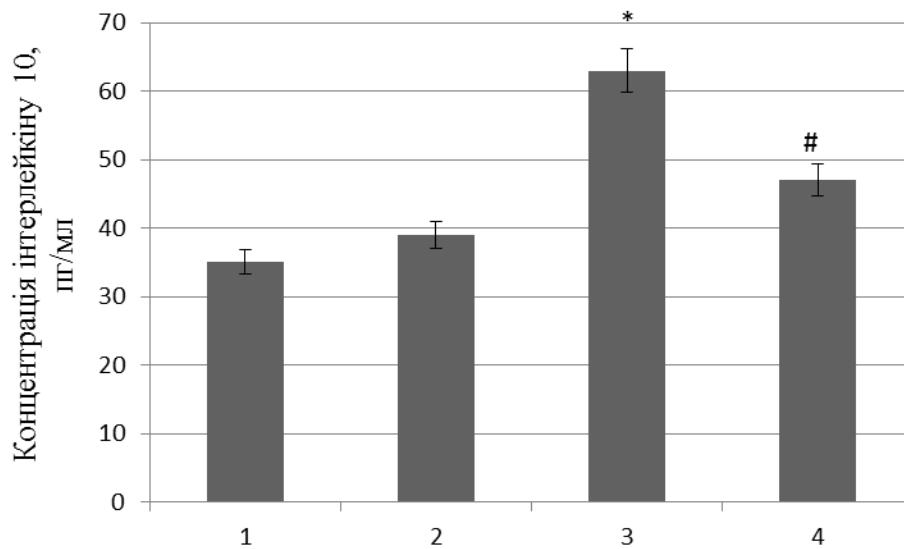


Рис. 3.8. Концентрація інтерлейкіну 10 у сироватці крові щурів через через 30 днів після введення моноіодацетатом ($M \pm m$, $n = 7$): 1 – контроль; 2 – хондроїтина сульфат; 3 – остеоартроз; 4 – остеоартроз + хондроїтина сульфат
* - $p < 0,05$, відносно контролю;
- $p < 0,05$, відносно групи щурів з ОА.

Відомо, що блокування ендogenous IL-10 антитілами проти IL-10 призводить до розвитку стійкого запалення суглобів з більш щільним синовіальним інфільтратом, а також посиленням деструкції хрящів. Додавання екзогенного -IL-10 у тваринних моделях ОА додатково збільшує супресивний ефект ендogenous IL-10. Ще більш виражена меліорація була виявлена з комбінацією -IL-4 / -IL-10. Це призвело до зменшення набряку та відновлення рівня синтезу протеоглікану хондроцитами на 4-й день. Лікування комбінацією -IL-4 / -IL-10 не тільки суттєво зменшило рівень фактора некрозу пухлини α (TNF- α), а й знижувало рівень IL-1 β в синовіумі.

Літературні дані свідчать про домінуючу роль IL-10 в природному пригніченні вираження ОА [121].

Отримані результати підтверджують наведені вище дані щодо ефективності препарату «Драстоп» при його терапевтичному введенні протягом 25 діб.

Результати свідчать про активацію протизапальної системи в умовах розвитку артрозу колінного суглоба щурів, при цьому показовим було зростання рівня ІЛ-10. Хондропротектор «Драстоп» зменшував активацію протизапальної системи, що корелювало зі зменшенням виділення прозапальних цитокінів та відновленням нормальної структури суглоба.

Відомо, що прозапальні цитокіни ІЛ-1 β і TNF- α стимулюють синтез ІЛ8 та -6, активують матричні металопротейнази 1, 8 та 13, які розщеплюють хрящовий колаген II типу, цитокіни активують циклооксигеназу 2 у фібробласт-подібних синовіоцитах і хондроцитах, які генерують запальні медіатори простагландини, що посилюють запалення. Деякі дослідження *in vivo* показали, що хондроїтина сульфат може зменшувати концентрації ІЛ-1 β у тканинах суглобів [122] та інших медіаторів запалення (ІЛ-6, синтази оксиду азоту, простагландину E₂) та інгібують індуковану експресію матриксних металопротіеназ 3, 9 і 13 у хондроцитах [123, 124].

Отже, отримані результати дослідження вказують на активацію імунітету щурів при введенні МІА. Введення препарату «Драстоп» сприяло відновленню рівня цитокінів в сироватці крові, що свідчить про відновлення стану хрящової тканини. Пошкодження тканин та вивільнення фрагментів макромолекул у міжклітинну речовину та кров, загибель клітин та вихід їх компонентів можуть стимулювати зростання рівня медіаторів запалення, тому наступним етапом було встановлення концентрації простагландину E₂ в сироватці крові щурів.

3.1.4. Концентрація простагландину E₂ у сироватці крові

В умовах МІА-індукованого ОА колінного суглоба щурів було зареєстровано збільшення рівня ейкозаноїдів в крові. Так, концентрація

простагландину E2 в сироватці крові в групі щурів, яким на тлі ОА вводили воду для ін'єкцій, зростала в 1,6 раза ($p \leq 0,05$) у порівнянні з інтактними щурами (рис. 3.9).

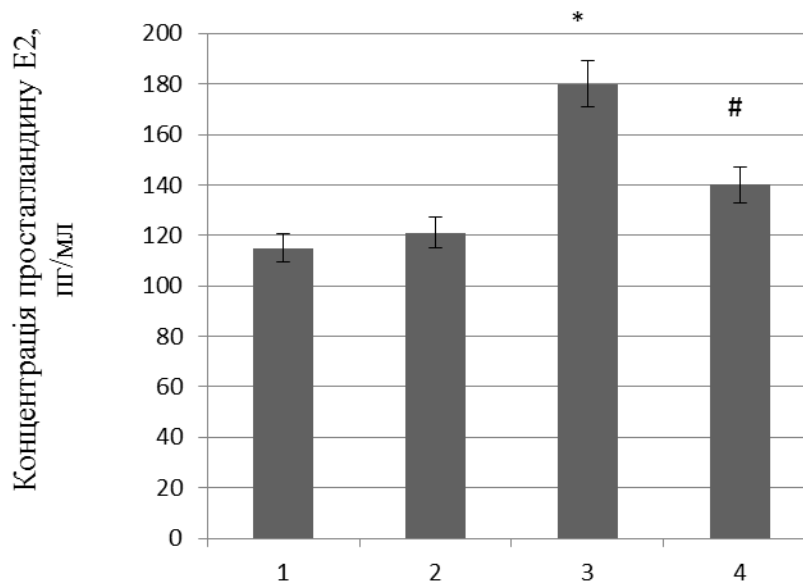


Рис. 3.9. Концентрація простагландину E2 в сироватці крові щурів через 30 днів після введення МІА ($M \pm m$, $n = 7$): 1 – контроль; 2 – хондроїтина сульфат; 3 – остеоартроз; 4 – остеоартроз + хондроїтина сульфат

* - $p \leq 0,05$ - відносно контролю;

- $p \leq 0,05$ - відносно групи щурів з ОА.

В умовах введення препарату концентрація простагландину E2 зменшувалася в 1,3 раза ($p \leq 0,05$) щодо групи щурів, яким вводили воду для ін'єкцій (рис. 3.9). При цьому значення при введенні препарату з хондроїтина сульфатом майже досягали рівня контрольних значень.

Дві изоформи ЦОГ, ЦОГ-1 та ЦОГ-2 каталізують ключову реакцію при перетворенні арахідонової кислоти на простагландини та тромбоксан A2 (ТХА2). ЦОГ-1 є конститутивним білком, який, як вважають, виробляє основні концентрації простагландинів і ТХА2, обидва з яких вважаються необхідними для нормальної фізіологічної функції у багатьох тканинах. Крім

того, ЦОГ-залежне виробництво простагландину E₂ (ПЕ₂) відбувається в багатьох тканинах за допомогою тісно регульованої та координованої активності цитоплазматичної фосфоліпази A₂ (сPLA₂), ЦОГ та ПЕ синтази (PGES). Ферменти ЦОГ каталізують утворення простагландину H₂ (ПН₂) з арахідонової кислоти, а потім ізомерацію ПН₂ до ПЕ₂ через PGES. Показано, що ЦОГ-2, PGES і їхній основний прозапальний продукт ПЕ₂ стимулюються IL-1 β і інгібуються дексаметазоном. Інгібування ЦОГ-2 дексаметазоном, нестероїдними протизапальними засобами або селективними інгібіторами ЦОГ-2 пов'язане з зниженням продуктивності ПЕ₂, зменшенням запалення та болю у хворих ОА. ПЕ₂ також має важливе значення для реконструкції кісток і хрящів та гомеостазу в індукованому IL-1 β метаболізмі кісток *in vitro* та *in vivo*. Тим не менш, механізм, за допомогою якого ПЕ₂ опосередковує його ефекти при ОА та інших захворюваннях, що включають патологічний метаболізм кісток і хрящів, залишається незрозумілим [123].

Відомо, що IL-1 β індукуює експресію ЦОГ-2 і ПЕ₂ в меніску, синовіальній мембрані та остеофітичних експлантатах при ОА, тоді як в нормі в суглобовому хрящі експресія ЦОГ-2 має низькі рівні. IL-1 β також індукуює деградацію протеоглікалу хряща в змішаних культурах клітин синусових мембран - хрящів при ОА. Підвищена деградація протеоглікану спавпадала з індукцією експресії білка ЦОГ-2 та вироблення PGE₂ у синовіальній мембрані. Дексаметазон, антитіла до IL-1 β , або селективний інгібітор COX-2, пригнічували як синтез ПЕ₂, індукований IL-1 β , так і деградацію протеоглікану хряща у цих змішаних культурах [125].

Аналіз взаємозв'язку між ПЕ₂ і апоптозом показав, що ПЕ₂ посилює SNP (Single nucleotide polymorphism) - опосередовану клітинну загибель, тоді як ПЕ₂ сам по собі не викликає загибелі хондроцитів. Вірогідно, що NO-індукований каскад апоптозу хондроцитів включає в себе генерацію ПЕ₂ через індукцію ЦОГ-2 та можливо, що сигнальні шляхи, в яких беруть участь кінази 1/2 та p38, посилюють синтез ПЕ₂. Результати також показують, що

екзогенний ПЕ2 може спричинити сенсibiliзацію хондроцитів ОА людини до NO залежного апоптозу [126].

Отже, результати дослідження показали розвиток системного запалення в організмі щурів після введення МІА. Препарат на основі хондроїтина сульфату виявився ефективним протизапальним засобом. Це дозволяє використовувати його в якості замітника НПЗП за умов їх непереносимості. В процесі розвитку системного запалення та хронізації процесу спостерігається переважання катаболічних процесів, надмірна загибель клітин та ушкодження тканин, які не компенсуються анаболічними процесами та захисними системами, в сироватці крові можливе накопичення продуктів розпаду, що підтримують запалення та деградацію, тому наступним етапом дослідження було встановити рівень молекул низької та середньої молекулярної маси у сироватці крові щурів з експериментальним ОА та після введення хондропротектору.

3.1.5. Рівень молекул низької та середньої молекулярної маси у сироватці крові

Одним з провідних патогенетичних синдромів патологічних станів є ендогенна інтоксикація (ЕІ). Сучасні уявлення пов'язують ЕІ з накопиченням в тканинах і біологічних рідинах організму надлишку метаболітів нормального або патологічного обміну речовин, продуктів життєдіяльності бактерій, великим антигенним навантаженням [127]. Серед факторів, що викликають ЕІ, виділяють три основних компоненти: мікробіологічний, біохімічний та імунологічний [128], які за пріоритетністю можуть займати різне положення і визначають характер метаболічних порушень при тій чи іншій патології. Основа ЕІ - дисбаланс системи гомеостазу, в результаті якого, у важких випадках, формується синдром поліорганної недостатності. В даний час розвиток ЕІ пов'язують з накопиченням в організмі молекул середньої маси (МСМ) - класу сполук з молекулярною масою до 5000Да.

МСМ поділяються на дві великі групи - речовини середньої молекулярної маси (ВНСММ) і олігопептиди (ОП). До ВНСММ відносять небілкові похідні різної природи: сечовина, креатинін, сечова кислота, глюкоза, молочні та ін. органічні кислоти, амінокислоти, жирні кислоти, холестерин, фосфоліпіди, продукти вільнорадикального окислення, проміжного метаболізму, нуклеопротейні обміну та ін., накопичуються в організмі та перевищують нормальні концентрації. Основна частина МСМ - олігопептиди - представлена речовинами пептидної природи, які виконують регуляторні і нерегуляторних функції. Розвиток ЕІ - результат дисбалансу між надходженням токсинів в кров і їх детоксикацією. Деякими дослідженнями показано, що затяжний перебіг патологічних станів може бути асоційований з накопиченням в крові своєчасно не елімінованих кінцевих і проміжних продуктів обміну [129].

Хімічний склад МСМ дуже неоднорідний і об'єднує гетерогенну групу речовин. Він включає пептиди, глікопептиди, нуклеопептиди, ендорфіни, аміноцукри, поліаміни, багатоатомні спирти, деякі гуморальні регулятори - інсулін, глюкагон, адренкортикотропний гормон, вазопресин, окситоцин, ангіотензин, кальцитонін, ліпофусцин (внутрішньоклітинні комплекси ліпідів і білків), атерогенні окислені ліпопротеїни, деякі вітаміни, нуклеотиди, олігосахариди, похідні глюкуронових кислот та інші. До теперішнього часу досить детально вивчено біологічну дію МСМ. Багато з них володіють нейротоксичною активністю, пригнічують процеси біосинтезу білка, здатні пригнічувати активність ряду ферментів, роз'єднують процеси окислення і фосфорилування, порушують механізми регуляції синтезу аденілових нуклеотидів, змінюють транспорт іонів через мембрани, еритропоез, фагоцитоз, мікроциркуляцію, лімфодінаміку, викликають стан вторинної імунодепресії. Відомо, що МСМ здатні з'єднуватися і блокувати рецептори будь-якої клітини, негативно впливаючи на її метаболізм і функції. Показана можливість впливу МСМ на тонус гладком'язових клітин, на

трансваскулярний транспорт. Ці речовини можуть взаємодіяти з компонентами систем гемостазу. Вважається, що МСМ можуть проникати через плацентарний бар'єр, надаючи безпосередній токсичний вплив на плід, викликаючи полі органні порушення різного характеру [130].

Було встановлено, що у сироватці крові щурів з ОА вміст молекул низької та середньої молекулярної маси зріс у 1,9 раза, порівняно з контролем. Контроль на препарат не показав змін щодо вмісту молекул низької та середньої молекулярної маси. Після введення препарату на основі хондроїтина сульфату даний показник знизився у 1,4 раза порівняно з групою ОА (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Вміст молекул низької та середньої молекулярної маси у сироватці крові щурів при експериментальному артрозі, ум. од. \times мг білка⁻¹ (M \pm m, n = 7)

Групи тварин	Показник
Контроль	6,74 \pm 0,65
Хондроїтина сульфат	7,01 \pm 0,68
Остеоартроз	12,63 \pm 1,24*
Остеоартроз + хондроїтина сульфат	9,02 \pm 0,84#

* - $p < 0,05$, відносно контролю;

- $p < 0,05$, відносно групи щурів з ОА.

Відомо, що у пацієнтів хворих на ідіопатичний остеоартроз колінного суглоба до і після його тотального ендопротезування спостерігалися підвищені рівні МСМ, які після періоду реабілітації знижувалися. За результатами досліджень рекомендовано використовувати рівень МСМ у сироватці крові як інтегративний показник ендогенної інтоксикації для контролю за біохімічним станом пацієнтів, що може бути корисним при

виборі тактики ведення цих хворих, а також в оцінці доцільності і ефективності лікування препаратами відповідного профілю [131, 132].

Отже, результати дослідження показали розвиток ендогенної інтоксикації у щурів через 30 днів після моделювання ОА. Препарат на основі хондроїтина сульфату виявився ефективним щодо пригнічення розвитку ЕІ, що вказує на його позитивний вплив на організм в цілому при терапії ОА. Зростання рівня медіаторів запалення, розвиток системного запалення, патології тканин суглобів, яка перейшла в хронічну форму, про що свідчать розвиток 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 запалення та деградації хряща, тому наступним етапом дослідження було оцінити рівень експресії мРНК генів *Ptgs2* (COX-2), *Nos2*, *Tgfb1* у хрящовій тканині суглобу з МІА-індукованим ОА та після застосування хондроїтина сульфату.

3.1.6. Рівень експресії мРНК генів *Ptgs2* (COX-2), *Nos2*, *Tgfb1* у хрящовій тканині суглобу

Наступним етапом дослідження було визначити рівень експресії мРНК генів *Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*, які залучені у розвиток запалення. Так, *Ptgs2* кодує циклооксигеназу 2, фермент, що відповідає за синтез простагландину E₂ з арахідонату. Також він задіяний у таких біологічних процесах як метаболізм жирних кислот, метаболізм ліпідів, біосинтез жирних кислот, біосинтез ліпідів, біосинтез та метаболізм простагландинів. Фермент є мішенню дії НПЗП, які використовують в якості консервативної терапії ОА [133].

Nos2 кодує індукцибельну NO синтазу. Синтез ферменту активується комбінацією ліпополісахариду та прозапальних цитокінів. Фермент синтезує оксид азоту, який є вільним радикалом і діє як вторинний посередник у багатьох процесах, включаючи нейротрансмісію, протимікробну та

протипухлинну активність, але при надмірному синтезі стимулює розвиток окисного стресу і пошкодження компонентів клітин [134]. Кодований геном *Tgfb1* білок за функціями належить до факторів росту, мітогенів. Локалізований у позаклітинному матриксі. В нормі регулює ріст хондроцитів, а при патологіях стимулює надмірну проліферацію клітин, що викликає розвиток захворювань, подібних до ОА, при чому його активність залежить від комплексу цитокінів та інших регуляторів [135].

У результаті подальших експериментальних досліджень було показано, що рівень експресії мРНК гена *Ptgs2* в групі тварин з ОА був вищим у 8 разів ($p \leq 0,001$) в порівнянні з контрольною групою тварин (рис. 3.10). Рівні експресії цього гена в першій та другій групі щурів достовірно не відрізнялися.

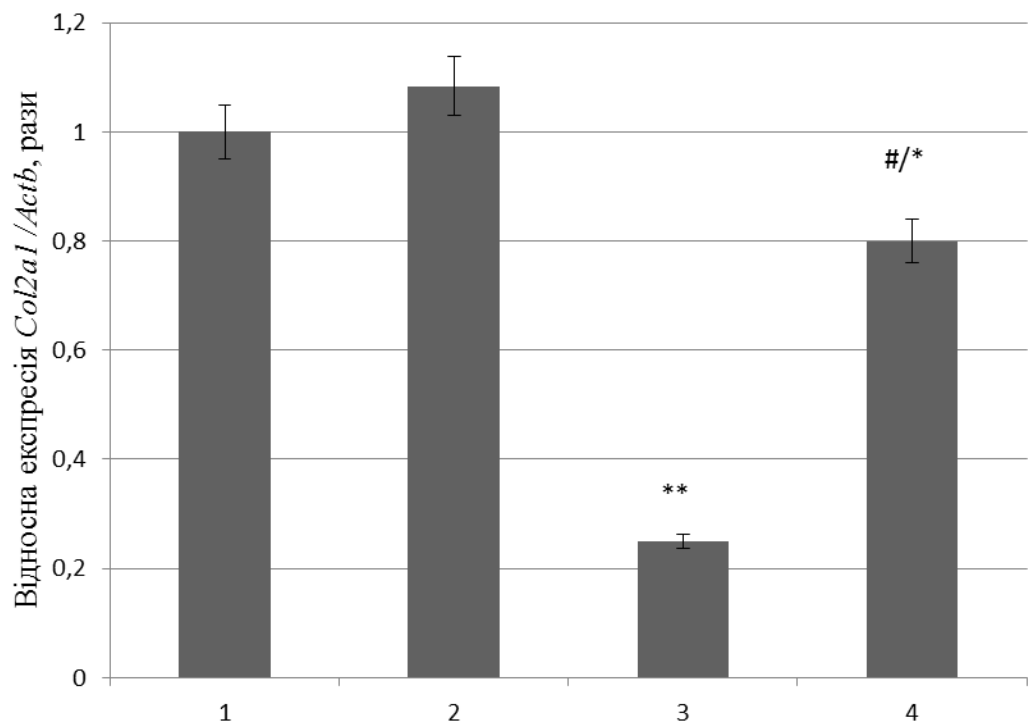


Рис. 3.10. Рівень експресії мРНК гена *Ptgs2* в хрящах колінного суглоба щурів за умов остеоартриту та введення препарату «Драстоп». ($M \pm m$, $n = 7$):

1 – контроль; 2 – хондроїтина сульфат; 3 – остеоартроз; 4 – остеоартроз + хондроїтина сульфат

** – $p \leq 0,001$, * – $p \leq 0,01$ відносно контролю;

- $p \leq 0,001$ відносно групи щурів з ОА.

У той же час, при застосуванні препарату на основі хондроїтина сульфату рівень відповідної мРНК був в 3,9 ($p \leq 0,001$) раза нижчим, ніж у тварин третьої групи (рис. 3.10).

У результаті подальших експериментальних досліджень було показано, що рівень експресії гена *Nos2* в групі тварин з МІА-індукованим ОА був вищим у 5,8 разів ($p \leq 0,001$) в порівнянні з контрольними тваринами (рис. 3.11). Рівні експресії цього гена в першій та другій групі щурів достовірно не відрізнялися.

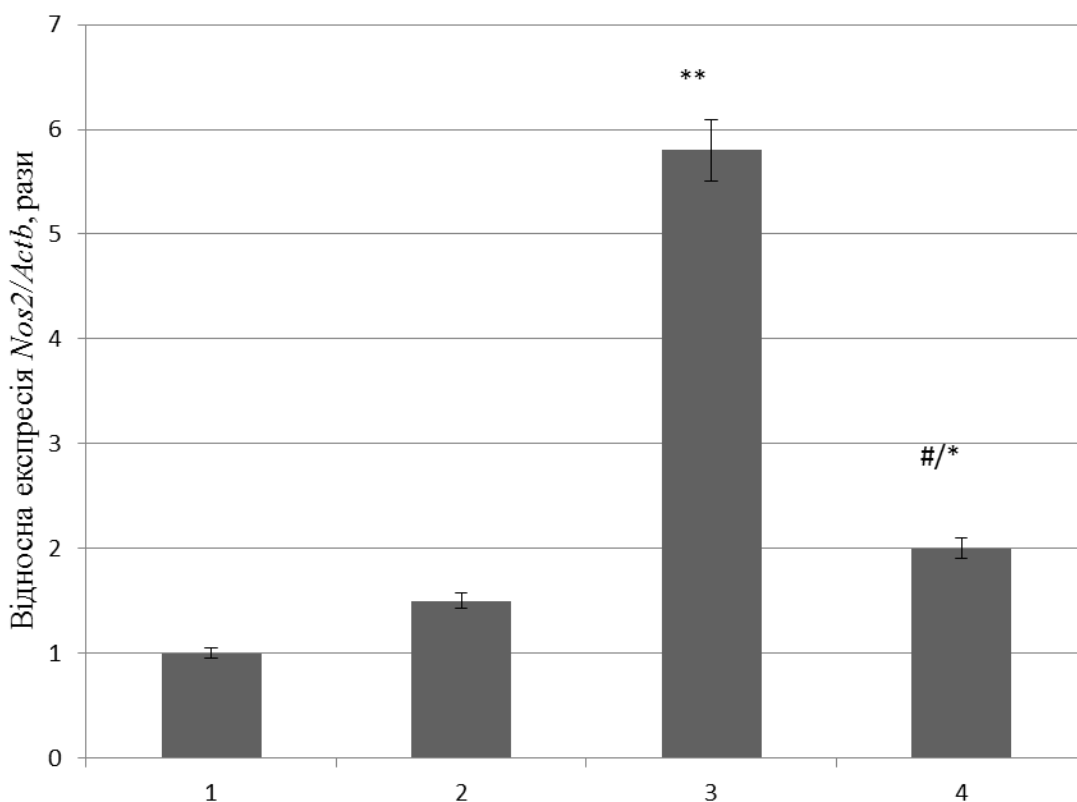


Рис. 3.11. Рівень експресії мРНК гена *Nos2* в хрящах колінного суглоба щурів за умов остеоартриту та введення препарату «Драстоп». ($M \pm m$, $n = 7$):

1 – контроль; 2 – хондроїтина сульфат; 3 – остеоартроз; 4 – остеоартроз + хондроїтина сульфат

** – $p \leq 0,001$, * – $p \leq 0,01$ відносно контролю;

- $p \leq 0,001$ відносно групи щурів з ОА.

У той же час, при одночасному введенні з МІА препарату «Драстоп» рівень відповідної мРНК був в 2,8 ($p \leq 0,001$) раза нижчим, ніж у тварин з МІА-індукованим ОА (рис. 3.11).

У результаті подальших експериментальних досліджень було показано, що рівень експресії гена *Tgfb1* в групі тварин з патологією був вищим у 1,7 раза ($p \leq 0,001$) в порівнянні з контролем (рис. 3.12).

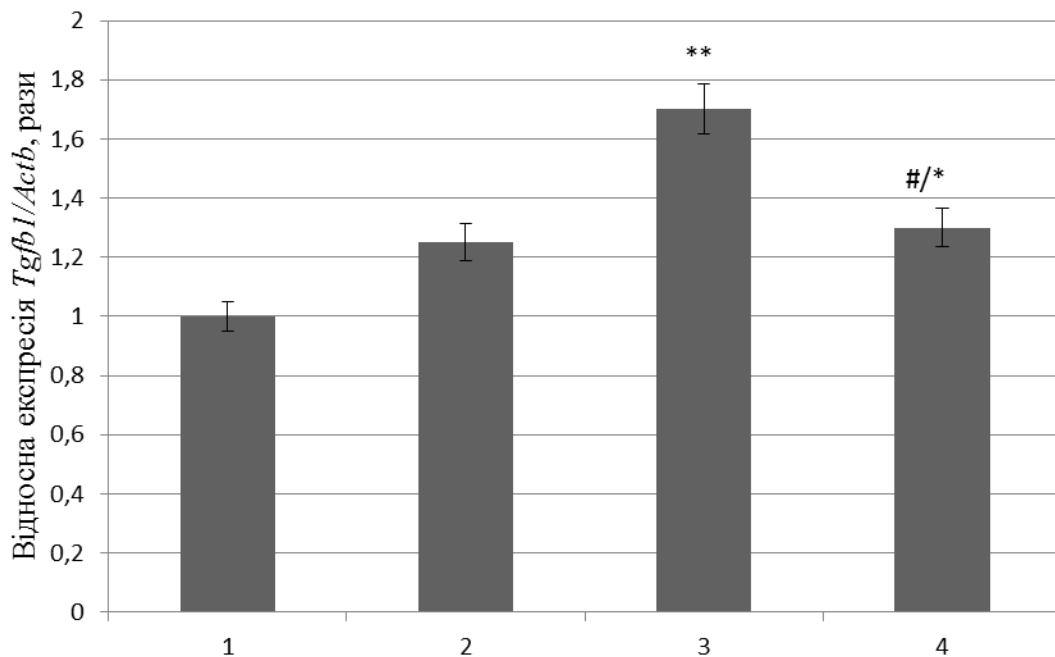


Рис. 3.12. Рівень експресії мРНК гена *Tgfb1* в хрящах колінного суглоба щурів за умов остеоартриту та введення препарату «Драстоп» ($M \pm m$, $n = 7$): 1 – контроль; 2 – хондроїтина сульфат; 3 – остеоартроз; 4 – остеоартроз + хондроїтина сульфат

** – $p \leq 0,001$, * – $p \leq 0,01$ відносно контролю;

- $p \leq 0,001$ відносно групи щурів з ОА.

У той же час, при одночасному введенні з МІА препарату «Драстоп» рівень відповідної мРНК був в 1,3 ($p \leq 0,01$) раза нижчим, ніж у тварин групи ОА (рис. 3.12).

Результати свідчать про значну активацію експресії мРНК COX-2 та iNOS, характерних для розвитку запалення в тканинах хряща. Як правило,

iNOS активна в імунних клітинах і забезпечує антимікробний та пухлинний захист, але надвисока експресія її мРНК може спричинити цитотоксичний вплив на резидентні клітини [136]. Відомо, що в культурах *ex vivo* хрящ людини уражений ОА виділяє значні кількості нітритів протягом 72 годин, проте автори прогнозують, що ОА-NOS може бути унікальною ізоформою, що синтезується хондроцитами при патологічних станах [137].

Показано, що NO пригнічує синтез протеоглікану, зменшуючи метаболічне включення сульфату (35SO_4^{2-}) у глікозаміноглікани [138], активує матричні металлопротеїнази в хрящі та хондроцитах [139] і гальмує синтез колагену II [140]. iNOS регулюється ІЛ-1 і TNF- α . При аналізі RT-ПЛР було помічено, що без стимуляції цитокінами навіть уражений ОА хрящ не експресує мРНК для iNOS [141]. ЦОГ або простагландин H синтаза, як NO синтеза, регулюється ІЛ-1. Показано, що ЦОГ у бичачих хондроцитах може бути активована NO через взаємодію з залізом каталітичного сайту, але після специфічного інгібування iNOS ЦОГ все ще залишається активною, а рівень ПгЕ2 продовжує зростати [142].

Простагландин-ендопероксид синтаза (PTGS), також відома як циклооксигеназа, є основним ферментом біосинтезу простагландинів і діє як діоксигеназа, і як пероксидаза. Є два ізофермента PTGS: конститутивний PTGS1 та індукбельний PTGS2, які відрізняються за їх регуляцією експресії та розподілу в тканинах. Ген PTGS2 кодує індукований ізоформ. Він регулюється специфічними стимулюючими явищами, що свідчить про те, що він відповідає за протеїновий біосинтез, залучений до запалення та мітогенезу. ЦОГ 2 перетворює арахідонат на простагландин H₂. Конститутивно синтезується у деяких тканинах у фізіологічних умовах, таких як ендотелій, нирки та мозок, а також при патологічних станах, таких як рак. PTGS2 відповідає за синтез запальних простагландинів. Регуляція PTGS2 також пов'язана з підвищеною адгезією клітин, фенотиповими змінами, стійкістю до апоптозу та пухлинним ангіогенезом. У ракових

клітинах PTGS2 є ключовим кроком у виробництві простагландину E2, який відіграє важливу роль у модуляції рухливості, проліферації та стійкості до апоптозу [143]. В клінічних дослідженнях показано, що блокування ефектів інтерлейкіну 1 β і тим самим інгібування запальних ензимів, таких як синтаза оксиду азоту та циклооксигенази-2, є одним з причин застосування хондропротекторів на основі глюкозамінгліканів [144]. Tgfb1 є трансформуючим фактором росту, це багатофункціональний цитокін, який відіграє важливу роль у ряді біологічних процесів, включаючи модуляцію імунітету та запалення, контроль клітинної проліферації, міграцію та диференціювання, регуляцію репарації тканин і синтез компонентів позаклітинного матриксу. Відомо, що в умовах запалення суглобів TGF- β 1 виробляється в синовіальній тканині і що посилена експресія цього цитокіну пов'язана з ремісією захворювання [145].

Вплив трансформуючого фактору росту β 1 (TGF- β 1) на макрофаги і моноцити переважно супресивний, цей цитокін може пригнічувати проліферацію цих клітин і перешкоджати виробництву АФК (наприклад, супероксиду (O₂⁻) та оксиду азоту (наприклад, оксиду азоту (NO))). Однак, як і у випадку з іншими типами клітин, TGF- β 1 також може мати протилежний ефект на клітини мієлоїдного походження. Наприклад, TGF- β 1 діє як хемоаттрактант, направляючи імунну відповідь на деякі патогени, макрофаги та моноцити реагують на низький рівень TGF- β 1. Крім того, експресія моноцитарних цитокінів (включаючи інтерлейкін-1 (ІЛ-1) -альфа, ІЛ-1-бета та ФНП- α) та фагоцитоз макрофагів може стимулюватися за рахунок дії TGF- β 1 [146].

Відомо, що TGF- β 1 активується в субхондральній кістці у відповідь на посилення механічного навантаження на передню хрестоподібну зв'язку в мишачих моделях ОА. Також високі концентрації TGF- β 1 спостерігалися в субхондральних ділянках кісток у людей з ОА. Висока концентрація TGF- β 1 індукує утворення кластерів з нестин-позитивних мезенхімальних

стовбурових клітин (МСК), що призводить до утворення остеїдних острівців кісткового мозку, що супроводжуються високим рівнем ангіогенезу.

Трансгенна експресія активного TGF- β 1 в остеопластичних клітинах викликала розвиток ОА, тоді як інгібування активності TGF- β в субхондральній кістці пригнічувало дегенерацію суглобового хряща. Зокрема, нокаут гена рецептора TGF- β типу II (T β RII) в нестин-позитивних МСК призвів до сповільнення розвитку ОА по відношенню до мишей дикого типу. Таким чином, висока концентрація активного TGF- β 1 в субхондральній кістці, вірогідно, ініціює патології, пов'язані з ОА і пригнічення цього процесу може бути потенційним терапевтичним підходом до лікування цього захворювання [147].

У деяких дослідженнях, навпаки, був виявлений високий рівень експресії фактору росту TGF- β в нормальних хрящах, а в хрящах з ОА його майже не спостерігалось. Також було показано що блокування TGF- β робить хрящ більш сприйнятливим до пошкоджень. TGF- β є потужним індуктором синтезу компонентів екстрацелюлярного матриксу хрящів, в особливості протеогіканів та колагену II типу та проявляє виражену протизапальну дію на ІЛ-1 через пригнічення експресії генів, що стимулюються прозапальними цитокінами, наприклад, генів матриксних протеїназ та колагеназ. Тому відсутність TGF- β викликає зменшення утворення компонентів матриксу і посилення наслідків катаболічних процесів [148].

Крім того, тваринна модель артриту виявила зв'язок між надмірною експресією TGF- β 1 та пригніченням захворювання [149]. З іншого боку, відомо, що остеобласти здатні секретувати ІЛ-10, TGF- β 1 та ІЛ-6 та виконувати роль антиген презентуючих клітин і активувати Т CD8⁺ та CD4⁺ клітини. В деяких дослідженнях виявилось, що введення щурам TGF- β 1 стимулює набряк, запалення, синовіальну гіперплазію та інфільтрацію суглоба Т - лімфоцитами, а анти TGF- β 1 антитіла, введені безпосередньо у

суглобову сумку, пригнічували резорбцію кістки, синтез прозапальних цитокінів та зменшували прояви синовіту, тому його роль в запаленні ще достовірно не встановлена [150, 151].

Відомо, в нормі трансформуючий фактор росту-бета (TGF β) відіграє ключову роль у рості, диференціюванні та гомеостазі нормального хряща, стимулює синтез агрекану, а також є імуносупресивним фактором. Він синтезується хондроцитами та в зовнішньо клітинному просторі знаходиться в неактивній формі у комплексі з пептидом латентності. Протеїнази, що вивільнюються при ОА активують TGF β , відщеплюючи пептид. На самому початку розвитку ОА, в період до руйнування хряща його рівні значно зростають, що може активувати синтез матриксних металопротеїназ. В процесі розвитку хвороби TGF β регулюється іншими зовнішньо клітинними компонентами, які здатні зв'язувати TGF β і запобігати його взаємодії з рецептором [152].

У дослідях на мишах показано, що TGF β та його основна внутрішньоклітинна сигнальна молекула Smad3 є важливими для запобігання гіпертрофічної диференціації хондроцитів та підтримки нормального фенотипу суглобових хрящів. У мутантних мишей нокаутних по Smad3 спостерігалися розвиток дегенеративних суглобів та хвороби, що нагадує ОА людини, що характеризується прогресуючою втратою суглобового хряща, утворенням великих остеофітів, знижувалася продукція протеогліканів, аномально зростав рівень експресії колагену X типу в хондроцитах синовіальних суглобів. Вірогідно, сигнальний каскад TGF- β / Smad3 має важливе значення для інгібування суглобового диференціювання хондроцитів. Без цього сигналу хондроцити виходять зі стану спокою і піддаються ненормальній термінальній диференціації, що в кінцевому підсумку призводить до ОА [153].

TGF-бета має подвійний вплив на проліферацію суглобових хондроцитів. У середовищі з низькою концентрацією сироватки крові він

пригнічує ріст клітин, тоді як у середовищі, що доповнюється 10% фетальної телячої сироватки, він стимулює ріст клітин. Ця стимуляція призводить до більш високої швидкості реплікації і більшої кількості клітин у фазі G2 / M клітинного циклу. Оскільки ці клітини вже реплікують свою ДНК, вони можуть почати мітоз, коли стимулюється фактором типу EGF. Цей механізм включає в себе системи рецепторів TGF-бета, які змінюються залежно від клітинного циклу. Крім того, ізолітофосфат глікану може відігравати роль вторинного месенджера для TGF-бета. Нарешті, TGF-бета не може відновити фенотип хондроцитів в дедифференційованих клітинах і не обмежує процес дедифференціювання. Він негативно впливає на інтерлейкін-1 шляхом інгібування експресії рецепторів до цього цитокіну на рівні транскрипції. Ці ефекти *in vitro* вказують на те, що TGF-бета відіграє важливу роль у відновленні потенціалу суглобового хряща, особливо при артрозі [154].

Відомо, що TGF-бета активується АФК та матриксними металопротеїназами [155, 156].

Оскільки застосування препарату на основі хондроїтина сульфату знижує експресію мРНК генів *iNOS* та *Ptgs2*, його можна вважати супресором запалення та розвитку ОА.

Висновки

Отже, при розвитку ОА в хрящах щурів спостерігаються ознаки запалення та деградації з помірною лейкоцитарною інфільтрацією та утворенням ерозій та виразок на поверхні хряща. В сироватці крові зростають рівні прозапальних та протизапальних цитокінів, що свідчить про активізацію імунної відповіді на запалення, яке характеризується збільшенням рівня простагландину E2, що вказує на зміну гомеостазу хондроцитів, зростання рівня молекул малої та середньої маси свідчить про розвиток ендогенної інтоксикації, а підвищення рівня експресії *Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1* у хрящовій тканині щурів свідчить про посилення процесів деградації

хряща. Введення препарату на основі ХС сприяло зниженню проявів запалення та деградації хрящової тканини щурів з ОА.

При запаленні та активації генів *NOS2* та *Ptgs2* можливе порушення процесів окиснення-відновлення з подальшим розвитком окисного стресу через посилений синтез NO на фоні переважання процесів катаболізму, тому наступним етапом було оцінити інтенсивність вільнорадикальних процесів та стан захисної антиоксидантної системи у сироватці крові та хрящовій тканині щурів, а також встановити вплив хондроїтина сульфату на окисно-антиоксидантний гомеостаз при експериментальному ОА.

Результати досліджень, поданих у даному підрозділі, опубліковані у працях [249, 252, 254].

3.2. Інтенсивність вільнорадикальних процесів у сироватці крові та хрящовій тканині щурів при експериментальному остеоартрозі та при дії хондропротектора

3.2.1. Вміст активних форм кисню у сироватці крові та хрящовій тканині щурів

Відомо, що на початку ОА в хондроцитах посилюються вільнорадикальні процеси, які порушують структурно-функціональний стан клітин хрящової тканини, що призводить до загибелі хондроцитів і синовіоцитів. Основними структурними білками хрящової тканини, які модифікуються в окисних реакціях є протеоглікани. Було помічено, що застосування препаратів, які містять у складі структурні компоненти протеогліканів сприяє відновленню структури хрящової тканини і гальмуванню процесів її деградації, проте недостатньо вивчено їх вплив на редокс-гомеостаз в суглобах [157].

Внаслідок дії прозапальних цитокінів та активації сигнальних каскадів в клітинах синтезується надлишки перекису водню, супероксид-аніону та оксиду азоту, які активують колагеназу та пригнічують інгібітори протеаз, викликають перекисне окиснення ліпідів мембран, пошкоджують ферменти, структурні білки та руйнують нуклеїнові кислоти [158].

В ході проведених експериментів встановлено, що у групі щурів з МІА – індукованим остеоартрозом в сироватці крові щурів зростає вміст супероксидного аніон-радикалу у 2,3 раза, рівень перекису водню - у 2,4 раза, відповідно, порівняно з контролем (табл. 3.2).

Було показано, що препарат на основі хондроїтина сульфату не впливає на зсув прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у тварин: в ході дослідження не виявлено змін вмісту супероксидного аніон-радикалу та кількості перекису водню у хрящовій тканині тварин групи «Драстоп» відносно відповідних показників контрольної групи.

Після застосування препарату тварин з експериментально викликаним остеоартрозом встановлено, що вміст супероксидного аніон-радикалу та перекису водню знижується в 1,6 раза відносно відповідних показників групи «ОА».

Таблиця 3.2

**Вміст активних форм кисню у сироватці крові щурів при остеоартрозі
($M \pm m$, $n=7$)**

Показник	Вміст O_2^- , мкмоль ХГТ формазану \times мг білка ⁻¹	Вміст H_2O_2 , мкмоль \times мг білка ⁻¹
Групи тварин		
Контроль	4,83 \pm 0,45	0,35 \pm 0,03
Хондроїтина сульфат	5,03 \pm 0,55	0,37 \pm 0,03
Остеоартроз	10,93 \pm 0,98*	0,84 \pm 0,08*
Остеоартроз + хондроїтина сульфат	7,01 \pm 0,69#	0,52 \pm 0,05#

* - $p < 0,05$, відносно контролю;

- $p < 0,05$, відносно групи щурів з ОА.

В ході проведених експериментів встановлено, що у групі щурів з МІА – індукованим остеоартрозом в гомогенатах хрящів щурів зростає вміст супероксидного аніон-радикалу у 3,1 раза, рівень перекису водню - у 1,7 раза, відповідно, порівняно з контролем (табл. 3.3).

Було показано, що, що ХС не впливає на зсув прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у тварин: в ході дослідження не виявлено змін вмісту супероксидного аніон-радикалу та кількості перекису водню у

хрящовій тканині тварин групи ХС відносно відповідних показників контрольної групи.

Після застосування препарату тварин з експериментально викликаним остеоартрозом встановлено, що вміст супероксидного аніон-радикалу знижується в 1,6 раза та кількість перекису водню зменшується в 1,4 раза відносно відповідних показників групи «ОА».

Таблиця 3.3

Вміст активних форм кисню у хрящовій тканині колінних суглобів щурів при остеоартрозі ($M \pm m$, $n=7$)

Показник	Вміст O_2^- , мкмоль ХГТ формазау \times мг білка ⁻¹	Вміст H_2O_2 , мкмоль \times мг білка ⁻¹
Групи тварин		
Контроль	8,03 \pm 0,76	12,83 \pm 1,15
Хондроїтина сульфат	9,21 \pm 0,85	11,96 \pm 1,07
Остеоартроз	24,95 \pm 2,17*	22,39 \pm 2,08*
Остеоартроз + хондроїтина сульфат	15,32 \pm 1,38 [#]	15,71 \pm 1,53 [#]

* - $p < 0,05$, відносно контролю;

- $p < 0,05$, відносно групи щурів з ОА.

Коїке М та спів. показали, що механічне перенавантаження суглобів сприяє генерації мітохондріального супероксид-аніон радикалу і селективному інгібуванню супероксиддисмутази 2 в хондроцитах *in vivo*, *in vitro* мітохондріальний супероксид-аніон радикал пригнічує експресію супероксиддисмутази 2 в хондроцитах *in vitro*. Дефіцит ферменту в

хондроцитах призводить до надмірного виробництва мітохондріального супероксид-аніон радикалу, що викликає дегенерацію хряща [159].

В хондроцитах щурів перекис водню, що в нормі є сигнальною молекулою, запускає NF-κB/MAPK каскад, який активує експресію прозапальних цитокінів і аутоімунну деградацію хрящової тканини [160]. Виявлене нами збільшення вмісту АФК у хрящовій тканині при експериментальному остеоартрозі може призводити до розривів ДНК, модифікації нуклеїнових основ, ушкодження хромосом. При взаємодії з білками перекису водню утворюються гідропероксидази, змінюється третинна структура білків, що призводить до їх агрегації і денатурації та втрати їх функціональної активності, перекисне окислення ліпідів порушує структуру мембран, змінює клітинну сигналізацію, що може призводити до апоптозу [161].

Отже, ХС сприяє зниженню вміст АФК при експериментальному ОА, не порушуючи окисного балансу в нормі.

АФК у концентраціях, що перевищують норму здатні хімічно модифікувати амінокислоти ферментів та переводити останні в аномальні форми зі зміною субстратної специфічності та продукту реакції, що негативно впливає на життєдіяльність клітини, тому додатково було оцінено ксантиноксидазну активність у хрящовій тканині колінних суглобів щурів.

3.2.2. Ксантиноксидазна активність у хрящовій тканині колінних суглобів щурів

Ксантиноксидаза (КО) - молібден-вмісний фермент, що каталізує окислення гіпоксантину в ксантин і ксантину в сечову кислоту. Ксантиноксидаза вважається аномальною формою ксантиндегідрогенази і утворюється в наслідок часткового протеолізу, змінюючи субстратну специфічність з НАДФ на кисень. Ксантиноксидаза каталізує двох стадійну реакцію окиснення гіпоксантина в ксантин і сечову кислоту і на кожній стадії

одним з продуктів є супероксид, що спонтанно дисмутує у перекис водню [162].

В ході проведених експериментів встановлено, що у групі щурів з МІА – індукованим остеоартрозом в гомогенатах хрящів щурів у 3,2 раза зростає активність ксантиноксидази порівняно з контролем (табл. 3.4).

Показано, що препарат на основі хондроїтина сульфату не впливає на активність ксантиноксидази у хрящовій тканині тварин групи ХС відносно відповідних показників контрольної групи.

Після введення препарату тварин з експериментально викликаним остеоартрозом встановлено, що активність ксантиноксидази падає в 2 рази відносно відповідних показників групи «ОА».

Таблиця 3.4

Ксантиноксидазна активність у хрящовій тканині колінних суглобів щурів при остеоартрозі ($M \pm m$, $n=7$)

Показник	Ксантиноксидазна активність, нмоль · хв ⁻¹ · мг білка ⁻¹
Групи тварин	
Контроль	2,02 ± 0,18
Хондроїтина сульфат	2,51 ± 0,23
Остеоартроз	6,39 ± 0,54*
Остеоартроз + хондроїтина сульфат	3,18 ± 0,29 [#]

* - $p < 0,05$, відносно контролю;

- $p < 0,05$, відносно групи щурів з ОА.

Нещодавно Aibibula Z. та співавторами було доведено, що ксантиноксидаза активується прозапальними цитокінами і бере участь у прогресуванні остеоартрозу колін мишей [163].

Ксантиноксидаза відіграє вирішальну роль при травматичній ішемії-реперфузії. Під час ішемії з АТФ утворюється гіпоксантин, а ксантиндегідрогеназа перетворюється на ксантиноксидазу. Під час реперфузії ксантиноксидаза каталізує реакцію гіпоксантину або ксантину з молекулярним киснем з вивільненням супероксидних радикалів. Ці радикали швидко реагують з оксидом азоту, пероксинітритом та іншими видами АФК. [164].

У хворих на остеоартроз людей було помічено кореляцію карбонілювання білків з зростанням активності ксантиноксидази та вмісту АФК внаслідок розвитку запалення [165].

Hanachi N. та спів. показали наявність ксантиноксидази у синовіальній рідині хворих на остеоартроз пацієнтів, при чому співвідношення лізоформ ксантиноксидаза/ ксантиндегідрогеназа було зміщене в бік оксидази і було прямо пропорційне важкості захворювання [166].

Отже, ХС здатен знижувати ксантиноксидантну активність та перешкоджати розвитку окисних процесів.

АФК здатні взаємодіяти з фосфоліпідами мембран, тому наступним етапом було визначити вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у сироватці крові та хрящовій тканині щурів та можливість корекції розвитку ПОЛ введенням хондроїтина сульфату.

3.2.3. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у сироватці крові та хрящовій тканині щурів

Одним з наслідків дії АФК на компоненти клітини є окиснення ліпідів. Його оцінюють за вмістом продуктів перекисного окиснення ліпідів – дієнових кон'югатів (первинні продукти), малонового діальдегіду (вторинний продукт) та шиффових основ (кінцеві продукти). Відомо, що у синовіальній рідині хворих на остеоартроз людей вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів зростає в кілька разів [167]. Дієнові кон'югати утворюються при

окисленні арахідонової кислоти з відривом водню у α положенні по відношенню до подвійного зв'язка. Вони пошкоджують структурні білки, ферменти, ліпопротеїди і нуклеїнові кислоти [168]. Дієнові кон'югати є нестійкими і перетворюються на ненасичені альдегіди, одним з яких є малоновий альдегід. Малоновий альдегід утворюється з жирних кислот з трьома чи більше подвійними зв'язками. В нормі він бере участь у синтезі простагландинів, прогестерону і інших стероїдів, а при патології сшиває молекули ліпідів і знижує плинність мембран, порушується фагоцитоз, піноцитоз, клітинна міграція та ін. [169].

Продуктами взаємодії карбонільних груп альдегідів чи кетонів з вільними аміногрупами є шиффові основи. Накопичення шиффових основ дестабілізує мембрани та сприяє апоптозу. Загалом продукти перекисного окиснення ліпідів володіють вираженою цитотоксичністю, пригнічують гліколіз і окисне фосфорилування, мембранні ферменти, процеси синтезу біомолекул [170].

Було встановлено зростання вмісту продуктів ПОЛ у сироватці крові щурів при введенні моноіодацетату натрію: вміст дієнових кон'югатів зростає у 2,6 раза, вміст ТБК – активних продуктів зростає у 2,1 раза, вміст шиффових основ зростає у 1,7 раза відносно контролю (табл. 3.5). Не було показано достовірного зростання вмісту продуктів ПОЛ відносно контролю. При застосуванні препарату «Драстоп» у гомогенатах хрящової тканини показано зниження вмісту первинних та вторинних продуктів продуктів перекисного окиснення ліпідів у 1,6 раза, вміст кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів знизився у 1,5 раза відносно групи «ОА».

Таблиця 3.5

Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у сироватці крові щурів при остеоартрозі (M±m, n=7)

Показник	Дієнові кон'югати, нмоль/мг білка ⁻¹	ТБК-активні продукти, нмоль × мг білка ⁻¹	Шиффові основи, ум. од. × мг білка ⁻¹
Контроль	30,00 ± 2,71	6,4 ± 0,62	0,78 ± 0,07
Хондроїтина сульфат	31,45 ± 3,4	6,8 ± 0,67	0,82 ± 0,05
Остеоартроз	78,42±7,68*	13,74±1,23*	1,29±0,11*
Остеоартроз + хондроїтина сульфат	50,11±4,73 [#]	8,41±0,87 [#]	0,84±0,05 [#]

* - $p < 0,05$, відносно контролю;

[#] - $p < 0,05$, відносно групи щурів з ОА.

Було встановлено зростання вмісту продуктів ПОЛ у хрящовій тканині щурів при введенні моноіодацетату натрію: вміст дієнових кон'югатів зростає у 2 рази, вміст ТБК – активних продуктів зростає у 2,3 рази, вміст шиффових основ зростає у 2,1 рази відносно контролю (табл. 3.6). В групі ХС показано незначне зростання вмісту дієнових кон'югатів – у 1,2 рази відносно контролю, вміст ТБК – активних продуктів не змінився, вміст шиффових основ зріс у 1,2 рази відносно контролю. При застосуванні препарату «Драстоп» у гомогенатах хрящової тканини показано зниження вмісту первинних продуктів перекисного окиснення ліпідів у 1,7 рази, вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів у 1,5 рази та кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів у 1,6 рази відносно групи «ОА».

Таблиця 3.6

**Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у хрящовій тканині
колінних суглобів щурів при остеоартрозі (M±m, n=7)**

Показник	Дієнові кон'югати, нмоль/мг білка ⁻¹	ТБК-активні продукти, нмоль × мг білка ⁻¹	Шиффові основи, ум. од. × мг білка ⁻¹
Групи тварин			
Контроль	279,88 ± 11,20	65,21 ± 6,18	8,06 ± 0,32
Хондроїтина сульфат	334,99 ± 13,40*	72,83 ± 6,95	9,81 ± 0,39*
Остеоартроз	570,14 ± 22,81*	149,97 ± 12,36*	16,91 ± 0,68*
Остеоартроз + хондроїтина сульфат	336,54 ± 13,46 [#]	98,35 ± 9,51 [#]	10,71 ± 0,43 [#]

* - $p < 0,05$, відносно контролю;

- $p < 0,05$, відносно групи щурів з ОА.

Згідно проведених експериментальних досліджень було встановлено, що при експериментальному артрозі у хрящовій тканині інтенсифікуються процеси ліпідної пероксидації, про що свідчить збільшення рівня дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів та шиффових основ. Згідно отриманих даних виявлено, що препарат на основі хондроїтина сульфату покращує показники прооксидації ліпідів та білків у хрящовій тканині суглобів при остеоартрозі, про що свідчить зниження вмісту АФК та продуктів перекисного окиснення ліпідів.

Подібні результати були отримані іншими дослідниками. Показано, що в хондроцитах *in vitro* при артрозі збільшується вміст продуктів перекисного

окислення ліпідів, а саме, малонового альдегіду та гідроксіноненалу [171]. Суглобовий хрящ не має в своєму складі судин, а отже, надходження кисню обмежене. І хоча метаболізм клітин добре пристосований до гіпоксії, було виявлено, що хондроцити чутливі до кисню. В дослідженні хондроцитів *in vitro* було показано, що гіпоксія сприяє експресії хондрогенного фенотипу і формуванню специфічного хрящового матриксу, що вказує на важливість підтримки певного рівня парціального тиску кисню в культурі клітин. Крім впливу самого кисню, активні форми кисню відіграють важливу роль в регуляції ряду основних видів метаболізму, таких як активація клітин хондроцитів, проліферація і ремоделювання матриксу. Проте, коли генерація АФК перевищує антиоксидантний потенціал клітини, розвивається окисний стрес, що призводить до структурних та функціональних ушкоджень хряща, таких як загибель клітин і деградації матрикса [172].

На моделі *in vitro* показано, що малоновий альдегід, який є продуктом перекисного окиснення ліпідів при окисному стресі здатен окислювати білки хрящового матриксу, що призводить до змін біохімічних та біофізичних властивостей хрящової тканини [173].

У синовіальній рідині пацієнтів, хворих на ОА виявляють розвиток окисного стресу, що супроводжується підвищеною продукцією активованих кисневих метаболітів (H_2O_2 , NO^*) і активацією перекисного окиснення ліпідів (малонового диальдегіду) на фоні дисбалансу і інгібування компонентів антиоксидантної системи (супероксиддисмутази, каталази, глутатіон-S-трансферази, глутатіонпероксидази, зниження вмісту відновленого глутатіону). Інтенсифікація вільнорадикального окислення і посилення прооксидантно властивостей синовіальної рідини хворих на ОА залежали від вираженості патологічного процесу, тяжкості оперативного втручання при артроскопії і сприяли поглибленню деструктивно-дистрофічних змін суглобового хряща і підвищенню рівня апоптозу і некрозу хондроцитів [174].

Відомо, що активований транскрипційний фактор NFκβ зв'язується з промотором відповідного гена і активує експресію прозапальних цитокінів, металопротеїназ, синтази азоту. Хондроїтина сульфат знижує активізацію NFκβ і його ядерну транслокацію в хондроцитах і клітинах синовіальної мембрани, що пригнічує експресію генів та синтез циклооксигенази 2, прозапальних цитокінів ІЛ 1β, ІЛ 6, інгібує активності лізосомальних ферментів, синтази оксиду азоту, металопротеїназ – стромелізина, колагенази, фосфоліпази А2, супероксидного аніон-радикалу, активує синтез гіалуронової кислоти та протеогліканів [175].

Отже, ХС здатен знижувати рівень продуктів ПОЛ при МІА-індукованому ОА, що вказує на його антиоксидантні властивості.

АФК реагують не лише ліпідами, а й з функціональними групами амінокислот, що порушує структуру та змінює функції білків аж до повної інактивації ферментів та деградації структурних молекул, тому наступним етапом було визначити вміст продуктів окисної модифікації білків у сироватці крові та хрящовій тканині щурів.

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

АФК, що утворюються при інтенсифікації вільно радикальних процесів, пошкоджують не лише ліпіди мембран, а й інші макромолекули: нуклеїнові кислоти і білки. Якщо ліпіди мембран захищені від радикальної атаки жиророзчинними антиоксидантами (вітамін Е, А), то білки, що знаходяться у водному оточенні, таким захистом не володіють. Є дані, що ліпіди та трансмембранні білки руйнуються під дією вільних радикалів у водному середовищі набагато швидше, ніж в гідрофобній [176]. Окисна модифікація білків та окиснення цистеїнових SH-груп призводить до зміни фізико-хімічних властивостей білків: фрагментації, агрегації та протеолізу. В результаті утворюються високоактивні продукти, інактивуються активні

центри ферментів або модифікуються білкові молекули, що порушує метаболізм хрящової тканини, підтримує запальні та дегенеративні процеси в організмі [177].

Показано, що препарати на основі хондроїтина здатні пригнічувати процеси перекисного окиснення молекул в клітині. Хондропротектори використовуються в медицині вже давно, але сировина для них являє собою суміш молекул хондроїтина сульфату різної довжини та варіаціями у позиції сульфатованих груп, а також різну ступінь очищення, що обумовлює різні ефекти, що потрібно мати на увазі при призначенні оригінальних препаратів та дженериків [178, 179].

В ході проведеного експерименту було встановлено, що у групі щурів з МІА – індукованим остеоартрозом в сироватці крові зростає вміст продуктів окисної модифікації білків: у 1,5 раза для альдегідних та у 1,6 раза для кетонних продуктів нейтрального характеру; у 1,5 раза для альдо- та у 1,4 раза для кетопохідних основного характеру, відповідно, порівняно з контролем (табл. 3.7).

Препарат на основі хондроїтина сульфату не змінює хімічну структуру білків в сироватці тварин: в ході дослідження не виявлено змін вмісту продуктів окисної модифікації білків у щурів групи ХС відносно відповідних показників контрольної групи.

Після застосування препарату тварин з експериментально викликаним остеоартрозом встановлено, що вміст нейтральних альдегідних та кетонних продуктів знижується у 1,3 та 1,4 раза, відповідно; вміст основних альдо- та кетопохідних основного характеру знижується у 1,4 та 1,2 раза, відповідно, відносно показників групи «ОА».

Таблиця 3.7

Вміст продуктів окисної модифікації білків у сироватці крові щурів при експериментальному остеоартрозі, ум.од. × мг білка⁻¹ (M ± m, n = 7)

Показник / Групи тварин	Продукти нейтрального характеру		Продукти основного характеру	
	356 нм, альдопохідні	370 нм, кетопохідні	430 нм, альдопохідні	530 нм, кетопохідні
	Контроль	0,054 ± 0,005	0,041 ± 0,004	0,035 ± 0,004
Хондроїтина сульфат	0,056 ± 0,005	0,042 ± 0,004	0,036 ± 0,004	0,032 ± 0,004
Остеоартроз	0,081 ± 0,007*	0,065 ± 0,005*	0,053 ± 0,006*	0,042 ± 0,005*
Остеоартроз + хондроїтина сульфат	0,063 ± 0,006#	0,048 ± 0,005#	0,039 ± 0,005#	0,035 ± 0,004#

* - p < 0,05, відносно контролю;

- p < 0,05, відносно групи щурів з ОА.

В ході проведеного експерименту було встановлено, що у групі щурів з МІА – індукованим остеоартрозом в гомогенаті хрящів щурів зростає вміст продуктів окисної модифікації білків: у 1,6 раза для альдегідних та кетонних продуктів нейтрального характеру; у 1,4 раза для альдо- та кетопохідних основного характеру, відповідно, порівняно з контролем (табл. 3.8).

В групі ХС показано, що препарат на основі хондроїтина сульфату не змінює хімічну структуру білків в сироватці тварин: в ході дослідження не виявлено змін вмісту продуктів окисної модифікації білків у щурів групи ХС відносно відповідних показників контрольної групи.

Після введення препарату тварин з експериментально викликаним остеоартрозом встановлено, що вміст нейтральних альдегідних та кетонних

продуктів знижується у 1,2 та 1,4 раза, відповідно; вміст основних альдо- та кетопохідних основного характеру знижується у 1,2 та 1,3 раза, відповідно, відносно показників групи «ОА».

Таблиця 3.8

Вміст продуктів окисної модифікації білків у гомогенаті хрящів щурів при експериментальному остеоартрозі, ум.од. × мг білка-1 (M ± m, n = 7)

Показник / Групи тварин	Продукти нейтрального характеру		Продукти основного характеру	
	356 нм, альдопохідні	370 нм, кетопохідні	430 нм, альдопохідні	530 нм, кетопохідні
Контроль	0,052 ± 0,005	0,048 ± 0,005	0,045 ± 0,005	0,043 ± 0,004
Хондроїтина сульфат	0,054 ± 0,005	0,049 ± 0,005	0,049 ± 0,005	0,049 ± 0,005
Остеоартроз	0,084 ± 0,008*	0,077 ± 0,008*	0,063 ± 0,006*	0,059 ± 0,006*
Остеоартроз + хондроїтина сульфат ХС	0,069 ± 0,007 [#]	0,054 ± 0,005 [#]	0,051 ± 0,005 [#]	0,046 ± 0,005 [#]

* - $p < 0,05$, відносно контролю;

- $p < 0,05$, відносно групи щурів з ОА.

Індукторами окисної модифікації білків можуть виступати активні форми кисню, зростання вмісту вільного заліза, продукти перекисного окиснення ліпідів в умовах зниження антиоксидантного захисту. Гідроксильний радикал змінює нативну конформацію доменів білків, в результаті чого збільшується кількість гідрофобних залишків на поверхні глобули, що зумовлює агрегацію молекул, а в комбінації з супероксидним аніон-радикалом викликає фрагментацію з утворенням низькомолекулярних

фрагментів. Ліпідні пероксиди кон'югують з залишками гістидину, цистеїну та лізину, змінюючи активність ферментів. Лізинові та аспарагінові залишки піддаються глікуванню та глікооксидації, а при додатковій дії вільних форм кисню з лізину можуть утворюватися стабільні карбонільовані похідні. SH-групи піддаються поступовому окисненню: від утворення дисульфідів Cys-S-S-Cys, цистеїн-сульфенової кислоти (SO), та сульфоксиду метіоніну (MetSO), що можуть бути зворотньо відновлені, до сульфінової (SO₂-) та сульфонової (SO₃-) кислот, що не відновлюються в клітинах [180, 181]. Під дією активних форм кисню за участі металів як каталізаторів залишки аргініну та лізину піддаються карбонілюванню з втратою одного чи більше атомів азоту, а залишки проліну, треоніну та цистеїну утворюють стабільні аддукти Міхаеля. Карбонілювання призводить до цільового розщеплення білків протеазами і деградації в протеасомах [182, 183]. Помічено, що накопичення модифікованих білкових агрегатів та альдегідів призводить до виснаження протезних систем та подільшого накопичення в клітині пошкоджених та неправильно згорнутих білків [184].

Окиснення амінокислотних залишків до альдегідів призводить до інактивації мембранних транспортерів - Na⁺-K⁺-АТФ-ази та транспортерів глюкози, білків холдингу - шаперонів Hsp90 та протеїндисульфідізомерази, інактивації кіназ сигнальних шляхів, посилення запалення та розвитку апоптозу [185, 186].

Отже, при МІА-індукованому ОА в крові та хрящах зростає вміст продуктів ОМБ. Введення препарату «Драстоп» сприяло зниженню вмісту ОМБ, що узгоджується з попередніми даними щодо пригнічення розвитку окисного стресу та зниження рівнів ПОЛ та АФК.

Через достовірне підвищення вмісту супероксиданіон радикалу, перекису водню та посилення ПОЛ і ОМБ доцільно оцінити стан захисної антиоксидантної системи, а саме, визначити активності ферментів

супероксиддисмутази та каталази та вплив хондройтина сульфату на антиоксидантні процеси.

3.2.5 Ферменти антирадикального захисту в сироватці крові та хрящовій тканині щурів

Першою лінією захисту клітин від вільних радикалів є анти радикальні ферменти супероксиддисмутаза та каталаза. Супероксиддисмутаза каталізує дисмутацію супероксида в кисень і пероксид водню. Таким чином, вона відіграє найважливішу роль в антиоксидантному захисті практично всіх клітин, що так чи інакше знаходяться в контакті з киснем. Каталаза здійснює захисну функцію щодо перекису водню. Розкладання перекису водню каталазою на молекулярний кисень і воду здійснюється в два етапи. При цьому в окисленному стані каталаза працює і як пероксидаза - каталізує окислення спиртів або альдегідів. Крім того, каталаза може виступати джерелом утворення активних форм кисню. Близько 5% кисню, що утворюється в результаті розкладання, H_2O_2 переходить у збуджений синглетний стан [187].

Було встановлено, що у сироватці крові щурів активність супероксиддисмутази знизилась в 1,6 раза, а каталази зросла в 1,6 раза порівняно з контролем. В групі ХС не показано змін в активностях ферментів. Після введення препарату на основі хондройтина сульфату активність супероксиддисмутази зросла в 1,5 раза, активність каталази знизилася в 1,4 рази, порівняно з групою ОА. (Табл. 3.9).

Таблиця 3.9

**Активності антиоксидантних ферментів у сироватці крові щурів з ОА
($M \pm m, n = 7$)**

Показник	Супероксиддисмутазна активність ум.од. \times хв ⁻¹ \times мг білка ⁻¹	Каталазна активність нмоль \times хв ⁻¹ \times мг білка ⁻¹
Групи тварин		
Контроль	0,19 \pm 0,02	0,66 \pm 0,04
Хондроїтина сульфат	0,18 \pm 0,02	0,69 \pm 0,04
Остеоартроз	0,12 \pm 0,01*	1,07 \pm 0,06*
Остеоартроз + хондроїтина сульфат	0,18 \pm 0,02 [#]	0,79 \pm 0,06 [#]

* - $p < 0,05$, відносно контролю;

- $p < 0,05$, відносно групи щурів з ОА.

Було встановлено, що у хрящовій тканині щурів, уражених хронічним запаленням суглобів, активність антиоксидантних ферментів - супероксиддисмутази та каталази значно зросла: активність супероксиддисмутази збільшилася в 4 рази, а активність каталази - у 4,7 рази порівняно з контролем. В групі ХС показано слабе зростання активності супероксиддисмутази в хрящах щурів - у 1,2 рази щодо контрольної. Після застосування препарату на основі хондроїтина сульфату активність супероксиддисмутази знизилася в 1,9 рази, активність каталази - в 3,1 рази, порівняно з групою ОА. (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

Активності антиоксидантних ферментів у хрящовій тканині колінного суглобів щурів з ОА (M ± m, n = 7)

Показник	Супероксиддисмутазна активність ум.од. × хв ⁻¹ × мг білка ⁻¹	Кааталазна активність, нмоль × хв ⁻¹ × мг білка ⁻¹
Контроль	0,321 ± 0,029	14,21 ± 1,25
Хондроїтина сульфат	0,383 ± 0,035*	12,92 ± 1,23
Остеоартроз	1,281 ± 0,105 *	67,49 ± 6,38 *
Остеоартроз + хондроїтина сульфат	0,672 ± 0,064 [#]	21,87 ± 2,09 [#]

* - p < 0,05, відносно контролю;

- p < 0,05, відносно групи щурів з ОА.

Відомо, що АФК (O_2^- та пероксинітрил) безпосередньо пошкоджують гуанінові повтори в теломерних ділянках ДНК, що вказує на те, що окиснення призводить до скорочення теломерів, незалежно від активності поділу клітини [188].

Ці дослідження дозволяють припустити, що окисний стрес може викликати нестабільність теломерів хондроцитів, яка призводить до передчасного старіння клітин.

У суглобовій порожнині пошкоджений некротичний хрящ та кісткові фрагменти піддаються фагоцитозу лейкоцитами з вивільненням медіаторів запалення, АФК (супероксидного аніону ($O_2^{\bullet-}$), гідроксилового радикалу ($\bullet OH$), перекису водню (H_2O_2), гіпохлорної кислоти ($HOCl$)) та лізосомальних ферментів. Цей процес клінічно виявляється розвитком синовіту та появою

імунологічних реакцій на продукти розпаду [189]. У хондроцитах АФК регулюють роботу внутрішньоклітинних сигнальних молекул, таких як рецепторні тирозинкінази, MAP-кінази (ERK1 / 2, JNK, p38), ліпідні шляхи (фосфоліпази, PKC і шлях PI3-кінази / Акт), фосфатази та фактори транскрипції (NFIB, p53 та AP-1), які беруть участь у сигнальних каскадах, що регулюють синтез та деградацію хрящової матриці, АФК можуть сприяти активації деяких сигналів шляхом зворотної інактивації специфічних фосфатаз і збільшення рівня АФК, активізувати катаболічну сигналізацію, викликати окисний стрес і пригнічувати анаболічну сигналізацію через інгібування IGF-1 залежний синтез протеогліканів [190, 191, 192].

Отже, ХС здатен відновлювати нормальне функціонування антиоксидантної системи при МІА-індукованому ОА, що узгоджується з попередніми результатами щодо зниження рівня АФК.

Другою захисною антиоксидантною ланкою є глутатіонова система, яка знешкоджує не лише АФК, а й здатна відновлювати продукти окиснення, тому наступним етапом дослідження було дослідити активність глутатіонової антиоксидантної системи в сироватці крові та хрящовій тканині щурів при ОА та після введення хондропротектора.

3.2.6. Глутатіонова антиоксидантна система в сироватці крові та хрящовій тканині щурів

Продукція ендогенних АФК (породжених NADPH оксидазою, ксантинооксидазою або цитохромом P450 та ін.) збалансована активностями внутрішньоклітинних антиоксидантних систем захисту, що включає ферменти супероксиддисмутази і каталазу, які є першою ланкою антиоксидантного захисту [193].

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

викликають перекисне окиснення ліпідів мембран, пошкоджують ферменти, структурні білки та руйнують нуклеїнові кислоти [194]. Другою ланкою антиоксидантного захисту клітин є глутатіонова система, яка захищає компоненти клітини від окиснення. Основним антиоксидантом є відновлений глутатіон – низькомолекулярний тіол, що виступає донором водню в окисно-відновних реакціях [195]. У відновленій формі глутатіон хімічно взаємодіє з активними формами кисню, знешкоджує вільні радикали, видаляє ацилперокси з мембран. В якості кофактора він входить до складу ферментів глутатіонової системи, які знешкоджують перекис водню (глутатіонпероксидаза), ліпоперекиси мембран та ксенобіотики (глутатіонтрансфераза), підтримують пул відновленого глутатіону (глутатіонредуктаза), забезпечуючи комплексний антиоксидантний захист [196].

Завдяки наявності залишку цистеїну, GSH неферментативно легко окислюється електрофільними сполуками в глутатіон-дисульфід (GSSG). Як антиоксидант, глутатіон займає центральне місце в антирадикальному і антиперекисному захисті клітини. GSH ефективно нейтралізує вільні радикали (наприклад, гідроксильні, ліпідні радикали, пероксинітрит і H_2O_2) безпосередньо і опосередковано, шляхом ферментативних реакцій. Так, розрізняють три лінії захисту від активованих кисневих метаболітів, в яких беруть участь наступні ферменти: 1) супероксиддисмутаза, 2) каталаза, глутатіонпероксидази, тіоредоксин, пероксиредоксини, глутаредоксини 3) глутатіон-пероксидаза і глутатіон-S-трансферази; вони послідовно відновлюють супероксид, H_2O_2 і органічні гидроперекиси. Інколи включають ще й четверту лінію захисту (знешкодження вторинних продуктів пероксидації та інших окислених сполук), в якій беруть участь глутатіон-S-трансферази, гліоксилаза і формальдегіддегідрогеназа. Очевидно, що глутатіон бере участь в трьох лініях захисту з чотирьох і, отже, вносить вагомий внесок у функціонування антиоксидантної системи [197].

Одна з функцій глутатіону в редокс-регуляції пов'язана з утворенням змішаних дисульфідів, або глутатіонілірованієм. Глутатіонілування функціональних редокс-чутливих SH-груп цистеїну в білках захищає їх від окисної деградації активними формами кисню. Крім того, глутатіон, беручи участь в редокс-регуляції, впливає на експресію сигнальних білків на рівні транскрипції [198].

В ході проведених експериментів встановлено, що у групі щурів з МІА – індукованим остеоартрозом в сироватці крові знижуються активності ферментів глутатінової системи – активність глутатіонпероксидази знижується у 1,4 раза, активність глутатіонтрансферази – в 1,3 раза, активність глутатіонредуктази в 1,2 раза відносно контролю. При розвитку експериментального запалення суглобів у сироватці крові порушується співвідношення окисненого і відновленого глутатіону. Так, вміст відновленого глутатіону знижується в 1,4 раза, а вміст окисненого зростає в 1,3 раза відносно відповідних показників контрольної групи (табл. 3.9).

Показано, що хондроїтина сульфат не змінює рівновагу глутатінової системи в сироватці порівняно з контрольною групою (табл. 3.9).

Після застосування препарату тварин з експериментально викликаним остеоартрозом виявлено підвищення активності ферментів глутатінової системи - активність глутатіонпероксидази зросла у 1,3 раза, активність глутатіонтрансферази – в 1,4 раза, активність глутатіонредуктази в 1,7 раза відносно відповідних показників сироватки крові хворих тварин групи ОА. Встановлено, що препарат на основі хондроїтина сульфату відновлює співвідношення окисненого і відновленого глутатіону у сироватці крові щурів з експериментальним остеоартрозом. Так, вміст відновленого глутатіону підвищився в 1,5 раза, вміст окисненого не змінився відносно відповідних показників групи ОА (табл. 3.11).

Таблиця 3.11

**Глутатіонова система у сироватці крові щурів при остеоартрозі (M±m,
n=7)**

Показник \ Група	Контроль	Хондроїтина сульфат	Остеоартроз	Остеоартроз + хондроїтина сульфат
Глутатіонпероксидазна активність, нмоль GSH×хв ⁻¹ ×мг білка ⁻¹	32,57 ± 2,95	35,29 ± 3,14	23,56 ± 2,17*	29,75 ± 2,38 [#]
Глутатіонтрансферазна активність, нмоль ×хв ⁻¹ ×мг білка ⁻¹	7,29 ± 0,07	7,97 ± 0,08	5,66 ± 0,54*	8,15 ± 0,74 [#]
Глутатіонредуктазна активність, нмоль НАДФН×хв ⁻¹ ×мг білка ⁻¹	0,38 ± 0,03	0,41 ± 0,03	0,32 ± 0,03*	0,53 ± 0,05 [#]
Глутатіон відновлений, нмоль ×мг білка ⁻¹	20,59 ± 1,82	21,62 ± 1,75	15,06 ± 1,42*	22,93 ± 1,94 [#]
Глутатіон окиснений, нмоль ×мг білка ⁻¹	6,59 ± 0,61	6,56 ± 0,63	8,63 ± 0,81*	7,95 ± 0,75 [#]

* - p < 0,05, відносно контролю;

- p < 0,05, відносно групи щурів з ОА.

В ході проведених експериментів встановлено, що у групі щурів з МІА – індукованим остеоартрозом в хрящовій тканині знижувались активності ферментів глутатіонової системи – активність глутатіонпероксидази

знижується у 1,8 раза, активність глутатіонтрансферази – в 1,7 раза, активність глутатіонредуктази в 2 рази відносно контролю. При розвитку експериментального запалення суглобів у хрящовій тканині порушувались співвідношення окисленого і відновленого глутатіону. Так, вміст відновленого глутатіону знижався в 1,9 раза, а вміст окисленого зріс в 1,7 раза відносно відповідних показників контрольної групи.

Показано, що хондроїтина сульфат не змінює рівновагу глутатіонової системи в хрящах порівняно з контрольною групою.

Після введення препарату тваринам з експериментально викликаним остеоартрозом виявлено підвищення активностей ферментів глутатіонової системи - активності глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази зросла у 1,4 раза, активність глутатіонредуктази в 1,6 раза відносно відповідних показників хрящової тканини хворих тварин групи ОА. Встановлено, що препарат на основі хондроїтина сульфату відновлює співвідношення окисленого і відновленого глутатіону у хрящовій тканині щурів з експериментальним остеоартрозом. Так, вміст відновленого глутатіону підвищився в 1,5 раза, вміст окисленого знижався в 1,3 раза відносно відповідних показників групи ОА (табл. 3.12).

Таблиця 3.12

Показники глутатіонової системи у хрящовій тканині щурів при експериментальному артрозі (M ± m, n = 7).

Показник	Контроль	Хондроїтина сульфат	Остеоартроз	Остеоартроз + хондроїтина сульфат
Глутатіонпероксидазна активність, нмоль GSH × хв ⁻¹ × мг білка ⁻¹	11,64 ± 1,15	11,23 ± 1,09	6,41 ± 0,62*	9,01 ± 0,83
Глутатіонтрансферазна активність, нмоль × хв ⁻¹ × мг білка ⁻¹	3,12 ± 0,28	2,97 ± 0,29	1,84 ± 0,17*	2,53 ± 0,22 [#]
Глутатіонредуктазна активність, нмоль НАДФН × хв ⁻¹ × мг білка ⁻¹	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,07 ± 0,01*	0,11 ± 0,01 [#]
Глутатіон відновлений, нмоль × мг білка ⁻¹	7,21 ± 0,69	6,94 ± 0,68	3,84 ± 0,37*	5,76 ± 0,53 [#]
Глутатіон окиснений, нмоль × мг білка ⁻¹	2,48 ± 0,23	2,41 ± 0,22	4,17 ± 0,39*	3,28 ± 0,31 [#]

* - p < 0,05, відносно контролю;

- p < 0,05, відносно групи щурів з ОА.

Глутатіонпероксидаза каталізує реакції відновлення пероксиду водню до води та органічних гідропероксидів (ROOH) до гідроксипохідних, і в результаті переходить в окислену дисульфідну форму GS-SG. На відміну від

каталази, яка локалізована в пероксисомах, фермент функціонує в цитозолі та мітохондріях і має вищу спорідненість до перекису. Фермент відновлює різні органічні ліпідні пероксили, які утворюються в організмі при активації перекисного окиснення ліпідів, такі як гідропероксид лінолевої і ліноленової кислот, холестерин-7 β -гідропероксид і деякі синтетичні речовини (кумен-, трет-бутил-гідропероксиди), захищаючи від окисної атаки білки, ліпіди, НАДФН, НАДН. Відновлення ферменту відбувається за участі глутатіонредуктази та відновленого глутатіону [199]. В клініці у хворих на системні захворювання сполучної тканини з ураженням суглобів спостерігається знижений антиоксидантний статус з низькою активністю глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази еритроцитів при низькому рівні відновленої форми глутатіону на тлі підвищеного рівня оксиду азоту в плазмі крові [200].

За останні 30 років було доведено, що глутатіон S-трансферази використовують відновлений глутатіон не лише для знешкодження ксенобіотиків та екзогенних електрофільних сполук, а й регулюють сигнальні шляхи, які активуються кінцевим продуктом окиснення n-6-поліненасичених жирних кислот - 4-гідрокси-транс 2-ноненалем, вторинним месенджером, який впливає на активацію транскрипційних факторів/репресорів. Низькі рівні гідроксіноненала активують клітинну проліферацію, синтез білків та ДНК, високі рівні, які досягаються при розвитку перекисного окиснення ліпідів, запускають механізми апоптозу. Встановлено, що в клітинах ця сполука впливає на токсичність окисного стресу, її гідроксильна група взаємодіє з нуклеофільними групами білків, нуклеїнових кислот та фосфоліпідів. Було показано, що глутатіон S-трансферази використовують гідроксіноненал як субстрат, ферменти регулюють клітинні рівні гідроксіноненала, пригнічуючи його утворення в процесі перекисного окиснення ліпідів, а також знижують вміст за допомогою кон'югації з відновленим глутатіоном (GSH) та АТФ-залежного експорту кон'югатів [201,

202]. Відомо, що у людей в сироватці крові при остеоартрозі активність глутатіон S-трансферази знижується на фоні зростання рівнів АФК та активації ММП 3 [203].

Окиснений глутатіон (GSSH) відновлюється глутатіонредуктазою за участі NADPH. Помічено, що у людей з остеоартрозом активність цього ферменту знижена, відповідно, знижено вміст відновленого глутатіону (GSH) на фоні активації окисних процесів. Пригнічення відновлення глутатіону та розвиток окисного стресу призводить до зниження синтезу протеогліканів та гіалуронової кислоти – компонентів матриксу хряща [204].

За даними літератури [205], GSH рівні істотно не відрізняються у різних вікових груп; однак у старих хондроцитах спостерігається підвищений рівень GSSG. Таке збільшення кількості GSSG достатньо для зміни співвідношення GSSG до GSH, що може посилювати цитотоксичну дію окислювального стресу в клітинах. Вікові зміни в внутрішньоклітинному тіол-редокс-статусі хондроцитів може бути основним фактором, що сприяє збільшенню клітинної загибелі, що спостерігається при розвитку ОА при збільшенні рівнів АФК. Тому пошук та розробка збалансованої антиоксидантної терапії на основі як зниження ендogenous виробництва АФК та збільшення загальної антиоксидантної ємності людських клітин може виявитися корисною в профілактиці певних вікових захворювань, у тому числі ОА.

На сьогодні дослідженнями *in vivo* та *in vitro* показано, що хондроїтина сульфат здатен проникати у тканини суглобових хрящів та стимулювати синтез колагену II типу та протеогліканів: ауто синтез та синтез гіалуронової кислоти; може зв'язуватись з toll-подібним рецептором (TLR)-4 та інгібувати синтез прозапальних цитокінів MyD88 та TRAF-6 через пригнічення ядерної транслокації NF- κ B; знижувати експресію ADAMTS-4 та 5 (агреканаз), інтерлейкінів ІЛ-1b та ІЛ-6, активацію iNOS, матриксних металопротеїназ (ММП-1, -3 -9 та -13), мікросомальної синтази простагландинів (mPGES)-1, циклооксигенази 2 та синтез простагландину E2; знижувати швидкість

апоптозу хондроцитів через зниження транслокації NF-κB, пригнічення активності MAP-кіназного сигнального шляху через p38 та Erk1/2, інгібування експресії, вмісту та активностей каспаз 3 та 7 [206, 207].

Отже, при MIA-індукованому OA ХС здатен позитивно впливати на обидві ланки антиоксидантного захисту як в сироватці крові, так і в хрящовій тканині, що узгоджується з попередніми даними щодо зниження вмісту АФК, ПОЛ та ОМБ.

В процесах окиснення амінокислот окрему увагу варто приділити SH-групам цистеїну, бо вони не лише входять до складу активних центрів ферментів, підтримують структуру поліпептидів, а й є складовою глутатіону і саме за рахунок окиснення - відновлення тіольних груп глутатіон здатен відновлювати перекиси та знешкоджувати ендогенні токсини.

3.2.7. Віст загальних, білок-зв'язаних та небілкових SH-груп у сироватці крові та хрящовій тканині щурів

Багато ферментів, такі як АТФази або дегідрогенази, містять SH-групи, які легко окислюються в результаті вільнорадикальної атаки. Дисульфідні групи виконують важливі функції з підтримки нативної конформації білкової молекули, беруть участь у каталізі, зв'язуванні субстратів та кофакторів. SH-групи відрізняються виключно високою реакційною здатністю і різноманіттям хімічних реакцій. Вони вступають в реакції алкілювання, ацилювання, окислення, тіолдисульфідного обміну, реакції з сульфенілгалоїдами, утворення меркаптидів, напівмеркапталій, меркаптолів, комплексів з переносом заряду і ін. [208].

Одним з прикладів зміни функції білків при дії окисників на SH-групи є ксантиндегідрогеназа, яка перетворює ксантин (і гіпоксантин) в сечову кислоту, а сечова кислота виступає як неферментативний компонент антиоксидантної системи. В результаті дії активних форм кисню відбувається окислення SH-груп білка і перетворення ксантиндегідрогенази в

ксантиноксидазу. Остання, одночасно з сечовий кислотою, утворює супероксид-аніон. В результаті відбувається додаткове збільшення концентрації вільних радикалів в тканинах [209].

Встановлено, що при введенні моноацетату натрію вміст відновлених тіолів у сироватці крові щурів знижується: небілкових SH-груп - в 1,4 раза, білкових та загальних SH-груп - в 1,6 раза порівняно з контролем. Не показано достовірних змін окисно-відновного балансу тіолів у сироватці крові щурів. При введенні хондропротектора тваринам з експериментальним остеоартрозом рівень білкових та загальних SH-груп зростає у 1,3 раза, небілкових – в 1,2 раза порівняно з тваринами, яким вводили лише моноацетат натрію (табл. 3.13).

Таблиця 3.13

Вміст сульфгідрильних (SH-) груп у сироватці крові щурів при експериментальному остеоартрозі, мкмоль \times мг білка⁻¹ (M \pm m, n = 7)

Групи тварин Показник	небілкові SH-групи	білкові SH-групи	загальні SH-групи
Контроль	0,23 \pm 0,02	3,38 \pm 0,31	3,61 \pm 0,31
Хондроїтина сульфат	0,21 \pm 0,02	3,30 \pm 0,34	3,51 \pm 0,34
Остеоартроз	0,16 \pm 0,01*	2,12 \pm 0,22*	2,28 \pm 0,21*
Остеоартроз + хондроїтина сульфат	0,19 \pm 0,01 [#]	2,67 \pm 0,21 [#]	2,86 \pm 0,23 [#]

* - $p < 0,05$, відносно контролю;

[#] - $p < 0,05$, відносно групи щурів з ОА.

Встановлено, що при введенні моноацетату натрію вміст відновлених тіолів у хрящовій тканині щурів знижується: небілкових SH-груп - в 2,4 раза, білкових - в 1,2 раза та загальних SH-груп - в 1,7 раза

порівняно з контролем. Не показано достовірних змін окисно-відновного балансу тіолів у хрящовій тканині щурів. При введенні хондропротектора тваринам з експериментальним остеоартрозом рівень білкових SH-груп зростає у 2,2 раза, рівень загальних SH-груп зростає у 1,5 раза, небілкових – в 1,1 раза порівняно з тваринами, яким вводили лише моноіодацетат натрію (табл. 3.14).

Таблиця 3.14

Вміст сульфгідрильних (SH-) груп у хрящовій тканині щурів при експериментальному остеоартрозі, мкмоль × мг білка⁻¹ (M ± m, n = 7)

Групи тварин / Показник	небілкові SH-групи	білкові SH-групи	загальні SH-групи
Контроль	5,86±0,61	5,45±0,52	11,31±1,11
Хондрітина сульфат	6,13±0,64	5,11±0,52	11,24±1,12
Остеоартроз	2,46±0,22*	4,39±0,43*	6,85±0,74*
Остеоартроз + хондрітина сульфат	5,34±0,53 [#]	4,87±0,51 [#]	10,21±1,03 [#]

* - $p < 0,05$, відносно контролю;

[#] - $p < 0,05$, відносно групи щурів з ОА.

Хондрітина сульфат – це основний компонент протеогліканів, що є компонентом хрящового матриксу. Він являє собою сульфатований глікозаміноглікан, який складається з довгих нерозгалужених ланцюгів з повторюваними залишками N-ацетилгалактозаміна і глюкуронової кислоти. Більшість N-ацетилгалактозамінових залишків сульфатованих в 4-м і 6-м положеннях. Молекули хондрітина сульфату беруть участь в процесах транспорту води, амінокислот і ліпідів в аваскулярних ділянках хряща [210].

В дослідженнях на моделях хронічного остеоартриту тварин було

помічено, що хондроїтина сульфат зменшував експресію генів і синтез циклооксигенази-2, ліганд 2 хемокінів в синовіальній мембрані. Відзначалося зниження інфільтрації імунними клітинами синовіальної мембрани і ступеня її проліферації [211]. Відомо, що прозапальний цитокін ІЛ-1 β разом з ФНП – α стимулює синтез ІЛ-8 та -6, матриксних металопротеїназ 1, 8 та 13, що руйнують хрящовий колаген 2 типу, цитокіни активують циклооксигеназу 2 синовіоцитів та хондроцитів, яка генерує медіатори запалення простагландини, що посилює запальні процеси. У деяких дослідженнях *in vivo* було виявлено, що хондроїтина сульфат може знижувати концентрацію в тканинах суглоба ІЛ-1 β [212] та інших прозапальних медіаторів (ІЛ-6, синтаза нітриту азоту, простагландин Е2), а також інгібувати індуковану експресію матриксних металопротеїназ 3, 9 та 13 в хондроцитах [213, 214].

Хондропротектори захищають клітини інгібуючи процеси окиснення білків, ліпідів та синтез вільних радикалів. Деякі дослідження вказують на пригнічення процесів апоптозу хондроцитів [215, 216]. Хондроїтина сульфат пригнічує активацію та ядерну транслокацію фактору NF κ B в хондроцитах та синовіоцитах. NF κ B, зв'язуючись з промотором відповідного гену, активує транскрипцію прозапальних цитокінів, синтази оксиду азоту, циклооксигенази 2, фосфоліпази А2, матриксних металопротеїназ, що поглиблює деструктивні процеси деформованих при остеоартрозі суглобів. Хондроїтина сульфат пригнічує експресію RANKL та активує синтез остеопротегрину, що регулює процеси ремоделювання субхондральної кістки [217].

Висновки

Отже, при моноіодацетат - індукованому остеоартрозі в хрящовій тканині шурів розвивається окисний стрес, що характеризується зростанням вмісту супероксидного радикалу, пероксиду гідрогену, продуктів ПОЛ (дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів, шиффових основ) та ОМБ

(альдо- та кетопохідних нейтрального та основного характеру) на фоні підвищення ксантинооксидазної активності, зростають активності супероксиддисмутази та каталази, знижується вміст відновлених SH-груп, спостерігається виснаження глутатіонової системи, в сироватці крові також спостерігається інтенсифікація утворення продуктів ПОЛ та ОМБ, але дещо по-іншому змінюються активності ферментів антирадикального захисту - знижується активність супероксиддисмутази, в той час як активність каталази зростає, знижується вміст відновлених SH-груп, падає активність глутатіонової системи. При застосуванні препарату на основі ХС біохімічні прояви окисного стресу стають менш вираженими, активності захисних систем відновлюються, що вказує на позитивний вплив препарату на окисно-відновний гомеостаз при МІА-індукованому ОА щурів.

Процеси деградації, що запускаються при ОА направлені не лише на клітини хряща, а й на основну речовину хрящового матриксу, яка представлена в основному молекулами колагену II типу та протеогліканами. Порушення синтезу компонентів матриксу може пояснити патології, що були виявлені при морфологічному та гістологічному аналізі гіалінових поверхонь суглобів. Зниження експресії мРНК колагену II та агрекану на фоні активації експресії мРНК генів, залучених до змін у проліферації, розвитку запалення та окисного стресу може підтримувати хронічну фазу захворювання та посилювати деградацію хрящової тканини. Передбачалося, що препарат «Драстоп» як хондропротектор і стимулятор репарації здатен відновлювати структуру хряща через посилення анаболічних процесів. Тому останнім етапом було визначення показників будови хрящової тканини у щурів за умов експериментального остеоартрозу та при дії хондропротектора.

Результати досліджень, поданих у даному підрозділі, опубліковані у працях [251, 253, 255 - 261].

3.3. Показники структурної будови хрящової тканини у щурів за умов експериментального остеоартрозу та при дії хондропротектора

3.3.1. Рівень експресії мРНК гену *Col2a1* (колаген тип II альфа 1)

Матрикс хрящової тканини складається, головним чином, з фібрил колагену II типу, що перетинаються з колагеном IX типу, великих сульфатованих (в основному агрекан) і дрібних протеогліканів, гіалуронової кислоти, катіонів і води. Колаген II типу становить до 90% сухої маси здорового хряща. Пошкоджені хондроцити при ОА виробляють протеоглікани, нездатні до агрегації, і замість колагену II типу продукують колаген I, IX і X типів, що не утворюють фібрил [218].

Інтенсивність катаболічного процесу посилюється надлишковою продукцією хондроцитами, клітинами синовіальної оболонки і субхондральної кістки прозапальних цитокінів - інтерлейкіну-1 і фактора некрозу пухлин α . Надмірне руйнування колагену II типу при ОА пов'язане з регуляторним впливом колагеназ, зокрема матриксної металопротеїнази [219]. У хворих ОА були виявлені нульові алелі гену *Col2A1*. У кількох дослідженнях була виявлена асоціація гаплотипів генів *Col2A1* і олігомерного матриксного білка COMP з ОА колінних суглобів [220].

Колаген типу II є спіральною молекулою, на обох кінцях якої знаходиться пропептид. Аміно- та карбоксильні термінальні кінці відщеплюються після секреції молекули в позаклітинний простір, де згодом утворюються щільно організовані фібрили. Основа молекули колагену типу II - колагенова потрійна спіраль, гомотример з трьох ланцюгів колагену α '1 (II) [221]. Спіраль кожного α -ланцюга складається з 1014 амінокислот, де гліцин займає кожен третю позицію, це критично важливо для складання і стійкості спіралі. Таким чином, спіраль складається з повторюваних мотивів Gly-X-Y, де зазвичай є «X» та «Y» – це пролін та гідроксипролін. Тип II колагену – це основний компонент позаклітинного матриксу хряща, є

необхідним для ендохондрального утворення кісткової тканини. Він також знаходиться в склоподібному тілі і внутрішньому вусі [222].

Відомо, що миші з нестачею гену *Col2A1* мають порушену структуру матриксу хрящів і в неонатальному періоді страждають від дихальної недостатності. Такі мутантні миші позбавлені зон росту в довгих кістках, а їх скелет погано мінералізований. За фенотипом вони мають розщеплення піднебіння, вкорочені або ненормально довгі кістки, ребра та тіла хребців [223].

У результаті експериментальних досліджень було показано, що рівень експресії мРНК гена *Col2a1* в групі тварин з патологією був нижчим в 4,1 раза ($p \leq 0,001$) в порівнянні з контрольними тваринами (рис. 3.13). Рівні експресії цього гена в першій та другій групі щурів достовірно не відрізнялися. У той же час, при одночасному введенні з МІА перпарату «Драстоп» рівень відповідної мРНК був в 3,3 ($p \leq 0,001$) раза вищим, ніж у тварин групи ОА, однак лишався в 1,3 раза зниженим порівняно з контрольними тваринами ($p \leq 0,05$).

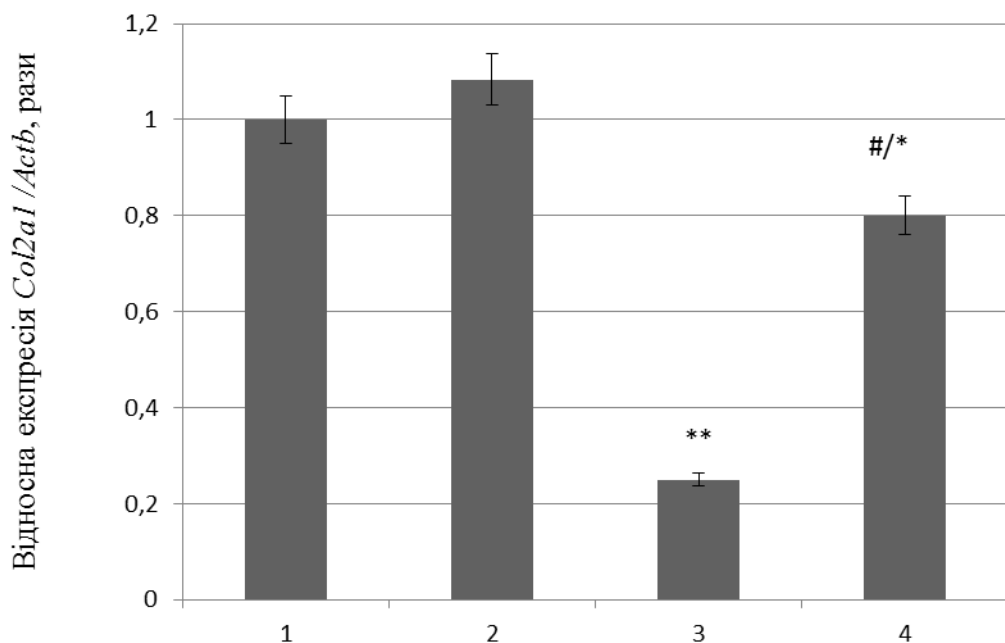


Рис. 3.13. Рівень експресії мРНК гена *Col2a1* у хрящовій тканині щурів ($M \pm m$, $n = 7$): 1 – контроль; 2 – хондроїтина сульфат; 3 – остеоартроз; 4 –

остеоартроз + хондроїтина сульфат;

** – $p \leq 0,001$, * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # - $p \leq 0,001$ відносно групи щурів з ОА.

Відомо, що у людей мутації в гені проколагена II *Col2a1* призводять до розвитку ОА та дисплазій суглобів. При цьому ушкоджуються тканини гіалуронових хрящів епіфізів кісток та міжхребцеві диски, хоча у різних людей зовнішні прояви можуть відрізнятися [224]. На сьогодні описано біля 100 різних видів мутацій в гені *Col2A1* людини. Хоча наслідки гетерозиготних мутацій (місенс, нонсенс, делеції, зсув рамки зчитування), що спричиняють розвиток фенотипу за аутосомно-домінантним наслідуванням, достатньо відомі, проте вивчення точних кореляцій між генотипом і фенотипом при колагенопатіях II типу ускладнюється широким спектром фенотипових варіацій і вікових особливостей. Тому на сьогодні не можливо точно передбачити фенотип більшості мутацій. Деякі мутації можуть проявлятися неоднорідними фенотипами. Більшість мутацій призводить до зміни структури потрійної спіралі через заміну гліцину на інші амінокислотні залишки.

Деякі місенс мутації гену *COL2A1* (G204A) людини викликають передчасну дегенерацію суглобів за відсутності традиційної клінічної картини, що вказувала б на розлад синтезу колагену II типу. У таких пацієнтів спостерігається розвиток ОА у перших двох декадах життя. А в третій і четвертій декадах вони потребували протезування. При чому ані запалення, ані порушення в рості не спостерігалось [225].

Отже, при МІА-індукованому ОА пригнічується експресія мРНК основного компоненту хряща – колагену II типу, що узгоджується з гістологічними аналізами, на яких помічено деградацію міжклітинної речовини та втрату волокнами впорядкованого розташування. ХС як

коректор метаболізму здатен відновлювати рівень експресії мРНК колагену II типу в хрящах та покращувати стан суглобів при ОА.

Окрім структурного компоненту - колагену II в підтримці нормального функціонування хряща важливу роль грають протеоглікани, що утримують воду та виконують низку важливих функцій. Основним протеогліканом суглобових хрящів є агрекан, тому визначення експресії його мРНК є важливим етапом комплексного дослідження розвитку ОА.

3.3.2. Рівень експресії мРНК гену *Acan* (агрекану)

Агрекан відомий як хрящової специфічний протеоглікановий ядерний білок або протеоглікановий хондроїтина сульфат 1, і наявний тільки у хребетних, основний протеоглікан суглобових хрящів. У людини кодується геном *Acan* [226]. Він протидіє механічним навантаженням і підтримує осмотичний тиск, необхідний для нормального функціонування хряща. Агрекан, як структурний протеоглікан, відіграє важливу роль у взаємодіях «клітина - клітина» і «клітина - матрикс» завдяки здатності зв'язуватися з гіалуроновою кислотою і колагеном [227].

У результаті подальших експериментальних досліджень було показано, що рівень експресії гену *Acan* в групі тварин з МІА-індукованим ОА був нижчим в 2 рази ($p \leq 0,001$) в порівнянні з контрольними тваринами (рис. 3.14). Рівні експресії цього гену в першій та другій групі щурів достовірно не відрізнялися.

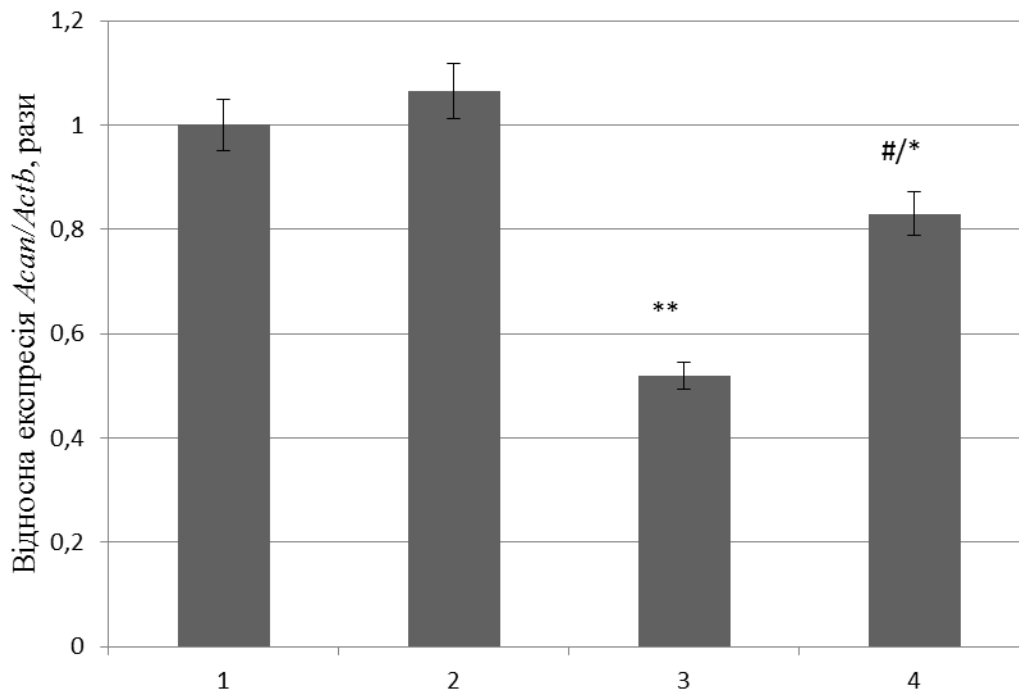


Рис. 3.14. Рівень експресії мРНК гена *Acan* у хрящовій тканині щурів ($M \pm m$, $n = 7$): 1 – контроль; 2 – хондроїтина сульфат; 3 – остеоартроз; 4 – остеоартроз + хондроїтина сульфат;

** – $p \leq 0,001$, * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; # - $p \leq 0,001$ відносно групи щурів з ОА.

У той же час, при введенні препарату «Драстоп» рівень відповідної мРНК був в 1,6 ($p \leq 0,001$) раза вищим, ніж у тварин групи ОА. Однак лишався в 1,2 раза зниженим порівняно з контрольними тваринами ($p \leq 0,05$).

Агрекан продукується хондроцитами, і його продукція регулюється цитокінами і гормонами росту, такими, як ІЛ 1, ФНП, IGF1 або TGF [228]. У позаклітинному матриксі з однією молекулою гіалуронової кислоти може зв'язуватися до 200 молекул агрекана з утворенням агрегатів. Дисбаланс синтезу і деградації компонентів матриксу є частим порушенням при остеоартрозі [229]. Втрата агрекану і інших компонентів матриксу хряща веде до деструкції тканини, викликаючи повне пошкодження суглобової поверхні. Дослідження показали, що агрекан і його фрагменти надходять в

синовіальну рідину і кровотік в процесі деградації і можуть служити маркерами метаболічних змін при захворюваннях суглобів [230].

Часто для вивчення хрящового метаболізму використовуються культури клітин. Вимірювання агрекану та інших компонентів матриксу в супернатантах клітинних культур і гомогенатах хрящів може допомогти проаналізувати вплив цитокінів, факторів росту, лікарських препаратів і потенційних хондропротекторів на гомеостаз хряща [231].

Висновки

Таким чином, при моноацетат-індукованому остеоартрозі порушується молекулярна будова хрящового матриксу, зокрема, знижується рівень колагенових фібрил, утворених колагеном II типу, та рівень протеогліканів, 90% яких формується у агрекан [228]. Відповідно це може призвести до порушення властивостей хрящової тканини, зокрема, її механічної стійкості та проникності. Введення щурам з експериментальним остеоартрозом хондропротектора на основі хондроїтина сульфату сприяє ремодуляції хряща, про що свідчить відновлення рівня експресії мРНК генів *Col2a1* та *Acan*, які кодують продукти колагену II типу та агрекану. Отримані дані свідчать про ефективність застосування досліджуваного хондропротектора на основі хондроїтина сульфату при моноацетат-індукованому остеоартрозі.

Результати досліджень, поданих у даному підрозділі, опубліковані у працях [262].

РОЗДІЛ 4

УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, за останні десятиліття змінилася структура захворюваності населення. Відбулося істотне зрушення в бік хронічної патології, в тому числі збільшилася частота дегенеративно-дистрофічних захворювань. У розвинених країнах світу відбувається неухильне старіння населення і остеоартроз стає одним з найпоширеніших захворювань. Соціальна значущість даної хвороби визначається ростом пов'язаної з ним непрацездатності та інвалідності, особливо в старших вікових групах, а також різким зниженням якості життя при цьому захворюванні. Розвиток патології суглобів пов'язаний з цілим рядом факторів: інфекційні захворювання, механічні травми, надлишкова вага, хвороби хребта, аутоімунні процеси, порушення обміну речовин, малорухливий спосіб життя, спадкова схильність, неправильне харчування, хронічний стрес тощо [231]. Все частіше в публікаціях з'являються повідомлення про генетичну етіологію ОА, що зумовлена мутаціями гена проколагену II типу (основного колагену гіалінового хряща) [232].

Остеоартроз – це захворювання суглобів, що виникає в результаті повільної дегенерації та поступового руйнування суглобового хряща. Згодом епіфізи кісток перебудовуються, а навколосуглобові тканини запалюються і дегенерують. В термін ОА входить ціла група захворювань суглобів, що носять дегенеративно-запальний характер, відрізняються різним походженням, але з близькими механізмами розвитку [233]. В кінцевому рахунку відбувається дегенерація суглобового хряща з його розволокніння, утворенням тріщин, ульцерацією і повною його втратою, розвивається остеосклероз з різким потовщенням і ущільненням кортикального шару субхондральної кістки, остеофітоз, формування субхондральних кіст. В найбільш важких випадках, на II і III стадії гонартроза, використовують

інвазивні методи лікування - від коригуючої остеотомії до ендопротезування [234].

Серед інвалідів з хворобами кістково-м'язової системи ревматоїдний артрит і деформуючий артроз складають 13,2%. В середньому з кожних 100 хворих, які страждають захворюваннями кістково-м'язової системи, один стає інвалідом. Значне зниження якості життя інвалідів обумовлено больовим синдромом, обмеженням свободи пересування і втратою функціональної активності, а часом і здатності самообслуговування [235].

На ранніх стадіях захворювання використовують консервативну терапію, а саме, призначають НПЗП, наприклад, диклофенак, для пригнічення розвитку запалення, але дані препарати негативно впливають на травну та серцево-судинну системи, призводячи до серйозних супутніх захворювань [236]. На сьогодні як альтернативу НПЗП розглядають прийом хондропротекторів на основі хондроїтина сульфату, гіалуронової кислоти чи їх поєднання. Хондроїтина сульфат представлений високомолекулярним мукополісахаридом, що сприяє уповільненню резорбції кісткової тканини і зниження втрати Ca_2^+ . Завдяки йому відбувається поліпшення фосфорно-кальцієвого обміну в хрящовій тканині і прискорення процесів її відновлення, а також гальмування процесів дегенерації як хрящової, так і сполучної тканини. За допомогою хондроїтина сульфату активність ферментів, що вражають хрящову тканину, пригнічується, зменшується біль в уражених суглобах разом зі збільшенням їх рухливості. Крім цього суглобова сумка і хрящові поверхні суглобів регенеруються, а продукування внутрішньосуглобової рідини стає інтенсивніше [237].

Як важлива частина структурних протеогліканів, таких як агрекан і нейрокан, ХС є основним компонентом хряща і грає важливу роль у збереженні структурної цілісності тканини. Як результат, ХС широко використовується завдяки його потенційним медичним та нутрицевтичним властивостям [238].

В даній роботі було зосереджено увагу на з'ясуванні механізму корегуючої дії хондропротектора (на прикладі препарату «Драстоп» на основі хондроїтина сульфату) щодо відновлення хрящової тканини колінного суглобу щурів при моноіодацетат-індукованому остеоартрозі. Для дослідження використовували широко поширену тваринну модель ОА, засновану на внутрішньосуглобовому введенні щурам моноіодацетату натрію – інгібітора клітинного дихання, а саме, гліколізу та циклу Кребса [100]. Для підтвердження розвитку захворювання було проведено гістологічний аналіз колінних суглобів щурів з експериментальним остеоартрозом. Було оцінено ступінь запалення у щурів при моноіодацетат-індукованому остеоартрозі. Також було визначено інтенсивність вільнорадикальних процесів у хрящовій тканині щурів за умов остеоартрозу. На фоні розвитку окисного стресу було оцінено стан антиоксидантної системи у хрящовій тканині щурів при експериментальному остеоартрозі. Додатково методом ЗТ-ПЛР було досліджено рівень експресії генів, які відповідають за будову та є маркерами деградації хрящової тканини за умов остеоартрозу через оцінку концентрації їх мРНК в гомогенаті хрящів щурів.

Першим етапом нашого дослідження було оцінити ступень запалення у щурів за умов моноіодацетат-індукованого остеоартрозу та при дії хондропротектора.

На 30 добу після початку експерименту було здійснено забір хрящів щурів і проведено їхній аналіз для підтвердження розвитку ОА. Морфологічний та гістологічний аналіз хрящів щурів виявив, що хрящова тканина при МІА-індукованому ОА піддавалась деградації. При огляді стану колінного суглоба щурів було виявлено почервоніння, гіперемію суглоба, патологічне розширення судин, симптоми запалення і набряклість м'яких оточуючих тканин. Після розтину суглобової сумки на поверхні епіфіза стегнової кістки були виявлені деформація хряща, борозни, тріщини, гіперемії, ерозії, спостерігалася наявність фібрильованих ділянок (початкові

дегенеративні зміни при остеоартрозі, які діагностуються як розм'якшення суглобового хряща і розвитку вертикальних ущелин між групами його клітин), проте хрящ все ще повністю покривав епіфіз кістки, субхондральні ділянки не були оголеними, остеофітів не спостерігалось.

Спостерігався розвиток гіперпластичних, запальних та деструктивно-дистрофічних змін, що відповідає загальним уявленням про патоморфологічні особливості розвитку артрозу. При цьому в синовіальній оболонці спостерігалось утворення розширених судин з великою кількістю лейкоцитів в просвіті, в тканинах знайдено велику кількість новоутворених фібробластів. Зональна структура хрящової тканини при патології зникла, міжклітинна речовина піддавалася деградації, волокна матриксу втрачали впорядковане розташування. У суглобі були поширені скупчення запального інфільтрату. У кістковій тканині відклалися солі кальцію та спостерігалися ділянки резорбції кістки остеокластами, кісткові трабекули руйнувалися. Синовіальна тканина була гіперплазована з незначними фіброзними змінами. Дані патологічні зміни підтвердили розвиток експериментального ОА у щурів.

Введення препарату щурам з ОА протягом 25 днів покращило стан хрящів тварин. Гіперемія і дегенеративні зміни суглобів значно зменшилися, спав набряк м'яких тканин, колір тканин та розмір судин відповідав нормі, поверхня хряща стала менш фібрильована, виразки, глибокі борозни і щілини в хрящовій тканині не були виявлені. Поверхні суглобів були гладкими, відновлювалася зональність хондроцитів та структура матриксу, зникав запальний інфільтрат, стан синовіальної тканини відповідав нормі. Це свідчить про ефективність застосування препарату «Драстоп» при МІА-індукованому ОА щурів.

В умовах розвитку дегенеративних змін хряща спостерігаються зміни рівня цитокінів в крові [105]. Було досліджено концентрацію прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-12В р40, ФНП- α) та протизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-

10) в умовах розвитку ОА колінного суглоба на тлі застосування препарату на основі хондроїтина сульфату. Було помічено зростання рівня прозапальних цитокінів, що свідчить про активацію запалення. Зростання протизапального цитокіну ІЛ-10 свідчить про компенсаторну активацію антизапальної системи при ОА колінного суглоба щурів. Введення препарату призвело до зниження рівнів про- та протизапальних цитокінів. Результати свідчать про активацію протизапальної системи в умовах розвитку артрозу колінного суглоба щурів, при цьому показовим було зростання рівня ІЛ-10. Хондропротектор «Драстоп» зменшував активацію протизапальної системи, що корелювало зі зменшенням виділення прозапальних цитокінів та відновленням нормальної структури суглоба.

Відомо, що при ОА прозапальні цитокіни, діючи на синовіоцити та хондроцити, активують один з основних ферментів запалення – циклооксигеназу 2, що синтезує простагландин E_2 [239]. Було помічено зростання медіатора запалення простагландину E_2 при ОА. Введення препарату зменшувало його рівень, що свідчить про пригнічення активності циклооксигенази 2 та запалення. Це свідчить про ефективність використання препарату «Драстоп» при ОА щурів та в перспективі дає можливість замінювати та доповнювати консервативну терапію НПЗП за умов розвитку побічних ефектів, бо основною мішенню НПЗП є саме ЦОГ2.

Сьогодні одним з критеріїв дослідження хронізації патологічних процесів в організмі є визначення вмісту молекул малої та середньої маси в сироватці крові, підвищення рівня яких вказує на розвиток ендогенної інтоксикації через посилення катаболічних процесів [126-128]. Помічене нами зростання рівня ММСМ свідчить про розвиток хронічного захворювання з поширенням ендогенної інтоксикації. Після курсу введення препарату «Драстоп» даний показник знижувався.

Додатково для дослідження процесів розвитку запалення було оцінено рівень експресії мРНК генів *Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1* безпосередньо у хрящовій

тканині суглобу. Ці гени кодують прозапальні ферменти ЦОГ2, iNOS та фактор росту *Tgfb1*, які при гіперактивації в хондроцитах та синовіоцитах сприяють розвитку та прогресуванню ОА [240]. iNOS є індукцибельним ферментом та синтезує оксид азоту, що при патології стимулює розвиток окисного стресу в клітинах, а фактор росту *Tgfb1* при посиленій експресії та активації призводить до синтезу прозапальних цитокінів та виникнення гіпертрофованих хондроцитів, наявність яких корелює з розвитком ОА як у людей, так і у тварин [241, 242]. Методом ЗТ-ПІР було встановлено посилення експресії зазначених генів в хрящах щурів при МІА-індукованому ОА, що корелює з попередніми даними про активацію запалення та гістологічним пошкодженням тканин хряща. Введення препарату знижувало рівні мРНК генів *Ptgs2*, *Nos2* та *Tgfb1*, що свідчить про ефективність застосування препарату при розвитку ОА у тварин.

Отже, при розвитку ОА в хрящах щурів спостерігаються ознаки запалення та деградації з помірною лейкоцитарною інфільтрацією та утворенням ерозій та виразок на поверхні хряща. В сироватці крові зростають рівні прозапальних та протизапальних цитокінів, що свідчить про активізацію імунної відповіді на запалення, яке характеризується збільшенням рівня простагландину E2, що вказує на зміну гомеостазу хондроцитів, зростання рівня молекул малої та середньої маси свідчить про розвиток ендогенної інтоксикації, а підвищення рівня експресії *Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1* у хрящовій тканині щурів свідчить про посилення процесів деградації хряща. Введення препарату на основі ХС сприяло зниженню проявів запалення та деградації хрящової тканини щурів з ОА.

Наступним етапом нашого дослідження було встановити інтенсивність вільнорадикальних процесів у хрящовій тканині щурів при експериментальному остеоартрозі та при дії хондропротектора.

Було встановлено зростання вмісту супероксид-аніону та перекису водню, а також активності ксантиноксидази в хрящовій тканині щурів.

Відомо, що ксантиноксидаза синтезує ксантин і сечову кислоту в дві стадії, на кожній стадії одним з продуктів є супероксид, що спонтанно дисмутує у перекис водню [161]. Зростання активності ксантиноксидази корелює зі зростанням вмісту АФК та ММСМ, представниками яких є ксантин і сечова кислота [129]. Застосування препарату «Драстоп» знижувало вміст АФК та активність ксантиноксидази.

Відомо, що АФК, реагуючи з фосфоліпідами мембран, викликають їх окиснення, що негативно впливає на життєдіяльність клітини [166-169]. Було помічено розвиток окисного стресу в хрящовій тканині щурів, що характеризувався зростанням рівнів первинних, вторинних та кінцевих продуктів ПОЛ при МІА – індукованому ОА. Застосування хондроїтина сульфату знижувала прояви окисного стресу, що свідчить про доцільність використання хондропротекторів на ранніх стадіях розвитку захворювання.

АФК, реагуючи з білками, викликають їх окиснення та модифікацію, що призводить до втрати білками їх функцій [175-178]. Було досліджено рівень окисної модифікації білків в сироватці крові і в хрящовій тканині щурів. В ході проведеного експерименту було встановлено, що у групі щурів з МІА – індукованим остеоартрозом в сироватці крові та хрящовій тканині зростає вміст альдегідних та кетонних продуктів нейтрального та основного характеру, що корелює з попередніми етапами дослідження рівня АФК, ПОЛ та активності ксантиноксидази. Після введення хондропротектору дані показники знижувались.

На фоні розвитку окисного стресу та активації ПОЛ та ОМБ було досліджено активності ферментів антирадикального захисту. Так, супероксиддисмутаза перетворює супероксид аніон на перекис водню, який далі розкладає каталаза [186]. Було встановлено, що в сироватці щурів з ОА знижується активність СОД і зростає активність каталази, в той час як в хрящовій тканині активності обох ферментів зростали у відповідь на

посилення генерації АФК. Введення препарату наблизило активності антиоксидантних ферментів до нормальних значень.

Додатково було досліджено активність роботи глутатіонової системи сироватки крові та хряща. Було виявлено пригнічення активностей глутатіонредуктази – ферменту, що відновлює окислений глутатіон, глутатіонпероксидази, яка разом з каталазою розкладає пероксид водню та додатково інші пероксиди та глутатіонтрансферази, яка залучена у знешкодження ксенобіотиків. Також змінювалося співвідношення окисленого і відновленого глутатіону в бік окислення. Такі зміни спостерігалися як в сироватці, так і в тканині хрящів, що свідчить про виснаження захисної антиоксидантної системи глутатіону. «Драстоп» підвищував активності ферментів та відновлював співвідношення окисленого і відновленого глутатіону.

На фоні виснаження глутатіонової системи та посилення генерації АФК було встановлено зниження білкових, небілкових та загальних SH-груп в сироватці крові та хрящах при ОА, що корелює з результатами дослідження активності ксантиноксидази та рівня АФК і ОМБ, бо саме окиснення SH-груп ксантиндегідрогенази перетворює фермент на його прооксидантну форму ксантиноксидазу [208]. Введення препарату «Драстоп» підвищувало рівень SH-груп в сироватці крові та хрящах щурів з МІА-індукованим ОА.

Отже, при моноіодацетат – індукованому остеоартрозі в хрящовій тканині щурів розвивається окисний стрес, що характеризується зростанням вмісту супероксидного радикалу, пероксиду водню, продуктів ПОЛ (дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів, шиффових основ) та ОМБ (альдо- та кетопохідних нейтрального та основного характеру) на фоні підвищення ксантиноксидазної активності, зростають активності супероксиддисмутази та каталази, знижується вміст відновлених SH-груп, зменшується активність ферментів глутатіонової ланки АО системи, в сироватці крові також спостерігається розвиток ПОЛ та ОМБ, але дещо по-

іншому змінюються активності ферментів антирадикального захисту - знижується активність супероксиддисмутази, в той час як активність каталази зростає, знижується вміст відновлених SH-груп, падає активність глутатіонової системи. При застосуванні препарату на основі ХС біохімічні прояви окисного стресу стають менш вираженими, активності захисних систем відновлюються, що вказує на позитивний вплив препарату на окисно-відновний гомеостаз при МІА-індукованому ОА щурів.

Останнім етапом дослідження було визначити показники структурної будови хрящової тканини у щурів за умов експериментального остеоартрозу та при дії хондропротектора.

Так методом ЗТ-ПЛР було встановлено вміст мРНК генів основних компонентів хрящового матриксу – колагена II типу та аггрекану. Відомо, що мутації колагену II типу чи аггрекану здатні призводити до серйозних порушень розвитку суглобів, а при ОА людей експресії зазначених білків знижується [243].

Було встановлено зниження експресії генів *Coll2a1* та *Acan* в хрящах щурів з ОА, що свідчить про дегенерацію матриксу хряща та узгоджується з морфологічними аналізами, що показали ураження та деструкцію хрящової поверхні та гістологічними дослідженнями, за результатами яких матрикс хряща піддавався дегенеративно - дистрофічним змінам. Введення препарату «Драстоп» відновлювало рівень мРНК генів *Coll2a1* та *Acan*, який виявився вищим, ніж при патології, хоча не досягав нормальних значень. Дослідження вказує на доцільність застосування хондроїтина сульфату при терапії ОА.

Таким чином, при моноіодацетат-індукованому остеоартрозі порушується молекулярна будова хрящового матриксу, зокрема, знижується рівень колагенових фібрил, утворених колагеном II типу, та рівень протеогліканів, 90% яких формується у аггрекан. Відповідно це може призвести до порушення властивостей хрящової тканини, зокрема, її механічної стійкості та проникності. Введення щурам з експериментальним

остеоартрозом хондропротектора на основі хондроїтина сульфату сприяє ремодуляції хряща, про що свідчить відновлення рівня експресії мРНК генів *Col2a1* та *Acan*, які кодують продукти колагену II типу та агрекану. Отримані дані свідчать про ефективність застосування досліджуваного хондропротектора на основі хондроїтина сульфату при моноіодацетат-індукованому остеоартрозі.

Таким чином, отримані в ході роботи результати показують, що при МІА-індукованому ОА щурів суглобові хрящі піддаються дегенеративним змінам, розвивається системне запалення з ендогенною інтоксикацією. Було встановлено, що безпосередньо в хрящовій тканині щурів розвивається окисний стрес, що стимулює перекисне окиснення ліпідів, окисну модифікацію білків. В хрящовій тканині було виявлено зміну експресії генів прооксидативних ферментів та пригнічення експресія генів основних компонентів хрящового матриксу – колагену II та агрекану. Показано виснаження глутатіонової системи та зміну активності антиоксидантних ферментів супероксиддисмутази та каталази в сироватці крові та хрящах. При застосуванні хондропротектору на основі хондроїтина сульфату встановлено покращення стану хрящів, показано пригнічення розвитку запальних процесів та ендогенної інтоксикації. Було виявлено відновлення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу хрящів та сироватки крові щурів з ОА. Препарат сприяв посиленню експресії генів колагену та агрекану на фоні пригнічення експресії генів прооксидантних ферментів ЦОГ2, iNOS та фактора росту Tfgb1.

Таким чином, згідно проведених власних досліджень та аналізу даних літератури розвиток остеоартрозу характеризується порушенням обміну речовин, розвитком запалення та активацією окисних процесів в синовіоцитах та хондроцитах. Вільні радикали безпосередньо та через цитокін – індуковане підвищення концентрації та активності матриксних металопротеїназ стимулюють хондро- та остеорезорбцію, викликають

фрагментацію гіалуронової кислоти та хондроїтина сульфату [244, 245]. Спостерігається зниження еластичності суглобового хряща через часткову чи повну втрату протеогліканів. Рівновага в суглобі зміщується в бік катаболічних процесів, тобто руйнування суглобного хряща. Згодом хрящ стоншується, стає сухим, шорстким, менш пружним. Суглобові поверхні кісток, позбавлені амортизатора – хряща, відшліфовуються і ущільнюються. Розвивається субхондральний остеосклероз. На периферії суглобових поверхонь, де живлення хряща порушується менше, відбуваються компенсаторне розростання хряща і подальша його кальцифікація. Так утворюються остеофіти (вирости на краях суглобових поверхонь, які посилюють больовий синдром при артрозі) [246]. У патологічний процес залучаються капсула суглоба, субхондральна кістка, м'язово-зв'язковий апарат. При цьому порушуються механізми активної і пасивної протекції, розвивається деформація суглобів, що в свою чергу погіршує дегенеративні процеси, що відбуваються в суглобовому хрящі і оточуючих його структурах. Хвороба набуває безперервно-прогресуючий характер [247, 248].

В зв'язку з вищевказаним, для лікування пацієнтів з остеоартрозом ефективним є застосування препаратів, які будуть сприяти відновленню структурно-функціонального стану хряща. Нашими дослідженнями ми показали, що використаний у наших експериментах хондропротекторний препарат «Драстоп» проявив протизапальні, антирадикальні та регенеруючі властивості, що сприяло відновленню хрящової тканини колінного суглобу у щурів при монойдацетат-індукованому остеоартрозі.

ВИСНОВКИ

Отримані результати дослідження доповнюють існуючі на сьогодні уявлення щодо біохімічних механізмів розвитку пошкодження хрящової тканини колінного суглобу щурів за умов моноіодацетат-індукованого остеоартрозу. Показано важливу роль окисного стресу у формуванні дегенеративно-дистрофічних змін у суглобі. Виявлено, що хондропротектор на основі хондроїтина сульфату проявляє антизапальну та антиоксидантну дію на організм щурів при моноіодацетат-індукованому остеоартрозі.

1. Виявлено ознаки запалення із помірною лейкоцитарною інфільтрацією колінних суглобів щурів та показано зростання рівня молекул низької та середньої молекулярної маси, концентрації медіаторів запалення (ІЛ-1 β , ФНП- α , простагландину E2) при одночасному зростанні рівня протизапального цитокіну ІЛ-10 у сироватці крові та збільшення рівня експресії генів, залучених до розвитку запалення (*Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*) у хрящовій тканині щурів при моноіодацетат-індукованому остеоартрозі.

2. Показано інтенсифікацію вільнорадикальних процесів, а саме зростання вмісту супероксидного радикалу, перекису водню, продуктів перекисного окиснення ліпідів (дієнових кон'югатів, ТБК-активних сполук, шиффових основ) та окисної модифікації білків на фоні підвищення ксантиноксидазної активності у хрящовій тканині та сироватці крові щурів за умов остеоартрозу.

3. Виявлено порушення антиоксидантної системи у хрящовій тканині та в сироватці крові щурів при експериментальному остеоартрозі, а саме, в хрящовій тканині виявлено зростання супероксиддисмутазної та каталазної активностей в 4 та в 4,7 раза на фоні виснаження глутатіон-залежної ланки антиоксидантного захисту; в сироватці крові спотерігалюся зниження супероксиддисмутазної активності в 1,6 раза та зростання каталазної активності в 1,6 раза на фоні пригнічення активності глутатіонової системи.

4. Показано зниження рівня експресії генів, що відповідають за будову хрящової тканини за умов остеоартрозу, а саме *Col2a1* – в 4,1 раза та *Acan* – в 2 рази порівняно з контролем.

5. Виявлено, що введення хондропротекторного препарату на основі хондроїтина сульфату призводить до зниження запалення, відновлення окисно-антиоксидантної рівноваги та регенерації хрящової тканини колінного суглобу щурів при моноіодацетат-індукованому остеоартрозі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Prodinge B, Stucki G, Coenen M and Tennant A. The measurement of functioning using the International Classification of Functioning, Disability and Health: comparing qualifier ratings with existing health status instruments. *Disability and rehabilitation*. 2017;1-8.
2. Deeny MC, Al Hamdan E, Ross EL, Edwards RR, Huang CC and Jamison RN. Chronic pain, comorbid medical conditions, and associated risk factors in Kuwait: gender and nationality differences. *Pain Medicine*. 2015;16(11):2204-2211.
3. Malempati C, Jacobs CA and Lattermann C. The Early Osteoarthritic Knee: Implications for Cartilage Repair. *Clinics in Sports Medicine*. 2017;36(3):587-596.
4. Nazarinasab M, Motamedfar A and Moqadam AE. Investigating mental health in patients with osteoarthritis and its relationship with some clinical and demographic factors. *Reumatologia*. 2017;55(4):183.
5. Aury-Landas J, Marcelli C, Leclercq S, Boumédiene K and Baugé C. Genetic determinism of primary early-onset osteoarthritis. *Trends in molecular medicine*, 2016;22(1):38-52.
6. Schmitt J, Lange T, Günther KP, Kopkow C, Rataj E, Apfelbacher C and Friederich N. Indication Criteria for Total Knee Arthroplasty in Patients with Osteoarthritis—A Multi-perspective Consensus Study. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*. 2017;155(05):539-548.
7. Pan Q, O'Connor MI, Coutts RD, Hyzy SL, Olivares-Navarrete R, Schwartz Z and Boyan BD. Characterization of osteoarthritic human knees indicates potential sex differences. *Biology of sex differences*. 2016;7(1):27.
8. Takahashi K, Hashimoto S, Kiuchi S, Watanabe A, Nakamura H, Ikuta F and Takai S. Bone morphological factors influencing cartilage degeneration in the knee. *Modern rheumatology*. 2017:1-7.

9. Felson, D. T. An update on the pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis. *Radiologic Clinics*. 2004;42(1):1-9.
10. Косинская НС. Дегенеративно-дистрофические поражения костно-суставного аппарата. *Медицина*. 1961:168.
11. Meireles S, Wesseling M, Smith CR, Thelen DG, Verschueren S and Jonkers I. Medial knee loading is altered in subjects with early osteoarthritis during gait but not during step-up-and-over task. *PloS one*. 2017;12(11):e0187583.
12. Goldring MB and Goldring SR. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1192(1):230-237.
13. Egloff C, Hügle T and Valderrabano V. Biomechanics and pathomechanisms of osteoarthritis. *Swiss Med Wkly*. 2012;142(0):14.
14. Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA and Van den Berg WB. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and cartilage*. 2006;14(1):13-29.
15. van Middelkoop M, Bennell KL, Callaghan M J, Collins NJ, Conaghan PG, Crossley KM and Meuffels DE. International patellofemoral osteoarthritis consortium: consensus statement on the diagnosis, burden, outcome measures, prognosis, risk factors and treatment. In *Seminars in arthritis and rheumatism*. WB Saunders. 2017, September.
16. de l'Escalopier N, Anract P and Biau D. Surgical treatments for osteoarthritis. *Annals of physical and rehabilitation medicine*, 2016;59(3): 227-233.
17. Huch K, Kuettner KE and Dieppe P. Osteoarthritis in ankle and knee joints. In *Seminars in arthritis and rheumatism*. 1997;26(4):667-674.
18. Goldring MB and Goldring SR. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010;1192(1):230-237.

19. Gao J, Fang J, Gong H and Gao B. Morphological and Microstructural Alterations of the Articular Cartilage and Bones during Treadmill Exercises with Different Additional Weight-Bearing Levels. *Journal of healthcare engineering*. 2017.
20. Sokolove J and Lepus CM. (). Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*. 2013;5(2):77-94.
21. Lopes EBP, Filiberti A, Husain SA and Humphrey MB. Immune Contributions to Osteoarthritis. *Current osteoporosis reports*. 2017;15(6):593-600.
22. Bhutia SC, Singh TA and Sherpa ML. Production of a polyclonal antibody against osteogenic protein-1, and its role in the diagnosis of osteoarthritis. *Singapore medical journal*. 2014;55(7):388.
23. Livshits G, & Kalinkovich A. Hierarchical, imbalanced pro-inflammatory cytokine networks govern the pathogenesis of chronic arthropathies. *Osteoarthritis and cartilage*. 2017.
24. Charlier E, Relic B, Deroyer C, Malaise O, Neuville S, Collée J and De Seny D. Insights on Molecular Mechanisms of Chondrocytes Death in Osteoarthritis. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(12):2146.
25. Daheshia M and Yao JQ. The interleukin 1 β pathway in the pathogenesis of osteoarthritis. *The Journal of rheumatology*. 2008;35(12):2306-2312.
26. Yeh CC, Chang SF, Huang TY, Chang HI, Kuo HC, Wu YC and Chen CN. Shear stress modulates macrophage-induced urokinase plasminogen activator expression in human chondrocytes. *Arthritis research & therapy*. 2013;15(2):R53.
27. Katz JA. COX-2 inhibition: what we learned—a controversial update on safety data. *Pain medicine*. 2013;14(suppl_1):29-S34.

28. Золотухин СЕ. и др. Расстройства иммунитета в динамике гонартроза. Патология. 2008:37.
29. Yao J and Lashgari D. Thumb basal joint: Utilizing new technology for the treatment of a common problem. *Journal of Hand Therapy*. 2014;27(2):127-133.
30. Mathiessen A and Conaghan PG (). Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. *Arthritis research & therapy*. 2017;19(1):18.
31. Frisbie DD, Ghivizzani SC, Robbins PD, Evans CH and McIlwraith CW. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene therapy*. 2002;9(1):12.
32. Henrotin Y, Priem F. and Mobasheri A. Curcumin: a new paradigm and therapeutic opportunity for the treatment of osteoarthritis: curcumin for osteoarthritis management. *Springerplus*. 2013;2(1):56.
33. Sandell LJ. and Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 2001;3(2):107.
34. Van der Kraan PM. and Van den Berg WB (). Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis and cartilage*. 2012;20(3):223-232.
35. Копылова ДА, Остапенко ВА. Клинико-патогенетические особенности гонартроза у женщин с различными типами ожирения. *Научно-практическая ревматология*. 2012;6:28-41.
36. Poonpet T. and Honsawek S. Adipokines: Biomarkers for osteoarthritis? *World journal of orthopedics* 2014;5(3):319.
37. Yusuf E, Ioan-Facsinay A, Bijsterbosch J, Klein-Wieringa I, Kwekkeboom J, Slagboom P E and Kloppenburg M. Association between leptin, adiponectin and resistin and long-term progression of hand osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 2011;70(7):1282-1284.

38. Francisco V, Pérez T, Pino J, López V, Franco E, Alonso A. and Gualillo O. Biomechanics, obesity, and osteoarthritis. The role of adipokines: When the levee breaks. *Journal of Orthopaedic Research*. 2017
39. Rosenberg JH, Rai V, Dilisio MF. and Agrawal DK.. Damage-associated molecular patterns in the pathogenesis of osteoarthritis: potentially novel therapeutic targets. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2017;1-9.
40. Rizkalla G, Reiner A, Bogoch E and Poole AR. Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. Evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease. *Journal of Clinical Investigation*. 1992;90(6):2268.
41. Ryu J, Treadwell BV and Mankin HJ. Biochemical and metabolic abnormalities in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis & Rheumatology*, 1984;27(1):49-57.
42. Farahat MN, Yanni G, Poston R. and Panayi GS. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1993;52(12):870-875.
43. Sandell LJ and Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2001;3(2):107.
44. Sarban S, Kocyigit A, Yazar M and Isikan UE (). Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clinical biochemistry*. 2005;38(11):981-986.
45. Корпан МІ. Лікування остеоартрозу: пірамідний підхід. Літопис травматології та ортопедії. 2008;1(2):47-52.
46. Hochberg MC, Altman RD, April KT, Benkhalti M, Guyatt G, McGowan J. and Tugwell P. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis care & research*. 2012;64(4):465-474.

47. Clauw DJ and Hassett AL. The role of centralised pain in osteoarthritis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2017;107:79-84.
48. Бур'янов ОА, Омельченко ТМ. Лікування остеоартрозу в рамках доказової медицини. *Здоров'я України*. 2011;1:12-14.
49. Harper TA. Conservative Management of Hip Dysplasia. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*. 2017;47(4):807-821.
50. Lanas A, Tornero J and Zamorano JL (). Assessment of gastrointestinal and cardiovascular risk in patients with osteoarthritis who require NSAIDs: the LOGICA study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(8):1453-1458.
51. Khojah HM, Ahmed S, Abdel-Rahman MS and Hamza AB. Reactive oxygen and nitrogen species in patients with rheumatoid arthritis as potential biomarkers for disease activity and the role of antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016;97:285-291.
52. Chen Q, Shao X, Ling P, Liu F, Han G and Wang F. Recent advances in polysaccharides for osteoarthritis therapy. *European journal of medicinal chemistry*. 2017;139:926-935.
53. Bhathal A, Spryszak M, Louizos C and Frankel G. Glucosamine and chondroitin use in canines for osteoarthritis: A review. *Open veterinary journal*. 2017;7(1):36-49.
54. Wildi LM, Raynauld JP, Martel-Pelletier J, Beaulieu A, Bessette L, Morin F. and Pelletier JP. Chondroitin sulphate reduces both cartilage volume loss and bone marrow lesions in knee osteoarthritis patients starting as early as 6 months after initiation of therapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study using MRI. *Annals of the rheumatic diseases*, 2011;70(6):982-989.
55. Watanabe H, Yamada Y and Kimata K. Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *The journal of biochemistry*. 1998;124(4):687-693.

56. Mantovani V, Maccari F and Volpi N. Chondroitin Sulfate and Glucosamine as Disease Modifying Anti-Osteoarthritis Drugs (DMOADs). *Current medicinal chemistry*. 2016;23(11):1139-1151.
57. Bobacz K, Sunk IG, Hofstaetter JG, Amoyo L, Toma CD, Akira S and Smolen JS. Toll-like receptors and chondrocytes: The lipopolysaccharide-induced decrease in cartilage matrix synthesis is dependent on the presence of toll-like receptor 4 and antagonized by bone morphogenetic protein 7. *Arthritis & Rheumatology*. 2007;56(6):1880-1893.
58. Ospelt C, Brentano F, Rengel Y, Stanczyk J, Kolling C, Tak PP and Kyburz, D. Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: Toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 2008;58(12):3684-3692.
59. Chan PS, Caron JP and Orth MW. Effect of glucosamine and chondroitin sulfate on regulation of gene expression of proteolytic enzymes and their inhibitors in interleukin-1–challenged bovine articular cartilage explants. *American journal of veterinary research*. 2005;66(11):1870-1876.
60. Chan PS, Caron JP, Rosa GJM and Orth MW. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E₂ in articular cartilage explants. *Osteoarthritis and cartilage*, 2005;13(5):387-394.
61. Bassler CT, Combal JPA, Bougaret S and Malaise M. Effects of chondroitin sulfate and interleukin-1 β on human articular chondrocytes cultivated in clusters. *Osteoarthritis and Cartilage*. 1998;6(3):196-204.
62. Grover AK and Samson SE. Benefits of antioxidant supplements for knee osteoarthritis: rationale and reality. *Nutrition journal*. 2015;15(1):1.
63. Журавльова ЛВ, Олійник МО. Сучасний погляд на лікування остеоартрозу як хронічного запального захворювання. *Ліки України плюс*. 20153(24):9-12.

64. Young L, Katrib A, Cuello C, Vollmer-Conna U, Bertouch JV, Roberts-Thomson PJ and Youssef PP. Effects of intraarticular glucocorticoids on macrophage infiltration and mediators of joint damage in osteoarthritis synovial membranes: Findings in a double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis & Rheumatology*. 2001;44(2):343-350.
65. Wandel S, Jüni P, Tendal B, Nüesch E, Villiger PM, Welton NJ and Trelle S. Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo in patients with osteoarthritis of hip or knee: network meta-analysis. *Bmj*. 2010;341:4675.
66. Lowe CJM, Barker KL, Dewey M and Sackley CM. Effectiveness of physiotherapy exercise after knee arthroplasty for osteoarthritis: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Bmj*. 2007;335(7624):812.
67. Hulme J, Robinson V, DeBie R, Wells G, Judd M and Tugwell P. Electromagnetic fields for the treatment of osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002;1(1).
68. Pisters MF, Veenhof C, Van Meeteren NL, Ostelo RW, De Bakker DH, Schellevis FG and Dekker J. Long-term effectiveness of exercise therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee: a systematic review. *Arthritis Care & Research*. 2007;57(7):1245-1253.
69. Омельченко ТН. Переломы лодыжек и быстро прогрессирующий остеоартроз голеностопного сустава: профилактика и лечение. *Ортопедия, травматология и протезирование*. 2013;4:35-40.
70. Henrotin Y, Marty M and Mobasher A. What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis? *Maturitas*. 2014;78(3):184-187.
71. Huskisson EC. Clinical aspects of chondroprotection. In *Seminars in arthritis and rheumatism*. 1990;19(4):30-32.

72. Инструкция по медицинскому применению препарата Драстоп (Drastop) 1 мл (раствор для внутримышечного введения), рег. уд. ЛП-003472.
73. Ковалев ГА, Введенский БП, Сандомирский БП. Технология моделирования остеоартроза крупных суставов. Биотехнология. 2010;3(10):37-43.
74. Baragi VM, Becher G, Bendele AM, Biesinger R, Bluhm H, Boer J and Gallagher BM. A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models. *Arthritis & Rheumatology*. 2009;60(7):2008-2018.
75. Гуськова ТА. Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их клинических исследований. Токсикологический вестник. 2010;5:2-5.
76. Mescher A. (). Junqueira's basic histology: text and atlas. McGraw-Hill. 2009;12:480.
77. Меркулов ГА. Курс патологической техники. Медгиз. 1969;339.
78. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. Мир 1969:102–108: 157–167.
79. Towbin H, Schmitz A, Van Oostrum J, Seitz M, Dewald B, Zingel O and Rordorf C. Monoclonal antibody based enzyme-linked and chemiluminescent assays for the human interleukin-1 receptor antagonist Application to measure hIL-1ra levels in monocyte cultures and synovial fluids. *Journal of immunological methods*. 1994;170(1):125-135.
80. Van Dyke K. Luminescence immunoassay and molecular applications. CRC press. 1990;352.
81. Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM and Winterbourn CC. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997;23(3):361-366.

82. Габриэлян НИ (). Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях: Методические рекомендации. Мир. 1985;11.
83. Able AJ, Guest DI and Sutherland MW. Use of a New Tetrazolium-Based Assay to Study the Production of Superoxide Radicals by Tobacco Cell Cultures Challenged with Avirulent Zoospores of *Phytophthora parasitica varnicotianae*. *Plant Physiology*. 1998;117(2):491-499.
84. Sutherland MW and Learmonth BA. The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase. *Free radical research*. 1997;27(3):283-289.
85. Hashimoto S. A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. *Analytical biochemistry*. 1974;62(2):426-435.
86. Jiang ZY, Woollard AC and Wolff SP. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *Febs Letters*. 1990;268(1):69-71.
87. Nouroozadeh J, Tajaddinisarmadi J and Wolff SP. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Analytical biochemistry*. 1994;220(2):403-409.
88. Дубинина ЕЕ, Бурмистров СО, Ходов ДА, Поротов ИГ. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения. *Вопросы медицинской химии*. 1995;41(1): 24-26.
89. Гаврилов ВБ, Гаврилова АР, Хмара НФ. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов. *Лабораторное дело*. 1988;(2):60-63.
90. Орехович ВН. Современные методы в биохимии. *Медицина*. 1977:62-68.
91. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1959;82(1):70-77.

92. Королюк МА, Иванова ЛК, Майорова ИГ, Токарева ВА. Метод определения активности каталазы. Клиническая лабораторная диагностика. 1988; (4):44-47.
93. Чевари С, Чаба И, Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. Лаб. Дело. 1985;11:678-680.
94. Власова СН, Шабунина ЕИ, Переслегина ИА. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей. Лаб. Дело. 1990;8:19-22.
95. Hissin PJ and Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. Analytical biochemistry. 1976;74(1):214-226.
96. Mokrasch LC and Teschke EJ. Glutathione content of cultured cells and rodent brain regions: a specific fluorometric assay. Analytical biochemistry. 1984;140(2):506-509.
97. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding. Analytical Biochemistry. 1976;86:193-200.
98. Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical biochemistry. 1987;162(1):156-159.
99. Zhang RX, Ren K and Dubner R. Osteoarthritis pain mechanisms: basic studies in animal models. Osteoarthritis and cartilage. 2013;21(9):1308-1315.
100. Kobayashi K, Imaizumi R, Sumichika H, Tanaka H, Goda M, Fukunari A and Komatsu H. Sodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis and associated pain model in rats. Journal of Veterinary Medical Science. 2003;65(11):1195-1199.
101. Cournil C, Liagre B, Grossin L, Abid A, Jouzeau JY, Terlain B and Gillet P. Overexpression and induction of heat shock protein (Hsp) 70

- protects in vitro and in vivo from mono-iodoacetate (MIA)-induced chondrocytes death. *Arthritis Research & Therapy*. 2001;3(1):41.
102. Collins JE, Donnell-Fink LA, Yang HY, Usiskin IM, Lape EC, Wright J and Losina E. Effect of Obesity on Pain and Functional Recovery Following Total Knee Arthroplasty. *JBJS*. 2017;99(21):1812-1818.
103. Мителева ЗМ, Снисаренко ПИ, Зеленецкий ИБ, Карпинский МЮ, Ярьсько АВ. Исследование напряженно-деформированного состояния моделей коленного сустава в зависимости от величины варусной деформации и толщины суставного хряща. *Травма*. 2015;16(3).
104. Knudson CB and Knudson W. Cartilage proteoglycans. In *Seminars in cell & developmental biology*. 2001;12(2):69-78.
105. Cerza F, Carni S, Carcangiu A, Di Vavo I, Schiavilla V, Pecora A and Ciuffreda M. Comparison between hyaluronic acid and platelet-rich plasma, intra-articular infiltration in the treatment of gonarthrosis. *The American journal of sports medicine*. 2012;40(12):2822-2827.
106. Scanzello CR. Chemokines and inflammation in osteoarthritis: insights from patients and animal models. *Journal of Orthopaedic Research*. 2017;35(4):735-739.
107. Van De Loo FA, Joosten LA, Van Lent PL, Arntz OJ and Van Den Berg WB. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor α , and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction effect of in situ blocking in murine antigen-and zymosan-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 1995;38(2):164-172.
108. Brennan F, Jackson A, Chantry D, Maini R and Feldmann M. Inhibitory effect of TNF α antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *The Lancet*. 1989;334(8657):244-247.
109. Elsaid KA, Ubhe A, Shaman Z and D'Souza G. Intra-articular interleukin-1 receptor antagonist (IL1-ra) microspheres for posttraumatic

- osteoarthritis: in vitro biological activity and in vivo disease modifying effect. *Journal of experimental orthopaedics*. 2016;3(1):18.
110. Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *The Journal of Rheumatology. Supplement*. 1997;49:15-19.
111. Terencio MC, Ferrándiz ML, Carceller MC, Ruhí R, Dalmau P, Vergés J, and Alcaraz MJ. Chondroprotective effects of the combination chondroitin sulfate-glucosamine in a model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament transection in ovariectomised rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;79:120-128.
112. Gately MK, Desai BB, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, Podlaski FJ and Gubler U. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *The Journal of Immunology*. 1991;147(3):874-882.
113. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S and Trinchieri G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 1989;170(3):827-845.
114. Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, Young D, Dicig M, Lowe L and Hewick RM. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *The Journal of Immunology*. 1991;146(9):3074-3081.
115. Turka LA, Goodman RE, Rutkowski JL, Sima AA, Merry A, Mitra R S and Nickoloff BJ. Interleukin 12: a potential link between nerve cells and the immune response in inflammatory disorders. *Molecular Medicine*. 1995;1(6):690.
116. Gearing DP and Cosman D. Homology of the p40 subunit of natural killer cell stimulatory factor (NKSF) with the extracellular domain of the interleukin-6 receptor. *Cell*. 1991;66(1):9-10.

117. Sakkas LI, Johanson NA, Scanzello CR and Platsoucas CD. Interleukin-12 is expressed by infiltrating macrophages and synovial lining cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Cellular immunology*. 1998;188(2):105-110.
118. Vannier E, Miller LC and Dinarello CA. Coordinated antiinflammatory effects of interleukin 4: interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992;89(9):4076-4080.
119. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG and De Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 1991;174(5):1209-1220.
120. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW and Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor B (NFB) activation in human monocytes IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(16):9558-9563.
121. Lubberts E, Joosten LA, Helsen MM and van den Berg WB. Regulatory role of interleukin 10 in joint inflammation and cartilage destruction in murine streptococcal cell wall (SCW) arthritis. More therapeutic benefit with IL-4/IL-10 combination therapy than with IL-10 treatment alone. *Cytokine*. 1998;10(5):361-369.
122. Pelletier JP, Martel-Pelletier J and Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis & Rheumatology*. 2001;44(6):1237-1247.
123. Chan PS, Caron JP, Rosa GJ and Orth MW. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E(2) in articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(5):387-394.

124. Cho SY, Sim JS, Jeong CS, Chang SY, Choi DW, Toida T and Kim YS. Effects of low molecular weight chondroitin sulfate on type II collagen–induced arthritis in DBA/1J mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2004;27(1):47–51.
125. Hardy MM, Seibert K, Manning PT, Currie MG, Woerner BM, Edwards D and Tripp CS. Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. *Arthritis & Rheumatology*. 2002;46(7):1789-1803.
126. Notoya K, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J, Mineau F and Pelletier JP. The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *The Journal of Immunology*. 2000;65(6):3402-3410.
127. Белова СВ, Карякина ЕВ. Церулоплазмин-структура, физико-химические и функциональные свойства. *Успехи современной биологии*. 2010;130(2):180-189.
128. Макарова НП, Коничева ИН. Синдром эндогенной интоксикации при сепсисе. *Анестезиол. и реаниматол.* 1995;6:4-6.
129. Белова СВ, Мамонова ИА, Пучиньян ДМ, Бабушкина ИВ, Гладкова ЕВ. Оптимизация мониторинга активности дегенеративного процесса у больных остеоартрозом до и после эндопротезирования коленного сустава. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; (5):145-145.
130. Никольская ВА, Данильченко ЮД, Меметова ЗН. Биохимический аспект рассмотрения роли молекул средней массы в организме. *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия»*. 2013;6(65):139-145.

131. Туровская ЕФ, Алексеева ЛИ, Филатова ЕГ. Современные представления о патогенетических механизмах боли при остеоартрозе. Научно-практическая ревматология. 2014;52(4).
132. Деформирующий О, Эндопротезирование ТС, Ремоделирование КТ, Перекисное ОЛ. Оценка ремоделирования костной ткани и процессов перекисного окисления липидов у больных деформирующим остеоартрозом в условиях эндопротезирования тазобедренных суставов. Забайкальский медицинский вестник. 2016; (2):47-51.
133. Zhang LZ, Zheng HA, Jiang Y, Tu YH, Jiang PH and Yang AL. Mechanical and biologic link between cartilage and subchondral bone in osteoarthritis. *Arthritis care & research*. 2012;64(7):960-967.
134. Ma Z, Wang Y, Piao T and Liu J. Echinocystic acid inhibits IL-1 β -induced COX-2 and iNOS expression in human osteoarthritis chondrocytes. *Inflammation*. 2016;39(2):543-549.
135. Zhang GM, Zhang GM and Gu B. Serum transforming growth factor beta1 level for knee osteoarthritis diagnosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2017;474:136.
136. Nathan CF and Hibbs JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current opinion in immunology* 1991;3(1):65-70.
137. Amin AR, Di Cesare PE, Vyas P, Attur M, Tzeng E, Billiar TR. and Abramson SB. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *Journal of Experimental Medicine* 1995;182(6):2097-2102.
138. Taskiran D, Stefanovicracic M, Georgescu H and Evans C. Nitric-oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by

- interleukin-1. *Biochemical and biophysical research communications*, 1994;200(1):142-148.
139. Murrell GA, Jang D and Williams RJ. Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;206(1):15-21.
140. Cao M, Westerhausen-Larson A, Niyibizi C, Kavalkovich K, Georgescu HI, Rizzo CF and Evans CH. Nitric oxide inhibits the synthesis of type-II collagen without altering Col2A1 mRNA abundance: prolyl hydroxylase as a possible target. *Biochemical Journal*. 1997;324(1):305-310.
141. Rediske JJ, Koehne CF, Zhang B and Lotz M. The inducible production of nitric oxide by articular cell types. *Osteoarthritis and cartilage*, 1994;2(3):199-206.
142. Manfield L, Jang D and Murrell GAC. Nitric oxide enhances cyclooxygenase activity in articular cartilage. *Inflammation Research*. 1996;45(5):254-258.
143. Hla T and Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1992;89(16):7384-7388.
144. Danilov AB and Grigorenko NV. An antinociceptive effect of chondroprotectors: a myth or a reality? *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni SS Korsakova*. 2015;115(9):84-89.
145. Lafyatis R, Thompson NL, Remmers EF, Flanders KC, Roche NS, Kim SJ and Wilder RL. Transforming growth factor-beta production by synovial tissues from rheumatoid patients and streptococcal cell wall arthritic rats. Studies on secretion by synovial fibroblast-like cells and immunohistologic localization. *The Journal of Immunology*. 1989;143(4):1142-1148.
146. Letterio JJ and Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF- β . *Annual review of immunology*. 1998;16(1):137-161.

147. Zhen G, Wen C, Jia X, Li Y, Crane JL, Mears SC and Carrino JA. Inhibition of TGF-[beta] signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis. *Nature medicine*. 2013;19(6):704-712.
148. Davidson EB, Van der Kraan PM and Van Den Berg WB. TGF- β and osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*. 2007;15(6):597-604.
149. Robbins PD, Evans CH and Chernajovsky Y. Gene therapy for arthritis. *Gene Therapy*. 2003;10(10):902-911.
150. Fava RA, Olsen NJ, Postlethwaite AE, Broadley KN, Davidson JM, Nanney LB and Townes AS. Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia. *Journal of Experimental Medicine*. 1991;173(5):1121-1132.
151. Allen JB, Manthey CL, Hand AR, Ohura K, Ellingsworth LARRY and Wahl SM. Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta. *Journal of Experimental Medicine*, 1990;171(1):231-247.
152. Iannone F and Lapadula G. The pathophysiology of osteoarthritis. *Aging clinical and experimental research*. 2003;15(5):364-372.
153. Long E, Motwani R, Reece D, Pettit N, Hepworth J, Wong P and Seegmiller R. The role of TGF-ss1 in osteoarthritis of the temporomandibular joint in two genetic mouse models. *Archives of oral biology*. 2016;67:68-73.
154. Pujol JP, Galera P, Pronost S, Boumediene K, Vivien D, Macro M. and Daireaux M. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) and articular chondrocytes. In *Annales d'endocrinologie*. 1994;55(2):109-120.
155. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S and Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annual review of cell biology*. 1993;9(1):541-573.

156. Barcellos-Hoff MH and Dix TA. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Molecular Endocrinology*. 1996;10(9):1077-1083.
157. Malfait AM. Osteoarthritis year in review 2015: biology. *Osteoarthritis and cartilage*. 2016;24(1):21-26.
158. Lepetsos P. and Papavassiliou AG. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2016;1862(4):576-591.
159. Robbins PD, Evans CH and Chernajovsky Y. Gene therapy for arthritis. *Gene Therapy*. 2003;10(10):902-911.
160. Na JY, Song K, Kim S and Kwon J. Rutin protects rat articular chondrocytes against oxidative stress induced by hydrogen peroxide through SIRT1 activation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016;473(4):1301-1308.
161. Rojkind M, Dominguez-Rosales JA, Nieto N. and Greenwel P. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2002;59(11):1872-1891.
162. Hille R. Structure and function of xanthine oxidoreductase. *European journal of inorganic chemistry*. 2006;2006(10):1913-1926.
163. Aibibula Z, Ailixiding M, Iwata M, Piao J, Hara Y, Okawa A and Asou Y. Xanthine oxidoreductase activation is implicated in the onset of metabolic arthritis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016;472(1):26-32.
164. Akyol Ö, Herken H, Uz E, Fadilloğ lu E, Ünal S, Söğ üt S and Savaş HA. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients: the possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2002;26(5):995-1005.

165. Stabler T, Zura RD, Hsueh MF and Kraus VB. Xanthine oxidase injurious response in acute joint injury. *Clinica Chimica Acta*. 2015;451:170-174.
166. Hanachi N, Charef N, Baghiani A, Khennouf S, Derradji Y, Boumerfeg S and Arrar L. Comparison of xanthine oxidase levels in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other joint inflammations. *Saudi medical journal*. 2009;30(11):1422-1425.
167. Henrotin YE, Bruckner P and Pujol JP. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2003;11(10):747-755.
168. Berlett BS and Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(33):20313-20316.
169. Del Rio D, Stewart AJ and Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*. 2005;15(4):316-328.
170. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A. and Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica chimica acta*. 2003;329(1):23-38.
171. Tiku ML, Shah R and Allison GT. Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(26):20069-20076.
172. Henrotin Y, Kurz B and Aigner T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis and cartilage*. 2005;13(8):643-654.

173. Tiku ML, Allison GT, Naik K and Karry SK (). Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. *Osteoarthritis and cartilage*. 2003;11(3):159-166.
174. Внуков ВВ, Кролевец ИВ, Милютин НП, Гуценко ОИ, Забродин, МА, Анина СБ, Бражников ЮИ. Свободнорадикальное окисление в синовиальной жидкости и апоптоз хондроцитов при гонартрозе. *Валеология*. 2012;(4):38.
175. Аникин СГ, Алексеева ЛИ. Хондроитина сульфат: механизмы действия, эффективность и безопасность при терапии остеоартроза. *Современная ревматология*. 2012;(3).
176. Перевозкина МГ. Кинетические модели для тестирования антиоксидантов. *Естественные и математические науки в современном мире*. 2013;(9):75-101.
177. Дубинина ЕЕ, Бурмистров СО, Ходов ДА, Поротов ИГ. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения. *Вопросы медицинской химии*. 1995;41(1):24-26.
178. Volpi N. Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2009;61(10):1271-1280.
179. Lauder RM. Chondroitin sulphate: a complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems. *Complementary therapies in medicine*. 2009;17(1):56-62.
180. Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262(20):9895-9901.
181. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease 2, 3. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002;32(9):790-796.
182. Grimsrud PA, Xie H, Griffin TJ and Bernlohr DA. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(32):21837-21841.

183. Shringarpure R, Grune T, Mehlhase J and Davies KJ. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278:311- 318.
184. Grune T, Jung T, Merker K and Davies KJA. Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004;36:2519-2530.
185. Carbone DL, Doorn JA, Kiebler Z, Ickes BR. and Petersen DR. Modification of heat shock protein 90 by 4-hydroxynonenal in a rat model of chronic alcoholic liver disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005;315(1):8-15.
186. Carbone DL, Doorn JA, Kiebler Z and Petersen DR. Cysteine modification by lipid peroxidation products inhibits protein disulfide isomerase. *Chemical research in toxicology*. 2005;18(8):1324-1331.
187. Ostalowska A, Nowak D and Świąchowski S. Assessment of knee function and biochemical parameters of articular fluid and peripheral blood in gonarthrosis patients following intra-articular administration of hyaluronic acid. *Pol Orthop Traumatol*. 2013;78:173-181.
188. Yermilov V, Rubio J and Ohshima H. Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS letters*. 1995;376(3):207-210.
189. Карпей ХЛФ. Остеоартроз. В кн.: Клиническая ревматология. Медицина. 1990:121-128.
190. Ray PD, Huang BW and Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*. 2012;24(5):981-990.
191. Starkman BG, Cravero JD, Delcarlo M and Loeser RF. IGF-I stimulation of proteoglycan synthesis by chondrocytes requires activation of

- the PI 3-kinase pathway but not ERK MAPK. *Biochemical Journal*. 2005;389(3):723-729.
192. Grigolo B, Roseti L, Fiorini M and Facchini A. Enhanced lipid peroxidation in synoviocytes from patients with osteoarthritis. *The Journal of rheumatology*. 2003;30(2):345-347.
193. Ozgocmen S, Ardicoglu O, Erdogan H, Fadillioglu E and Gudul H. In vivo effect of celecoxib and tenoxicam on oxidant/anti-oxidant status of patients with knee osteoarthritis. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 2005;35(2):137-143.
194. Yui N, Yudoh K, Fujiya H and Musha H. Mechanical and oxidative stress in osteoarthritis. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*. 2016;5(1):81-86.
195. Maiorino FM, Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D and Flohé L. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in enzymology*. 1995;252:38-53.
196. Кулинский ВИ, Колесниченко ЛС. Система глутатиона. I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы. *Биомедицинская химия*. 2009;55(3):255-277.
197. Меньщикова ЕБ, Ланкин ВЗ, Зенков НК, Бондарь ИА., Круговых НФ, Труфакин ВА. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. *Слово*. 2006;556.
198. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2013;1830(5):3217-3266.
199. Tappel A. Selenium-glutathione peroxidase: properties and synthesis. *Current topics in cellular regulation*. 2014;24:87-96.
200. Александрова ЛА, Филиппова НА, Субботина ТФ, Алексеевская ЕС, Жлоба АА, Трофимов ВИ. Оценка проявлений окислительнонитрозильного стресса при системных заболеваниях

- соединительной ткани. Ученые записки СПбГМУ им. акад. ИП Павлова. 2016;23(1):26-28.
201. Singhal SS, Singh SP, Singhal P, Horne D, Singhal J and Awasthi S. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicology and applied pharmacology*. 2015;289(3):361-370.
202. Koike M, Nojiri H, Ozawa Y, Watanabe K, Muramatsu Y, Kaneko H and Shirasawa T. Mechanical overloading causes mitochondrial superoxide and SOD2 imbalance in chondrocytes resulting in cartilage degeneration. *Scientific reports*. 2015;5.
203. Kullich W, Fagerer N and Schwann H. Effect of the NSAID nimesulide on the radical scavenger glutathione S-transferase in patients with osteoarthritis of the knee. *Current medical research and opinion*. 2007;23(8):1981-1986.
204. Shaat RM, Senna MK, Mokhtar N, Monir R and Abd-El AI. Impact of obesity on status of glutathione reductase activity and inflammatory response in patients with knee osteoarthritis. *International Journal*. 2015;3(9):609-616.
205. Carlo MD and Loeser RF. Increased oxidative stress with aging reduces chondrocyte survival: correlation with intracellular glutathione levels. *Arthritis & Rheumatology*. 2003;48(12):3419-3430.
206. Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Traina P, Sama D and Calatroni A. Glycosaminoglycans modulate inflammation and apoptosis in LPS-treated chondrocytes. *Journal of cellular biochemistry*. 2009;106(1):83-92.
207. Henrotin Y, Mathy M, Sanchez C and Lambert C. Chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: from in vitro studies to clinical recommendations. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*. 2010;2(6):335-348.

208. Anfinsen CB and Haber E. Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds. *J Biol Chem.* 1961;236(5):1361-1363.
209. Болдырев АА, Юнева МОСЕ, Крамаренко ГГФТ, Коновалова ГГ, Ланкин ВЗ. Антиоксидантные системы в тканях мышц с ускоренным темпом старения (SAM, Senescence Accelerated Mice. *Биохимия.* 2001;66:1157-1163.
210. Conte A, Volpi N, Palmieri L, Bahous I and Ronca G. Biochemical and pharmacological aspects of oral treatment with chondroitin sulfate. *Arzneimittel Forschung - Drug Research.* 1995;45:918–925.
211. Largo R, Roman-Blas JA, Moreno-Rubio J, Sánchez-Pernaute O, Martínez-Calatrava MJ, Castañeda S and Herrero-Beaumont G. Chondroitin sulfate improves synovitis in rabbits with chronic antigen-induced arthritis. *Osteoarthritis and cartilage.* 2010;18:S17-S23.
212. Pelletier JP, Martel-Pelletier J and Abramson SB (). Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis & Rheumatology.* 2001;44(6):1237-1247.
213. Chan PS, Caron JP, Rosa GJM and Orth MW. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E 2 in articular cartilage explants. *Osteoarthritis and cartilage.* 2005;13(5):387-394.
214. Cho SY, Sim JS, Jeong CS, Chang SY, Choi DW, Toida T and Kim YS. Effects of low molecular weight chondroitin sulfate on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2004;27(1):47-51.
215. Caraglia M, Beninati S, Giuberti G, D'alessandro AM, Lentini A, Abbruzzese A and Costantino M. Alternative therapy of earth elements increases the chondroprotective effects of chondroitin sulfate in mice. *Experimental & molecular medicine.* 2005;37(5):476-481.

216. Jomphe C, Gabriac M, Hale TM, Héroux L, Trudeau LÉ, Deblois D and Du Souich P. Chondroitin Sulfate Inhibits the Nuclear Translocation of Nuclear Factor- κ B in Interleukin-1 β -Stimulated Chondrocytes. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2008;102(1):59-65.
217. Tat SK, Pelletier JP, Lajeunesse D, Fahmi H, Lavigne M and Martel-Pelletier J. The differential expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts is an indicator of the metabolic state of these disease cells. *Clinical and experimental rheumatology*. 2008;26(2):295.
218. Goldring MB. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*. 2012;4(4):269-285.
219. Reisig G, Kreinest M, Richter W, Wagner-Ecker M, Dinter D, Attenberger U and Schwarz ML. Osteoarthritis in the Knee Joints of Göttingen Minipigs after Resection of the Anterior Cruciate Ligament? Missing Correlation of MRI, Gene and Protein Expression with Histological Scoring. *PloS one*. 2016;11(11):e0165897.
220. Мустафин РН, Хуснутдинова ЭК. Молекулярные механизмы развития остеоартроза. *Лечебное дело*. 2015; (3).
221. Roeder BA, Kokini K, Sturgis JE, Robinson JP and Voytik-Harbin SL. Tensile mechanical properties of three-dimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure. *Journal of biomechanical engineering*. 2002;124(2):214-222.
222. Bateman JF. Genetic aspects of osteoarthritis. In *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2004;34(6):15-18.
223. Li SW, Prockop DJ, Helminen H, Fässler R, Lapveteläinen T, Kiraly K. and Arita M. Transgenic mice with targeted inactivation of the Col2 alpha 1 gene for collagen II develop a skeleton with membranous and

- periosteal bone but no endochondral bone. *Genes & Development*. 1995;9(22):2821-2830.
224. Knowlton RG, Katzenstein PL, Moskowitz RW, Weaver EJ, Malesud CJ, Pathria MN and Prockop DJ. Genetic linkage of a polymorphism in the type II procollagen gene (COL2A1) to primary osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia. *New England Journal of Medicine*. 1990;322(8):526-530.
225. Ritvaniemi P, K rkk  J, Bonaventure J, Vikkula M, Hyland J, Paasilta P and Mannism ki P. Identification of COL2A1 gene mutations in patients with chondrodysplasias and familial osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 1995;38(7):999-1004.
226. Kubosch EJ, Heidt E, Niemeyer P, Bernstein A, S dkamp NP and Schmal H. In-vitro chondrogenic potential of synovial stem cells and chondrocytes allocated for autologous chondrocyte implantation: a comparison. *International orthopaedics*. 2017;41(5):991-998.
227. Kiani C, Liwen CHEN, Wu YJ, Albert JY and Burton BY. Structure and function of aggrecan. *Cell research*. 2002;12(1):19-32.
228. Schmal H, Pilz IH, Henkelmann R, Salzmann GM, S dkamp NP and Niemeyer P. Association between intraarticular cytokine levels and clinical parameters of osteochondritis dissecans in the ankle. *BMC musculoskeletal disorders*. 2014;15(1):169.
229. Glant TT, Ocsko T, Markovics A, Szekanecz Z, Katz RS, Rauch TA and Mikecz K. Characterization and localization of citrullinated proteoglycan aggrecan in human articular cartilage. *PloS one*. 2016;11(3):e0150784.
230. Wasilko SM, Tourville TW, DeSarno MJ, Slauterbeck JR, Johnson RJ, Struglics A and Beynon BD. Relationship between synovial fluid biomarkers of articular cartilage metabolism and the patient's perspective of

- outcome depends on the severity of articular cartilage damage following ACL trauma. *Journal of Orthopaedic Research*. 2016;34(5):820-827.
231. Struglics A, Larsson S, Kumahashi N, Frobell R and Lohmander LS. Changes in cytokines and aggrecan ARGS neoepitope in synovial fluid and serum and in C-terminal crosslinking telopeptide of type II collagen and N-terminal crosslinking telopeptide of type I collagen in urine over five years after anterior cruciate ligament rupture: an exploratory analysis in the Knee Anterior Cruciate Ligament, Nonsurgical versus Surgical Treatment trial. *Arthritis & Rheumatology*. 2015;67(7):1816-1825.
232. Luong MLN, Cleveland RJ, Nyrop KA and Callahan LF. Social determinants and osteoarthritis outcomes. *Aging health*. 2012;8(4):413-437.
233. Aury-Landas J, Marcelli C, Leclercq S, Boumédiene K and Baugé C. Genetic determinism of primary early-onset osteoarthritis. *Trends in molecular medicine*. 2016;22(1):38-52.
234. Матвеев ПП, Брагина СВ. Остеоартроз коленного сустава: проблемы и социальная значимость. *Экология человека*. 2012;(9).
235. Raudner M, Schreiner MM, Röhrich S, Zalaudek M and Trattinig S. Wann ist eine Knorpelreparatur erfolgreich? When is cartilage repair successful? *Der Radiologe*. 2017;57(11):907-914.
236. Liow Y, Wang W and Loh VWK. Outpatient management of knee osteoarthritis. *Singapore medical journal*. 2017;58(10):580.
237. Kendzerska T, Jüni P, King LK, Croxford R, Stanaitis I and Hawker GA. The longitudinal relationship between hand, hip and knee osteoarthritis and cardiovascular events: a population-based cohort study. *Osteoarthritis and cartilage*. 2017;25(11):1771-1780.
238. Bobacz K. Pharmacologic treatment of hand-, knee-and hip-osteoarthritis. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2013;163(9-10):236-242.

239. DeAngelis PL. Glycosaminoglycan polysaccharide biosynthesis and production: today and tomorrow. *Applied microbiology and biotechnology*. 2012;94(2):295-305.
240. Lou Y, Wang C, Tang Q, Zheng W, Feng Z, Yu X and Wang J. Paeonol Inhibits IL-1 β -Induced Inflammation via PI3K/Akt/NF- κ B Pathways: In Vivo and Vitro Studies. *Inflammation*. 2017;40(5):1698-1706.
241. Zhou K, Hu L, Liao W, Yin D and Rui F. Coptisine prevented IL- β -induced expression of inflammatory mediators in chondrocytes. *Inflammation*. 2016;39(4):1558-1565.
242. Zhang GM, Zhang GM and Gu B. Serum transforming growth factor beta1 level for knee osteoarthritis diagnosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2017;474:136.
243. Wang YJ, Shen M, Wang S, Wen X, Han XR, Zhang ZF and Zheng YL. Inhibition of the TGF- β 1/Smad signaling pathway protects against cartilage injury and osteoarthritis in a rat model. *Life sciences*. 2017;189:106-113.
244. Feng Z, Li X, Lin J, Zheng W, Hu Z, Xuan J and Pan X. Oleuropein inhibits the IL-1 β -induced expression of inflammatory mediators by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in human osteoarthritis chondrocytes. *Food & function*. 2017;8(10):3737-3744.
245. Noh KC, Park SH, Yang CJ, Lee GW, Kim MK, & Kang YH. Involvement of synovial matrix degradation and angiogenesis in oxidative stress-exposed degenerative rotator cuff tears with osteoarthritis. *Journal of shoulder and elbow surgery*. 2018;27(1):141-150.
246. Benedetti S, Canino C, Tonti G, Medda V, Calcaterra P, Nappi G and Canestrari F. Biomarkers of oxidation, inflammation and cartilage degradation in osteoarthritis patients undergoing sulfur-based spa therapies. *Clinical biochemistry*. 2010;43(12):973-978.

247. Moskowitz RW. Bone remodeling in osteoarthritis: subchondral and osteophytic responses. *Osteoarthritis and cartilage*. 1999;7(3):323-324.
248. Loeser RF. Age-related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis. *Clinics in geriatric medicine*. 2010;26(3):371-386.
249. Дворщенко К, Берник О, Тіхова Є, Вовк А, Короткий О. Окисна модифікація білків сироватки крові щурів за умов експериментального запалення задньої кінцівки щурів. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка*. 2015;2(19):76-78.
250. Тіхова ЄВ, Берник ОО, Савчук ОМ, Дворщенко КО, Остапченко ЛІ. Інтенсивність вільнорадикальних процесів у хрящовій тканині щурів з колаген-індукованим артритом. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка*. 2016;2(21):27-30.
251. 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;4(7):26-30.
252. Tikhova Y, Dvorshchenko KO, Dranitsina AS, Grebinyk DM, Korotkyi OG. and 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 sciences*. 2017;8(4):994-1001.
253. Тіхова Є, Тимошенко М, Ковельська Ю, Дворщенко К. Стан глутатіонової системи у сироватці крові щурів при експериментальному артозі та при введенні хондроїтина сульфату. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. 2017;1(22):47-50.
254. Тіхова ЄВ, Дворщенко КО, Короткий ОГ, Фалалєєва ТМ, Берегова Т.В. Стан суглобових хрящів при артозі та після введення

- тест-зразка «Драстоп». Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. 2017;1(30):99-101.
255. Тіхова ЄВ, Ашпін МК, Воєйков АІ, Табурець ОВ, Дворщенко КО. Перекисне окиснення ліпідів у сироватці крові щурів при гострому запаленні у суглобах. В: XIII Міжнародна наукова конференція молодих науковців «Шевченківська весна 2015: Біологія». Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка. 2015:22.
256. Тіхова ЄВ, Дворщенко КО, Ашпін МК, Воєйков АІ, Короткий ОГ, Остапченко Л.І. Дія хондропротектора на окисно-антиоксидантний баланс у сироватці крові за умов каррагінан-індукованого запалення задньої кінцівки щурів. В: Науково-практична конференція «Мультипробіотики в профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань». Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка. 2015:21.
257. Тіхова ЄВ, Берник ОО, Вовк АА, Проценко ЮА, Компанець ІВ, Дворщенко КО. Окисна модифікація білків сироватки крові щурів при гострому запаленні суглобів. В: Міжнародна міждисциплінарна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна 2016». Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка. 2016:194-195.
258. Тіхова ЄВ, Вовк АА, Короткий ОГ, Дворщенко КО. Окисна модифікація білків у сироватці крові щурів при експериментальному артриті. В: XI Международная научно-практическая конференция «Фундаментальная и прикладная наука – 2016». Sheffield, Science and education ltd. 2016:30-32.
259. Tikhova Ye, Korotkyi O, Kovel'ska 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: матер.конф. Львів, Україна. 2017:73.
260. Тихова ЕВ, Ашпин НК, Короткий АГ, Дворщенко ЕА. Окислительная модификация белков в суставе крыс с коллаген-индуцированным артритом. XII Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Наука и образование - 2017». Астана. Евразийский национальный университет имени Л. Н. Гумилёва. 2017:1042-1046.
261. 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 «Іновації та перспективи сучасної медицини» ВІМСО, 5 – 7 квітня, 2017: матер.конф. Чернівці, Україна. 2017:58.
262. Tikhova Y, Vovk A, Korotkyi O, Dranitsina A, Dvorshchenko K. Effect of chodroprotector on cartilage tissue repairing during experimental osteoarthritis in rats. In: Third Kyiv International Symposium Smooth Muscles Physiology, Biophysics & Pharmacology: from genes and molecules to functions, disorders and their novel treatment opportunities. Kyiv – Lutsk, Taras Shevchenko National University of Kyiv. 2017:74.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

За темою дисертації опубліковано 14 наукових праць, з яких 5 наукових статей у фахових виданнях, що входять до переліку, затвердженому МОН України, стаття у виданні, що входить до міжнародної наукометричної бази, а також 8 матеріалів і тез доповідей на всеукраїнських та міжнародних наукових конференціях.

1. Дворщенко К, Берник О, Тіхова Є, Вовк А, Короткий О. Окисна модифікація білків сироватки крові щурів за умов експериментального запалення задньої кінцівки щурів. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. 2015;2(19):76-78.
2. Тіхова ЄВ, Берник ОО, Савчук ОМ, Дворщенко КО, Остапченко ЛІ. Інтенсивність вільнорадикальних процесів у хрящовій тканині щурів з колаген-індукованим артритом. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. 2016;2(21):27-30.
3. 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;4(7):26-30.
4. Tikhova Y, Dvorshchenko KO, Dranitsina AS, Grebinyk DM, Korotkyi OG. and 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 sciences. 2017;8(4):994-1001.
5. Тіхова Є, Тимошенко М, Ковельська Ю, Дворщенко К. Стан глутатіонової системи у сироватці крові щурів при експериментальному артозі та при введенні хондроїтина сульфату. Вісник Київського

національного університету імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2017;1(22):47-50.

6. Тіхова ЄВ, Дворщенко КО, Короткий ОГ, Фалалєєва ТМ, Берегова Т.В. Стан суглобових хрящів при артрозі та після введення тест-зразка «Драстоп». Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. 2017;1(30):99-101.

7. Тіхова ЄВ, Ашпін МК, Воєйков АІ, Табурець ОВ, Дворщенко КО. Перекисне окиснення ліпідів у сироватці крові щурів при гострому запаленні у суглобах. В: XIII Міжнародна наукова конференція молодих науковців «Шевченківська весна 2015: Біологія». Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка. 2015:22.

8. Тіхова ЄВ, Дворщенко КО, Ашпін МК, Воєйков АІ, Короткий ОГ, Остапченко Л.І. Дія хондропротектора на окисно-антиоксидантний баланс у сироватці крові за умов каррагінан-індукованого запалення задньої кінцівки щурів. В: Науково-практична конференція «Мультипробіотики в профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань». Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка. 2015:21.

9. Тіхова ЄВ, Берник ОО, Вовк АА, Проценко ЮА, Компанець ІВ, Дворщенко КО. Окисна модифікація білків сироватки крові щурів при гострому запаленні суглобів. В: Міжнародна міждисциплінарна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна 2016». Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка. 2016:194-195.

10. Тіхова ЄВ, Вовк АА, Короткий ОГ, Дворщенко КО. Окисна модифікація білків у сироватці крові щурів при експериментальному артриті. В: XI Международная научно-практическая конференция «Фундаментальная и прикладная наука – 2016». Sheffield, Science and education ltd. 2016:30-32.

11. Tikhova Ye, Korotkyi O, Kovelska Y, Dvorshchenko K. Positive effect of chondroitin sulfate on prooxidant-antioxidant balance in rat cartilage tissue in the

treatment of osteoarthritis. XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 25 – 27 квітня 2017: матер.конф. Львів, Україна. 2017:73.

12. Тихова ЕВ, Ашпін НК, Короткий АГ, Дворщенко ЕА. Окислительная модификация белков в суставе крыс с коллаген- индуцированным артритом. XII Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Наука и образование - 2017». Астана. Евразийский национальный университет имени Л. Н. Гумилёва. 2017:1042-1046.

13. 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 «Іновації та перспективи сучасної медицини» ВІМСО, 5 – 7 квітня, 2017: матер.конф. Чернівці, Україна. 2017:58.

14. Tikhova Y, Vovk A, Korotkyi O, Dranitsina A, Dvorshchenko K. Effect of chondroprotector on cartilage tissue repairing during experimental osteoarthritis in rats. In: Third Kyiv International Symposium Smooth Muscles Physiology, Biophysics & Pharmacology: from genes and molecules to functions, disorders and their novel treatment opportunities. Kyiv – Lutsk, Taras Shevchenko National University of Kyiv. 2017:74.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові положення дисертаційної роботи були представлені на XIII Міжнародній науковій конференції молодих науковців «Шевченківська весна» (Київ, 2015), XIV Міжнародній науковій конференції молодих науковців «Шевченківська весна» (Київ, 2016), The XII international scientific and practical conference «Fundamental and applied science» (Sheffield, England, 2016), XIII Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2017), XII Международной научной конференции студентов и молодых ученых

«Наука и образование - 2017» (Астана, Казахстан, 2017), IV Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих учених «Інновації та перспективи сучасної медицини» (Чернівці, 2017), Third Kyiv International Symposium Smooth Muscles Physiology, Biophysics & Pharmacology (Київ – Львів, 2017).