

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

Кваліфікаційна наукова
праця правах рукопису

БЛОХІНА ОКСАНА ГРИГОРІВНА

УДК 616.7:615.2/.3:577.125.8

ДИСЕРТАЦІЯ
БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ЗА РОЗВИТКУ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЗАПАЛЕННЯ СУГЛОБУ ТА ЗА УМОВ
ПРОФІЛАКТИЧНОГО ВВЕДЕННЯ ХОНДРОЇТИН СУЛЬФАТУ

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

_____ О.Г. Блохіна

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

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Блохіна О.Г. Біохімічні показники крові за розвитку експериментального запалення суглобу та за умов профілактичного введення хондроїтин сульфату. – 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, 2021.

Сьогодні патології опорно-рухового апарату (ОРА) займають четверте місце за поширеністю після хвороб серцево-судинної системи, органів дихання та травлення. Серед захворювань ОРА провідне місце займають хвороби суглобів, які є однією з найбільш актуальних медико-соціальних світових проблем, що обумовлено їх значним впливом на працездатність, складністю ранньої діагностики та лікування. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, з ними пов'язано 30% випадків тимчасової непрацездатності і 10% інвалідизації населення земної кулі. Значно збільшується захворюваність опорно-рухового апарату й в Україні, де щорічно реєструється до 350 тис. випадків первинних захворювань суглобів, з яких понад 60% припадає на осіб працездатного віку. Таким чином, в зв'язку з широким розповсюдженням данної патології, несприятливим впливом на стан здоров'я, працездатність, психічний та соціальний статус, профілактика та лікування захворювань суглобів є актуальним питанням медицини.

Патогенез більшості захворювань суглобів відбувається внаслідок розвитку запалення, яке проявляється як місцево у самому суглобі, так і системно – в організмі в цілому. Запальні процеси безпосередньо пов'язані з інтенсифікацією вільнорадикальних процесів. Також при запаленні суглобу спостерігаються дегенеративні зміни хрящової тканини, що призводить до структурно-функціональних змін суглобу. У зв'язку з цим важливим є пошук препаратів, які б володіли регенераційними, протизапальними та антирадикальними

властивостями. Серед таких сполук важливе місце займає хондроїтин сульфат, який є специфічним компонентом хряща, що забезпечує його пружність та щільність. За даними літератури, крім відомої структурної функції, молекули хондроїтин сульфату здатні проявляти антизапальні та антиоксидантні властивості. Тому дослідження біологічної дії хондроїтин сульфату на організм є перспективним у профілактиці та лікуванні захворювань суглобів.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню профілактичної дії хондроїтин сульфату на певні показники запалення в крові щурів за умов розвитку каррагінан-індукованого запалення суглобу.

У ході проведених експериментів на гістологічному рівні було показано, що у щурів при субплантарному введенні каррагінану, виявляються ознаки розвитку гострого запалення суглобу (значний набряк навколосуглобових тканин задньої кінцівки, у навколосуглобовій м'язовій тканині спостерігаються вогнищеві інфільтрати, що складаються з лейкоцитів і гістіоцитів та десквамованих фрагментів). Профілактичне введення хондроїтин сульфату тваринам з каррагінан-індукованим запаленням суглобу на гістологічному рівні зменшує інтенсивність запальних явищ у м'язево-суглобовому компоненті задньої кінцівки щурів.

При каррагінан-індукованому запаленні суглобу у сироватці крові встановлено зростання концентрації неспецифічного маркера запалення – С-реактивного білка, а також виявлено розвиток ендогенної інтоксикації – збільшення вмісту молекул середньої молекулярної маси, що є проявом прогресії запалення. За даних експериментальних умов у крові виявлено активацію імунітокінової системи: зростає рівень прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-12 β р40, ФНП- α), при цьому рівень антизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10) залишається незмінним. При тривалому профілактичному введенні хондроїтин сульфату щурам з запаленням суглобу у крові досліджувані показники відновлюються, при цьому рівень антизапального цитокіну ІЛ-10 зростає порівняно з групою тварин з патологією.

При експериментальному запаленні суглобу у крові щурів інтенсифікуються вільнорадикальні процеси: зростає вміст супероксидного радикалу, гідроген пероксиду, вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів (дієнових кон'югатів, ТБК-активних сполук, шиффових основ) та продуктів окисної модифікації білків (альдо- і кетопохідних нейтрального та основного характеру). За даних експериментальних умов у крові порушується робота антиоксидантної системи: знижується супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза активності та вміст відновленого глутатіону, при цьому зростає каталазна, глутатіонтрансферазна активності і вміст окисненого глутатіону порівняно з контролем. При профілактичному введенні хондроїтин сульфату щурам з експериментальним запаленням суглобу у крові відновлюється окисно-антиоксидантний гомеостаз порівняно з групою тварин з каррагінан-індукованим запаленням суглобу.

Також було показано, що за даних експериментальних умов у крові щурів збільшується рівень експресії генів *Ptgs2* (циклооксигенази), *Nos2* (індуцибельної нітрооксидсинтази), *Tgfb1* (трансформуючого фактора росту бета) та *Nfkb1* (транскрипційного фактору NF-κB), що залученні до розвитку запалення. Показано збільшення рівня експресії досліджуваних генів (*Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*, *Nfkb1*) у крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення суглобу. При тривалому профілактичному введенні хондроїтин сульфату щурам з запаленням суглобу у крові досліджувані показники відновлюються порівняно з групою тварин з експериментальним запаленням: рівень експресії генів *Ptgs2* та *Nfkb1* частково відновлюється, а рівень експресії генів *Nos2* та *Tgfb1* повертається до контрольного рівня.

Отже, у даному дисертаційному дослідженні вперше показано, що профілактичне введення хондроїтин сульфату щурам з каррагінан-індукованим запаленням суглобу на системному рівні сприяє зниженню інтенсивності запалення та вільнорадикальних процесів в крові. Отримані дані свідчать про імуномодулюючі, антизапальні та антиоксидантні властивості досліджуваного

препарату на основі хондроїтин сульфату на організм при експериментальному запаленні суглобу.

Ключові слова: гостре запалення суглобу, хондроїтин сульфат, вільнорадикальні процеси, антиоксидантна система.

SUMMARY

Blokhina O.G. Biochemical parameters of blood under the development of experimental joint inflammation and chondroitin sulfate prophylactical addition. – Manuscript.

Thesis for a Candidate Degree in Biology. Specialty 03.00.04 – biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2021.

Nowadays the pathologies of muscle-skeletal system (MSS) in the terms of occurrence firmly take the fourth place after cardiovascular, respiratory and digestive diseases. Among MSS diseases the leading place is devoted to joint pathologies, which are the most actual medical and social problems worldwide, what can be explained by their considerable influence on work efficiency, as well as a complex nature of early diagnostics and treatment. According to the data of World Health Organization (WHO) they are connected to 30% of temporary work disability and 10% Earth population physical disability. The MSS diseases are on the rise in Ukraine also where up to 350000 cases of joint pathologies are registered daily, 60% of which are among persons of working age. Hence, taking into account the widespread distribution of these pathologies, harmful influence of them on health state, work ability, psychological and social standing, the prophylactic and treatment of joint diseases seems to be an actual medical problem.

The pathogenesis of majority of joint diseases happens due to inflammation development, which manifests either locally (inside a joint) or in a systemic way – in a

whole organism. These inflammation processes are tightly connected to free radical production process intensification. Also during joint inflammation degenerative cartilage changes are evident, which leads to structural and functional joint changes. Hence, the most important task in this regard is to search for medications which could provide regenerative, anti-inflammatory, and anti-radical action. Among these substances the most important is chondroitin sulfate which is an integral cartilage component providing its elasticity and density. According to the literature data, aside from a well-known structure function, chondroitin sulfate molecules are able to manifest anti-inflammatory and anti-oxidant properties. This is why the research of chondroitin sulfate biological action on an organism seems to be in perspective for treatment and prevention of joint diseases.

PhD-thesis is devoted to the research of prophylactic action of chondroitin sulfate onto certain parameters of inflammation in rat blood during carrageenan- induced joint inflammation.

During the experiments histologically it was shown that in case of subplantar carrageenan addition the markers of acute joint inflammation development become evident (considerable swelling of hind extremities joint tissues, core infiltrates in muscle tissues around joints, consisting of leukocytes and histiocytes and desquamate fragments). Prophylactic addition of chondroitin sulfate to the animals with carrageenan-induced joint inflammation on the histological level leads to decrease inflammation intensity in muscle and joint components of rat hind extremities.

During the carrageenan-induced joint inflammation the increase of non-specific inflammation marker – C-reactive protein was shown in rat blood serum, as well as the development of endogenic intoxication – the increase of middle molecular mass molecules concentration, which can be regarded as proof of inflammation progression. Under these experimental conditions the activation of immuno-cytokine system in rat blood was shown in the form of the increase of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-12B p40, FNP- α), while the level of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10) remains unchanged. During prolonged prophylactic injection of chondroitin sulfate to rats with

joint inflammation the abovementioned parameters in rat blood become normal, while the level of anti-inflammatory cytokine IL-10 increases in comparison to the animal group with pathology.

Under the experimental joint inflammation it was shown that free radical processes in rat blood intensify: the level of superoxide radical, hydrogen peroxide as well as the amount of lipid peroxidation products (dienic conjugates, TBA-active products, Schiff bases) and products of protein oxidative modification (neutral and basic aldo- and keto-derivatives) increases. Under these experimental conditions the antioxidant system of blood becomes disturbed: the activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase are decreased, as well as the reduced glutathione amount, while the activity of catalase, glutathione transferase and oxidized glutathione amount in rat blood are increased in comparison to controls. After the prophylactic addition of chondroitin sulfate to rats with experimental joint inflammation oxidative homeostasis is restored if compared to the animal group with carrageenan-induced joint inflammation.

It was also shown that under these experimental conditions the level of *Ptgs2* (cyclooxygenases), *Nos2* (inducible NOS synthase), *Tgfb1* (transforming growth factor beta) та *Nfkb1* (transcriptional factor NF-κB) which take part in inflammation development, in rat blood are increased. It was also demonstrated that the levels of researched genes (*Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*, *Nfkb1*) were increased in rat blood under conditions of carrageenan-induced joint inflammation. During prolonged prophylactic injection of chondroitin sulfate to rats with joint inflammation the researched parameters in blood are restored in comparison to the animal group with experimental inflammation: the expression level of *Ptgs2* and *Nfkb1* genes becomes partially restored, while the level of expression of *Nos2* та *Tgfb1* genes reverts to the control values.

Hence, in this PhD thesis we have shown for the first time that prophylactic addition of chondroitin sulfate to rats with carrageenan-induced joint inflammation on systemic level favors the decrease in inflammation intensity, as well as free radical processes in blood. The obtained data indicates to immune-modulative, anti-

inflammatory and anti-oxidant properties of the researched preparation based on chondroitin sulfate on organism under experimental joint inflammation.

Key words: acute joint inflammation, chondroitin sulfate, free radical processes, antioxidant system.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

1. Блохіна О, Короткий О, Кот Л, Неграй Д, Дворщенко К Окисна модифікація білків у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення та тривалого профілактичного введення хондроїтина сульфату. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Серія: Біологія. 2018; 2(76):62-65.

2. Драницина А, Блохіна О, Короткий О, Дворщенко К, Остапченко Л Експресія гена *Ptgs2* у клітинах хрящової тканини колінного суглоба щурів за умов остеоартрозу та при введенні біологічно-активних речовин. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2018;1(24):36-42.

3. Блохіна О, Кот Л, Хілько В, Драницина А, Дворщенко К Вільнорадикальні процеси у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення задньої кінцівки та тривалого профілактичного введення хондроїтина сульфату. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2018; 1(25):6-9.

4. Korotkyi O, Vovk A, Blokhina O, Dvorshchenko K, Falalyeyeva T, Abenavoli L, Ostapchenko L Effect of Chondroitin Sulfate on Blood Serum Cytokine Profile during Carrageenan-induced Edema and Monoiodoacetate-induced Osteoarthritis in Rats. Rev. Recent. Clin. Trials. 2019;14(1):50-55.

5. Блохіна О, Кот Л, Торгалю Є, Дворщенко К Концентрація С-реактивного білка та молекул низької та середньої молекулярної маси у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення та тривалого профілактичного введення хондроїтина сульфату. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2019; 1(26) :17-21.
6. Blokhina OG, Dvorshchenko KO, Dranitsina AS, Grebinyk DM Effect of chondroitin sulfate on oxidative balance in blood serum of rats with acute hind paw inflammation. XI Parnas Conference (Kyiv, Ukraine). Ukr. Biochem. J. 2018;90, Special Issue 2018;165.
7. Блохіна О, Кисельова А, Драницина А, Дворщенко К Дія хондроїтин сульфату на вільнорадикальні процеси у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення. XVII Міжнародна наукова конференція «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки . BioScience Advances», 23 – 25 квітня 2019;Київ, 2019;С. 57-58.
8. Blokhina OG, Dranitsina AS, Dvorshchenko KO, Grebinyk DM, Korotkiy O, Ostapchenko L Expression of NF- κ B gene in blood of rats with acute hind paw inflammation and with administration of chondroitin sulfate. Biomed Talks. Міжнародна науково-практична конференція-школа студентів та молодих вчених 2019; 1(1):15-16.
9. Blokhina OG, Dranitsina AS, Dvorshchenko KO, Grebinyk DM, Korotkiy O, Ostapchenko L Expression of Ptg2 and Nos2 genes in blood serum of rats with acute hind paw inflammation and with administration of chondroitin sulfate. Матеріали XII українського біохімічного конгресу. Медична та клінічна хімія. 2019;21(3): 159-160.
10. Shepeleva A, Blokhina O, Korotkiy A, Dranitsina A, Grebinyk D, Dvorshchenko K Expression of Tgf b2 gene in blood of rats with acute hind paw inflammation and with administration of chondroitin sulfate. XVIII International conference of students and young scientists «Shevchenkivska vesna: BioScience Advances», 2020 may 3 – 5;Kyiv;2020;49-50.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	13
ВСТУП.....	16
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури.....	22
1.1. Етіологія та патогенез захворювань суглобів	22
1.2. Біохімічні зміни у суглобі за умов розвитку запалення	29
1.3. Лікування та профілактика патологічних станів суглобів	33
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	43
2.1. Використані матеріали та реактиви.....	43
2.2. Умови проведення експерименту.....	44
2.3. Гістологічний аналіз зрізів навколосуглобових тканин щурів.....	45
2.4. Отримання сироватки крові щурів.....	46
2.5. Визначення вмісту цитокінів та факторів росту	47
2.6. Визначення концентрації С-реактивного білка	48
2.7. Визначення концентрації молекул низької молекулярної маси	48
2.8. Визначення вмісту супероксидного радикалу	49
2.9. Визначення вмісту гідроген пероксиду	50
2.10. Визначення вмісту дієнових кон'югатів та шиффових основ	50
2.11. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів	51
2.12. Визначення вмісту продуктів окисної модифікації білків	52
2.13. Визначення вмісту загальних, білок-зв'язаних та небілкових SH-груп	53
2.14. Визначення каталазної активності.....	54
2.15. Визначення супероксиддисмутазної активності.....	55
2.16. Визначення глутатіонпероксидазної активності	56
2.17. Визначення глутатіонтрансферазної активності.....	56
2.18. Визначення глутатіонредуктазної активності.....	56

2.19.	Визначення вмісту відновленого та окисленого глутатіону	57
2.20.	Визначення концентрації білка.....	58
2.21.	Кількісна ЗТ-ПЛР.....	58
2.21.1.	Виділення загальної РНК.....	58
2.21.2.	Оцінка рівня експресії генів.....	59
2.22.	Статистична обробка отриманих результатів.....	60
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їх обговорення.....		61
3.1.	Оцінка ступеню запалення в організмі щурів за умов каррагінан-індукованого запалення суглобу та тривалого профілактичного введення хондроїтин сульфату	61
3.1.1.	Гістологічний аналіз навколосуглобових тканин	61
3.1.2.	Концентрація С-реактивного білка у сироватці крові	64
3.1.3.	Рівень молекул середньої молекулярної маси у сироватці крові	67
3.1.4.	Концентрація цитокінів у сироватці крові (ІЛ-1 β , ІЛ-12В р40, ФНП- α , ТФР- β , ІЛ-4, ІЛ-10)	70
3.2.	Інтенсивність вільнорадикальних процесів у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення суглобу та тривалого профілактичного введення хондроїтин сульфату.....	83
3.2.1.	Вміст активних форм кисню.....	83
3.2.2.	Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів.....	87
3.2.3.	Вміст продуктів окисної модифікації білків.....	93
3.3.	Стан антиоксидантної системи у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення суглобу та тривалого профілактичного введення хондроїтин сульфату.....	98
3.3.1.	Ферменти антирадикального захисту	99
3.3.2.	Глутатіонова антиоксидантна система	103

3.4. Рівень експресії ряду генів, залучених до розвитку запалення у крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення суглобу та тривалого профілактичного введення хондроїтин сульфату.....	114
3.4.1. Рівень експресії мРНК гену <i>Ptgs2</i> (циклооксигенази)	114
3.4.2. Рівень експресії мРНК гену <i>Nos2</i> (індуцибельної нітрооксидсинтази)	116
3.4.3. Рівень експресії мРНК гену <i>Tgfb1</i> (трансформуючого фактора росту бета)	118
3.4.4. Рівень експресії мРНК гену <i>Nfkb1</i> (транскрипційного фактору NF-κB)	121
РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	125
ВИСНОВКИ.....	132
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	134
Додаток 1.....	161

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АОС — антиоксидантна система

АФК — активні форми кисню

ВООЗ — Всесвітня організація охорони здоров'я

ГА — глікозамін

ГАГ — глікозаміноглікан

ГЛП — глутатіонпероксидаза

ГЛР — глутатіонредуктаза

ГЛТ — глутатіонтрансфераза

ДК — дієнові кон'югати

ДНФГ — динітрофенілгідрозин

ДТНБК — 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойна кислота

ЕІ — ендогенна інтоксикація

ІЛ — інтерлейкін

КАТ — каталаза

КС — кератан сульфат

МІА — монойодацетат натрію

ММП — матриксні металопротеїнази

МСК — мезенхімальні стовбурові клітини

МСММ — молекули середньої молекулярної маси

НАД⁺ — нікотинамідаденіндинуклеотид окиснений

НАДН — нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений

НАДФН — нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений

НПЗП — нестероїдні протизапальні препарати

НСТ — нітросиній тетразолій

ОА — остеоартрит

ОМБ — окисна модифікація білків

ОП — олігопептиди

ОРА — опорно-руховий апарат

ОС — окисний стрес

ПГ — простагландин

ПЛР — полімеразна ланцюгова реакція

ПОЛ — перекисне окиснення ліпідів

СОД — супероксиддисмутаза

СРБ — С-реактивний білок

ТБК — тіобарбітурова кислота

ФНП- α — фактор некрозу пухлин α

ХС — хондроїтин сульфат

ЦОГ — циклооксигеназа

ШО — шиффові основи

COMP — cartilage oligomeric matrix protein

GSH — reduced glutathione

GSSG — oxidized glutathione

H_2O_2 — пероксид водню

iNOS — inducible nitric oxide synthase

NF- κB , *Nfkb1* — nuclear factor-kappa B

NO — монооксид азоту

NOS — nitric oxide synthase

Nos2 — nitric oxide synthase 2 (inducible)

O_2^- — супероксид аніон радикал

Ptgs2 — prostaglandin-endoperoxide synthase 2

RANKL — receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

SNP — single-nucleotide polymorphism

TGF- β_1 , *Tgfb1* — transforming growth factor beta 1

TLR — toll-liked receptors

TNF- α — tumor necrosis factor-alpha

XTT — 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

ВСТУП

Актуальність теми. На сьогоднішній день захворювання опорно-рухового апарату є актуальною проблемою медицини, а їх профілактика та лікування має першочергове значення для збереження здоров'я населення. Провідне місце серед хвороб опорно-рухової системи займають захворювання суглобів. Вони супроводжуються розвитком запальних процесів, як на рівні компонентів суглобу, включаючи синовіальну оболонку, хрящ, суглобову капсулу, зв'язки, сухожилля, субхондральну кістку, так і на рівні цілого організму [13, 142, 148, 238]. Важливу роль у розвитку та прогресуванні запалення у суглобах відіграє оксидативний стрес, який виникає внаслідок постійної генерації вільних радикалів активованими фагоцитами та за рахунок гіпоксичних процесів при роботі суглобів, що призводить до пошкодження синовіальних клітин, деструкції хрящової тканини, ерозії кісток та суглобових поверхонь. Крім того, при надмірному утворенні вільних радикалів спостерігається виснаження всіх ланок антиоксидантного захисту, що також сприяє формуванню пошкоджень тканин суглобового апарату [82].

Оскільки захворювання опорно-рухового апарату, зокрема суглобів, мають прогресуючий характер, необхідно своєчасно приймати міри для того, щоб зупинити або пригальмувати розвиток патологічних змін у організмі. Важливим є проведення ефективної профілактики даних захворювань, особливо, якщо є генетична схильність до розвитку хвороб суглобів, при професійній ймовірності перевантаження опорно-рухового апарату, переохолодженні, а також у людей похилого віку.

В зв'язку з цим, важливим питанням є пошук засобів для відновлення суглобів. Відомо, що дистрофічні зміни хрящової тканини пов'язані зі зниженням вмісту хондроїтин сульфату, який є природнім компонентом міжклітинної речовини хряща. Дослідженнями останніх років показано, що хондроїтин сульфат виконує не тільки структурну функцію в суглобі, але і володіє антиоксидантними

та антизапальними властивостями [158, 199, 251]. Тому дослідження препаратів, основу яких складає хондроїтин сульфат, є перспективним у профілактиці та лікуванні захворювань суглобів.

Дана дисертація присвячена вивченню профілактичної дії хондропротектора на основі хондроїтин сульфату на розвиток запальних процесів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу щурів.

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

Дисертаційна робота була виконана на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідних тем «Механізми метаболічних процесів в організмі за умов патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.) та «Розробка методичних рекомендацій використання хондропротекторів та мультипробіотиків для корекції патології суглобів» (№ д/р 0118U000243, 2018-2020 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідити профілактичну дію хондроїтин сульфату на біохімічні показники крові за умов розвитку каррагінан-індукованого запалення суглобу.

Відповідно до мети дисертаційного дослідження поставлено наступні завдання:

1. Оцінити ступінь розвитку запалення у щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичному введенні хондроїтин сульфату.
2. Визначити інтенсивність вільнорадикальних процесів у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичному введенні хондроїтин сульфату.
3. Оцінити стан антиоксидантної системи у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичному введенні хондроїтин сульфату.

4. Дослідити рівень експресії генів у крові, залучених у розвиток запалення, при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичному введенні хондроїтин сульфату.

Об'єкт дослідження: біохімічні механізми розвитку запалення в організмі щурів з експериментальним каррагінан-індукованим запаленням суглобу та відновлювальні процеси при профілактичній дії хондропротектора.

Предмет дослідження: маркери запалення, стан окисно-антиоксидантної системи, рівень експресії мРНК генів, залучених у розвиток запалення у щурів за умов каррагінан-індукованого запалення суглобу та при профілактичному введенні хондроїтин сульфату і його протизапальні, імуномодулюючі та антиоксидантні властивості.

Методи дослідження: гістологічні, імуноферментні – визначення вмісту цитокінів, спектрофотометричні – визначення молекул низької молекулярної маси, вмісту супероксидного радикалу, пероксиду водню, продуктів перекисного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків, каталазної, супероксиддисмутазної, глутатіонпероксидазної, глутатіонтрансферазної і глутатіонредуктазної активності, тіолових (SH-) груп; спектрофлюорометричні – визначення вмісту шиффових основ, відновленого та окисненого глутатіону; молекулярно-біологічні – ПЛР-аналіз експресії генів циклооксигенази (*Ptgs2*), індукцибельної нітрооксидсинтази (*Nos2*), трансформуючого фактора росту бета (*Tgfb1*), транскрипційного фактору NF-κB (*Nfkb1*) та методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено дослідження профілактичної дії хондропротекторного препарату – хондроїтин сульфату на біохімічні показники крові щурів при експериментальному запаленні суглобу. Показано взаємозв'язок запалення з процесами вільнорадикального окиснення та функціонуванням системи антиоксидантного захисту у сироватці крові щурів на моделі каррагінан-індукованого запалення суглобу та при профілактичному введенні хондропротектора.

Виявлено, що при каррагінан-індукованому запаленні суглобу у крові активується імунітокінова система: зростає рівень прозапальних цитокінів: інтерлейкіну (ІЛ) ІЛ-1 β , ІЛ-12В р40, фактору некрозу пухлин- α (ФНП- α), що супроводжується збільшенням концентрації С-реактивного білка та вмісту молекул середньої молекулярної маси, які є індикатором розвитку ендогенної інтоксикації та проявом прогресії запалення. За даних експериментальних умов рівень антизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10) залишається незмінним. Доведено збільшення рівня експресії генів, що залучені до розвитку запалення (*Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*, *Nfkb1*) у крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення суглобу. При профілактичному введенні хондроїтин сульфату щурам з гострим запаленням суглобу у крові досліджувані показники відновлюються, при цьому рівень антизапального цитокіну ІЛ-10 зростає порівняно з групою тварин з експериментальним запаленням.

При каррагінан-індукованому запаленні суглобу у крові щурів показано зсув окисно-антиоксидантної рівноваги в напрямку інтенсифікації прооксидантних процесів та розвитку окисного стресу на фоні порушення роботи антиоксидантної системи. Зокрема, у сироватці крові при каррагінан-індукованому запаленні суглобу зростає вміст супероксидного радикалу, пероксиду водню, підвищується 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 запаленні суглобу у сироватці крові знижується супероксиддисмутазна та зростає каталазна активність порівняно з контролем. За даних експериментальних умов у сироватці крові знижуються глутатіонпероксидазна, глутатіонредуктазна активності та вміст відновленого глутатіону, при цьому зростає глутатіонтрансферазна активність та вміст окисненого глутатіону відносно контрольних значень. При профілактичному введенні хондроїтин сульфату щурам з гострим запаленням

суглобу у сироватці крові відновлюється окисно-антиоксидантний гомеостаз порівняно з групою тварин з каррагінан-індукованим запаленням.

Розширено наукові дані про особливості профілактичної дії хондропротекторного препарату на основі хондроїтин сульфату (імуномодуючи, антизапальні та антиоксидантні властивості) на розвиток запалення в організмі щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу.

Практичне значення одержаних результатів. Експериментально доведено ефективність профілактичного застосування хондропротекторного препарату на основі хондроїтин сульфату для зниження запалення суглобу, викликаного каррагінаном. Результати дисертації можуть бути використані у профілактичній медицині, 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.В. 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 XI Парнасівський конференції - Форумі молодих учених "Біохімія та молекулярна біологія для інноваційної медицини" (Київ, Україна, 2018), XVII міжнародній науковій конференції «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances» (Київ, Україна, 2019), міжнародній науково-практичній конференції-школі

студентів та молодих вчених «BIOMED Talks – 2019» (Київ, Україна, 2019), XII українському біохімічному конгресі (Тернопіль, Україна, 2019) та XVIII міжнародній науковій конференції «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances» (Київ, Україна, 2020).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 10 наукових праць, з яких 4 наукові статті у фахових виданнях, що входять до переліку, затвердженому МОН України, одна стаття у виданні, що входить до міжнародної наукометричної бази Scopus, а також 5 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 251 найменування та додаток. Дисертаційна робота викладена на 162 сторінках машинописного тексту (з яких основна частина займає 133 сторінки), ілюстрована 26 рисунками та містить 3 таблиці.

Висновок біоетичної експертизи. Згідно висновку комісії з питань біоетики Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка від 14 січня 2020 року, експериментальні дослідження вважати такими, що не суперечать загальноприйнятим біоетичним нормам, виконані з дотриманням відповідних міжнародних положень стосовно проведення експериментальних робіт та клінічних досліджень і можуть бути використані в матеріалах дисертації.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Етіологія та патогенез захворювань суглобів

Сьогодні патології опорно-рухового апарату (ОРА) займають четверте місце за поширеністю після хвороб серцево-судинної системи, органів дихання та травлення. Серед захворювань ОРА провідне місце займають хвороби суглобів, які є однією з найбільш актуальних медико-соціальних світових проблем, що обумовлено їх значним впливом на працездатність, складністю ранньої діагностики та лікування [65]. За даними ВООЗ, з ними пов'язано 30% випадків тимчасової непрацездатності і 10% інвалідізації населення земної кулі. Значно збільшується захворюваність ОРА й в Україні, де щорічно реєструється до 350 тис. випадків первинних захворювань суглобів, з яких понад 60% припадає на осіб працездатного віку [2, 238].

Серед захворювань суглобів основну кількість складають артрити – запальні захворювання суглобів: інфекційні поліартрити, ревматоїдні артрити, травматичні остеоартрити, подагричні артрити, дистрофічні остеоартрити тощо [107, 144, 173].

Остеоартрит (ОА) є мультифакторним поліетіологічним захворюванням. Він може бути ініційований багатьма факторами, включаючи інфекційні, генетичні, еволюційні, метаболічні та травматичні [167].

ОА буває первинним і вторинним. Якщо причина розвитку захворювання не встановлена, то такий остеоартрит прийнято називати первинним, або ідіоматичним. Факторами ризику первинного ОА є: спадкова схильність, надлишкова маса тіла, похилий вік, специфічні професії. Крім цього, захворюваність на ОА залежить від статі та расової/етнічної приналежності. До генетичних факторів відносяться: спадкові порушення і мутації колагену II типу,

інші спадкові захворювання кісток і суглобів, вроджені порушення розвитку суглоба (дисплазії) [162].

Вторинний ОА має явну причину: він розвивається як результат запального процесу (гнійне запалення суглоба, ревматоїдний артрит, артрит при туберкульозі), при порушеннях метаболізму, ендокринних захворюваннях, як результат дегенеративно-некротичного процесу (асептичний некроз головки стегнової кістки, розсікаючий остеохондрит (хвороба Кеніга), хвороба Пертеса) або після травми [205].

Частою причиною ОА є запалення, яке призводить до пошкоджень тканин суглоба і розвитку вторинного остеоартриту. Найчастіше це є результатом аутоімунних захворювань (наприклад, ревматоїдний артрит), рідше – інфекційного процесу (наприклад, гостре гнійне запалення суглоба, викликане стафілококом або іншою специфічною інфекцією (при гонореї, сифілісі, кліщовий енцефаліт)). ОА також є досить поширеним ускладненням при хронічних гемартрозах (гемофілія) [54, 194].

Ще однією групою факторів ризику ОА є фактори навколишнього середовища: переохолодження, порушення екологічної рівноваги, дія хімічних токсинів, травма суглоба, повторювані мікротравми, операції на суглобах (наприклад, менісектомія) та надмірні фізичні навантаження.

Розвиток і прогресування ОА також пов'язані з такими множинними факторами, як: вік, остеопороз, надлишкова маса тіла, порушення ендокринного балансу організму, у тому числі зниження секреції естрогенів (постменопаузі), метаболічні порушення в організмі, дефіцит в організмі мікроелементів, порушення розвитку (дисплазія) і набуті захворювання кісток і суглобів, нейродистрофічні прояви патологічного процесу в попереково-крижовому (синдром попереково-клубового м'язу), або в шийному відділі хребта (плече-лопатковий періартрит) та запальний процес у суглобі, наявність супутніх запальних захворювань [167, 207].

ОА є результатом дії механічних і біологічних факторів, які порушують процеси утворення клітин суглобового хряща і субхондральної кістки. ОА вражає всі тканини суглобів. Захворювання проявляється морфологічними, біохімічними, молекулярними і біомеханічними змінами в клітинах і матриксі, які призводять до розм'якшення, разволокнення, виразок та зменшення товщини суглобового хряща, а також до остеосклерозу з різким потовщенням і ущільненням кортикального шару субхондральної кістки, формуванню остеофітів і розвитку субхондральних кіст. ОА проявляється артралгіями, обмеженням рухів, рецидивуючим синовітом, локальним запальним процесом в різних тканинах суглоба [107, 142, 181].

Незалежно від причини, розрізняють три стадії ОА. На першій або початковій стадії ОА немає виражених морфологічних порушень тканин суглоба. Зміни стосуються тільки функції синовіальної оболонки, біохімічного складу синовіальної рідини, яка за рахунок дифузії живить хрящ і меніски суглоба. Суглоб втрачає здатність протистояти звичному для нього навантаженню, перевантаження суглоба супроводжується запаленням і больовим синдромом. На другій стадії захворювання починається руйнування суглобного хряща і менісків. Кістка реагує на навантаження суглобової площадки крайовими розростаннями – остеофітами. Друга стадія неминуче переходить у третю – стадія важкого ОА. Її ознаки – виражена кісткова деформація опорної частини суглоба, яка змінює вісь кінцівки. Укорочення зв'язок суглоба призводить до патологічної рухливості суглобу або в поєднанні з жорсткістю суглобової сумки – до різкого обмеження природних рухів – контрактур. Хронічне запалення і хронічний больовий синдром зазвичай супроводжують 2 і 3 стадію [181, 185].

На початковій стадії захворювання м'язи, які здійснюють рух у суглобі, ослаблені, але, загалом, не змінені. На другій стадії спостерігається порушення функції м'язів за рахунок порушення рефлекторної нейротрофічної регуляції. На третій стадії захворювання навантаження суглоба і рухова активність різко порушується, у зв'язку з контрактурами і порушенням осі кінцівки змінюється амплітуда скорочення м'яза, змінюються нормальні точки прикріплення м'язово-

сухожильного комплексу. Це супроводжується укороченням або розтягуванням м'яза, зниженням здатності до повноцінного скорочення. Трофічні порушення при захворюванні суглоба стосуються не тільки м'язів, але і всіх тканин кінцівки [86].

Ключовими симптомами ОА є біль і нестабільність суглоба. При рентгенографії відзначається звуження суглобової щілини, що розглядається як основна клінічна ознака захворювання. Поряд із зумовленою ОА деградацією хряща відбуваються зміни субхондральної кістки з утворенням остеофітів та ремоделювання кісткової тканини. Типовими є синовіт (запалення синовіальної оболонки), зміна рівнів запальних медіаторів у синовіальній рідині, а також дегенерація зв'язок, ураження менісків, гіпертрофія суглобової капсули [33].

Нині ОА широко розглядають як системне захворювання, в основі розвитку якого лежить багато взаємодіючих причин та механізмів. Проте, хронічний характер залучення тканин до патологічного процесу при ОА залишається неоднозначним, і хрящ може бути не єдиним початковим місцем, з якого поширюється ОА. Одночасно спостерігаються зміни в периартекулярних тканинах (м'язах, нервах, зв'язках, жировій тканині), які сприяють формуванню характерних симптомів ОА. Взаємні, перехресні впливи між хрящовою й іншими тканинами свідчать про те, що втрата суглобового хряща може виникати вторинно щодо інших пов'язаних з ОА змін суглоба [84].

Розвиток ОА – це метаболічно активний, динамічний процес, який залучає всі тканини суглоба (суглобовий хрящ, субхондральну кістку, синовіальну оболонку, капсулу, зв'язки і навіколосуглобові м'язи).

Основним патологічним проявом ОА є порушення структури, функцій та метаболізму матриксу суглобового хряща, найважливіша функція якого – адаптація суглоба до механічного навантаження та забезпечення вільного руху суглобових поверхонь. Хрящ на 98% складається з хрящового матриксу, основними компонентами якого є макромолекули колагену різних типів (переважно II тип), що утворюють міцний волокнистий каркас, та протеоглікани (ПГ), які забезпечують пружно-еластичні властивості матриксу. 90% ПГ хряща

належить до родини агреканів. Їх молекула складається з білкового ядра, до якого приєднані ланцюги глікозаміногліканів (ГАГ) – хондроїтин сульфату (ХС), кератан сульфату (КС) та гіалуронової кислоти (ГК). Структура агрекана забезпечує дуже високу гідрофобність і низьку в'язкість. Лише 1-5% маси хряща складають клітини: хондроцити та хондробласти, але саме вони відповідають за функціональний стан хрящового матриксу та синтезують практично всі його компоненти. Хондроцити – клітини, що регулюють обмін хрящової тканини, тобто синтез (анаболізм) і деградацію (катаболізм) агреканів, а також інших компонентів хрящового матриксу. Так, хондроцити із глюкози в присутності глютаміну синтезують глюкозамін, похідними якого є ХС та КС. В нормі ці процеси перебувають в збалансованому стані, але за умов розвитку ОА спостерігається порушення нормального обміну хрящової тканини в бік переважання катаболічних процесів над анаболічними [103, 180].

Характерною ознакою деструкції хряща при ОА є втрата матриксом ГАГ – ХС, КС, гіалуронової кислоти на рівні поверхневої, проміжної та глибокої зон. Крім того, відмічається зменшення молекули ПГ, яка набуває здатності до виходу з матриксу хряща. ПГ (змінені та дрібні) здатні поглинати воду, але не здатні її втримувати. Надлишкова вода поглинається колагеном, він набрякає та розволокнюється, що веде до зниження резистентності хряща. За таких умов хондроцити синтезують ПГ, які не здатні до агрегації, і замість нормального продукують колаген IX, X типів, що не утворює фібрил [141].

Суттєву роль в розвитку катаболічних процесів у хрящі при ОА відіграють деструктивні ферменти – лізосомальні протеази (катепсини) та нейтральні металопротеїнази (ММП) (стромелізін, колагенази, агреканази, желатиназа), які викликають деградацію колагену та ПГ хряща [176]. Активатором ММП вважають плазміноген, що утворюється під впливом тканинного активатора плазміногену, який синтезується хондроцитами або клітинами синовіальної рідини, інтерлейкіном-1 (ІЛ-1) та ін. ММП активно синтезуються під впливом прозапальних цитокінів і здатні руйнувати компоненти позаклітинного матриксу

[68]. Хондроцити виділяють також інгібітори ММП і тканинного активатора плазміногену, які перешкоджають активації ферментів і їх руйнівній дії на тканину хряща.

Значення ММП при ОА сьогодні активно вивчається. Встановлено, що ММП приймають участь не тільки в деградації хрящової тканини, а й у підтримці гомеостазу нормального хряща. ММП та продукти деградації агреканів виявляються в синовіальній рідині здорових людей. Експериментальні дані свідчать, що матрична рибонуклеїнова кислота ММП-1, -3 та -13 постійно експресується в хрящовій тканині суглобів [103]. Дослідження, у яких застосовували інгібітори різних ММП, показують, що ММП-13, відіграє важливу роль у деградації колагену II типу [43]. Стимуляція MMP-13 колагеновими молекулами здійснюється через DDR-2 рецептор, активація якого запускає внутрішньоклітинні сигнальні шляхи за участю мітоген-активованої протеїнкінази p38 (MAPK p38), та ядерного фактора NF- κ B, та призводить до зміщення метаболізму хондроцитів в бік катаболізму, що може виявлятися початковим етапом розвитку незворотніх дегенеративних процесів, які спостерігаються при ОА [170].

Слід відмітити значення в патогенезі ОА кристалів пірофосфату кальцію та гідроксиapatиту кальцію, які часто виявляють в синовіальній рідині. Їх наявність корелює з рентгенологічними змінами в суглобах і наявністю реактивного синовіту. Кристали гідроксиapatиту здатні стимулювати мітогенез і синтез простагландинів у хондроцитах, а також синтез і секрецію ММП [231].

Існує гіпотеза судинного генеза дегенеративних захворювань суглобів, яка полягає у зміні кровопостачання субхондральної кістки, розвитку гіпертензії, набряку та мікрофрактур з подальшим ремоделюванням та склерозуванням, що призводить до зміни умов навантаження на суглобовий хрящ та розвитку ОА [76].

Залишається актуальним питанням репаративної можливості суглобового хряща при пошкодженні. Анаеробний характер метаболізму хрящової тканини обумовлює низьку інтенсивність процесів обміну речовин у зрілій тканині.

Фізіологічну втрату суглобового хряща відновлюють клітини проміжної зони. Упродовж року відбувається оновлення близько 50% всіх ПГ у суглобових хрящах дорослої людини [151]. На фізіологічну регенерацію суглобового хряща впливає остеогенний протеїн-1, що експресується хондроцитами середньої та глибокої зони хряща. Зниження рівня остеогенного протеїну-1, що спостерігається під час старіння людини, сприяє розвитку ОА [120].

Слід зазначити, що у тканинах суглобового хряща відсутня капілярна мережа і трофічні процеси здійснюються шляхом дифузії речовин із синовіальної рідини при русі суглоба. За умов, якщо суглоб зменшує або припиняє функціонування (артрит, травма, ін.), то трофіка хондроцитів погіршується і репарація хрящової тканини призупиняється [146].

Отже, на сьогодні сформоване уявлення про ОА не лише як про комплексну патологію, що уражує всі складові частини суглоба, але й як про гетерогенний синдром, який може бути спричинений різноманітними факторами, прогресує та згодом призводить до формування загального клінічного фенотипу. Серед найбільш загальних факторів ризику розвитку ОА виділяють: вік, генетичну схильність, попередні травми суглобів, ожиріння та механічні фактори, такі як дисплазія або недостатність зв'язкового апарату [142].

Патологічні зміни, що спостерігаються при ОА, включають, окрім уже зазначених деградації суглобового хряща та запалення синовіальної оболонки, також зміни субхондральної кістки з утворенням остеофітів, дегенерацію зв'язок та менісків, гіпертрофію суглобової капсули. Одночасно спостерігаються зміни в периартикулярних тканинах – м'язах, зв'язках, нервах, жировій тканині, що сприяють формуванню характерної картини симптомів ОА. Патологічні зміни в суглобах відбуваються синхронно, паралельно, що дозволяє розглядати ОА саме як хворобу суглоба як органа.

1.2. Біохімічні зміни у суглобі за умов розвитку запалення

Запалення все частіше розглядається як провідний чинник розвитку та прогресування симптомів багатьох захворювань суглобів, зокрема ОА [170, 194].

Під час запалення в суглобах порушуються процеси агрегації протеогліканів: зменшується кількість агрегатів, скорочується середній розмір одного агрегату. Порушення агрегації протеогліканів є одним з ранніх біохімічних симптомів ОА. На початкових стадіях захворювання активується біосинтез глікозаміногліканів хондроцитами, що, очевидно, можна розглядати як компенсаторну реакцію. Різке збіднення матриксу суглобового хряща протеогліканами відбувається разом зі значним підвищенням вмісту води, що є головною причиною набрякання суглобового хряща на ранніх стадіях процесу. Припускають, що надлишковій гідратації хрящів може сприяти збільшення гідрофільності колагенових волокон [176, 211].

При ОА змінюється фенотип хондроцитів, вони синтезують замість колагену II типу колаген IX, X типів; збільшується загальний вміст неколагенових білків, а також інтенсифікується їх біосинтез. Концентрації нуклеїнових кислот у тяжких випадках знижені, що свідчить про скорочення клітинної популяції внаслідок загибелі частини клітин. Водночас різко зростає біосинтез ДНК, що є результатом підвищення мітотичної активності хондроцитів, а також РНК, що означає підвищення метаболічної активності клітин [205].

Підвищена метаболічна активність не тільки стимулює біосинтез протеогліканів, колагену і неколагенових білків — учасників репаративних процесів у хрящі, а й лежить в основі його катаболічних потенцій. Різко зростає активність кислих лізосомальних гідролаз. В осередках деструкції суглобового хряща при ОА виявляється значне підвищення однієї з лізосомальних протеїназ — катепсину, який розщеплює стрижневий білок протеогліканів і викликає цим вивільнення й подальше виведення з матриксу глікозаміногліканів. Вважають, що

саме такий механізм забезпечує характерне для ОА збіднення хрящової тканини протеогліканами. В остеоартротичному хрящі стає помітною активність колагенолітичних ферментів, яка практично відсутня в нормальному його стані. Посилений колагеноліз компенсує гіперпродукування колагену, і загальна концентрація колагену в хрящі майже не змінюється [120, 211].

Підвищення рівня С-реактивного білка з високою чутливістю відображає запалення синовіальної оболонки у пацієнтів з ОА і пов'язане з рівнем больового синдрому. Відзначимо, що синовіальне запалення досить часте і при травматичному пошкодженні менісків і асоціюється з рівнем болю і дисфункції суглоба. Деградовані хрящові фрагменти подразнюють синовіальну оболонку, викликаючи продукцію медіаторів запалення. Синовіальні макрофаги продукують численні прозапальні медіатори, в результаті чого порушується баланс репарації і деградації хряща з переважанням останньої.

Останнім часом йде активне накопичення даних про ініціальну та провідну роль запальних медіаторів у розвитку та прогресуванні ОА. Джерелом таких медіаторів можуть слугувати як клітини суглоба, так і інші тканини організму, насамперед жирова тканина (особливо у пацієнтів з ожирінням і метаболічним синдромом), які надходять в системний кровоток і досягають суглоба через субхондральну кістку. Ці прозапальні медіатори надалі визначають ремоделювання хрящової, кісткової і синовіальної тканин [54, 86].

Значна роль в ушкодженні хряща належить прозапальним цитокінам, зокрема інтерлейкіну (ІЛ) -1, фактору некрозу пухлин- α (ФНП- α), ІЛ-6, ІЛ-15, ІЛ-17 та ІЛ-18 [117, 208]. Їх синтез активованими хондроцитами, синовіальними клітинами або остеоцитами, секреція, та їх дія через рецептори на клітинах-мішенях відбувається вже на ранній стадії запалення. ІЛ-1 β і ФНП- α вважають головними медіаторами деструкції суглобового хряща [116]. Механізм їх дії багатокомпонентний: під впливом ІЛ-1 і ФНП- α запускається лізосомний механізм клітинного пошкодження з руйнуванням колагену і протеогліканів суглобового хряща матриксними протеїназами. У синовіальній рідині та

суглобовому хрящі хворих на ОА виявлено підвищення концентрацій цих цитокінів, які зростають з подальшим пошкодженням та деструкцією суглобового хряща. Синовіальна оболонка також продукує підвищену кількість ІЛ-6, ІЛ-10, гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор, а також молекули судинної та міжклітинної адгезії [138, 153]. Деякі цитокіни (такі як ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-11 та ІЛ-13) володіють протизапальними, а іноді й анаболічними ефектами, модулюють запальну відповідь, таким чином знижують ферментативну деградацію кісткової тканини та уповільнюють прогресування ОА [121, 137, 193, 223].

Під впливом ІЛ-1 стимулюється індукбельна форма синтетази оксиду азоту (NOS), що міститься в хондроцитах. Підвищення рівня NO призводить до розвитку резистентності хондроцитів до дії факторів росту, що інгібує синтез компонентів хрящового матриксу, а також індукує апоптоз хондроцитів [117]. Оксид азоту здатний ушкоджувати позаклітинний матрикс хряща, а також знижувати рівень інгібітора ІЛ-1 та антагоніста рецептора ІЛ-1, що призводить до підвищення біологічної активності цього цитокіну. Застосування інгібіторів NOS за умов експериментального артрити викликало зменшення запального процесу в синовіальній оболонці, деструкції хряща та кістки [13].

Характерною особливістю хондроцитів при ОА є також гіперекспресія двох ізоформ циклооксигенази (COX) – ключового ферменту метаболізму арахідонової кислоти, який регулює синтез простагландинів (ПГ). COX-1 – конституційний фермент, який постійно присутній у клітинах і регулює синтез ПГ, які забезпечують нормальну функціональну активність клітин, а саме: синтез тромбаксану A_2 тромбоцитами, простацикліну – клітинами ендотелію та слизової оболонки шлунка. COX-2 обумовлює синтез ПГ, які викликають запалення, мітогенез, клітинну проліферацію та деструкцію. Активація COX-2 в хондроцитах супроводжується підвищеним синтезом простагландину E_2 та колагенази і прискоренням процесів деградації хряща. ПГ E_2 , відповідальний за вазодилатацію та біль, а також підвищує синтез стромелізину. За таких умов лейкотриєни чинять хемотаксичну дію, залучаючи лейкоцити в порожнину суглоба. Доведено, що

медіатори запалення, включно цитокініни, фактори росту та простагландини залучені в патогенез ОА, як на системному, так і на локальному рівні [119, 171].

Прозапальні цитокіни також викликають синовіальний ангіогенез і сприяють подальшій продукції медіаторів запалення синовіальних клітинами. Вплив на хондроцит аномальних позаклітинних стимулів, таких як прозапальні синовіальні цитокіни, матричні зміни, паракринні і аутокринні фактори, індукують безліч аномальних клітинних відповідей, призводячи до змін катаболізму та анаболізму, апоптозу і змін клітинного фенотипу, який стосується клітин, що диференціюються, гіпертрофованих хондроцитів і клітин-попередників хондроцитів [84].

Виявилося, що будь-яке незвичне механічне напруження - розтягнення, стиснення, компресія, навантаження зсуву, гідростатичний тиск - може бути перетворено у внутрішньоклітинні сигнали за допомогою механорецепторів, розташованих на поверхні клітин суглоба (механосигналінг). Ці сигнали можуть призвести до надлишкової експресії прозапальних медіаторів, таких як простагландини, цитокіни, хемокіни, в хондроцитах і клітинах субхондральної кістки. Перетворення механічного сигналінгу в синтез медіаторів запалення опосередковується активацією внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, насамперед через NF- κ B і MAPK [59, 116, 154].

Отже, ініціація ушкодження хряща і його подальше ремоделювання визначаються різними самостійними механізмами, можливо, незалежними на ранніх етапах ОА, але вони тісно переплітаються в пізніх його стадіях.

Таким чином, різні етіологічні фактори та складний патогенез ОА за участю різних медіаторів, що призводять до імунних порушень з розвитком запалення та деструкції хрящової тканини, зумовлюють необхідність пошуку шляхів профілактики та лікування препаратами з різною патогенетичною дією та з урахуванням супутніх патологій.

1.3. Лікування та профілактика патологічних станів суглобів

Профілактика та лікування захворювань суглобів залишається актуальною проблемою сучасної медицини. Це пов'язано з багатофакторністю розвитку патології з одного боку, а з іншого – з симптоматичною дією більшості препаратів, що застосовуються для її лікування.

Незважаючи на значну кількість експериментальних і клінічних досліджень, не існує ефективних фармакологічних засобів лікування ОА, які достовірно позитивно можуть впливати на біохімічні, імунозапальні та біомеханічні чинники, що лежать в основі розвитку даного захворювання. Тому сьогодні надзвичайно актуальним завданням є пошук і оцінка ефективності нових методів та засобів профілактики та лікування ОА, які матимуть комплексний вплив на суглобові тканини, володітимуть протизапальними властивостями, особливо на ранніх стадіях захворювання, та запобігатимуть прогресуванню дегенерації суглобового хряща з мінімальними побічними ефектами [102].

Рекомендації щодо терапії ОА включають фармакологічні, нефармакологічні (модифікація способу життя, зменшення ваги тіла, фізіотерапія та адекватна фізична активність) та хірургічні методи, базовими принципами яких є запобігання прогресуванню хвороби, зменшення запального процесу та інтенсивності больового синдрому, уповільнення дегенерації хряща та відновлення функції суглоба [37, 115].

Відповідно до рекомендацій ВООЗ, Європейського товариства з клінічних та економічних аспектів остеопорозу та остеоартриту (ESCEO), Міжнародного товариства з вивчення остеоартриту (OARSI) та ін. для лікування ОА застосовують швидкодіючі симптом-модифікуючі засоби — нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП), глюкокортикостероїди, анальгетики, а також препарати сповільненої дії, що модифікують структуру хряща [23]. Ці препарати характеризується різною швидкістю настання симптомомодифікуючого ефекту.

Однак, безперечним є той факт, що ці симптом-модифікуючі засоби мають також і патогенетичний вплив на певні ланки патогенезу ОА.

На підставі аналізу даних доказової медицини Європейською антиревматичною лігою (EULAR) були розроблені та прийняті рекомендації з лікування патологій суглобів. Вказані рекомендації передбачають чотири основні групи лікувальних процедур при остеоартриті: нефармакологічне лікування, фармакологічне лікування, інтраартикулярне лікування та хірургічне лікування. На ранніх стадіях лікування спрямоване на розвантаження хворого суглоба та застосування медикаментозних і хірургічних методів для покращення гемомікроциркуляції, зменшення запального процесу за його наявності, зменшення больового синдрому, остеотропні та хондропротекторні медикаментозні засоби. У кінцевих стадіях, коли медикаментозне лікування зазвичай неефективне, застосовується ендопротезування ураженого суглоба, а в разі його неможливості та за наявності протипоказань – артродез. Таким чином, терапія ОА має бути індивідуальною та комплексною. Оптимальним вважається поєднання немедикаментозних та медикаментозних методів лікування [7, 23, 37, 90, 137].

Тривалий час основними медикаментозними засобами у терапії ОА були НПЗП, проте їх застосування не позбавлене недоліків. За їх застосування є достатньо високою ймовірність розвитку шлунково-кишкових, кардіоваскулярних, нефрологічних побічних явищ, особливо в осіб похилого віку. Прийом НПЗП ускладнює протікання артеріальної гіпертензії, знижує ефективність антигіпертензивної терапії [7]. Призначення натомість селективних інгібіторів циклооксигенази-2 знижує ризик розвитку гастропатій та, як правило, не впливає на протікання гіпертензії, проте пов'язане з ризиком інших ускладнень у серцево-судинній патології [124].

У цьому світлі набуває актуальності застосування протиартритних препаратів повільної дії – хондропротекторів. Показано, що ці препарати володіють не лише симптом-модифікуючою, але й структурно-модифікуючою

дією та знижують потребу пацієнтів у супутній аналгетичній терапії [66]. До хондропротекторів відносять структурні аналоги хрящової тканини: хондроїтин сульфат, глюкозамін сульфат, препарати гіалуронової кислоти, а також комплексні та комбіновані їх препарати.

Існуюче розмаїття хондропротекторів можна систематизувати наступним чином:

1. Препарати першого покоління, до яких відносять засоби, в основі яких лежать натуральні компоненти: екстракти рослинного або тваринного походження (Алфлутоп, Румалон). Однак, більшість з них в даний час обмежено використовується в клінічній практиці через слабку доказову базу їх ефективності.

2. Друге покоління представлено більш очищеними монопрепаратами, основною діючою речовиною яких є хондроїтин сульфат, глюкозамін сульфат, гіалуронова кислота (Драстоп, Дона, Структум, Артрадол).

3. У третьому поколінні представлені хондропротектори, основу яких становить комбінація ГА і ХС, нестероїдного протизапального засобу або інших лікарських препаратів (вітаміну Е, поліненасичених жирних кислот). Серед таких препаратів Терафлекс адванс, Артра, Артрон, Мовекс. Порівняно з препаратами першого покоління, препарати двох останніх мають більш точний склад, доведену клінічну ефективність, підтверджено сприятливий вплив на хрящ, що й визначає високий рівень обґрунтованості їх застосування при ОА [7, 47, 100].

Початок адекватного лікування ОА в перші 3 місяці від появи симптомів дозволяє зберегти працездатність хворого в 75% випадків протягом десяти й більше років. Якщо лікування не було почато вчасно пацієнти вимушені відновлювати функціональність суглобу за рахунок хірургічного лікування. Однак, ендопротезування суглобів є складним операційним втручанням, яке може супроводжуватися розвитком ускладнень. Тому необхідно своєчасно приймати міри для того, щоб зупинити або пригальмувати розвиток патологічних змін в організмі при ОА.

Профілактика захворювань є однією з найважливіших задач сучасної охорони здоров'я, яка закладена у цілому ряді державних програм. Людина з самого раннього віку може бути схильна до різних захворювань. Вони впливають на тривалість і якість її життя, знижують працездатність і навіть стають причиною інвалідності та соціально-побутової беспорядності. Деякі хвороби характеризуються високою смертністю, інші підвищують ризик народження нащадків з різними відхиленнями, треті роблять хвору людину небезпечною для оточуючих і можуть привести до епідемій. У багатьох випадках профілактичні заходи здатні попередити розвиток захворювань або зробити їх прогноз більш сприятливим. Таким чином, грамотна і комплексна профілактика в цілому дозволить знизити захворюваність і ризик виникнення різних епідемій, скоротити тривалість розвитку хвороб та пришвидшити відновлення працездатності [23].

Важливою задачею охорони здоров'я є попередження артритних захворювань, оскільки впродовж всього нашого життя суглоби відчують сильні навантаження, особливо страждають колінні суглоби і голеностоп. Поступово хрящові тканини суглобів зношуються, порушуються функції суглобів, а при наявності деяких супутніх захворювань – ці процеси прискорюються. З віком ризик виникнення захворювань суглобів лише зростає, саме тому профілактику необхідно починати якомога раніше [161].

До факторів ризику, які можуть призвести до розвитку симптомів ОА, належать надлишкова вага, неправильне харчування, систематичні травми і переломи, сильне навантаження на суглоби, яке пов'язане з умовами праці та життєдіяльності [142].

У профілактиці захворювань суглобів важливим є підхід, що охоплював би ключові принципи персоналізованої медицини, яка, цілком підходить для таких захворювань, як ОА. Так, при колінному ОА захворювання є неоднорідним за рівнем факторів ризику та темпів прогресування, і лікування не працює однаково добре для всіх пацієнтів.

В цілому, профілактика ОА складається з комплексу заходів, призначених для попередження виникнення захворювань суглобів. Щоб запобігти складного і дорогого лікування, продовжити молодість і здоров'я, рухливість суглобів, варто дотримуватися принципів, правил, які пропонують лікарі: стежити за вагою власного тіла, так як зайва вага передбачає швидше «зношування» суглобів; підіймати важкі предмети не згинаючи хребет вліво-вправо, уникаючи травм і зайвих навантажень на суглоби та м'язи; регулярно займатися фізичними вправами, які розвивають «м'язовий корсет» і цим зменшують навантаження на суглоби; зменшити вживання цукру та інших легко засвоюваних вуглеводів; не курити і не вживати алкоголь; зберігати правильну поставу; організувати робоче місце так, щоб сидіти зручно і не напружувати спину і шию; робити перерви в роботі, яка пов'язана з тривалим сидінням чи, навпаки, стоянням. Також збалансовано харчуватися, включаючи в раціон поліненасичені жирні кислоти (жирна риба, риб'ячий жир) і кальцій (молочні продукти, риба), уникаючи тваринних жирів, їсти більше овочів та фруктів. Омега-3-ненасичені жирні кислоти полегшують симптоматику вже розвинутого артрити за рахунок синтезу резолвіну – протизапальної молекули [7, 93].

Внаслідок старіння населення та підвищення рівня ожиріння та його фізичної бездіяльності необхідні стратегії первинної та вторинної профілактики для запобігання розвитку ОА. Стратегії первинної профілактики призначені для запобігання виникнення специфічних захворювань за рахунок зменшення ризику шляхом зміни поведінки або впливу, які можуть призвести до захворювання, або шляхом підвищення стійкості до впливу на збудник захворювання. Так, прикладом такої стратегії для ОА коліна є попередження травм коліна та ожиріння під час підліткового віку. Вторинна профілактика включає виявлення факторів ризику та лікування хвороби, яка вже виникла у людей, для зниження її прогресування. Приклади, що стосуються вторинної профілактики ОА коліна включають виявлення та моніторинг збільшення ваги, порушення динамічної стабільності суглобів і функціонування м'язів та подальше втручання з

управлінням вагою та цілеспрямованою лікувальною фізкультурою у тих, хто вже переніс травму коліна. Таким чином, для попередження розвитку ОА важлива персоналізація стратегій профілактики, успіх яких залежить як від відповідальності самого хворого, так і від мотивації та підтримки лікаря [48, 229].

Особлива складність відновлення суглобів пов'язана з тим, що хрящова тканина не має судин, по яких надходять поживні речовини. Тому все необхідне для відновлення хряща надходить або з боку кістки, або з боку синовіальної рідини, яка знаходиться всередині суглоба. Тому дуже важливо забезпечити хондроцити, що входять в структуру хряща, необхідними поживними речовинами. В зв'язку з цим, серед заходів вторинної (виявлення і лікування захворювань на ранніх стадіях при наявності факторів ризику) та третинної (проводиться після підтвердження основного діагнозу та покращує прогноз і полегшує перебіг захворювання) профілактики ОА важливе місце займають хондропротектори. Вони допомагають усунути причину появи болю в суглобах і дискомфорту за рахунок уповільнення процесів руйнування хрящової тканини. Важливо, що хондропротектори можна і потрібно використовувати тривалий час на відміну від протизапальних препаратів. Ці препарати несуть менший ризик побічних ефектів, якщо порівнювати їх з багатьма представниками класу нестероїдних протизапальних засобів, не впливаючи на слизову оболонку шлунка, серцево-судинну систему і тощо. Вони захищають структуру хряща від руйнувань, продовжуючи здоров'я і зберігаючи рухливість «зношеним» суглобам [37, 235].

Важливим представником серед хондропротекторів є хондроїтин сульфат (ХС), який є незамінним компонентом суглобів. Хондроїтин сульфат разом з кератин сульфатом, дерматин сульфатом, гепаран сульфатом та гепарином належить до групи сполук, які мають загальну назву – сульфатовані глікозаміноглікани. Хондроїтин сульфат – один з основних компонентів сполучної тканини, він входить до складу кістки, хряща, сухожиль, зв'язок, виконуючи ряд найважливіших обмінних і біомеханічних функцій. ХС це

нерозгалужена, полідисперсна, складна макромолекула, що складається з довгих нерозгалужених альтернативних дисахаридних послідовностей різних сульфатованих залишків D-глюкуронової кислоти та N-ацетил-D-галактозаміну. Хондроїтин-4-сульфат складається з дисахаридів, сульфатованих в положенні 4 N-ацетил-D-галактозаміну, в той час як хондроїтин-6-сульфат в основному складається з дисахаридного блоку, сульфатованого в положенні 6 N-ацетил-D-галактозаміну, що обумовлює поліаніонні властивості молекули та її участь в процесах транспорту води, амінокислот і ліпідів в аваскулярних ділянках хряща. Довгі ланцюги ХС, що входять до складу екстрацелюлярного матриксу, визначають найважливіші біомеханічні властивості хрящової тканини і виконують важливі біологічні функції при запаленні, проліферації, диференціації, міграції клітин, морфогенезі, органогенезі тканин та відновленні ран [48, 100, 228].

Ця речовина входить до складу суглобової рідини, сполучної тканини і хряща. ХС синтезується хрящовою тканиною суглобів з глюкозаміну. Він входить до складу агрекану – макромолекули, що формує мікрооточення, в якому функціонують хондроцити суглобового хряща, впливаючи таким чином на їх метаболізм. Важливою властивістю ХС є також його здатність впливати на проліферацію та обмін хондроцитів [102].

Недостатній вміст хондроїтин сульфату призводить до дегенеративних процесів опорно-рухового апарату. При його дефіциті розвиваються структурні зміни хрящів. У патологічний процес залучаються хрящові прокладки, які грають амортизуючу і стабілізуючу роль. Руйнування суглоба супроводжується запальними процесами в його тканинах, також патологічні зміни відбуваються у зв'язках і сухожиллях [64].

Основним джерелом отримання ХС є бичачий і свинячий хрящі, однак в більшості досліджень використовують очищений хондроїтин сульфат з бичачої трахеї (95% чистоти). Природні молекули мають молекулярну масу 50-100 кДа, а після процесу екстракції – 10-40 кДа, в залежності від сировини [228].

Екстрагована суміш являє собою молекули різної маси і довжини з різними варіантами позиції сульфатних груп. Препарати, що випускаються мають різну ступінь очищення від домішок. Всі ці відмінності можуть в кінцевому рахунку обумовлювати різний ефект ХС, який слід враховувати при призначенні оригінальних препаратів або дженериків [134].

Перший анаболічний ефект хондроїтин сульфату був засвідчений ще п'ять десятиліть років тому, в дослідженнях ХС збільшив синтез гіалуронату в синовіальних клітинах [227]. З того часу також було показано, що збільшується синтез колагену II типу і протеоглікану в хондроцитах людини [230] і глікозамінглікану у бичачих хондроцитах [128]. Показано також, що ХС інгібує матричну металопротеїназу (MMP) -1, -3 і -13, а також агреканизи (ADAMTS) -4 і -5 у людських, свинячих і бичачих хондроцитах. Інгібування MMP-13 може відбуватися через інгібування активації p38 і Erk1 / 2 [104] ХС може регулювати гіалуронатсинтазу в фібробластоподібних клітинах і може бути ефективним як сумісний змащувальний засіб, що було показано у експлантатах хряща великої рогатої худоби [118].

Анаболічний та антикатаболічний ефекти ХС також були продемонстровані *in vivo*. Молекула здатна збільшувати продукування протеоглікану в моделі кролячої деградації хряща, запобігаючи збільшенню MMP-9 при ад'ювантному артриті Фрейнда у щурів при введенні в якості дієтичної добавки або інгібувати MMP-13 при колаген-індукованому артриті у мишей [158]

У ході деяких досліджень було виявлено протизапальний ефект ХС. Було показано, що він інгібує синтез *in vitro* різних запальних проміжних сполук, таких як синтаза оксиду азоту, циклооксигеназа (ЦОГ-2), мікросомальна простагландинсинтаза (mPGES)-1 і простагландин E2 [64]. Було також показано, що ХС може діяти на toll-подібний рецептор (TLR-4) для інгібування запальних цитокінів, MyD88 і фактора, пов'язаного з фактором некрозу пухлини (ФНП) – TRAF-6, через інгібування ядерного фактора (NF-kB) [60, 249].

Показано, що ХС має антиапоптотичні властивості як *in vitro*, так і *in vivo*. Він знижує чутливість хондроцитів кролика до апоптозу, що пов'язано зі зменшенням транслокації NF- κ B і зменшенням шляху передачі сигналів MAP-кінази через p38 і Erk1/2 [113]. Інше дослідження, яке вказувало на антиапоптотичний ефект як ХС-4, так і ХС-6 у мишачих суглобових хондроцитах. *In vivo*, на мишачій моделі спонтанного ОА було показано, що 12-денна обробка ХС (0,3 мг / день) зменшує кількість апоптотичних хондроцитів, рівень яких був оцінений через 30 днів [62]. Також було продемонстровано, що ХС здатний інгібувати активацію каспази-3 та -7 при колаген-індукованому артриті у мишей. Зазначені вище результати виступають на користь хондропротекторного ефекту хондроїтин сульфату [48, 228].

Крім того молекула хондроїтин сульфату володіє власною антиоксидантною активністю. За рахунок функціональних груп вона здатна хелатирувати іони перехідних металів (залізо, мідь та ін.), які приймають безпосередню участь у ініціюванні реакцій Фентона та Хабер-Вейса, що призводить до зменшення утворення вільних радикалів. Хелатування відбувається за рахунок зв'язування металів з карбоксильною групою залишку глюкуронової кислоти та сульфатованою групою в положенні 4 або 6 амінокислотного залишку в протилежному боці карбонової групи молекули ХС [39].

При введенні хондропротекторних препаратів відбуваються наступні процеси: стимуляція утворення хондроцитами міжклітинної речовини хрящової тканини; заміщення або заповнення суглобової рідини; гальмування дії лізосомальних ферментів, які сприяють руйнуванню кісток і хряща; прискорення відкладення і фіксація в кістках кальцію; активація синтезу гіалуронової кислоти, яка відповідає за в'язкість синовіальної рідини і еластичність зв'язкового апарату; зміцнення сполучнотканинних структур; збереження рідини в товщі хряща; поліпшення рухливості суглобу та гальмування утворення фібринових згустків в мікросудинах синовіальної сумки. Результати американського систематичного огляду свідчать про те, що довгострокове використання глюкозаміну та

хондроїтин сульфату значно уповільнює прогресування хвороби у пацієнтів з ОА коліна [90]. Таким чином, хондропротектори забезпечують еластичність і міцність зв'язкового апарату, перешкоджають стирання суглобових поверхонь та попереджають розвиток запальних процесів.

Підсумовуючи проведений аналіз літературних даних, показано, що остеоартрити є хронічними дегенеративними захворюваннями суглобів, які мають значний економічний вплив на систему охорони здоров'я в усьому світі. ОА є гетерогенними захворюваннями, які мають велику кількість факторів ризику, що часто взаємодіють між собою. На сьогоднішній день за патогенезом і клінічними проявами ОА поділяють на два типи: первинний з трьома підвидами – генетично детермінованим, естрогензалежним та вікозалежним, і вторинний, який поділяють на посттравматичний і ендокринний (останній, зокрема, включає діабет-індукований ОА). Терапія ОА має бути не лише індивідуальною, але й комплексною. Оптимальним вважається поєднання немедикаментозних та медикаментозних методів профілактики та лікування. У цьому світлі набуває актуальності застосування хондропротекторів, які не тільки знижують основні клінічні прояви ОА, але й чинять патогенетичний вплив на його перебіг, перешкоджаючи деструкції тканин суглобового хряща та сприяють їх регенерації, що знижує потребу пацієнтів у супутній аналгетичній терапії. Тому стратегія профілактики ОА є доцільним та економічно ефективним заходом, що сприятиме зниженню розвитку захворювання та підтримці здоров'я у всіх верст населення.

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, ХТТ, сорбітол, бутил гідрокситолуол, ксиленол оранж, ДСН, тіобарбітурова кислота, L-цистеїну гідрохлорид, L-аргінін, ЕДТА, ауротіомалат натрію («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 , ІЛ-1 β , ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-12Вр40 («GE Healthcare: Amersham», Великобританія); 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 заліза, диацетилмонооксим, ацетат кальцію, ацетат натрію, фенолфталеїн, борна кислота, парафін, еозин, гематоксилін, гліцилгліцин, п-нітроанілін, оцтова кислота, γ -L-

глутаміл-4-нітроанілід, перхлорат амонію, етилацетат, диметил сульфоксид, гліцерол, бромфеноловий синій, фенол) вітчизняного виробництва кваліфікації х.ч. та о.х.ч. 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 хондроїтин сульфат під торговою назвою «Драстоп» (Drastop), власником реєстраційного посвідчення є фармацевтична компанія WORLD MEDICINE, Limited (Великобританія) та виробником S.C. ROMPHARM Company, S.R.L. (Румунія). 1 мл препарату «Драстоп» містить суміш динатрієвих солей хондроїтин-4-сульфату (I) та хондроїтин-6-сульфату (II). У препараті «Драстоп» вміст активної речовини складає хондроїтин сульфат натрію – 100 мг/мл.

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. Перша група – контроль: тваринам субплантарно (під подошовний або плантарний апоневроз) вводили 0,1 мл 0,9% розчину NaCl у задню праву кінцівку. Друга група – тваринам щоденно протягом 28 діб внутрішньом'язево вводили терапевтичну дозу $3 \text{ мг} \times \text{кг}^{-1}$ хондроїтин сульфат (препарат «Драстоп», «WORLD MEDICINE»,

GREAT BRITAIN). Третя група (модель гострого запалення суглобу) – тваринам щоденно протягом 28 діб внутрішньом'язево вводили 0,1 мл 0,9% розчину NaCl у задню праву кінцівку та на 29 день моделювали запальний набряк суглобу: тваринам субплантарно вводили 0,1 мл 1% розчин каррагінану у задню праву кінцівку [157]. Четверта група – тваринам щоденно протягом 28 діб внутрішньом'язево вводили терапевтичну дозу $3 \text{ мг} \times \text{кг}^{-1}$ хондроїтин сульфату, після чого щурам субплантарно вводили 0,1 мл 1% розчину каррагінану у задню праву кінцівку.

Тварин умертвляли через 3 години після ін'єкції розчину каррагінану згідно протоколу етичного комітету, після чого швидко робили забір колінних суглобів та крові для подальших досліджень.

Загальна кількість тварин, залучених до експериментальних досліджень, становила 120 особин. 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 навколосуглобових тканин щурів

Навколосуглобові тканини щурів фіксувалися за стандартною гістологічною методикою [149] 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 [26]. На ротаційному мікротомі «Мікром» (Харків, Україна) виготовлялися гістологічні зрізи товщиною 5 мкм.

Для фарбування мікропрепаратів зрізів навколосуглобових тканин використовували метод подвійного фарбування гематоксиліном і еозином [25].

Зріз навколосуглобових тканин 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 навколосуглобових тканин тварин різних груп розташовували рядами на одне скло таким чином, що на першому склі були подані зрізи навколосуглобових тканин 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 навколосуглобових тканин отримували за допомогою світлового мікроскопа фірми «Olympus» BX-41, гвинтовий окуляр-мікрометр (об'єктив $\times 100$). Висновки щодо впливу експериментальних речовин робилися на основі гістологічного аналізу.

2.4. 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 надосадову рідину (сироватку) відбирали в окремі одноразові

мікропробірки, заморожували при -20°C та використовували для подальших досліджень.

2.5. Визначення вмісту цитокінів та факторів росту

Вміст цитокінів та факторів росту визначали методом хемілюмінісцентного імуноферментного аналізу (CLIA), що базується на принципі сандвіча [215; 222].

Лунки поділені на дискретні ділянки з тест імобілізованими 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 – H_2O_2 -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 H_2O_2 1:1) та визначали величину люмінесценції через 2 хв.

Вміст цитокінів та факторів росту виражали в $\text{пг} \times \text{мл}^{-1}$.

2.6. Визначення концентрації С-реактивного білка

Концентрацію С-реактивного білка (СРБ) визначали методом кінетичного аналізу при фіксованому часі за стандартом (час реакції – 120 с, час затримки – 3 с) [15].

Кількісно концентрацію С-реактивного білка в сироватці крові оцінювали імунотурбідиметрично за допомогою латексного реагенту СРБ. Латексні частинки, покриті специфічними антитілами до СРБ, аглютинують при змішуванні зі зразками, що містять СРБ. Аглютинація викликає зміну абсорбції при $\lambda=540$ нм, в залежності від вмісту СРБ в зразку.

Концентрацію С-реактивного білка визначали за концентрацію калібратора за формулою:

$$C_{\text{СРБ}} = ((A_0 - A_1)_{\text{зразка}} / (A_0 - A_1)_{\text{калібр.}}) \times C_{\text{калібр.}}, \quad (2.1)$$

де A_0 – абсорбція через 3 с, A_1 – абсорбція через 120 с, C – концентрація.

Концентрацію С-реактивного білка у сироватці крові виражали в $\text{мг} \times \text{л}^{-1}$.

2.7. Визначення концентрації молекул низької молекулярної маси

Концентрацію молекул низької молекулярної маси визначали за Габриелян [11] 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 крові 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 дистильованої води. Вміст молекул низької молекулярної маси виражали в ум. од. $\times$ мг білка⁻¹.

2.8. Визначення вмісту супероксидного радикалу

Вміст супероксидного радикалу у біологічному матеріалі визначають за накопиченням ХТТ-формазау [36, 204]. 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-формазау, 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:

$$C = \frac{\Delta E}{\varepsilon \times a}, \quad (2.2)$$

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.

2.9. Визначення вмісту гідроген пероксиду

Визначення вмісту гідропероксидів у біологічному матеріалі базується на здатності гідроген пероксиду 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 $\lambda=540\text{-}580$ нм [109, 165].

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.

2.10. Визначення вмісту дієнових кон'югатів та шиффових основ

У щільно притертий скляний гомогенізатор Поттера вносять аліквоту, що містить 0,1 мл досліджуваного біологічного матеріалу, до аліквоти – додають 5 мл суміші гептан/ізопропіловий спирт у співвідношенні 1:1 та гомогенізують 10 хв. Проби центрифугують (1000 g, 15 хв) у пробірках з притертою пробкою. Надосадову фракцію відбирають та додають 0,5 мл дистильованої води для розшарування фаз гептану та ізопропілового спирту. Верхню гептанову фазу

відбирають для визначення вмісту шиффових основ на флуориметрі RF-510, Shimadzu (Японія) за умов $\lambda_{\text{збуд}}=360$ нм і $\lambda_{\text{еміс}}=420$ нм. Вміст шиффових основ у пробі розраховують 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 виражають в умовних одиницях $\times 1$ мг білка⁻¹ [21].

Для визначення дієнових кон'югатів у хімічні пробірки відбирають по 0,3 мл гептанової фази, додають 1,5 мл 96% етилового спирту, проби перемішують, вимірюють поглинання при $\lambda=233$ нм на спектрофотометрі «Multiscan» (Thermo Scientific, США). Вміст дієнових кон'югатів у пробі розраховують, виходячи з величини молярного коефіцієнту екстинкції при $\lambda=233$ нм для спряжених дієнів полієнасичених вищих жирних кислот, що дорівнює $2,2 \times 10^5$ см⁻¹М⁻¹, та виражають в умовних одиницях $\times$ мг білка⁻¹ [12]. Вміст дієнових кон'югатів у пробі розраховують 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 полієнасичених вищих жирних кислот, a – вміст білку в пробі, мг.

2.11. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів

Вміст ТБК-активних продуктів оцінювали згідно методу Стальної [29]. У пробу вносили аліквоту досліджуваного зразка, який містив 0,5 мг білка, у трис-буфері (25 мМ трис-НСl, 175 мМ КCl, 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 C – вміст ТБК-активних продуктів, $E_{\text{досл}}$ – екстинція проби, a – вміст білка в пробі, мг. Вміст ТБК-активних продуктів визначали у $\text{нмоль} \times \text{мг}^{-1}$ білка.

2.12. Визначення вмісту продуктів окисної модифікації білків

Визначення рівня продуктів пероксидного окиснення білків проводили за методом Дубиніної [17], 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 аліфатичних альдегід- і кетон-динітрофенілгідразинів нейтрального і основного характеру. Аліквоту досліджуваного зразка, що містила 0,5 мг білка вміщували у фосфатний буфер ($\text{pH} = 7,4$) та 15 хв. інкубували в термостаті при температурі 37°C . Після інкубації

вносили 1 мл розчину 2,4-динітрофенілгідразину (на 1-2М НСІ) та знову поміщали на 45 хв. в термостат при температурі 37°C 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.

2.13. Визначення вмісту загальних, білок-зв'язаних та небілкових SH-груп

Визначення вмісту сульфгідрильних (SH) груп проводилося за методом Елмана [83]. 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-НСІ 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 mM трис-HCl буфер з 1 mM EDTA (pH = 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.

2.14. Визначення каталазної активності

Каталазну активність визначали за Корольок і співавторами [22]. 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 нмоль $\text{H}_2\text{O}_2 \times \text{хв}^{-1} \times 1 \text{ мг білка}^{-1}$.

2.15. Визначення супероксиддисмутазної активності

Супероксиддисмутазну активність визначали за Чеварі і співавторами [34]. Метод базується на здатності супероксиддисмутази конкурувати з нітросинім тетразолієм (НСТ) за супероксидні аніони, що утворюються в результаті аеробної взаємодії відновленої форми нікотинамідаденіндинуклеотида (НАДН) та феназинметасульфату (ФМС). В результаті цієї реакції НСТ відновлюється з утворенням гідрозинтетразолію. 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. Супероксиддисмутазну активність визначали у умовних одиницях $\times \text{хв}^{-1} \times \text{мг білка}^{-1}$.

2.16. Визначення глутатіонпероксидазної активності

Сумарну глутатіонпероксидазну активність визначали за накопиченням окисненого глутатіону (GSSG). До складу реакційної суміші входили 1 мл 0,3 М фосфатного буферу, $\text{pH} = 7,4$; 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 H_2O_2 . 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 [9].

2.17. Визначення глутатіонтрансферазної активності

Для визначення ГЛТ-активності готували суміш: 1,5 мл 0,1М фосфатного буферу, $\text{pH} = 6,5$; 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 [9].

2.18. Визначення глутатіонредуктазної активності

Глутатіонредуктазну активність визначали за Власовою та ін. [9], 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, $\text{pH} = 8,0$; 35 мкл 1 мМ ЕДТА; 50 мкл 7,5 мМ GSSG; 50 мкл клітинного

лізату; 50 мкл 1,2 мМ НАДФН + H⁺; інкубація тривала 8 хв. Ензиматичну активність визначали по зменшенню кількості НАДФН + H⁺ при 37°C за довжини хвилі 340 нм та виражали в нмолях НАДФН + H⁺ на 1 мг білка за хв.

2.19. Визначення вмісту відновленого та окисленого глутатіону

Вміст відновленого та окисленого глутатіону визначали спектрофлюориметричним методом із використанням ортофталевого альдегіду за різних значень рН середовищ [101, 156].

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-етилмалеїміду, який попереджав окислення GSH в GSSG, та інкубували 20 хв при кімнатній температурі. Далі додавали 430 мкл 0,1 N NaOH (рН=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 ($\lambda_{\text{ex}}=360$ нм, $\lambda_{\text{em}}=460$ нм) на мікропланшетному спектрофлюорофотометрі Synergy HT (BioTeck, США). Концентрацію окисленого глутатіону визначали за попередньо побудованим калібрувальним графіком.

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

2.20. Визначення концентрації білка

Визначення концентрації білка проводили за методом Лоурі. Метод базується на утворенні забарвлених продуктів ароматичних амінокислот з реактивом Фоліну у поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки [136].

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 $\text{dist H}_2\text{O}$) 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 $\text{dist H}_2\text{O}$).

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.

2.21. Кількісна ЗТ-ПЛР

2.21.1. Виділення загальної РНК

РНК отримували за методом Chomczynski [70].

У пробірку з 200 мкл цільної крові з антикоагулянтном вносили 1 мл розчину D (гуанідин ізотіоціанат + β -меркаптоетанол + лаурилсаркозинат натрію) та перемішували. Після чого суміш переносили на лід і послідовно додавали 100 мкл 2 М ацетату натрію та знову перемішували, після чого додавали 1 мл фенолу.

Далі додавали 200 мкл суміші хлороформ:ізоаміловий спирт 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 при -20°C .

Проби знов центрифугували за тих же умов, після чого супернатант декантували, а осад розчиняли в 0,3 мл розчину D і додавали до нього 0,3 мл ізопропанолу. Проби лишали на 1 год. при -20°C , після чого повторювали центрифугування. Супернатант зливали, а до осаду обережно додавали 2 мл 70% етанолу, перемішували та центрифугували протягом 2 хв при 10 000 g. Спирт зливали, повторювали зазначену процедуру із 96% етанолом. Потім осад підсушували, залишивши мікропробірки відкритими на декілька хвилин. Отриману тотальну РНК розчиняли в 100 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist, додавали 2,5 об'єми 96% етанолу та зберігали при -20°C до наступних маніпуляцій чи впродовж року.

2.21.2. Оцінка рівня експресії генів

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 та по 2 мкл виділеної РНК (2 мкг), 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; добування 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 - CTCCTGCCCCACTGACTTCGTC;
 для *Tgfb1* – прямий - CTCAGCTCCACAGAGAAGAACTGC та зворотний -
 CACGATCATGTTGGACAACCTGCTCC; для NF-κB – прямий -
 TTCCTGATCCCGACAAGAACTG та зворотний -
 CCCCCAGAGACCTCATAGTTGT; 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. Відносну кількість мРНК обраховували за
 порівняльним СТ методом « $\Delta\Delta C_T$ Method», ефективність ПЛР реакцій була
 однаковою ($E_x = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$), $\text{slope} < 0,1$. Відносний рівень експресії зазначених
 генів нормалізували до мРНК *Actb*.

2.22. 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 $p \leq 0,05$ [30].

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 в організмі щурів за умов каррагінан-індукованого запалення суглобу та тривалого профілактичного введення хондроїтин сульфату

3.1.1. Гістологічний аналіз навколосуглобових тканин

Для оцінки розвитку гострого запалення суглобу, спричиненого введенням у задню кінцівку каррагінану, першим етапом наших досліджень було проведення гістологічного аналізу стану навколосуглобової м'язової тканини. Виявлено, що у контрольній групі щурів м'язова тканина навколо суглобу має анатомічну структуру з невеликою кількістю міжклітинної рідини (Рис. 3.1). М'язові волокна розділені прошарками сполучної тканини. М'язовий масив утворює множинні дрібніші пучки. Простір між пучками заповнений рихлою сполучною тканиною. Шар перимізію охоплює пучки ззовні та проникає в середину тонкими волокнами ендомізію (Рис. 3.1).

На гістологічних препаратах навколосуглобової м'язової тканини добре видно чергування темних та світлих дисків волокна, які утворюють виразну поперечну смугастість. Під клітинною сарколемою через більш-менш постійні інтервали розташовуються багаточисленні сплюснені ядра, які входять до складу міосимпластичної частини м'язового волокна. Ядра цих волокон своїм максимальним діаметром орієнтовані уздовж м'язів. Також поряд з ядрами міосимпласту виявляються більш дрібні овальні ядра міосателітоцитів, які

прилягають ззовні до сарколеми міосимпласту. Центр міосимпласту утворює саркоплазма з багаточисленими органелами та включеннями (Рис. 3.1).

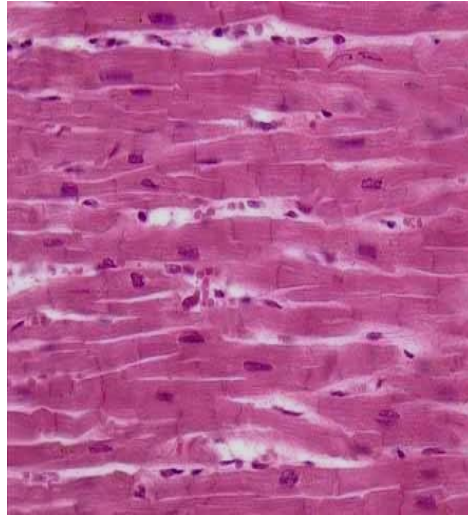


Рис. 3.1. Мікрофотографія навколосуглобової м'язової тканини задньої кінцівки щурів (контроль). Фарб. гем.-еоз. $\times 400$.

При гістологічній оцінці навколосуглобової м'язової тканини щурів, яким вводили хондроїтин сульфат, показано, що ця тканина має структуру в межах анатомічної норми (Рис. 3.2).

М'язова тканина складається з м'язевих волокон, між якими знаходяться прошарки сполучної тканини. М'язова тканина має чітку поперечну смугастість, яка утворюється за рахунок чергування темних та світлих дисків волокна. У міосимпласті м'язевого волокна, що складається з сукупності клітин, що злилися, по периферії розташовані багаточисленні сплюснені ядра, які орієнтовані своїм максимальним діаметром уздовж м'язів. Центральну частину симпласту займають міофібрили. Ззовні до сарколеми міосимпласту прилягають міосателлітоцити, овальні ядра яких за розміром є більш дрібні порівняно з клітинами міосимпласту (Рис. 3.2).

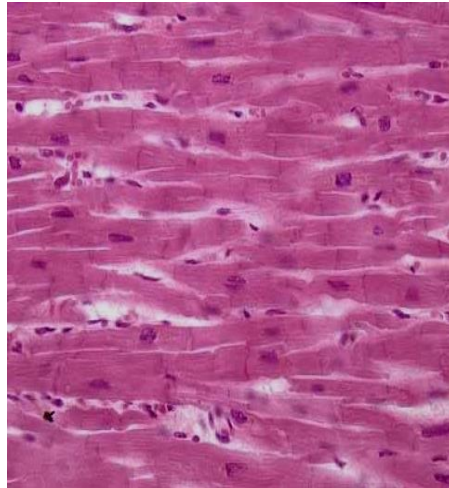


Рис. 3.2. Мікрофотографія навколосуглобової м'язової тканини задньої кінцівки щурів (хондроїтин сульфат). Фарб. гем.-еоз. $\times 400$.

У ході проведених експериментів нами було встановлено, що у щурів при субплантарному введенні каррагінану, спостерігається значний набряк тканин суглобу задньої кінцівки. У навколосуглобовій м'язовій тканині виявлені вогнищеві інфільтрати, що складаються з лейкоцитів і гістіоцитів та десквамованих фрагментів. Встановлені деструктивні зміни свідчать про розвиток вираженої запальної реакції в м'яких тканинах суглобу (Рис. 3.3).

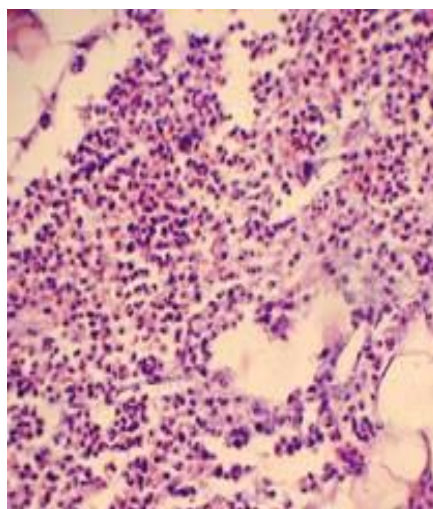


Рис. 3.3. Мікрофотографія навколосуглобової м'язової тканини задньої кінцівки щурів (каррагінан). Фарб. гем.-еоз. $\times 400$.

При тривалому профілактичному введенні хондроїтин сульфату тваринам з каррагінан-індукованим запаленням у навколосуглобовій м'язовій тканині гістологічні зміни виражені у меншому ступені: зменшення набряку та зниження лейкоцитарної інфільтрації тканин. Отримані дані свідчать про зниження розвитку запалення у м'яких тканинах суглобу (Рис. 3.4).

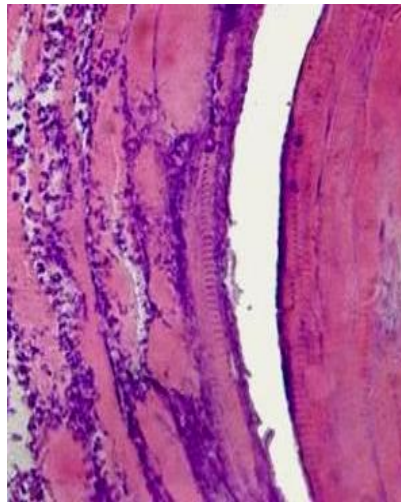


Рис. 3.4. Мікрофотографія навколосуглобової м'язової тканини задньої кінцівки щурів (каррагінан + хондроїтин сульфат). Фарб. гем.-еоз. $\times 400$.

Таким чином, аналіз даних гістологічних досліджень дозволив виявити гостру стадію запалення у м'язево-суглобовому компоненті задньої кінцівки щурів при введенні каррагінану. При профілактичному введенні хондроїтин сульфату ознаки запального процесу зменшуються, що свідчить про антизапальну дію досліджуваного хондропротектора [59, 60, 113, 184, 206].

3.1.2. Концентрація С-реактивного білка у сироватці крові

Комплекс змін, що виникають слідом за пошкодженням, в сукупності становить поняття гострої фази запалення, в розвитку якої беруть участь різні системи організму – імунна, нервова, ендокринна, серцево-судинна та ін [91, 92, 174, 177].

Запалення як системний процес, індукує відповідні реакції на рівні макроорганізму. Навіть при наявності чітко обмеженого вогнища запалення, на рівні організму з'являється комплекс білків гострої фази (acute-phase proteins) або «адаптивних білків», продукція яких в організмі ініціюється антигенами, імунними комплексами, бактеріями та грибами. До білків гострої фази належить до 30 різних протеїнів, що виявляються в плазмі крові та інших біологічних рідинах в гостру фазу запалення будь-якої етіології, що володіють різними фізіологічними властивостями [172].

Інформативним маркером серед даної групи білків є концентрація С-реактивного білка (СРБ) у сироватці крові [244]. У клінічній практиці С-реактивний білок розглядається в якості основного, хоча і досить неспецифічного, маркера запалення [147].

Протягом багатьох десятиліть СРБ був відомий як білок, що синтезується в печінці. Проте, останні дослідження свідчать про істотні рівні експресії СРБ в інших тканинах, в тому числі у стінках кровоносних судин і в клітинах гладеньких м'язів коронарних артерій, де, за припущеннями вчених, СРБ представлений у вигляді мономера, в той час як нативний пентамерний білок міститься переважно в плазмі крові.

С-реактивний білок є негліколізованим білком з пентамерною структурою, який належить до β -глобулінів. За рахунок його спорідненості до фосфорилхоліну, який є складовою клітинних стінок деяких бактерій та одноклітинних грибів. С-реактивний білок здатний зв'язувати відповідні мікробні клітини та опсонізувати їх для фагоцитозу або лізувати за допомогою комплекта. СРБ виконує роль прозапального «тригера», який стимулює моноцитарний синтез таких цитокінів як фактор некрозу пухлин- α , інтерлейкін-1 та інтерлейкін-6. Таким чином, СРБ виконує імунорегуляторну функцію: стимулює захисні реакції та активізує імунітет [125].

Встановлено, що у щурів при запаленні суглобу, індукованому каррагінаном, у сироватці крові концентрація С-реактивного білка зростає в 1,9

раза порівняно з контролем (Рис. 3.5). При введенні препарату на основі хондроїтин сульфату щурам з експериментальною моделлю запалення суглобу в сироватці крові спостерігається зниження концентрації С-реактивного білка в 1,4 раза відносно групи тварин, яким вводили лише каррагінан. Виявлено, що хондроїтин сульфат не впливає на концентрацію С-реактивного білка у сироватці крові контрольної групи тварин (Рис. 3.5).

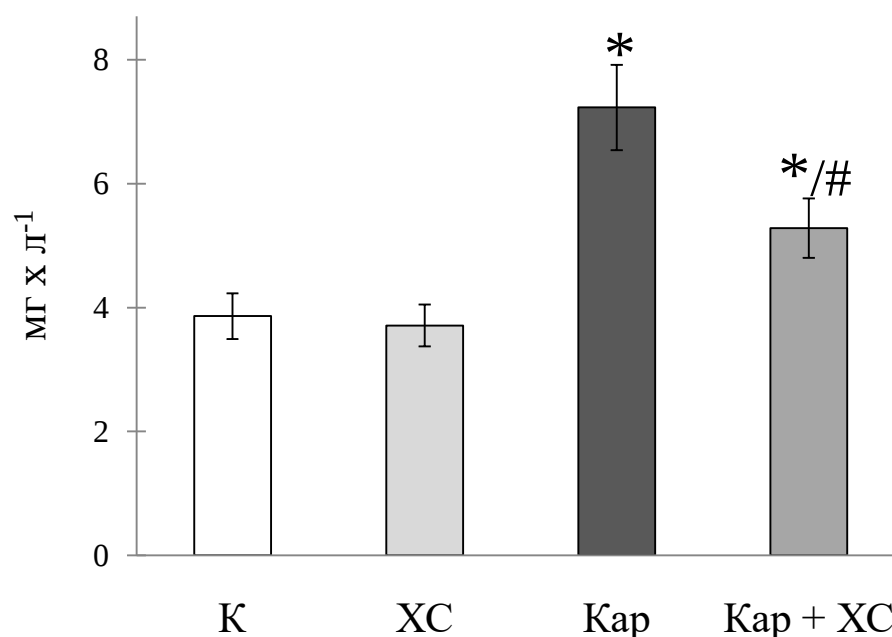


Рис. 3.5. Концентрація С-реактивного білка у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Отримані результати є підтвердженням розвитку запальних процесів в організмі при гострому запаленні, викликаного дією каррагінану [169, 198]. Оскільки відомо, що рівень С-реактивного білка має прогностичне значення як маркер інтенсивності протікання запалення. Так, підвищення вмісту СРБ при артритях різного генезу свідчить про ступінь важкості захворювання [160]. Крім

того, вміст СРБ є інформативним показником при моніторингу ефективності лікування інфекційних процесів та ускладнень, пов'язаних з інфікуванням [135, 190]. Це підтверджується нашими результатами стосовно зниження його рівня при тривалому профілактичному введенні хондроїтин сульфату щурам з моделлю гострого запалення суглобу.

3.1.3. Рівень молекул середньої молекулярної маси у сироватці крові

Біохімічним проявом прогресії запалення є розвиток ендогенної інтоксикації внаслідок порушення метаболічних процесів в організмі. Критерієм ступеню цих розладів є рівень накопичення в тканинах та біологічних рідинах організму проміжних та кінцевих продуктів обміну речовин – неідентифікованих токсичних субстанцій, які належать до молекул середньої молекулярної маси від 500 до 5000 дальтон [27, 35, 200].

Хімічний склад молекул низької та середньої молекулярної маси 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. Біля 80% середніх молекул є продуктами порушеного білкового обміну та деструкції тканин [18, 19; 31].

До теперішнього часу досить детально вивчено біологічну дію молекул середньої молекулярної маси. 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 молекул середньої молекулярної маси здатні з'єднуватися і блокувати рецептори будь-якої клітини, негативно впливаючи на її метаболізм і функції. Показана можливість впливу молекул середньої молекулярної маси на тонус гладком'язевих клітин, на трансваскулярний транспорт. Ці речовини можуть взаємодіяти з компонентами систем гемостазу [14, 20]. Таким чином, утворені ендотоксини володіють високою біологічною активністю, вони здатні спричиняти порушення функціонування всіх систем організму та погіршувати перебіг основного захворювання, зокрема запальних захворювань суглобів. Так, у пацієнтів хворих на ідіопатичний остеоартроз колінного суглоба до і після його тотального ендопротезування спостерігалися підвищені рівні молекул середньої молекулярної маси, які після періоду реабілітації знижувалися. Також встановлено розвиток ендогенної інтоксикації та порушення метаболізму сполучної тканини у хворих на ревматоїдний артрит [18, 32, 41]. За результатами досліджень рекомендовано використовувати рівень молекул середньої молекулярної маси 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.

В ході проведених експериментальних досліджень нами встановлено, що у щурів при запаленні задньої кінцівки, індукованому каррагінаном, у сироватці крові зростає вміст молекул середньої молекулярної маси – в 1,5 раза відносно контролю (Рис. 3.6).

При тривалому профілактичному введенні хондроїтин сульфату тваринам з каррагінан-індукованим запаленням у сироватці крові знижується рівень молекул середньої молекулярної маси – в 1,3 раза порівняно з групою тварин з експериментальною моделлю гострого локального запалення. Показано, що хондропротектор не впливає на рівень досліджуваного показника у сироватці крові контрольної групи тварин (Рис. 3.6).

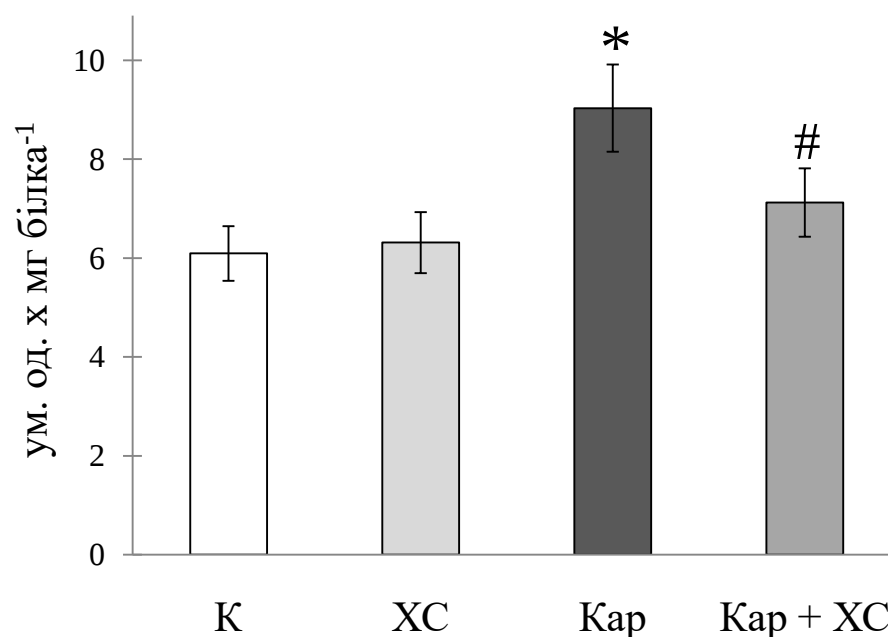


Рис. 3.6. Вміст молекул середньої молекулярної маси у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Отримані дані свідчать про розвиток синдрому ендогенної інтоксикації в організмі щурів при каррагінан-індукованому запаленні. Підвищений рівень молекул середньої молекулярної маси спричинює токсичну дію на організм та може призвести до роз'єднання процесів дихання та окисного фосфорилування, інгібування синтезу білка, пригнічення трансформації лімфоцитів і фагоцитарної активності лейкоцитів, сприяти гемолізу еритроцитів, гальмувати еритропоез, порушувати проникність мембран капілярів та уповільнювати в них швидкість кровотоку [18, 200, 236].

Виявлене зниження вмісту молекул середньої молекулярної маси у сироватці крові щурів з запаленням при введенні хондроїтин сульфату, пов'язане із протизапальною дією досліджуваного препарату.

З літературних джерел відомо, що при розвитку запалення у зону ураження тканини відбувається міграція та активація прозапальних клітин (нейтрофілів, макрофагів та Т-лімфоцитів), які продукують біологічно-активні молекули, зокрема цитокіни [75, 95].

3.1.4. Концентрація цитокінів у сироватці крові (ІЛ-1 β , ІЛ-12В р40, ФНП- α , ТФР- β , ІЛ-4, ІЛ-10).

Патогенез багатьох захворювань значною мірою пов'язаний з порушенням продукції цитокінів, які є ендogenousними медіаторами, що регулюють інтенсивність і тривалість імунзапальної відповіді [79, 208]. За фізіологічних умов цитокіни беруть участь у взаємозв'язку між неспецифічною резистентністю організму та його специфічним захистом. У нормі цитокіни підтримують резистентність організму до різних інфекцій. Активація їх синтезу відбувається під дією різних стимулів: віруси, бактерії, гормони, лікарські препарати тощо [80, 163].

Цитокіни мають широкий спектр біологічних властивостей. Вони взаємодіють між собою, утворюючи універсальну мережу, яка запускає і регулює каскад запальних, імунних, метаболічних процесів, як локальних, так і системних, спрямованих на нейтралізацію і елімінацію патогенних агентів. На сьогодні описано більше 300 різноманітних цитокінів, кожний з яких має певну спрямованість дії; нестача одного компенсується наявністю інших, які виконують подібну функцію. За допомогою такого механізму відбувається збереження балансу цитокінового спектру. В низьких концентраціях вони регулюють інтенсивність місцевої запальної реакції, а їх більш високі концентрації відображають інтенсивність розвитку системної запальної реакції. при цьому синтез прозапальних цитокінів, таких як ФНП, ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-17 контролюється їх ендogenousними антагоністами, антизапальними медіаторами ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-13 [46, 80].

На даний час визначення цитокінів досить широко використовується в клінічній практиці, оскільки їх кількісні характеристики і співвідношення між собою, як правило, відображають динаміку патологічного процесу, корелюють з активністю захворювання і дозволяють судити про ефективність проведеного лікування.

В зв'язку з цим, визначення цитокінового профілю є важливим діагностичним інструментом. Зокрема, концентрація цитокінів у крові дозволяє оцінити ступінь запалення в організмі в цілому. Для визначення механізмів розвитку запалення важливим є визначення співвідношення прозапальних та протизапальних цитокінів.

У наших дослідженнях ми визначали у крові рівень прозапальних цитокінів – інтерлейкіну-1 β , інтерлейкіну-12В, фактору некрозу пухлин- α , трансформуючого фактору росту β та протизапальних цитокінів – інтерлейкіну-4 та інтерлейкіну-10 [138, 226, 233].

Встановлено, що у сироватці крові концентрація інтерлейкіну-1 β у контрольних тварин дорівнює $113,09 \pm 10,14$ пг $\times$ мл⁻¹ (Рис. 3.7).

Показано, що у щурів при гострому запаленні суглобу, індукованого каррагінаном, у сироватці крові концентрація інтерлейкіну-1 β зростає в 1,9 раза порівняно з контрольною групою тварин (Рис. 3.7). У групі тварин з експериментальною моделлю запалення, яким профілактично вводили препарат на основі хондроїтин сульфату, в сироватці крові концентрація інтерлейкіну-1 β знижується в 1,3 раза відносно групи щурів з гострим запаленням суглобу (Рис. 3.7).

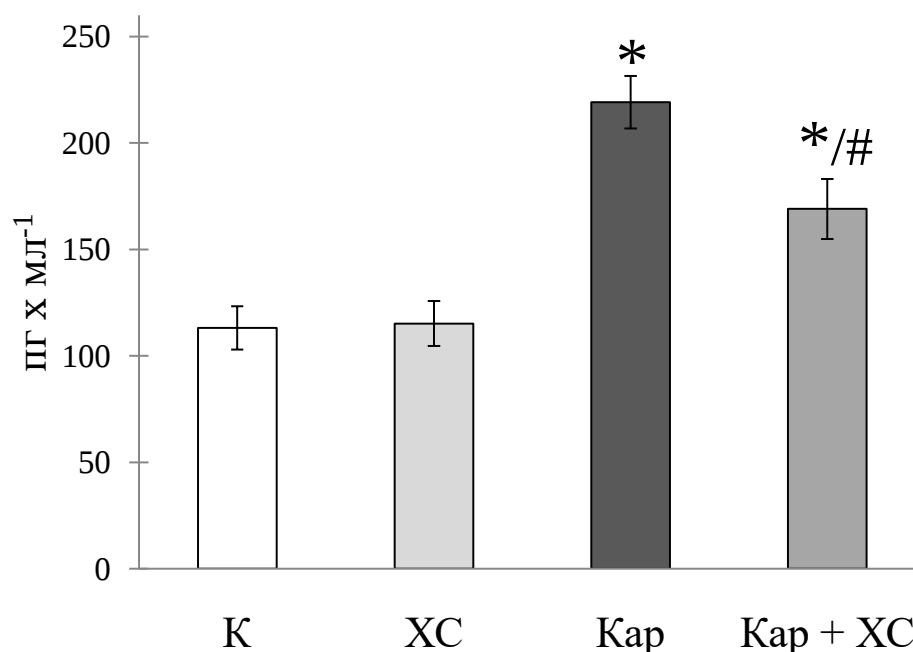


Рис. 3.7. Концентрація інтерлейкіну 1 β у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Виявлено, що у сироватці крові концентрація інтерлейкіну-12В р40 у контрольних тварин дорівнює $312,17 \pm 34,02$ пг $\times$ мл⁻¹. Показано, що у щурів при гострому запаленні суглобу, індукованого каррагінаном, у сироватці крові концентрація інтерлейкіну-12В р40 зростає в 1,6 раза порівняно з контрольною групою тварин (Рис. 3.8).

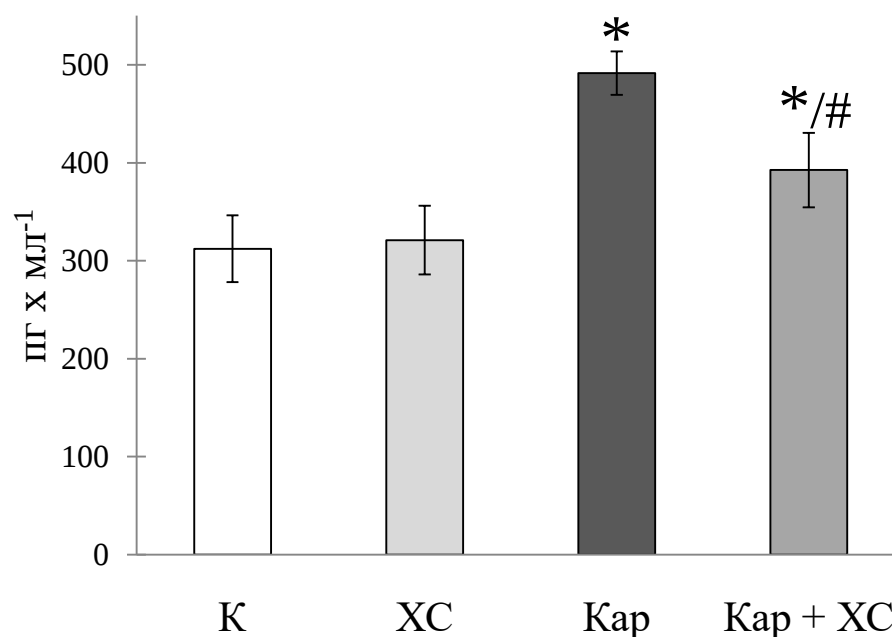


Рис. 3.8. Концентрація інтерлейкіну-12В р40 у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

При профілактичному введенні хондроїтин сульфату тваринам з каррагінан-індукованим запаленням в сироватці крові концентрація інтерлейкіну-12В р40 знижується в 1,3 раза відносно групи щурів з гострим запаленням кінцівки (Рис. 3.8).

Показано, що у сироватці крові концентрація фактору некрозу пухлин- α у контрольних тварин дорівнює $73,13 \pm 8,01$ пг $\times$ мл⁻¹. Встановлено, що у щурів при гострому запаленні суглобу, індукованого каррагінаном, у сироватці крові концентрація фактору некрозу пухлин- α зростає в 5 разів порівняно з контрольною групою тварин (Рис. 3.9).

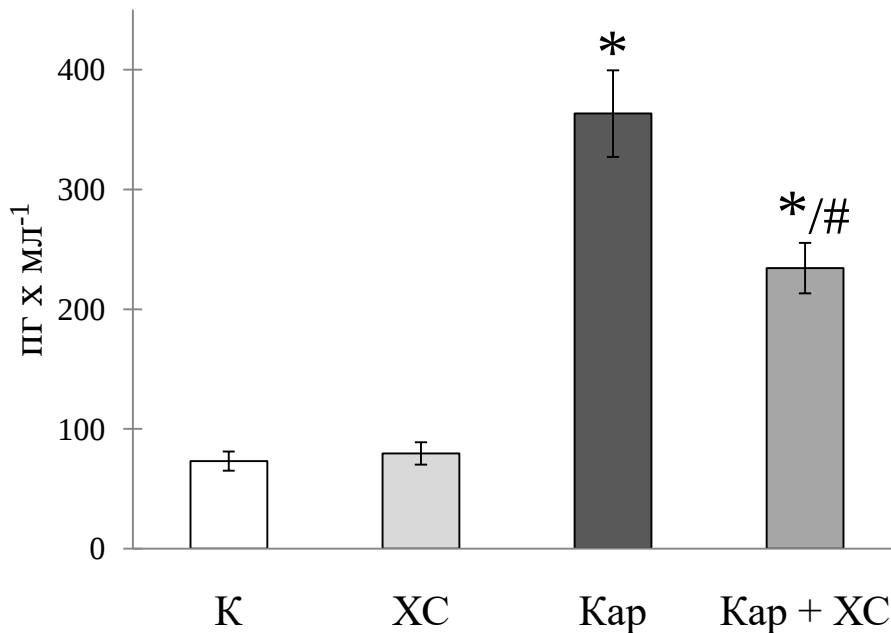


Рис. 3.9. Концентрація фактору некрозу пухлин- α у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Виявлено, що при тривалому профілактичному введенні хондроїтин сульфату тваринам з запаленням суглобу концентрація фактору некрозу пухлин- α знижується в 1,6 раза відносно групи щурів з гострим запаленням кінцівки (Рис. 3.9).

Виявлено, що у сироватці крові концентрація трансформуючого фактору росту β у контрольних тварин дорівнює 53.63 ± 4.12 пг $\times$ мл⁻¹. Показано, що у щурів при гострому запаленні суглобу, індукованого каррагінаном, у сироватці крові концентрація досліджуваного показника залишається в межах контрольних значень (Рис. 3.10).

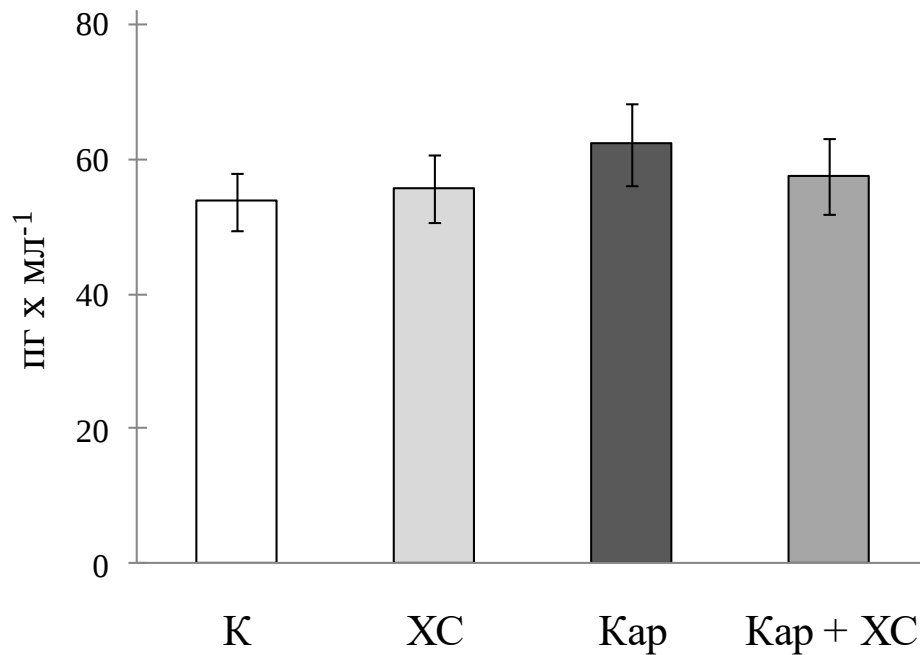


Рис. 3.10. Концентрація трансформуючого фактору росту β у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

Таким чином, концентрація трансформуючого фактору росту β у сироватці крові не змінюється в усіх експериментальних групах (Рис. 3.10).

Виявлено, що введення щурам хондроїтин сульфату не впливає на вміст досліджуваних параметрів прозапальних цитокінів у сироватці крові контрольної групи тварин (Рис. 3.7-3.10).

Таким чином, при карагінан-індукованому запаленні суглобу у сироватці крові зростає концентрація прозапальних цитокінів ІЛ 1 β , ІЛ 12В р40 та ФНП- α порівняно з досліджуваними показниками контрольної групи тварин. Тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату тваринам з запаленням суглобу сприяє відновленню досліджуваних цитокінів, що свідчить про антизапальну дію досліджуваного хондропротектора.

Встановлені нами зростання рівня прозапальних цитокінів у крові при введенні тваринам каррагінану свідчить про ініціацію та розвиток запалення.

З даних літератури відомо, що одним з головних медіаторів, що відповідає за розвиток неспецифічних форм захисту – формування місцевої запальної реакції у різних органах та гострофазної відповіді на рівні організму при інфекційному ураженні, є ІЛ-1. Основним джерелом продукції ІЛ-1 є, в першу чергу, фагоцитуючі моноклеари різної тканинної локалізації: макрофаги та моноцити периферичної крові і перитонеального екссудата, ендотеліоцити та ін. Також, здатністю секретувати даний цитокін володіють Т-лімфоцити та В-лімфоцити, фібробласти, НК-клітини, кератиноцити, нейтрофіли. Індукторами синтезу ІЛ-1 клітинами є компоненти клітинної стінки бактерій та цитокіни, які з'являються в ділянці запалення у ході розвитку захисної реакції. Згідно даних літератури [79, 233], ІЛ-1 β та ФНП- α володіють властивостями ініціювати запалення та деструкцію кісткової та хрящової тканини. Під дією ІЛ-1 хондроцити продукують власні прозапальні медіатори, а також підвищену кількість оксиду азоту, що призводить до загибелі хрящових клітин. Даний цитокін сприяє збільшенню вивільнення протеаз та пригніченню синтезу протеогліканів і колагенів хондроцитами. ФНП- α та ІЛ-1 β володіють синергічною і власноіндукованою активністю, потенціюють розвиток синовіту з лейкоцитарною інфільтрацією суглоба. Дані цитокіни посилюють експресію молекул адгезії (ICAM-1, VCAM-1) на мембранах ендотелію судин синовіальної мембрани, індукують синтез хемотоксичних факторів, стимулюють продукцію фактора росту фібробластів, що викликає прогресування деструкції суглобів. ІЛ-1 β та ФНП- α є потужними індукторами синтезу прозапальних агентів (ІФ- γ , ІЛ-6, ІЛ-8), гіперпродукція яких потенціює ефекти ключових медіаторів запалення в синовіальній оболонці, що запускає деструктивні процеси в суглобах, стимулює остеокластогенез та сприяє розвитку кісткової і хрящової деструкції суглоба. Ланцюг таких подій в організмі призводить до прогресії захворювань суглобів [163].

Так, 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, синовіальній рідині і хрящі у хворих на ОА [80, 221].

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 [153].

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 [84, 163]. 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 металопротеїнази (ММП), які є агресивними факторами деградації колагену і протеогліканів хряща, при цьому знижується експресія тканинного інгібітора ММП. Характерною особливістю хондроцитів при ОА є і гіперекспресія ЦОГ 2, яка індукує синтез простагландинів, що беруть участь в розвитку запалення [105, 171].

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

металлопротеїназу-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 [212].

Таким чином, ініціація та основні етапи розвитку запальної відповіді контролюються головним чином прозапальними цитокінами, які продукуються макрофагами, нейтрофілами і Т-клітинами. У той же час прозапальні цитокіни відіграють захисну роль, оскільки забезпечують надходження у вогнище інфекції ефektorних клітин (нейтрофілів, макрофагів), стимулюють їх фагоцитарну, бактерицидну активність і індукують запуск антигенспецифічної імунної відповіді, що в сукупності сприяє елімінації патогенного фактора [163].

Розвиток і перебіг імунозапальних реакцій пов'язаний з рівнем в організмі протизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10). Протизапальні цитокіни, такі як ІЛ-4, ІЛ-10, здатні пригнічувати транскрипцію генів прозапальних цитокінів у клітинах-продуцентах, індукувати синтез рецепторних антагоністів інтерлейкінів, посилювати утворення розчинних рецепторів та за допомогою down-регуляції знижувати щільність прозапальних рецепторів на клітинах [67, 231].

ІЛ-4 є регулятором росту та диференціації В-лімфоцитів та процесу біосинтезу ними антитіл. Джерелом продукції даного цитокіну є переважно Т-лімфоцити – субпопуляція Т-хелперів (ТН2). Обмеженою здатністю до утворення ІЛ-4 володіють тучні клітини, еозинофіли, В-лімфоцити та стромальні клітини кісткового мозку. Основною функцією ІЛ-4 є контроль проліферації, диференціювання та функцій В-лімфоцитів (антитільна відповідь). Він пригнічує активність макрофагів і моноцитів та процес біосинтезу ними прозапальних цитокінів (ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-8 та ФНП- α) [99, 139].

ІЛ-10 є імуносупресивним цитокіном, що пригнічує проліферацію і активність Т-клітин, продукцію синтезу ряду прозапальних цитокінів (ІЛ-1 α , ІЛ-1 β , ІЛ-8 та ФНП- α), розвиток гіперчутливості сповільненого типу та знижує активність макрофагів та моноцитів. В той же час ІЛ-10 стимулює проліферацію

В-лімфоцитів і тимоцитів та синтез імуноглобулінів М і А. ІЛ-10 виробляється Т-хелперами І-го типу, моноцитами та цитотоксичними клітинами [216]. У ряді досліджень показано, що ІЛ-4 та ІЛ-10 відіграють важливе значення у пригніченні розвитку запалення кісткової та хрящової тканини [67, 223].

У наших дослідженнях було визначено концентрацію у крові інтерлейкіну-4 та інтерлейкіну-10.

Встановлено, що у сироватці крові концентрація інтерлейкіну-4 у контрольних тварин дорівнює $6,23 \pm 0,71$ пг $\times$ мл⁻¹. Виявлено, що у щурів при гострому запаленні суглобу, індукованого каррагінаном, у сироватці крові концентрація інтерлейкіну-4 залишається в межах контрольних значень (Рис. 3.11).

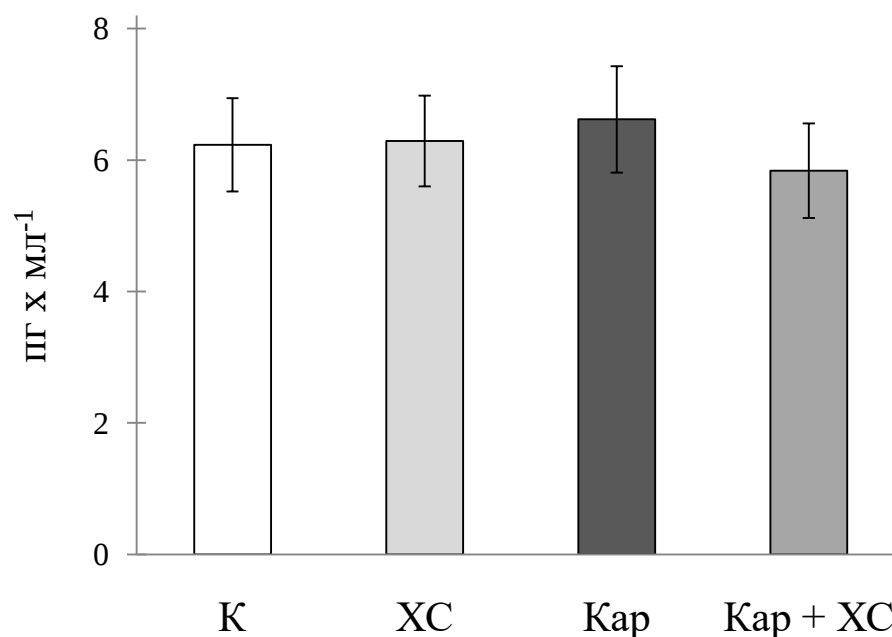


Рис. 3.11. Концентрація інтерлейкіну 4 у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Показано, що у сироватці крові концентрація інтерлейкіну-10 у контрольних тварин дорівнює $34,72 \pm 1,53 \text{ пг} \times \text{мл}^{-1}$ (Рис. 3.12). Встановлено, що у щурів при гострому запаленні суглобу, індукованого каррагінаном, у сироватці крові концентрація інтерлейкіну-10 залишається в межах значень контрольних тварин. Виявлено, що при тривалому профілактичному введенні хондроїтин сульфату тваринам з запаленням задньої кінцівки концентрація ІЛ-10 зростає в 1,7 раза відносно як контролю, так і групи тварин, яким вводили каррагінан (Рис. 3.12).

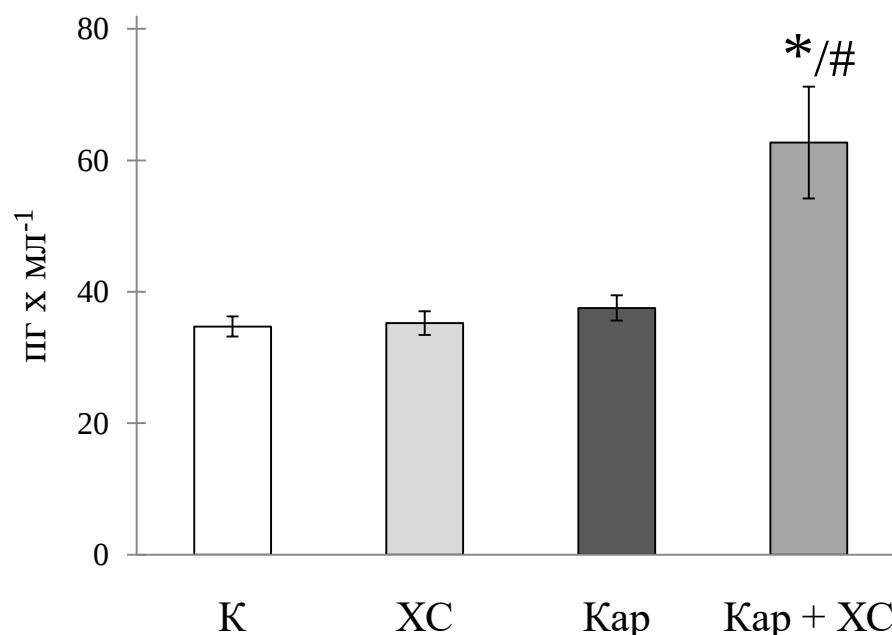


Рис. 3.12. Концентрація інтерлейкіну 10 у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Отримані нами результати свідчать, що при каррагінан-індукованому запаленні суглобу рівень протизапальних цитокінів ІЛ-4 та ІЛ-10 залишається в

межах контрольних значень. При дії хондроїтин сульфату на групу тварин з експериментальним запаленням, у крові зростає концентрація ІЛ-10. Введення контрольним щурам хондропротектора не впливає на вміст досліджуваних показників у сироватці крові.

Інтерлейкін 10 та ІЛ-4 є модулюючими цитокінами, що мають супресивний ефект на фактор некрозу пухлин α та ІЛ-1 *in vitro* [67].

Вони пригнічують синтез цитокінів різними механізмами. ІЛ-4 підвищує деструкцію мРНК, тоді як ІЛ-10 гальмує ядерний фактор каппа В (NF- κ B). Було показано, що ІЛ-4 та ІЛ-10 стимулюють виробництво інгібіторів цитокінів, таких як антагоніст рецептора інтерлейкіну 1 (ІЛ-1Ra), розчинний тип рецептора інтерлейкіну 1 II (sIL-1RII) і розчинний рецептор фактора некрозу пухлин (sTNFR) в моноцитах / макрофагах та нейтрофілах [123].

Відомо, що блокування ендогенного ІЛ-10 антитілами проти ІЛ-10 призводить до розвитку стійкого запалення суглобів з більш щільним синовіальним інфільтратом, а також посиленням деструкції хрящів. Додавання екзогенного -ІЛ-10 у тваринних моделях ОА додатково збільшує супресивний ефект ендогенного ІЛ-10. Ще більш виражена меліорація була виявлена з комбінацією -ІЛ-4 / -ІЛ-10. Це призвело до зменшення набряку та відновлення рівня синтезу протеоглікану хондроцитами на 4-й день. Лікування комбінацією -ІЛ-4 / -ІЛ-10 не тільки суттєво зменшило рівень фактора некрозу пухлини α (TNF- α), а й знижувало рівень ІЛ-1 β в синовіумі. Літературні дані свідчать про домінуючу роль ІЛ-10 в природному пригніченні прояву ОА [67, 137, 226, 231, 237].

Отримані результати свідчать, що на фоні каррагінанового запалення суглобу у сироватці крові порушується баланс про- та протизапальних цитокінів у бік розвитку запалення, що є відповіддю організму на патогенні фактори. Під дією хондроїтин сульфату у щурів з експериментальною моделлю гострого запалення суглобу у крові рівень прозапальних цитокінів частково знижується, але не досягає значень інтактних тварин. Антизапальний ефект досліджуваного

хондропротектора обумовлений посиленою секрецією цитокіну ІЛ-10, який має виражений протизапальний ефект.

Встановлені нами зміни у цитокіновому профілі сироватки крові свідчать про формування запальної реакції в організмі щурів при введенні каррагінану. Наявність підвищеного рівня прозапальних цитокінів у кровотоку вказує на їх дію на системному рівні. Тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату сприяє зниженню прояву запальних реакцій, про що свідчить зниження рівня прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-12В р40, ФНП- α) та зростання протизапального інтерлейкіну-10.

Підсумовуючи отримані нами результати та проведений аналіз літературних даних встановлено, що у щурів, яким вводили каррагінан, на гістологічному рівні спостерігаються ознаки запалення навколосуглобових тканин (набряк тканин, вогнищеві інфільтрати, що складаються з лейкоцитів і гістіоцитів та десквамованих фрагментів). За даних експериментальних умов маніфестація запалення відбувається за участю активації імуноцитокінової системи, яка характеризується порушенням балансу між прозапальними (ІЛ-1 β , ІЛ-12В р40, ФНП- α) та антизапальними (ІЛ-4, ІЛ-10) цитокінами. Підтвердженням розвитку гострого запалення є зростання в крові рівня гострофазного білка – СРБ та молекул середньої молекулярної маси, які належать до маркерів запальних процесів та ендогенної інтоксикації. Профілактичне введення хондроїтин сульфату, виявилось ефективним для зменшення розвитку запалення як місцево в суглобі щурів (гістологічний аналіз навколосуглобових тканин), так і системно (показники запалення в крові) на рівні цілого організму. Це пов'язано з антизапальними та регенераційними властивостями досліджуваного препарату [143, 196]. З літературних джерел відомо, що хондроїтин сульфат у хондроцитах та клітинах синовіальної мембрани знижує ядерну транслокацію NF- κ B – ядерного фактору, який є ключовою ланкою у розвитку запальних та імунних реакцій [110, 199].

Таким чином, хондроїтин сульфат є ефективним засобом корекції запалення при експериментальній моделі гострого набряку кінцівки, викликаного каррагінаном.

Основні наукові результати даного розділу опубліковані в працях [6, 122].

3.2. Інтенсивність вільнорадикальних процесів у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення суглобу та тривалого профілактичного введення хондроїтин сульфату

Неспецифічною ланкою пошкодження тканин є порушення окисно-антиоксидантного балансу та розвиток окисного стресу. Дисбаланс між утворенням вільних радикалів та ендогенними механізмами антиоксидантного захисту викликає окисну модифікацію основних клітинних компонентів, що є підґрунтям у генезі різних патологічних станів. Відомо, що розвиток запального процесу супроводжується активацією вільнорадикальних процесів [82, 126, 139, 186].

У наших дослідженнях ми оцінювали інтенсивність вільнорадикальних процесів у сироватці крові за вмістом активних форм кисню, продуктів пероксидного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків.

3.2.1. Вміст активних форм кисню

В результаті окисного стресу в організмі накопичуються токсичні продукти перекисного окиснення ліпідів, що спричинюють розбалансування регуляції гомеостазу, відповідно серйозні метаболічні порушення, зміну імунного статусу, функціонального стану різних систем організму [186, 220].

У нашій роботі ми досліджували інтенсивність вільнорадикальних процесів за вмістом у сироватці крові АФК: супероксидного радикалу та гідроген пероксиду.

Супероксидний радикал є реакційно здатною сполукою, яка належить до АФК. Утворення супероксидного радикалу відбувається внаслідок приєднання одного електрону до молекули кисню. В клітинах супероксидний радикал є проміжним продуктом багатьох біохімічних реакцій: окиснення тіолів, флавінів, хінонів, катехоламінів, а також метаболізму ксенобіотиків. Однак основними джерелами його утворення є ферментативні системи: НАДФН-оксидаза фагоцитуючих клітин, ксантиноксидаза, мітохондріальна цитохром-с-оксидаза та мікросомальні монооксигенази. Відомо, що найвища експресія НАДФН-оксидаз характерна для запальних клітин, таких як нейтрофіли та макрофаги, які рекрутуються до пошкоджених тканин в ході запалення [8, 225].

Гідроген пероксид є АФК, яка виникає внаслідок двоелектронного його відновлення або дисмутації супероксидного радикалу. Біологічні ефекти H_2O_2 є концентраційно-залежними: за низьких концентрацій він проявляє себе як сигнальна молекула, за високих – як цитотоксичний оксидант [53, 108].

Встановлено, що у щурів при експериментальному запаленні суглобу у сироватці крові вміст АФК зростає: супероксидного радикалу – в 1,7 раза та гідроген пероксиду – в 1,5 раза відносно контролю (табл. 3.1).

У групі тварин з експериментальною моделлю запалення суглобу, яким профілактично вводили препарат на основі хондроїтин сульфату, в сироватці крові спостерігається відновлення досліджуваних показників. За даних експериментальних умов, у сироватці крові знижується рівень супероксидного радикалу – в 1,4 раза та гідроген пероксиду – в 1,3 раза порівняно з групою щурів з гострим запаленням суглобу (табл. 3.1). Показано, що хондропротектор не впливає на рівень досліджуваних показників у сироватці крові контрольної групи тварин (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Вміст активних форм кисню у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату ($M \pm m$, $n = 10$)

Показник Групи тварин	Супероксидний радикал, мкмоль ХТТ-формазану $\times$ мг білка ⁻¹	Гідроген пероксид, мкмоль $\times$ мг білка ⁻¹
Контроль	$4,63 \pm 0,45$	$0,28 \pm 0,03$
Хондроїтин сульфат	$4,24 \pm 0,42$	$0,31 \pm 0,03$
Каррагінан	$7,83 \pm 0,75^*$	$0,43 \pm 0,04^*$
Каррагінан + хондроїтин сульфат	$5,75 \pm 0,54^*/\#$	$0,34 \pm 0,03^\#$

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

Виявлене нами у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу підвищення генерації АФК є пусковою ланкою каскаду реакцій, які призводять до виникнення інших вільних радикалів. Супероксидний радикал та гідроген пероксид є попередниками утворення сильного окислювача – гідроксид-радикалу, продукту трьохелектронного відновлення кисню, який пошкоджує біологічні молекули. Біологічні ефекти вищезазначених інтермедіатів кисню реалізуються опосередковано – через посилення процесів пероксидного окиснення ліпідів та накопичення відповідних радикалів і гідро пероксидів [108, 182].

Тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату тваринам з запаленням суглобу сприяє зниженню інтенсифікації вільнорадикальних процесів у сироватці крові, про що свідчить зниження вмісту супероксидного радикалу та гідроген пероксиду, які атакують та пошкоджують основні біологічні молекули. Встановлений ефект пов'язаний як з антизапальними, так і антиоксидантними

властивостями досліджуваного препарату. Відомо, що хондроїтин сульфат володіє власною антиоксидантною активністю [39, 178, 250]. Так, у ряді досліджень [57, 58] показано здатність хондроїтин сульфату хелатувати іони перехідних металів (залізо, мідь та ін.), які приймають безпосередню участь у ініціюванні реакцій Фентона та Хабер-Вейса. Це призводить до зменшення утворення вільних радикалів. Хелатування відбувається за рахунок зв'язування металів з карбоксильною групою залишку глюкуронової кислоти та сульфатованою групою в положенні 4 або 6 амінокислотного залишку в протилежному боці карбонової групи молекули хондроїтин сульфату.

Так, у роботі [178] досліджено антиоксидантні властивості хондроїтин сульфату. Вченими встановлено, що досліджуваний препарат хондроїтин сульфату виявляє антирадикальну активність проти вільнорадикальної сполуки –ДФПГ (1-дифеніл-2-пікрилгідрозил) та супероксидного радикала, що захищає від окислювального пошкодження. Результати свідчать про те, що досліджуваний ними препарат хондроїтин сульфату має сильну антиоксидантну активність проти окислювальних пошкоджень, спричинених активними формами кисню, і тому може бути використаний як потенційний антиоксидант у фармацевтичних препаратах [178].

В дослідженнях китайських вчених показано антиоксидантні властивості фукозилзованого хондроїтин сульфату, який зменшував вміст 1,1-дифеніл-2-пікрилгідрозилу, оксидів азоту та інгібував процеси перекисного окислення ліпідів [158].

Інші китайські дослідники провели вивчення співвідношення між антиоксидантною активністю та молекулярною масою хондроїтин сульфату, який одержували із носового хряща великої рогатої худоби [251]. Вони встановили, що антиоксидантна активність хондроїтин сульфату *in vitro* міцно пов'язана з його молекулярною масою: хондроїтин сульфат з найнижчею молекулярною масою мав найсильнішу антиоксидантну активність. В зв'язку з цим, низькомолекулярний хондроїтин сульфат може бути використаний як

антиоксидант у харчовій та фармацевтичній промисловості та інших галузях [251].

3.2.2. Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів

Вільні радикали мають високу електрофільність, за рахунок якої вони викликають окисну модифікацію різних за хімічною природою субстратів та призводити до структурних змін біомолекул (білків, ліпідів, нуклеїнових кислот, ферментів, гормонів тощо). Статичним індикатором наслідків інтенсифікації вільнорадикальних процесів є вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). Одними з основних продуктів ПОЛ є дієнові кон'югати (первинні продукти), ТБК-активні сполуки (вторинні продукти) та шиффові основи (кінцеві продукти). Дієнові кон'югати утворюються при окисненні арахідонової кислоти з відривом водню у α положенні по відношенню до подвійного зв'язка. Вони пошкоджують структурні білки, ферменти, ліпопротеїди і нуклеїнові кислоти. 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. [38]. 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 [8, 213].

У ході проведених експериментів нами було досліджено вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у сироватці крові, а саме: первинних продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів, проміжних продуктів ПОЛ – ТБК-активних сполук,

головним з яких є малоновий діалдегід, та кінцевих продуктів ПОЛ – шиффових основ.

У контрольній групі тварин вміст дієнових кон'югатів у сироватці крові становить $46,38 \pm 4,27$ нмоль $\times$ мг білка⁻¹. Виявлено, що рівень дієнових кон'югатів у сироватці крові щурів при експериментальному гострому запаленні суглобу зростає в 1,6 раза порівняно із групою контролю (Рис. 3.13).

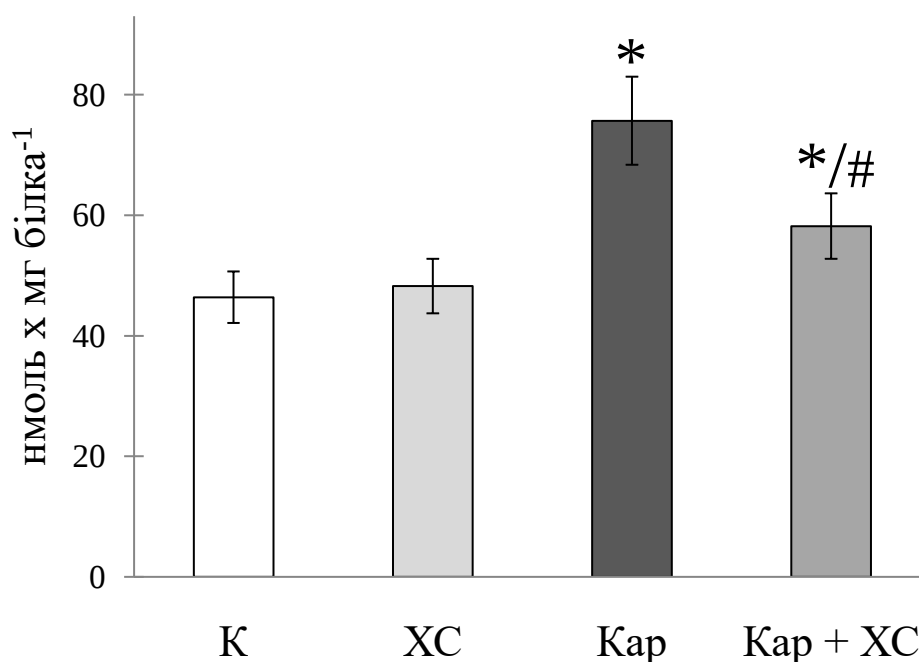


Рис. 3.13. Вміст дієнових кон'югатів у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

При тривалому профілактичному введенні хондроїтин сульфату тваринам з каррагінан-індукованим запаленням суглобу у сироватці крові вміст дієнових кон'югатів знижується в 1,3 раза відносно групи тварин з моделлю гострого запалення суглобу (Рис. 3.13). Виявлено, що введення щурам хондроїтин сульфату

не впливає на вміст досліджуваного параметру ліпідної пероксидації у сироватці крові контрольної групи тварин (Рис. 3.13).

Підвищення концентрації первинного продукту перекисного окиснення ліпідів – дієнових кон'югатів свідчить про активацію процесів ПОЛ та розвитку окисного стресу вже на початку запалення.

У контрольній групі тварин вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові становить $17,75 \pm 1,71$ нмоль $\times$ мг білка⁻¹. Виявлено, що у сироватці крові щурів за умов експериментального запалення суглобу вміст ТБК-активних продуктів зростає в 1,5 раза порівняно з контролем (Рис. 3.14).

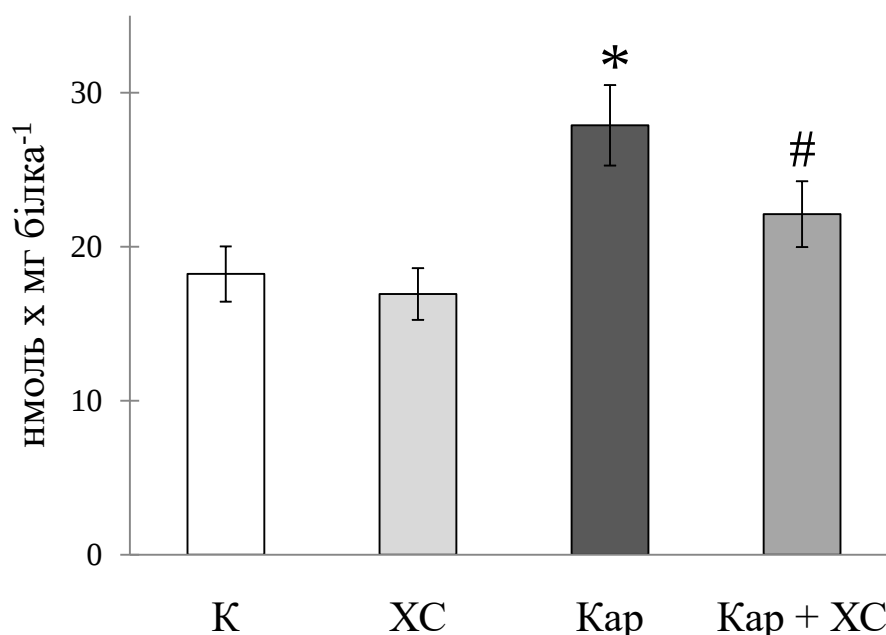


Рис. 3.14. Вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Показано, що при профілактичному введенні хондроїтин сульфату щурам з каррагінан-індукованим запаленням суглобу у сироватці крові вміст ТБК-

активних продуктів знижується в 1,3 раза порівняно з групою тварин з експериментальним запаленням (Рис. 3.14). Виявлено, що введення щурам хондроїтин сульфату не впливає на вміст досліджуваного параметру ПОЛ у сироватці крові контрольної групи тварин (Рис. 3.14).

В результаті досліджень було встановлено, що вміст шиффових основ у сироватці крові щурів при гострому запаленні суглобу зростає в 1,3 раза у порівнянні з контролем (Рис. 3.15).

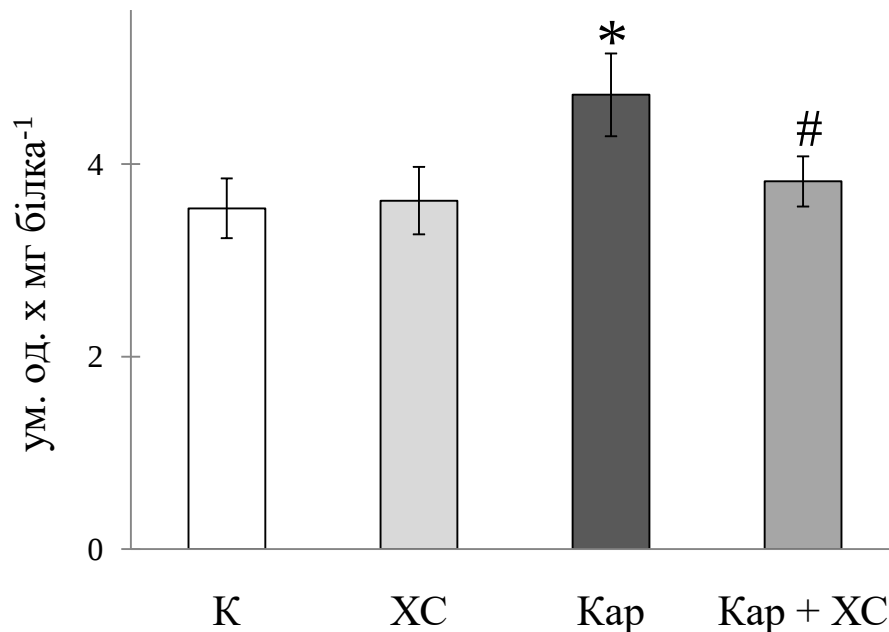


Рис. 3.15. Вміст шиффових основ у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

При тривалому профілактичному введенні хондроїтин сульфату тваринам з каррагінан-індукованим запаленням суглобу у сироватці крові вміст шиффових основ знижується в 1,2 раза відносно групи тварин з моделлю гострого запалення

суглобу (Рис. 3.15). Показано, що введення щурам хондроїтин сульфату не впливає на вміст досліджуваного параметру ліпідної пероксидації у сироватці крові тварин контрольної групи (Рис. 3.15).

Підвищення рівня шиффових основ – флюорисцуючих кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів свідчить про окисну полімеризацію модифікованих ліпідів і білків та їх зшивок. Їх утворення відбувається внаслідок взаємодії малонового діальдегіду (основний продукт серед ТБК-активних сполук) з аміногрупами білка. В результаті утворюються шиффові основи – баластні сполуки, що володіють вираженою стабільністю, повільної утилізацією і здатністю накопичуватися в організмі. Крім того, ці сполуки володіють високою реактивною здатністю і токсичністю, утворюючи міжмолекулярні «зшивки» і порушення структур і функції біомембран [201].

Біологічні ефекти вищезазначених інтермедіатів кисню реалізуються опосередковано – через посилення процесів перекисного окиснення ліпідів та накопичення відповідних радикалів і гідропероксидів. Зафіксоване нами накопичення продуктів ПОЛ за даних експериментальних умов вказує на розвиток запалення, оскільки відомо, що продукти ПОЛ є маркерами екссудативно-деструктивного запалення, які з одного боку, виконують роль регуляторів запального процесу, а з іншого – цитотоксичних факторів, що роблять внесок у розвиток ускладнень [89, 152, 217].

Подібні результати були отримані іншими дослідниками. Показано, що в хондроцитах *in vitro* при артриті збільшується вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів, а саме, малонового альдегіду та гідроксиноненалу [188]. 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 [53, 97, 130, 213].

З літературних даних відомо, що у синовіальній рідині хворих на остеоартрит людей вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів зростає в кілька разів [166, 241, 245].

На моделі *in vitro* показано, що малоновий альдегід, який є продуктом пероксидного окиснення ліпідів при окисному стресі здатен окислювати білки хрящового матриксу, що призводить до змін біохімічних та біофізичних властивостей хрящової тканини [214].

У синовіальній рідині пацієнтів, хворих на ОА, виявлено розвиток окисного стресу, що супроводжувався підвищеною продукцією активованих кисневих метаболітів (H_2O_2 , NO^*) і активацією пероксидного окиснення ліпідів (малонового диальдегіду) на фоні дисбалансу і інгібування компонентів антиоксидантної системи (супероксиддисмутази, каталази, глутатіон-S-трансферази, глутатіонпероксидази, зниження вмісту відновленого глутатіону). Інтенсифікація вільнорадикального окиснення і посилення прооксидантних 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 [10, 82].

Таким чином, отримані нами результати біохімічних досліджень свідчать, що у щурів за умов гострого запалення суглобу у крові наявні характерні ознаки розвитку окисного стресу. Це виражається в інтенсифікації окисних реакцій з надмірним накопиченням у сироватці крові продуктів вільнорадикального окиснення: активних форм кисню (супероксидного радикалу, гідроген пероксиду)

та продуктів ліпідної пероксидації (дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів, шиффових основ).

Тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату тваринам з запаленням суглобу сприяє зниженню прояву окисного стресу в організмі: вміст АФК та продуктів ПОЛ знижується у сироватці крові. Встановлений ефект пов'язаний як з антизапальними, так і антиоксидантними властивостями досліджуваного препарату [40, 59, 60, 61, 210].

3.2.3. Вміст продуктів окисної модифікації білків

Раннім та надійним індикатором розвитку окисного стресу в організмі є окисне пошкодження білків [77, 96, 168]. Індукторами продукції окисно-модифікованих білків виступають активні форми кисню, збільшення вільного заліза, продукти пероксидного окиснення ліпідів на фоні зниження роботи антиоксидантної системи. Вільні радикали атакують білки по всій довжині поліпептидного ланцюга, порушуючи не тільки первинну, але і вторинну та третинну їх структуру, що призводить до агрегації або фрагментації білкової молекули. Інтенсивність окисної модифікації білків визначається особливостями їх амінокислотного складу. Акцепторними групами, що здатні перехоплювати електрони, взаємодіючи з активними формами кисню та утворювати аніон-радикали, можуть бути дисульфідні, сульфгідрильні, карбонільні, карбоксильні та аміногрупи білків. Утворення та накопичення таких модифікованих білків порушує нормальне функціонування організму як на клітинному рівні, так і на системному, що призводить до розвитку різних патологічних станів та формуванню захворювань [55, 126, 240].

В ході проведених експериментальних досліджень встановлено, що у щурів при запаленні суглобу, індукованому каррагінаном, у сироватці крові вміст окисно-модифікованих білків зростає (табл. 3.2). Зокрема, збільшується рівень

нейтральних альдегідних продуктів (макс. абсорбції при 356 нм) – в 2,1 раза та нейтральних кетонних продуктів ($E_{\text{max}} = 370$ нм) відповідно – в 1,8 раза порівняно з контролем (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вміст продуктів окисної модифікації білків у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату, ум.од. $\times$ мг білка⁻¹ ($M \pm m$, $n = 10$)

Показник Групи тварин	Продукти нейтрального характеру		Продукти основного характеру	
	356 нм, альдопохідні	370 нм, кетопохідні	430 нм, альдопохідні	530 нм, кетопохідні
Контроль	0,145 $\pm$ 0,014	0,109 $\pm$ 0,011	0,085 $\pm$ 0,008	0,039 $\pm$ 0,004
Хондроїтин сульфат	0,133 $\pm$ 0,013	0,115 $\pm$ 0,012	0,091 $\pm$ 0,009	0,042 $\pm$ 0,004
Каррагінан	0,302 $\pm$ 0,029*	0,198 $\pm$ 0,017*	0,134 $\pm$ 0,012*	0,052 $\pm$ 0,005
Каррагінан + хондроїтин сульфат	0,191 $\pm$ 0,018 ^{#/*}	0,134 $\pm$ 0,013 [#]	0,101 $\pm$ 0,009 [#]	0,044 $\pm$ 0,004 [#]

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

За тих же умов експерименту у сироватці крові кількість основних альдегідних продуктів (максимум поглинання при 430 нм) збільшується в 1,6 раза відносно контрольної групи тварин, при цьому вміст основних кетонних продуктів ($E_{\text{max}} = 530$ нм) зростає в 1,3 раза порівняно з показниками контрольної групи тварин (табл. 3.2).

При введенні препарату на основі хондроїтин сульфату щурам з експериментальною моделлю запалення суглобу в сироватці крові спостерігається зниження ступеню окиснення білків (табл. 3.2). Виявлено зниження вмісту нейтральних альдегідних продуктів – в 1,6 раза, нейтральних кетонних продуктів – в 1,5 раза, основних альдегідних продуктів – в 1,3 раза та основних кетонних продуктів – в 1,2 раза порівняно з групою тварин з експериментальною моделлю локального запалення суглобу. Показано, що хондропротектор не впливає на рівень досліджуваних показників ОМБ у сироватці крові контрольної групи тварин (табл. 3.2).

Показником білкової модифікації є окиснення їх сульфгідрильних груп, яке може відбуватись як прямим, так і ферментативним шляхом за участю ферменту глутатіонпероксидази та гідроперекисей ліпідів [42, 224]. В першу чергу, окисненню піддаються саме сульфгідрильні групи білків, що оберігає від окиснення інші функціональні групи та молекули.

Виявлено, що за умов гострого запалення у сироватці крові щурів вміст сульфгідрильних груп знижується: небілкових SH-груп – в 1,6 раза, білкових та загальних SH-груп – в 1,8 раза відносно контролю (табл. 3.3). Встановлене зниження вмісту сульфгідрильних груп у сироватці крові щурів за умов гострого запалення суглобу, індукованого каррагінаном, свідчить про накопичення ковалентних зв'язків за участю цистеїну та метіоніну, а також про окиснення SH-груп.

При тривалому профілактичному введенні хондроїтин сульфату тваринам з каррагінан-індукованим запаленням суглобу у сироватці крові рівень білкових та загальних сульфгідрильних груп зростає в 1,5 раза відносно групи щурів, яким вводили лише каррагінан. За даних експериментальних умов вміст небілкових тіолових груп залишається на рівні групи щурів при гострому запаленні суглобу (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Вміст сульфгідрильних (SH-) груп у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату, мкмоль $\times$ мг білка⁻¹ ($M \pm m$, $n = 10$)

Показник Групи тварин	небілкові SH-групи	білкові SH-групи	загальні SH-групи
Контроль	0,26 $\pm$ 0,02	4,38 $\pm$ 0,43	4,64 $\pm$ 0,45
Хондроїтин сульфат	0,23 $\pm$ 0,02	4,29 $\pm$ 0,41	4,52 $\pm$ 0,43
Каррагінан	0,17 $\pm$ 0,01*	2,45 $\pm$ 0,21*	2,62 $\pm$ 0,25*
Каррагінан + хондроїтин сульфат	0,19 $\pm$ 0,02*	3,62 $\pm$ 0,34 [#]	3,81 $\pm$ 0,35 [#]

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

Аналізуючи отримані нами результати та літературні дані, при гострому запаленні суглобу у сироватці крові щурів зростає рівень вільних радикалів, що призводить до порушення нативної конформації білків з утворенням білкових агрегатів або фрагментів білкової молекули [133]. Утворення карбонільних похідних білків може відбуватись декількома шляхами. По-перше, за участю залишків проліну, аргініну, лізину, треоніну з утворенням аддуктів Міхаеля, при цьому карбонілювання аргініну та лізину супроводжується втратою одного або декількох атомів азоту. По-друге, карбонільні похідні білків можуть формуватись за участю амінокислотних залишків лізину, цистеїну та гістидину з продуктами перекисного окиснення ліпідів. Карбонільні групи білків, які утворились внаслідок перетворення карбоксильних груп під дією вільних радикалів, можуть

взаємодіяти з аміногрупами, утворюючи шиффові основи, які є баластом для клітин, що дестабілізує мембрани та сприяє деструкції клітин [81, 96, 240].

Виявлене нами зниження сульфгідрильних груп пов'язане з виснаженням рівня небілкових низькомолекулярних тіолів (цистеїну, глутатіону, дигідролипоевої кислоти та ін.) та порушенням нативної структури і пригніченням каталітичної активності тіолових ферментів за рахунок блокування їх сульфгідрильних груп (глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази, глутатіонредуктази, АТФази, дегідрогенази). Крім того, зменшення рівня тіолових груп може порушувати процеси транспорту та пасивної проникності іонів крізь мембрану, а в крові зміна нативного стану тіолових груп може призвести до порушення функціонування гемоглобіну [42, 150, 192].

Отже, окисна модифікація викликає порушення структурної організації білків, їх агрегацію та денатурацію, зміни заряду білкової молекули, її чутливості до протеолізу, що може призвести до трансформації або втрати функціональної активності протеїнів (каталітичної, регуляторної, транспортної, рецепторної та ін.). Наслідком цих змін буде порушення стану клітинних мембран (проникності, адгезивних властивостей тощо), зміни активності ферментів, клітинної проліферації тощо. Крім того, утворений пул модифікованих білків робить їх більш чутливими до протеолізу, що сприяє подальшій інтенсифікації деструктивних процесів. Окиснені білки здатні виступати в якості джерела вільних радикалів, виснажувати запаси клітинних антиоксидантів (глутатіон, аскорбінова кислота). У молекулярних механізмах вільнорадикальних процесів окисна модифікація білків може спричинити деструкцію інших молекул (ліпіди, ДНК) клітини, що сприятиме розвитку та прогресуванню захворювань [78, 133, 219]. Відповідно, окиснені білки є не тільки показниками ступеня вільнорадикального пошкодження клітини, але і його активними співучасниками.

Виявлене зниження утворення окиснених білкових молекул у сироватці крові при профілактичному тривалому введенні хондроїтин сульфату щурам при запаленні суглобу пов'язано з антизапальними, антирадикальними та

регенераційними властивостями. Хондроїтин сульфат є одним з основних компонентів екстрацелюлярного матрикса хряща та є складовою протеогліканових комплексів основної речовини хрящової тканини. Він володіє вираженою гідрофільністю за рахунок наявності карбоксильної та сульфатної груп, що сприяє нормальному функціонуванню хряща та збереженню його еластичності. Хондроїтин сульфат активує анаболічні процеси за рахунок стимуляції синтезу протеогліканів і колагену, а також пригнічує синтез ферментів деструкції хряща (металопротейнази 3, 9, 13, 14; катепсину-бета, лейкоцитарної еластази) [145].

Таким чином, за умов локального запалення суглобу, індукованого введенням каррагінану, у сироватці крові зростає рівень окисно-модифікованих білків та знижується вміст сульфгідрильних груп, що свідчить про загальний зсув редокс-балансу крові у прооксидантний бік. Тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату щурам з експериментальною моделлю запалення суглобу призводить до часткового зниження продукції окиснених білкових молекул у сироватці крові.

Основні наукові результати даного розділу опубліковані в працях [3, 4, 5, 49].

3.3. Стан антиоксидантної системи у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення суглобу та тривалого профілактичного введення хондроїтин сульфату

Для захисту від пошкоджуючої дії вільних радикалів та їх продуктів в організмі існує розвинена антиоксидантна система, яка підтримує активність протікання процесів вільнорадикального окиснення на фізіологічному рівні, що дозволяє утримувати редокс-гомеостаз клітин.

3.3.1. Ферменти антирадикального захисту

Супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1.) – це група металоферментів, які каталізують реакція дисмутації супероксид-аніонів та підтримують концентрацію цих радикалів всередині клітини на досить низькому рівні, а до того ж зменшують вірогідність утворення синглетного кисню, активність якого перевищує активність супероксидних аніон – радикалів в три-чотири рази. Сам механізм функціонування СОД складається з послідовного відновлених та окиснених іонів металів, що розташовані в активному центрі даного фермента [234].

Супероксиддисмутаза відіграє важливу роль у захисті клітин від ушкоджуючої дії супероксидного радикала і є головним ферментом внутрішньоклітинної антиоксидантної системи. СОД не лише займається стабілізацією клітинних мембран, запобігаючи таким чином процесам пероксидного окислення ліпідів, а і знижує рівень $O_2^{\cdot-}$, захищаючи при цьому від його дезактивуючої дії такі антиоксидантні ферменти, як каталаза і глутатіонпероксидаза.

Активність СОД регулюється SH-групами, які містять в своєму складі глутатіон, цистеїн та деякі інші речовини, а також опосередковано регулюється ферментами глутатіонового обміну. Дані ферменти забезпечують також дезактивацію пероксиду водню. Негативним наслідком цього процесу є утворення перекису, що спричинює генерацію високореакційних гідроксильних радикалів, проте таке перетворення є зворотно відновлюваним до води і здійснюється, загалом, каталазою та глутатіонпероксидазою.

За даних експериментальних умов, каррагінан-індуковане запалення суглобу зумовлювало наступні зміни активності антирадикальних ферментів в сироватці крові щурів. Супероксидазна активність (Рис. 3.16) у сироватці крові щурів контрольної групи становила $0,22 \pm 0,02$ ум. од. $\times$ хв⁻¹ $\times$ мг білка⁻¹, а при

каррагінан-індукованому запаленні суглобу знижувалася в 1,5 раза порівняно з контролем. В групі з каррагінан-індукованим запаленням суглобу, що отримувала тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату, супероксиддисмутазна активність була більшою в 1,2 раза в порівнянні з групою запалення, що не отримувала ХС, проте статистично меншою від контрольної групи.

Показано, що тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату не впливає на активність супероксиддисмутази у сироватці крові контрольної групи тварин (Рис. 3.16).

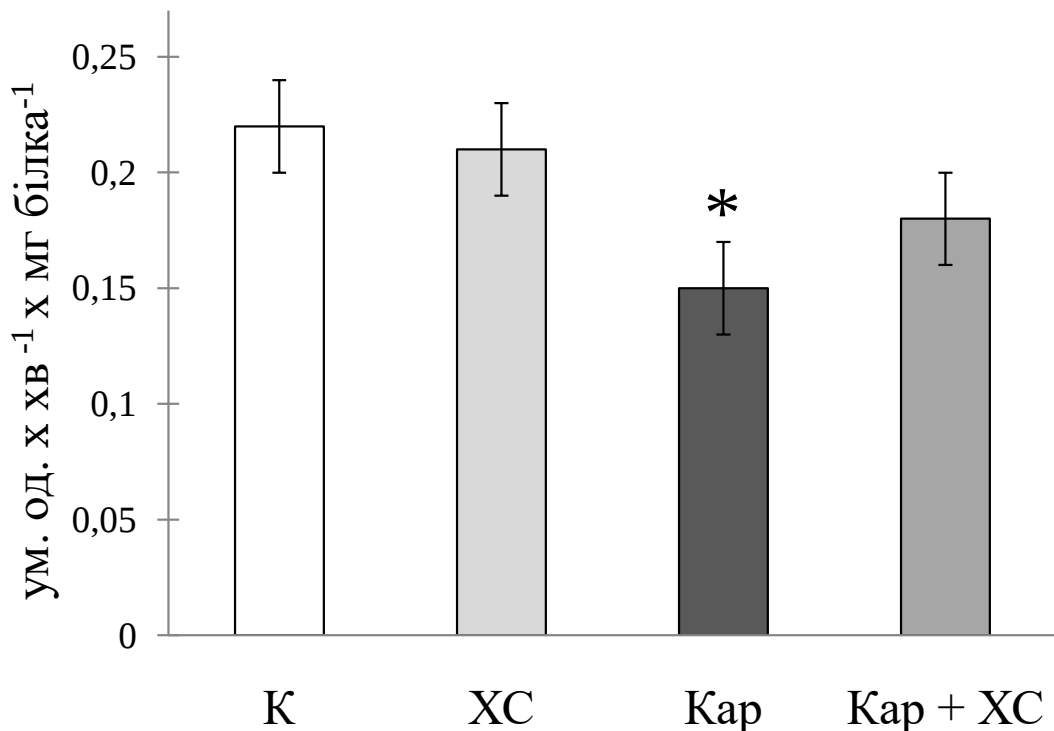


Рис. 3.16. Супероксиддисмутазна активність у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Другим важливим антирадикальним ферментом виступає каталаза (САТ, КФ 1.11.1.6.), фермент, який є каталізатором в реакції розкладання гідроген пероксиду, в ході якої утворюються вода і молекулярний кисень.

Каталаза – це гемопротейн, простетичною групою якого є гем, який містить іон тривалентного заліза. Молекула складається з чотирьох ідентичних субодиниць і чотирьох простетичних груп, які надійно пов'язані з апоферментом. Біологічне значення каталази полягає у розкладанні пероксидів, що утворюються в клітинах за дії флавопротеїнових оксидаз, та захисті клітинних структур від руйнування, спровокованого саме гідроген пероксидом [161].

Каталазна активність (Рис. 3.17) у сироватці крові щурів контрольної групи становила $0,75 \pm 0,07$ нмоль $\times$ хв⁻¹ $\times$ мг білка⁻¹, при каррагінан-індукованому запаленні суглобу зростала в 2,1 раза в порівнянні з контрольною групою. В групі з карагінан-індукованим запаленням суглобу, що отримувала тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату, каталазна активність знижувалась в 1,3 раза в порівнянні з групою запалення, що не отримувала ХС, проте статистично залишалася вищою за значення контрольної групи (Рис. 3.17).

Показано, що тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату не впливає на активність каталази у сироватці крові контрольної групи тварин (Рис. 3.17).

Каталаза захищає клітини від гідроген пероксиду, який генерується всередині них. За патологічних умов вмикаються адаптивні механізми, в період дії яких, каталаза відіграє важливу роль у придбанні організмом стійкості до окислювального стресу [192].

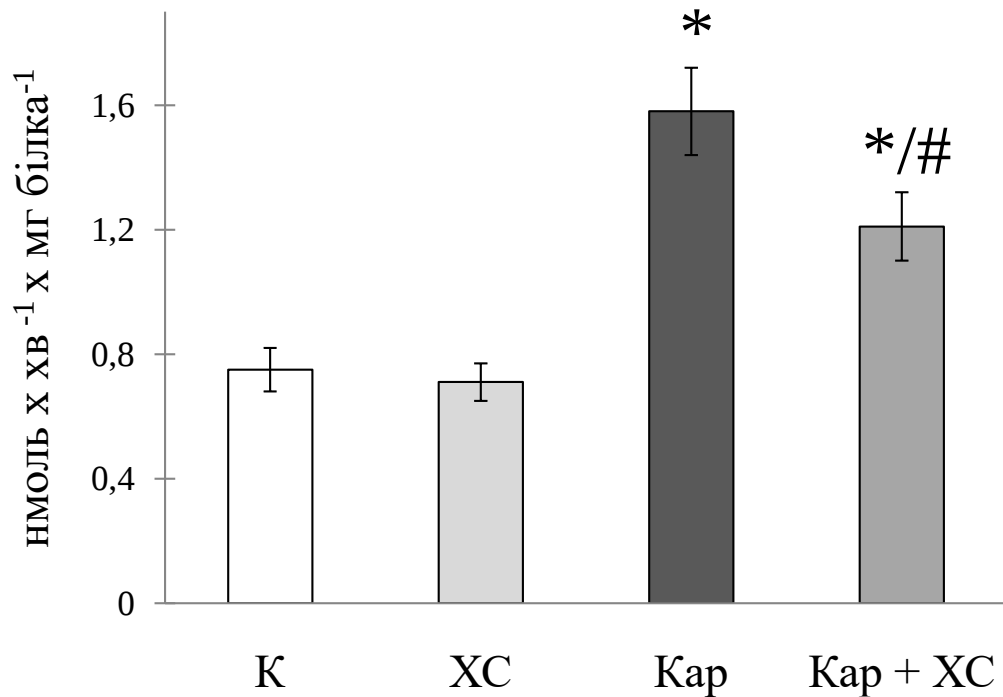


Рис. 3.17. Каталазна активність у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні та тривалого профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Таким чином, встановлено, що у крові щурів за умов гострого запалення суглобу, викликаного каррагінаном, спостерігається порушення роботи антирадикальних ферментів. При профілактичному введенні хондроїтин сульфату у крові щурів активність супероксиддисмутази та каталази частково відновлюється у порівнянні з групою тварин з гострим запаленням суглобу. Отримані дані свідчать про корегувальний ефект досліджуваного хондропротектора на стан антирадикальних ферментів у крові щурів.

3.3.2. Глутатіонова антиоксидантна система

Важливе місце у формуванні антиоксидантного захисту організму займає тіол-дисульфідна глутатіонова редокс-система та її ферменти, яка здійснює антиоксидантні функції, бере участь у біотрансформації екзогенних та ендогенних сполук, підтримує редокс-гомеостаз. Глутатіонова система складається з глутатіонзалежних ферментів (глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази, глутатіонредуктази) та відновленого глутатіону, який є природним метаболітом гомоцистеїну та найважливішим компонентом антиоксидантних реакцій [24, 88].

Глутатіонпероксидази (ГЛП) (КФ 1.11.1.9.) – родина ферментів, які захищають організм від окислювального пошкодження та каталізують відновлення гідроперекисів ліпідів у відповідні спирти, а також відновлення гідроген пероксиду до води. Різні форми ГЛП, кодуються декількома генами, що відрізняються між собою локалізацією в організмі. У людини значна кількість даного ферменту є Se-вмісними тетрамерними білками або глікопротеїнами, проте існують також мономерні і неселенові форми. В активному центрі ферменту знаходиться залишок амінокислоти – селеноцистеїну. Атом селену знаходиться в ступені окислення -1 і окислюється гідроген пероксидом до SeOH. Далі SeOH з'єднується з молекулою глутатіону (GSH), утворюючи Se-SG і далі поєднуються з іншою молекулою глутатіону. При цьому регенерується Se, що в подальшому призводить до утворення побічного продукту GS-SG [45].

Цитозольна і мітохондріальна глутатіонпероксидаза (ГЛП1) відновлюють гідропероксиди жирних кислот і пероксид водню з використанням відновленого глутатіону. Фосфоліпідгідропероксид-глутатіонпероксидаза (ГЛП4) має надзвичайно різноманітну субклітинну локалізацію і може знаходитися в цитоплазмі, в ядрі і в мітохондріях. Більш того, ГЛП4 існує в вільній і мембрано-зв'язаній формах (Scheerer, 2007). Крім цього, ГЛП4 ссавців ще й виступає структурним білковим компонентом мітохондріальної капсули.

Глутатіонпероксидаза може безпосередньо відновлювати гідропероксиди фосфоліпідів, гідропероксиди жирних кислот і гідропероксиди холестерину, які утворюються після перекисного окиснення мембран і окиснення ліпопротеїнів.

Активності двох інших ізоферментів - цитозольної (ГЛП2) та клітинної (ГЛП3) глутатіонпероксидази є дуже низькими практично у всіх органах і тканинах ссавців, за винятком, відповідно, шлунково-кишкового тракту і нирок. ГЛП3 є білком плазми крові. Цей фермент не функціонує при низьких концентраціях відновленого глутатіону.

Глутатіонпероксидаза самостійно може ефективно реагувати з ліпідними та іншими органічними гідропероксидами і виступає головним компонентом глутатіонової захисної системи при низьких рівнях окисного стресу [239].

В ході проведених експериментальних досліджень встановлено, глутатіонпероксидазна активність в сироватці крові щурів контрольної групи дорівнювала $34,71 \pm 3,19$ нмоль GSH $\times$ хв⁻¹ $\times$ мг білка⁻¹, а при каррагінан-індукованому запаленні суглобу знижувалася в 1,6 раза порівняно з контролем (Рис. 3.18).

В групі з карагінан-індукованим запаленням, що отримувала тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату, глутатіонпероксидазна активність була в 1,3 раза більшою в порівнянні з групою запалення суглобу, що не отримувала ХС і статистично відрізнялася від контрольної групи, будучи при цьому меншою в 1,3 раза. Показано, що тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату не впливає на активність глутатіонпероксидази у сироватці крові контрольної групи тварин (Рис. 3.18).

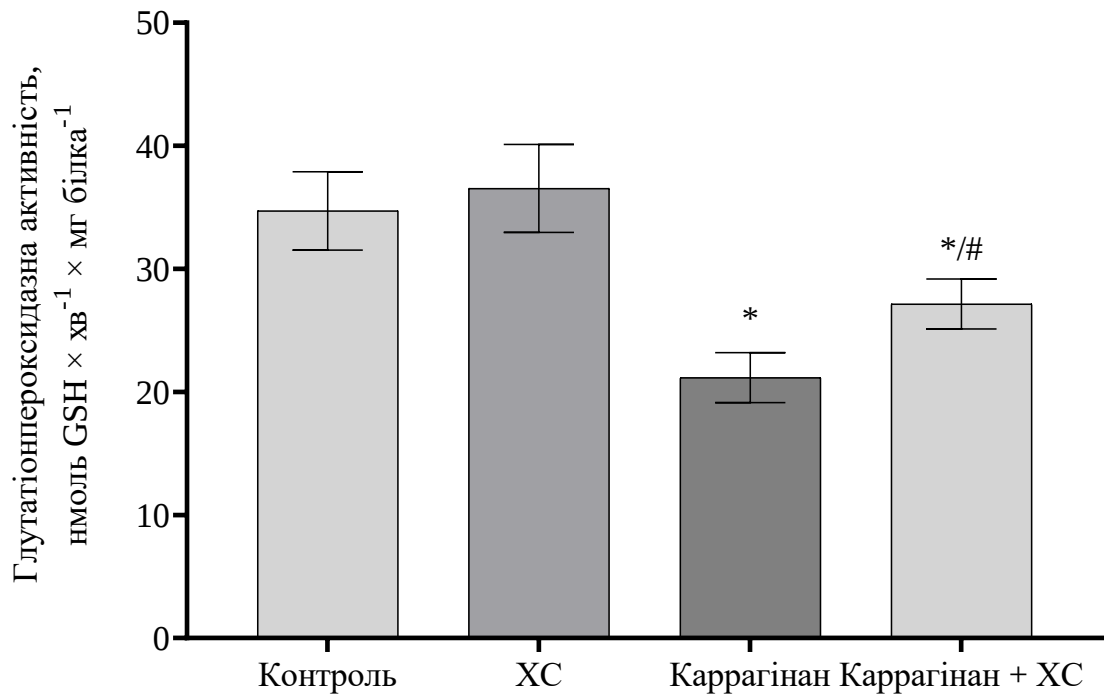


Рис. 3.18. Глу­та­ті­он­пе­ро­кси­да­зна ак­тив­ність у си­ро­ват­ці кро­ві щу­рів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Встановлено, що в клініці у хворих на системні захворювання сполучної тканини с 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 [1]. Потенційні агенти, що здатні стимулювати глутатіонпероксидазну активність за різноманітних паталогічних станів є об'єктами багатьох сучасних досліджень [135].

Вагому роль в клітинних редокс-залежних процесах відіграють глутатіонтрансферази (ГЛТ) (КФ 2.5.1.18), що каталізують кон'югацію глутатіону з рядом неполярних сполук ендо- та екзогенного походження, які мають в своєму

складі електрофільні атоми вуглецю, сірки, азоту і фосфору, що є важливим у захисті клітин від токсичної дії цих сполук [239]. На сьогоднішній день ізоферменти ГЛТ виявлені в більшості живих організмів [114].

Глутатіонтрансфераза є важливим ферментом в антиоксидантній системі через свою здатність відновлювати органічні гідроперекиси до спиртів, використовуючи GSH як косубстрат: за рахунок Se-незалежної глутатіонпероксидазної активності GST відновлює гідроперекиси поліненасичених вищих жирних кислот, фосфоліпідів та холестерину. Серед продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) субстратами ферменту є акролеїн та 4-гідроксіноненаль, кон'югація яких з глутатіоном захищає молекули білків і ДНК від ковалентної модифікації. В результаті окисного стресу можуть окислюватися нуклеотиди з утворенням гідропероксидів, які також виступають субстратами для глутатіонтрансферази.

Глутатіонтрансферазна активність (Рис. 3.19) в контрольній групі тварин дорівнювала $6,12 \pm 0,52$ нмоль $\times$ хв⁻¹ $\times$ мг білка⁻¹ і зростала в 1,7 раза при каррагінан-індукованому запаленні суглобу в порівнянні з контрольною групою. В групі з каррагінан-індукованим запаленням суглобу, що отримувала тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату, глутатіонтрансферазна активність знижувалась в 1,3 раза у порівнянні з групою тварин з гострим запаленням суглобу, що не отримувала ХС. Показано, що тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату не впливає на активність глутатіонтрансферази у сироватці крові контрольної групи тварин (Рис. 3.19).

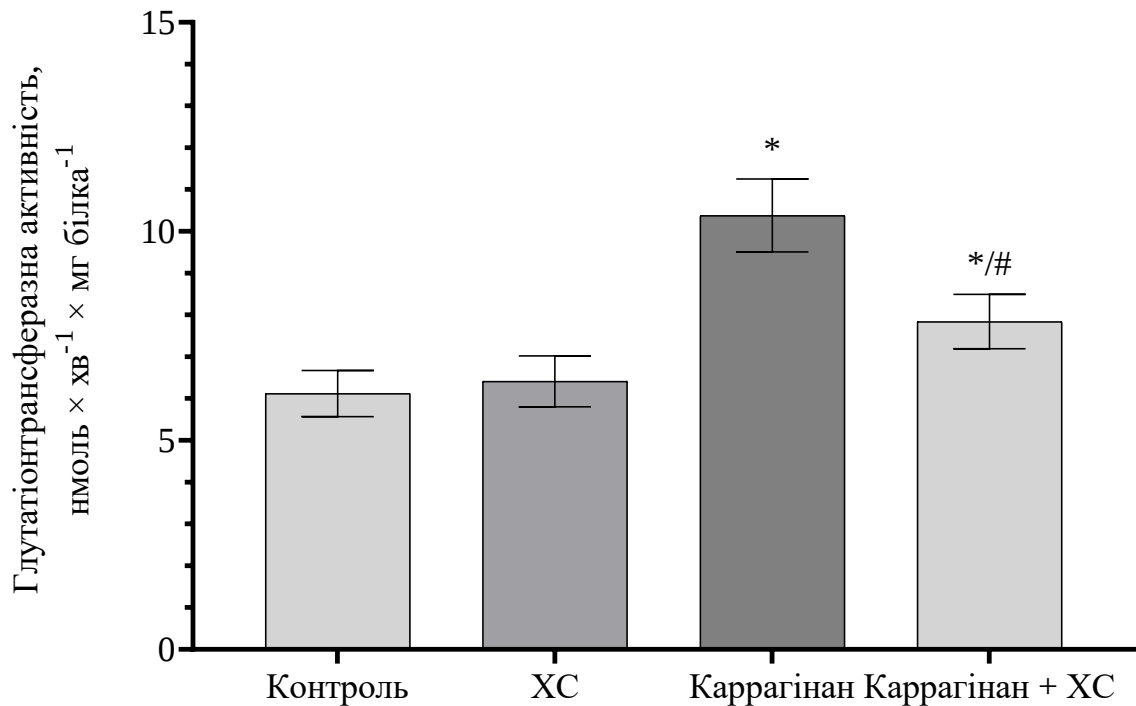


Рис. 3.19. Глутатіонтрансферазна активність у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Глутатіонтрансфераза модулює активацію сигнального шляху NF- κ B та прозапальну відповідь організму [114], тому є об'єктом досліджень пов'язаних з широким спектром захворювань, серед яких, хвороби опорно-рухової системи, аміотропічного латерального склерозу, астми, хвороб Альцгеймера та Паркінсона, тощо [63, 203, 242].

Тваринні моделі продемонстрували, що зниження глутатіонтрансферазної активності в крові безпосередньо пов'язаний з розвитком запалення та прогресування паталогічних станів, показано кореляцію між активністю ферменту

та активацією прозапальних цитокінів, зокрема інтерлейкіну-1 β та фактору некрозу пухлин α [191].

Глутатіонредуктаза (ГЛР) (КФ 1.20.4.1) – є важливим ферментом у процесах відновлення дисульфідів та деглутатіонуванні. Ізоформи ГЛР – є термостійкими низькомолекулярними білками, які функціонують як GSH-залежні оксидоредуктази і за своєю структурою відносяться до суперродини Trx і поряд з Trx, відіграють важливу роль в клітинних редокс-залежних процесах. Глутатіонредуктаза, також відома як глутатіон-дисульфідна редуктаза (GSR), каталізує відновлення глутатіондисульфиду (GSSG) до сульфгідрильної форми глутатіону (GSH), що є критичною за окислювального стресу та в підтримці відновлення клітин. Глутатіонредуктаза функціонує як димерно-дисульфідна оксидоредуктаза і використовує протеазну групу FAD та NADPH⁺ для зменшення одного молярного еквівалента GSSG до двох молярних еквівалентів GSH [72].

В ході проведених експериментальних досліджень встановлено, що глутатіонредуктазна активність в контрольній групі тварин дорівнювала $0,34 \pm 0,03$ нмоль НАДФН $\times$ хв⁻¹ $\times$ мг білка⁻¹ (Рис. 3.20). При каррагінан-індукованому запаленні суглобу глутатіонредуктазна активність знижувалась в 1,8 раза порівняно з контролем. У тварин з гострим запаленням суглобу, що отримувала тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату, активність ферменту зростала в 1,3 раза в порівнянні з групою запалення, що не отримувала ХС. Показано, що тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату не впливає на активність глутатіонредуктази у сироватці крові контрольної групи тварин (Рис. 3.20).

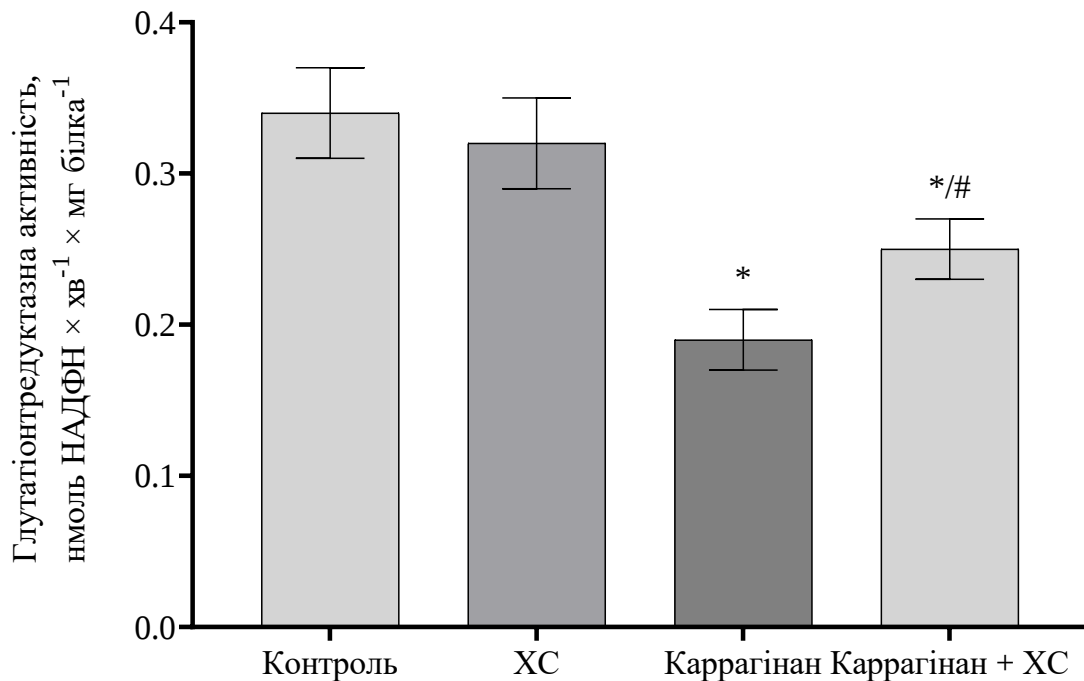


Рис. 3.20. Глутатіонредуктазна активність у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Фермент глутатіонредуктаза запобігає надмірному утворенню гідроксильних радикалів, синглетного кисню та різних електрофілів. Співвідношення GSSG / GSH, що присутнє в клітині, є ключовим фактором підтримання окисно-відновного балансу всередині клітини, тобто є дуже важливим, щоб клітина утримувала досить високий рівень відновленого глутатіону та, в свою чергу, низький окисленого і саме цей баланс підтримується глутатіонредуктазою, що каталізує відновлення GSSG до GSH [72].

За умов розвитку запалення глутатіонредуктаза нейтрофілів відіграє важливу роль як при виникненні респіраторного вибуху, так і при регуляції клітинного сигналіngu через ERK – сигнальний шлях [242]. Крім цього,

глутатіонредуктаза має безпосередній вплив на систему тіоредоксину у регуляції оксидативного стресу [175].

Таким чином, активність ферментів, які пов'язані з глутатіонзалежною антиоксидантною захисною системою, впливає на розвиток запальних процесів як напрямую – через регуляцію рівня окисненого та відновленого глутатіону в організмі, так і опосередковано, через вплив на внутрішньоклітинні сигнальні шляхи.

Відновлений глутатіон (GSH) – низькомолекулярний тіол, пряма функція якого – руйнування вільних радикалів. За своєю будовою є трипептидом (L-гамма-глутаміл-L-цистеїнілгліцин), біосинтез і катаболізм якого описується глутамільним циклом. Глутатіон у відновленій формі, може виступати антиоксидантом через взаємодію з синглетним киснем, супероксид-аніоном і радикалами гідроксила або на пряму руйнувати вільні радикали, які утворюються через пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ). Відновлений глутатіон є коферментом, ферментативна активність якого заснована на зміні редокс-потенціалу глутатіону. Відновлений глутатіон є необхідним для підтримки реакцій аскорбат-глутатіонового циклу, що пов'язаний з нейтралізацією H_2O_2 , де він повторно конформує аскорбінову кислоту від окисленої до відновленої форми [88].

В результаті проведених експериментальних досліджень встановлено, що вміст відновленого глутатіону в контрольній групі щурів дорівнював $18,01 \pm 1,67$ нмоль $\times$ мг білка⁻¹, а при каррагінан-індукованому запаленні суглобу знижувався в 1,6 раза, в порівнянні з контрольною групою (Рис. 3.21). В групі з карагінан-індукованим запаленням суглобу, що отримувала тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату, вміст глутатіону був в 1,3 раза більшим ніж в групі з запаленням, що не отримувала ХС. Показано, що тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату не впливає на вміст відновленого глутатіону у сироватці крові контрольної групи тварин (Рис. 3.21).

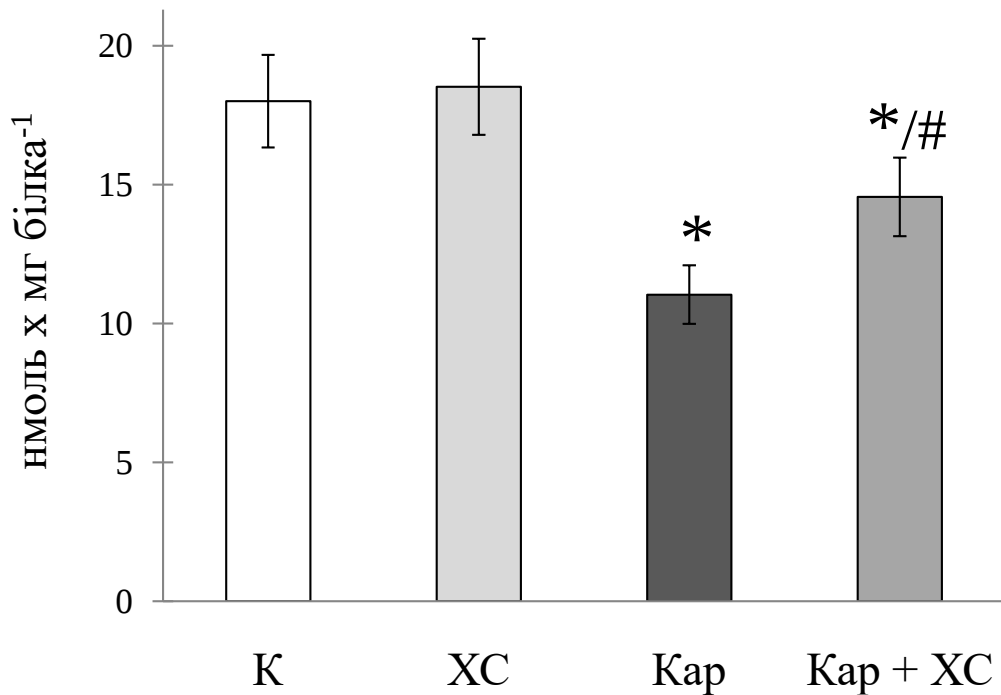


Рис. 3.21. Вміст відновленого глутатіону у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Окиснений глутатіон (GSSG) також є низькомолекулярним тіолом, що виявлений у всіх типах клітин і може перебувати в позаклітинному просторі, в нормі в набагато нижчих концентраціях ніж відновлений глутатіон.

Доведено, що окиснений глутатіон відновлюється ферментом глутатіонредуктазою за участі NADPH. Статистичні дані зазначають, що у людей, хворих на остеоартрит активність даного ферменту є зниженою, що в свою чергу, впливає на зниження вмісту відновленої форми глутатіону, причиною цього виступає активації окисних процесів. В глобальних масштабах, зниження процесу відновлення глутатіону та суміжний розвиток окисного стресу в організмі

призводить до зниження синтезу протеогліканів та гіалуронової кислоти, які є основними компонентами матриксу хряща [94].

В результаті проведених експериментальних досліджень виявлено, що вміст окисненого глутатіону в контрольній групі тварин дорівнював $6,13 \pm 0,57$ нмоль $\times$ мг білка⁻¹ (Рис. 3.22). У групі тварин з каррагінан-індукованим запаленням вміст окисненого глутатіону зростав в 1,4 раза в порівнянні з контролем.

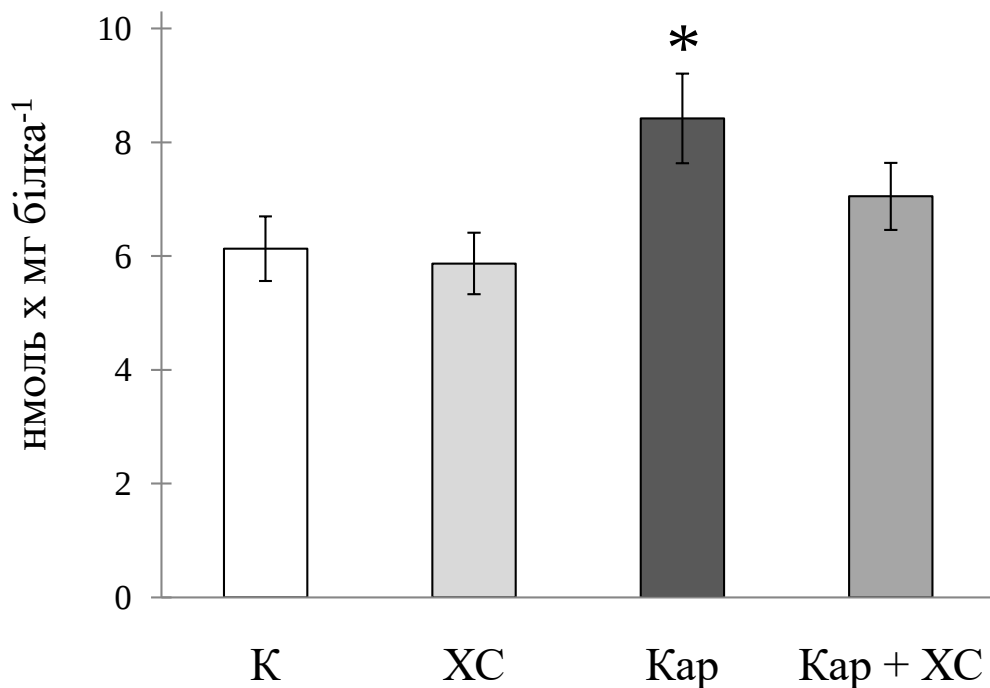


Рис. 3.22. Вміст окисненого глутатіону у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

В групі з каррагінан-індукованим запаленням, що отримувала тривале профілактичне введення ХС вміст GSSG знижується в 1,2 раза у порівнянні з групою запалення, що не отримувала ХС. Показано, що тривале профілактичне

введення хондроїтин сульфату не впливає на вміст окисненого глутатіону у сироватці крові контрольної групи тварин (Рис. 3.22).

Таким чином, в ході досліджень було показано, що при гострому запаленні суглобу, викликаного дією карагінану, у щурів в крові порушується робота системи антиоксидантного захисту: знижується активність супероксиддисмутази, зростає активність каталази. За даних експериментальних умов у сироватці крові також змінюється робота глутатіонової системи: знижується активність глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази та вміст відновленого глутатіону, при цьому зростає активність глутатіотрансферази та вміст окисненого глутатіону. Тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату щурам з гострим запаленням суглобу сприяє частковому відновленню роботи антиоксидантної системи, що свідчить про зниження розвитку окисного стресу в організмі при карагінан-індукованому запаленні.

Встановлене відновлення системи антиоксидантного захисту в крові щурів з експериментальним запаленням суглобу пов'язані антиоксидантною активністю молекули хондроїтин сульфату. За рахунок наявності у складі функціональних груп хондроїтин сульфат здатен хелатувати іони перехідних металів (залізо, мідь та ін.), які приймають безпосередню участь у ініціюванні реакцій Фентона та Хабер-Вейса, що призводить до зменшення утворення вільних радикалів. Хелатування відбувається за рахунок зв'язування металів з карбоксильною групою залишку глюкуронової кислоти та сульфатованою групою в положенні 4 або 6 амінокислотного залишку в протилежному боці карбонової групи молекули хондроїтин сульфату [39]. Таким чином, хондроїтин сульфат зменшує інтенсивність вільнорадикальних процесів за рахунок власної антиоксидантної активності, що знижує навантаження на антиоксидантну систему організму.

Основні наукові результати даного розділу опубліковані в працях [3, 4].

3.4. Рівень експресії ряду генів, залучених до розвитку запалення у крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення суглобу та тривалого профілактичного введення хондроїтин сульфату

Нами було проведено вивчення молекулярно-генетичних основ формування запалення. Зокрема, ми визначили рівень експресії генів *Ptgs2* (циклооксигенази), *Nos2* (індуцибельної нітрооксидсинтази), *Tgfb1* (трансформуючого фактора росту бета) та *Nfkb1* (транскрипційного фактору NF-κB), що залученні до розвитку запалення. Дослідження молекулярних механізмів дозволяє отримати додаткову уяву про механізми профілактичної дії хондроїтин сульфату на організм за умов каррагінан-індукованого запалення суглобу.

3.4.1. Рівень експресії гену *Ptgs2* (циклооксигенази)

Ptgs2 кодує циклооксигеназу 2, фермент, що відповідає за синтез простагландину E_2 з арахідонату. Також він задіяний у таких біологічних процесах як метаболізм жирних кислот, метаболізм ліпідів, біосинтез жирних кислот, біосинтез ліпідів, біосинтез та метаболізм простагландинів [73, 195].

За фізіологічних умов циклооксигеназа 2 в більшості тканин та рідин організму не виявляється, але її рівень істотно збільшується на тлі розвитку запалення. Цей фермент є мішенню дії нестероїдних протизапальних препаратів, які використовують в якості консервативної терапії запальних захворювань суглобів [87].

В ході проведених експериментальних досліджень встановлено, що у щурів при запаленні суглобу, індукованому каррагінаном, у крові рівень експресії *Ptgs2* зростає в 1,6 раза відносно показників контролю (Рис. 3.23).

При тривалому профілактичному введенні хондроїтин сульфату тваринам з каррагінан-індукованим запаленням суглобу у крові рівень експресії *Ptgs2*

знижується в 1,3 раза у порівнянні з щурами з патологією. Показано, що хондропротектор не впливає на рівень досліджуваного показника у крові контрольної групи тварин (Рис. 3.23).

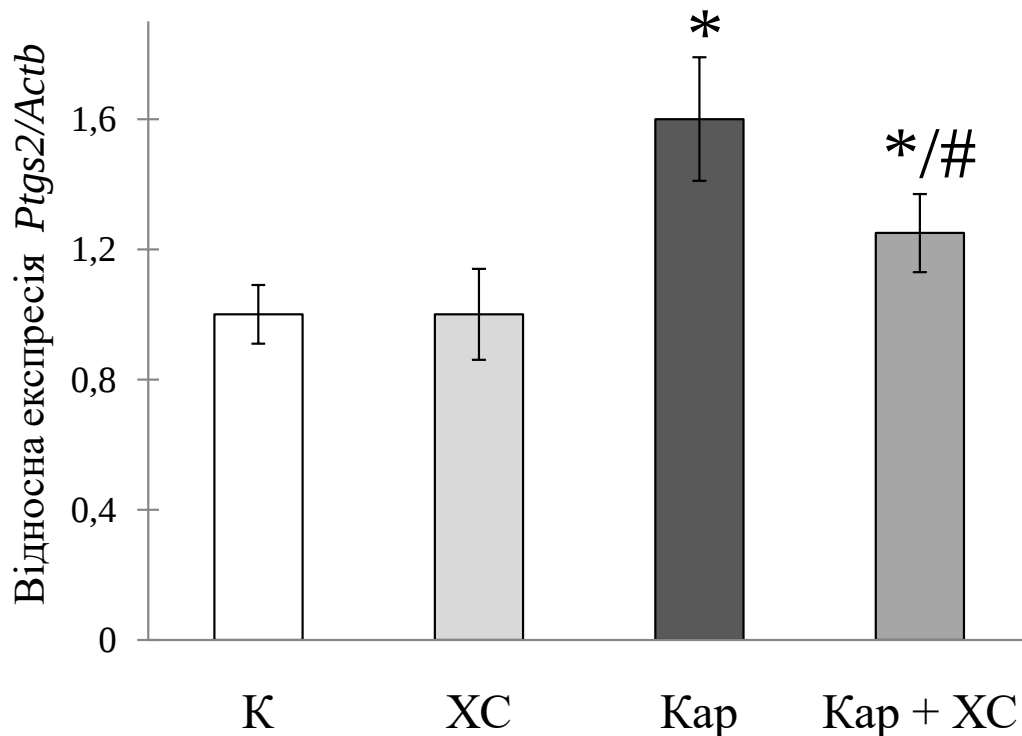


Рис. 3.23. Рівень експресії гену *Ptgs2* у крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Виявлене збільшення рівня експресії гену *Ptgs2* у крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу може призвести до активації синтезу простагландину E2, який є медіатором запалення. Біологічна дія простагландину E2 буде реалізовуватись через розширення і збільшення проникності мікроциркуляторних судин та розвиток запальної гіперемії, а також супресію функцій лімфоцитів та поліморфоядерних лейкоцитів. Наслідком збільшення

проникності мікроциркуляторних судин буде поява набряків. Також простагландин E2 сенсебілізує закінчення больових нервів до дії алгезуючих агентів (спричинюють біль), в тому рахунку гістаміну та брадікініну [159, 164].

При тривалому профілактичному введенні хондроїтин сульфату щурам з каррагінан-індукованим запаленням суглобу у крові рівень експресії гену *Ptgs2* знижується, що свідчить про антизапальні властивості досліджуваного препарату.

3.4.2. Рівень експресії гену *Nos2* (індуцибельної нітрооксидсинтази)

Nos2 кодує індукцибельну NO-синтазу. Синтез ферменту активується під дією різних агентів: бактеріальні ліпополісахариди, віруси та прозапальні цитокіни. Фермент синтезує монооксид 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 [71, 82].

Виявлено, що за умов гострого запалення суглобу у крові щурів рівень експресії *Nos2* зростає в 1,4 раза порівняно з контрольною групою (Рис. 3.24).

При профілактичному введенні хондроїтин сульфату щурам з експериментальним запаленням суглобу у крові рівень експресії *Nos2* знижується в 1,2 раза відносно показників тварин з гострим запаленням (Рис. 3.24). Показано, що хондропротектор не впливає на рівень досліджуваного показника у крові контрольної групи тварин (Рис. 3.24).

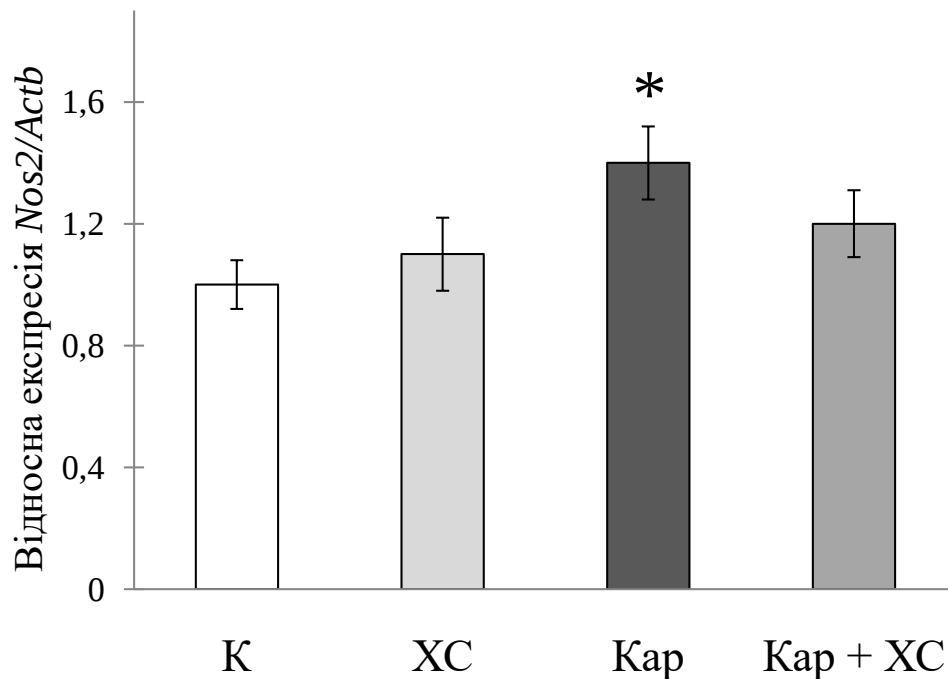


Рис. 3.24. Рівень експресії гену *Nos2* у крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Виявлене нами зростання рівня експресії гену *Nos2* у крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу відбувається внаслідок дії прозапальних цитокінів (ІЛ-1, ФНП- α , ІФ- γ) та інших агентів (бактеріальних ліпополісахаридів тощо). Збільшення активності індукцибельної NO-синтази може призвести до підвищення синтезу монооксиду азоту, який є медіатором запалення. Він стимулює синтез і вивільнення прозапальних цитокінів – ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-3, ІЛ-6, лейкотрієнів, хемокінів, які, в свою чергу, стимулюють міграцію лейкоцитів у вогнище запалення. В той же час, індукцибельна NO-синтаза

контролює біосинтез ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-11 та ІЛ-13, які належать до протизапальних цитокінів [127, 129]

Також високий рівень NO може призводити до розвитку окисного стресу, за рахунок взаємодії цієї молекули з супероксидним радикалом та утворення потужного радикалу-окислювача – пероксинітриту ($O=N-O-O-$), який за своєю реакційною здатністю переважає всі кисневі радикали. Таким чином, монооксид азоту володіє не тільки протимікробною дією, але і виступає в ролі активатора вільнорадикальних процесів та бере участь у пошкодженні структур організму [197].

Таким чином, рівень експресії індукцибельної NO-синтази та високий вихід продукції оксиду азоту є триггером для короточасних та довготривалих сигналів, які по відношенню до розвитку запалення можуть мати як активуючий, так і інгібуючий ефект. Напрямок розвитку залежить від стану метаболічних шляхів, що забезпечують індукцибельну NO-синтазу субстратами та кофакторами; стану інших шляхів, які можуть модулювати індукцію та активність цього ферменту; молекулярних мішеней, з якими взаємодіє оксид азоту та його похідні (нітрати, нітроти, пероксинітрит); локальних факторів (редокс-статус та ін.) та наявності ендогенних захисних та антиоксидантних механізмів [71].

Тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату тваринам з запаленням суглобу сприяє зниженню рівня експресії гену індукцибельної NO-синтази, що пов'язано з антизапальними та антирадикальними властивостями досліджуваного хондропротектора.

3.4.3. Рівень експресії гену *Tgfb1* (трансформуючого фактора росту бета)

Трансформуючий фактор росту- β – TGF- β_1 (кодується геном *Tgfb1*) є багатофункціональним цитокіном, який відіграє важливу роль у ряді біологічних процесів, включаючи модуляцію імунітету та запалення, контроль проліферації та росту клітин, міграцію та диференціювання, апоптоз, регуляцію репарації тканин і синтез компонентів позаклітинного матриксу. TGF- β_1 синтезується у вигляді прогормону, який перетворюється у зрілий TGF- β_1 за рахунок розщеплення амінокінцевої ділянки в апараті Гольджі. TGF- β_1 зв'язується з TGF- β_1 -зв'язуючими білками та секретується в латентній формі. Активація TGF- β_1 може відбуватися за рахунок різних молекулярних механізмів (при зв'язуванні інтегринами- $\alpha v\beta 6$, рецепторами до манозо-6-фосфату, плазміном, матриксними металопротеїназами 2 і 9 і тромбоспондином-1) [132, 187].

Встановлено, що зміна експресії трансформуючого фактору росту- β асоційована з розвитком запальних процесів. При різних патологічних станах TGF- β_1 стимулює надмірну проліферацію клітин, що викликає розвиток захворювань, подібних до остеоартритів, при чому його активність залежить від комплексу цитокінів та інших регуляторів [247, 248].

Встановлено, що у щурів з каррагінан-індукованим запаленням суглобу у крові рівень експресії *Tgfb1* зростає в 1,3 раза порівняно з показниками контрольної групи (Рис. 3.25).

При профілактичному введенні хондроїтин сульфату тваринам з експериментальним запаленням суглобу у крові рівень експресії *Tgfb1* повертається до контрольних значень у порівнянні з групою щурів з патологією. Показано, що хондропротекторний препарат не впливає на рівень досліджуваного показника у крові контрольної групи тварин (Рис. 3.25).

Показане нами зростання рівня експресії гену *Tgfb1* у крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу відбувається внаслідок активації АФК та матриксними металопротеїназами [44, 202] Згідно отриманих нами результатів у підрозділі 3.1.4 концентрація білка TGF- β_1 у крові щурів з експериментальним запаленням залишається незмінною. Відповідно встановлене

зростання експресії гену *Tgfb1* у крові свідчить про ранні зміни в організмі, які відбуваються при розвитку запалення, спричиненого дією каррагінану. Вірогідно на подальших стадіях запального процесу буде зростати і вміст продукту досліджуваного гену – TGF- β 1.

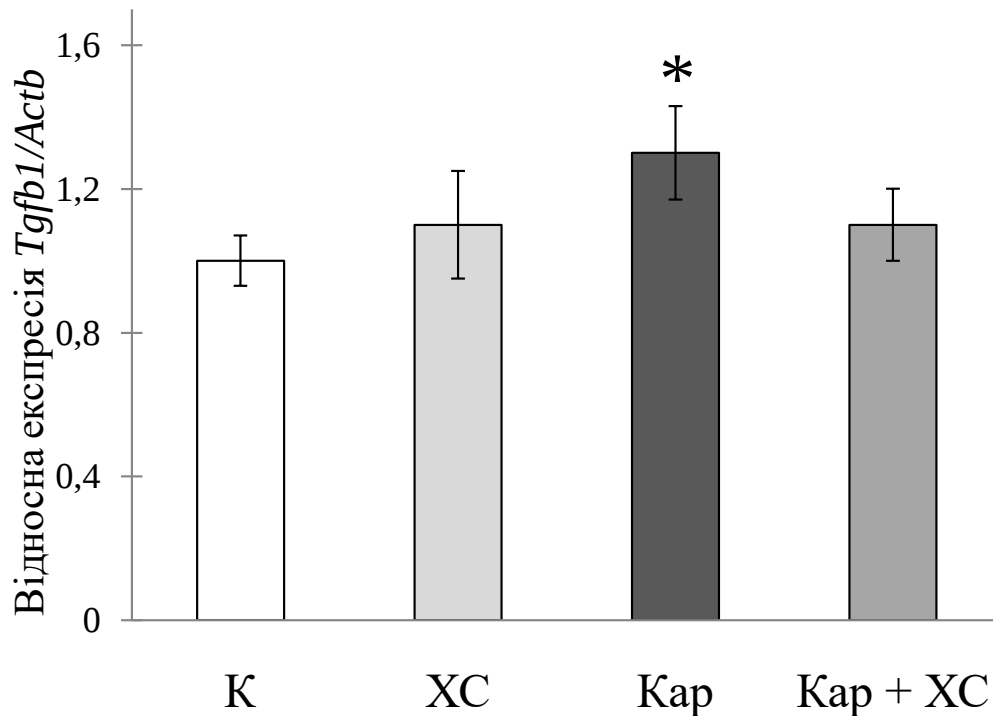


Рис. 3.25. Рівень експресії гену *Tgfb1* у крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Відомо, що 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, супероксидного радикалу та монооксиду азоту). Крім того, трансформуючий

фактор росту $\beta 1$ може стимулювати експресію моноцитарних цитокінів (включаючи ІЛ-1 α , ІЛ-1 β та ФНП- α) [85, 106, 132, 248]

Оскільки профілактичне застосування препарату на основі хондроїтин сульфату щурам, яким вводили каррагінан, призводить до зниження експресії гену *Tgfb1* у крові, це свідчить про зниження інтенсивності розвитку запалення. Відповідно немає необхідності у системному синтезі трансформуючого фактору росту- β в організмі, який бере участь у протизапальних механізмах.

3.4.4. Рівень експресії гену *Nfkb1* (транскрипційного фактору NF- κ B)

Транскрипційний фактор NF- κ B (ядерний фактор «каппа-бі»;) є універсальним транскрипційним фактором, який контролює експресію генів імунної відповіді, клітинного циклу та апоптозу. Крім того, NF- κ B регулює багато генів, що беруть участь у запальних реакціях. Зокрема, NF- κ B регулює гени, що беруть участь в кодуванні цитокінів (ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-12, фактора некрозу пухлини- α), хемокінів (ІЛ-8, MIP1, RANTES і еотоксину), білків гострої фази, молекул адгезії, індукцйбельних ефекторів ферментів (наприклад, iNOS, COX-2) [131, 154].

Члени цієї родини відповідають за регуляцію більше 150 генів-мішеней. Діючи як димери ці фактори транскрипції зв'язуються з ДНК в κ B сайтах, тим самим регулюючи експресію генів-мішеней.

У стані спокою клітина накопичує та зберігає NF- κ B в неактивному стані, який інгібується протеїном I κ B. Певні стимули призводять до фосфорилювання, убіквітинування та послідовній деградації I κ B, що робить можливим транслокацію NF- κ B в ядро. Це дає можливість NF- κ B регулювати експресію генів-мішеней. Завдяки механізму зворотного зв'язку I κ Bа входить у ядро, видаляє NF- κ B з ділянок ДНК і транспортує його назад у цитоплазму, де він зберігається в неактивному стані.

Все вище викладене вказує на важливість дослідження даного гену, оскільки NF-κB створює молекулярні зв'язки між різними ланками запального процесу.

Встановлено, що у щурів при запаленні суглобу, індукованому каррагінаном, у крові рівень експресії *Nfkb1* зростає в 1,8 раза відносно контролю (Рис. 3.26).

При тривалому профілактичному введенні хондроїтин сульфату тваринам з каррагінан-індукованим запаленням суглобу у крові рівень експресії *Nfkb1* знижується в 1,4 раза у порівнянні з щурами з патологією. Показано, що хондропротектор не впливає на рівень досліджуваного показника у крові контрольної групи тварин (Рис. 3.26).

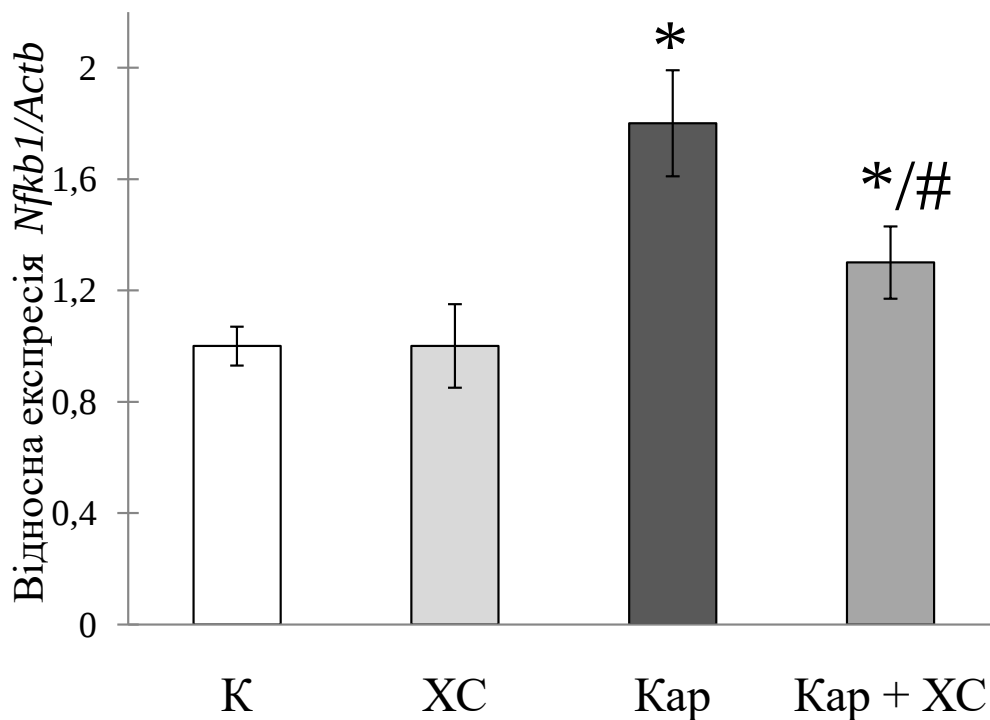


Рис. 3.26. Рівень експресії гену *Nfkb1* у крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичного введення хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату тваринам з запаленням суглобу сприяє зниженню рівня експресії гену *Nfkb1*, що пов'язано зі зниженням інтенсивності запалення. Це відбувається внаслідок антизапальних та антиоксидантних властивостей досліджуваного хондропротекторного препарату [39, 110, 199].

Показане нами зростання рівня експресії гену *Nfkb1* у крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу свідчить про розвиток наступних подій в організмі. В результаті дії різних прозапальних стимулів (ІЛ-1, фактора некрозу пухлини, гіпоксія) запускаються шляхи сигнальної трансдукції, що негайно призводять до активації специфічної ІкВ кінази – ІКК. Активація ІКК комплексу і подальша деградація ІкВ призводить до звільнення NF-кВ. Звільнений NF-кВ транслокується в ядро та зв'язується з кВ-сайтами всередині промоторів відповідних генів для активації їх транскрипції [69, 194]. Далі NF-кВ буде впливати на гени, що задіяні у гострофазну та запальну відповіді: ІЛ-1 β , ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-12, ФНП- α , індукцибельні ферменти (iNOS, COX-2) та ін. Таким чином, дослідження експресії ряду генів, що залучені до розвитку запалення у щурів при введенні каррагінану, свідчить про залучення молекулярно-генетичних механізмів у розвиток запалення на системному рівні.

При профілактичному введенні хондроїтин сульфату щурам з експериментальним запаленням суглобу встановлене зниження розвитку запального процесу на системному рівні. Встановлені ефекти пов'язані як з антизапальними, так і антиоксидантними властивостями досліджуваного препарату. З літературних даних відомо, що хондроїтин сульфат у хондроцитах та клітинах синовіальної мембрани знижує ядерну транслокацію NF-к β – ядерного фактору, який є ключовою ланкою у розвитку запальних та імунних реакцій [110,

199]. Крім того молекула хондроїтин сульфату володіє власною антиоксидантною активністю. За рахунок карбоксильних груп залишку глюкуронової кислоти та сульфатованою групою в положенні 4 або 6 амінокислотного залишку в протилежному боці карбонової групи молекули ХС здатний хелатувати іони перехідних металів (залізо, мідь та ін.), які приймають безпосередню участь у ініціюванні реакцій Фентона та Хабер-Вейса, що призводить до зменшення інтенсивності вільнорадикальних процесів [39].

Таким чином, згідно отриманих результатів експериментальних досліджень встановлено, що при каррагінан-індукованому запаленні суглобу щурів на системному рівні у крові спостерігається розвиток запалення, яке супроводжується інтенсифікацією вільнорадикальних процесів та порушенням роботи системи антиоксидантного захисту. Тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату щурам з експериментальною моделлю локального запалення суглобу призводить у крові до зниження прояву запальних явищ (зниження рівня прозапальних цитокінів, С-реактивного білка, рівня експресії генів *Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*, *Nfkb1*, зниження розвитку ендогенної інтоксикації (зниження вмісту молекул середньої молекулярної маси) та відновлення окисно-антиоксидантної рівноваги (зниження утворення АФК, продуктів окиснення ліпідів та білків, нормалізації активності ферментів антиоксидантної системи).

Основні наукові результати даного розділу опубліковані в працях [16, 50, 51, 189].

УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Провідне місце серед захворювань займають патології опорно-рухового апарату, зокрема хвороби суглобів. Патогенез більшості захворювань суглобів (ревматоїдний артрит, реактивний артрит, інфекційний артрит, ідіопатичний анкілозуючий спондилоартрит, подагричний артрит, деформуючий остеоартроз, бурсит) відбувається внаслідок розвитку запалення, яке проявляється як місцево у самому суглобі, так і системно – в організмі в цілому. Згідно даних літератури важливу роль у запальних процесах відіграє інтенсифікація вільнорадикальних процесів. Тому стан окисно-антиоксидантної системи в організмі має важливе значення у патогенезі захворювань суглобів [65, 82, 130, 173, 213, 232, 246].

При тривалому запаленні у суглобі спостерігаються дегенеративні зміни хрящової тканини, що призводить до структурно-функціональних змін суглобу. У зв'язку з цим важливим є пошук препаратів, які б володіли регенераційними, протизапальними та антирадикальними властивостями. Серед таких сполук важливе місце займає хондроїтин сульфат, який є специфічним компонентом хряща, що забезпечує його пружність та щільність [48, 218]. За даними літератури, крім відомої структурної функції, молекули хондроїтин сульфату здатні проявляти антизапальні та антиоксидантні властивості [59, 60, 61, 40, 210, 249]. Тому дослідження біологічної дії хондроїтин сульфату на організм є перспективним у профілактиці та лікуванні захворювань суглобів. Зокрема, важливо своєчасно приймати міри для того, щоб зупинити або пригальмувати розвиток патологічних змін у суглобах на початкових стадіях захворювань, а також проводити їх профілактику у людей похилого віку, при генетичній схильності до розвитку хвороб суглобів та при професійній ймовірності перевантаження опорно-рухового апарату.

Метою нашого дослідження було вивчити профілактичну дію хондроїтин сульфату на розвиток запалення суглобу, викликаного субплантарним введенням

1% розчину каррагінану. Хондроїтин сульфат (препарат «Драстоп», «WORLD MEDICINE», GREAT BRITAIN) вводили тваринам внутрішньом'язево у терапевтичній дозі $3 \text{ мг} \times \text{кг}^{-1}$ щоденно протягом 28 діб.

У ході проведених експериментів на гістологічному рівні було показано, що у щурів при субплантарному введенні каррагінану, спостерігається значний набряк навколосуглобових тканин задньої кінцівки. У навколосуглобовій м'язовій тканині спостерігаються вогнищеві інфільтрати, що складаються з лейкоцитів і гістіоцитів та десквамованих фрагментів. Таким чином, у щурів, яким вводили каррагінан, виявляються ознаки розвитку гострого запалення суглобу, що підтверджує адекватність нашої моделі. Профілактичне введення хондроїтин сульфату тваринам з каррагінан-індукованим запаленням суглобу на гістологічному рівні зменшує інтенсивність запальних явищ у м'язево-суглобовому компоненті задньої кінцівки щурів.

При дослідженні розвитку запалення суглобу у щурів, яким вводили каррагінан, показано у сироватці крові зростання рівня неспецифічного маркера запалення – С-реактивного білка, а також виявлено розвиток ендогенної інтоксикації – збільшується рівень молекул середньої молекулярної маси, що є проявом прогресії запалення. За даних експериментальних умов у крові виявлено активацію імунітокінової системи: зростає рівень прозапальних цитокінів (ІЛ- 1β , ІЛ-12В р40, ФНП- α), при цьому рівень антизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10) залишається незмінним.

Досліджувані показники у сироватці крові частково відновлюються при профілактичному введенні хондроїтин сульфату щурам з гострим запаленням суглобу: зменшується концентрація гострофазного білка – С-реактивного білка та молекул середньої молекулярної маси, які належать до маркерів запальних процесів та ендогенної інтоксикації. За даних експериментальних умов тривале профілактичне введення хондроїтин сульфату у сироватці крові викликає зменшення концентрації прозапальних цитокінів (ІЛ- 1β , ІЛ-12В р40, ФНП- α), але

при цьому рівень антизапального цитокіну ІЛ-10 зростає порівняно з групою тварин з експериментальним запаленням суглобу.

При каррагінан-індукованому запаленні суглобу нами було досліджено інтенсивність вільнорадикальних процесів у крові щурів та показано зсув окисно-антиоксидантної рівноваги в напрямку інтенсифікації прооксидантних процесів та порушення роботи системи антиоксидантного захисту. Зокрема, у сироватці крові при каррагінан-індукованому запаленні суглобу зростає вміст супероксидного радикалу, гідроген пероксиду, підвищується вміст продуктів пероксидного 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 запаленні суглобу у крові порушується робота системи антиоксидантного захисту. Показано, що при каррагінан-індукованому запаленні у сироватці крові знижується супероксиддисмутазна та зростає каталазна активність порівняно з контролем. За даних експериментальних умов у сироватці крові глутатіонпероксидазна та глутатіонредуктазна активності знижуються, при цьому глутатіонтрансферазна активність зростає відносно показників контрольних значень. Виявлено, що в сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу вміст відновленого глутатіону знижується, при цьому вміст окисненого глутатіону зростає порівняно з контролем. Отримані нами дані свідчать про розвиток окисного стресу у крові щурів з експериментальним запаленням суглобу.

При тривалому профілактичному введенні хондроїтин сульфату щурам з гострим запаленням суглобу у сироватці крові відновлюється окисно-антиоксидантний гомеостаз порівняно з групою тварин з каррагінан-індукованим запаленням. Зокрема, сироватці крові знижується вміст активних форм кисню (супероксидного радикалу, гідроген пероксиду) та продуктів ліпідної пероксидації (дієнових кон'югатів, ТБК-активних сполук, шиффових основ). За даних експериментальних умов профілактичне введення хондроїтин сульфату

сприяє зменшенню у сироватці крові рівня окисної модифікації білків: знижується вміст нейтральних альдегідних і кетонних продуктів, основних альдегідних і кетонних продуктів та відновлюється рівень білкових та загальних сульфгідрильних груп у білкових молекулах.

Наступна серія експериментів присвячена вивченню молекулярно-генетичних основ формування запалення. Зокрема, ми визначили рівень експресії генів *Ptgs2* (циклооксигенази), *Nos2* (індуцибельної нітрооксидсинтази), *Tgfb1* (трансформуючого фактора росту бета) та *Nfkb1* (транскрипційного фактору NF-κB), що залученні до розвитку запалення. Показано збільшення рівня експресії досліджуваних генів (*Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*, *Nfkb1*) у крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення суглобу. При тривалому профілактичному введенні хондроїтин сульфату щурам з гострим запаленням суглобу у крові досліджувані показники відновлюються порівняно з групою тварин з експериментальним запаленням: рівень експресії генів *Ptgs2* та *Nfkb1* частково відновлюється, а рівень експресії генів *Nos2* та *Tgfb1* повертається до контрольного рівня.

Таким чином, згідно отриманих результатів експериментальних досліджень встановлено, що при каррагінан-індукованому запаленні суглобу щурів на системному рівні у крові спостерігається розвиток запалення, яке супроводжується інтенсифікацією вільнорадикальних процесів та порушенням роботи системи антиоксидантного захисту.

Виявлене нами зниження розвитку запалення та інтенсивності вільнорадикальних процесів у крові при профілактичному тривалому введенні хондроїтин сульфату щурам з патологією пов'язано з антизапальними, антирадикальними та регенераційними властивостями даної сполуки [28, 48, 178, 196].

Хондроїтин сульфат є одним з основних компонентів екстрацелюлярного матрикса хряща та є складовою протеогліканових комплексів основної речовини хрящової тканини [143, 148]. Він володіє вираженою гідрофільністю за рахунок наявності карбоксильної та сульфатної груп, що сприяє нормальному

функціонуванню хряща та збереженню його еластичності. Хондроїтин сульфат активує анаболічні процеси за рахунок стимуляції синтезу протеогліканів і колагену, а також пригнічує синтез ферментів деструкції хряща (металопротеїнази 3, 9, 13, 14; катепсину-бета, лейкоцитарної еластази) [183].

Також, відомо, що хондроїтин сульфат володіє імуномодулюючою активністю. У ряді досліджень *in vitro* та *in vivo* показано, що хондроїтин сульфат може зменшити окислювальний стрес та / або зменшити біосинтез різних прозапальних молекул у клітинах, що стимулюються запаленням [40, 56, 59, 60, 61, 98, 210, 249]. З цієї причини хондроїтин сульфат було введено як дієтична добавка для лікування хворих на остеоартрит [145, 209].

Однак опосередкований вплив хондроїтин сульфату на запалення може бути специфічним для клітин і, що ще важливіше, це також може залежати від структури глікозаміногліканів, особливо від сульфатування їх структури. Таке припущення є результатом досліджень, в яких було вивчено вплив декількох препаратів хондроїтин сульфату, що хімічно відрізнялись між собою за місцем сульфатування молекули, на ступінь вираженості експериментального аутоімунного енцефаломієліту. Показано, що структурно різноманітні препарати хондроїтин сульфату значно скорочують вивільнення кількох прозапальних молекул з макрофагів, які стимулювали ліпополісахаридом. А саме, при дослідженні дії природних сульфатів хондроїтину з різними структурами на культивованих хондроцитах та макрофагах показано, що і хондроїтин-4-сульфат, і хондроїтин-6-сульфат мали протизапальну дію як на хондроцити, так і на макрофаги, але з різною ефективністю. Так, на хондроцитах коня та людини вони знизили ІЛ-1 β -індуковане вивільнення NO і простагландину E2, а при дії на RAW 264.7 іморталізовану макрофагоподібну клітинну лінію сульфати хондроїтину знизили ліпополісахарид-індуковане вивільнення фактору некрозу пухлин- α , але не вплинули на рівень ІЛ-6. В той же час, при дії на макрофаги, що походять з кісткового мозку, хондроїтин-4-сульфат і хондроїтин-6-сульфат знижували ліпополісахарид-індуковане вивільнення ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-1 β та NO [74].

В інших експериментах з нокаутом та надмірною експресією C6ST-1 показали, що 6-О-сульфатований хондроїтин сульфат може полегшити клінічний прояв аутоімунного енцефаломієліту [155]. Японськими дослідниками було встановлено, що хондроїтин-6-сульфат інгібує *in vitro* секрецію ІЛ-6 у макрофагах, які були прозапально стимульовані бактеріальною та вірусною ДНК за допомогою Toll-подібного рецептора (TLR) 9, більш ефективно, ніж хондроїтин-4-сульфатом [111].

Американськими дослідниками було показано, що хондроїтин-6-сульфат у ліпополісахарид-активованих макрофагах викликає зниження продукції прозапального інтерлейкіну-12 [112].

Антизапальна дія хондроїтин сульфату пов'язана з його здатністю пригнічувати ядерну транслокацію NF-κB, який ініціює транскрипцію спектру генів, що контролюють клітинну відповідь на ендо- та екзосигнали. Зокрема, NF-κB контролює експресію ряду генів, що кодують цитокіни, хемокіни, реактанти гострої фази запалення [59, 60, 113, 184, 206].

Крім того, хондроїтин сульфат володіє власною антиоксидантно активністю [52, 56, 57; 58, 158, 179, 251]. Так, у ряді досліджень італійських вчених [56, 57, 58] показано здатність хондроїтин сульфату хелатувати іони перехідних металів (залізо, мідь та ін.), які приймають безпосередню участь у ініціюванні реакцій Фентона та Хабер-Вейса. Це призводить до зменшення утворення вільних радикалів. Хелатування відбувається за рахунок зв'язування металів з карбоксильною групою залишку глюкуронової кислоти та сульфатованою групою в положенні 4 або 6 амінокислотного залишку в протилежному боці карбонової групи молекули хондроїтин сульфату [39].

Підсумовуючи вище вказане, можна зазначити, що хондроїтин сульфат є специфічним компонентом хряща, в складі протеогліканів матриксу він забезпечує еластичність та амортизацію при рухах, стимулює синтез протеогліканів та гіалуронової кислоти, гальмує процеси вільнорадикального окиснення, є ключовою ланкою в запальних сигнальних каскадах, пригнічує

активність катаболічних ферментів та прозапальних цитокінів, блокує геномні механізми апоптозу хондроцитів, здійснює структурно-модифікуючий вплив на субхондральну кістку. Отже, хондроїтин сульфат – є мультфункціональною макромолекулою, біологічна роль якої не обмежується лише структурною функцією як складової агрекану – основного протеоглікану хрящового матриксу. Хондроїтин сульфат також володіє власною антизапальною та антиоксидантною активністю.

Таким чином, нами було проведено дослідження профілактичної дії хондропротекторного препарату – хондроїтин сульфату на біохімічні показники розвитку запалення в організмі щурів при експериментальному запаленні суглобу, викликаного каррагінаном. Показано взаємозв'язок запалення з процесами вільнорадикального окиснення та функціонуванням системи антиоксидантного захисту у крові щурів на моделі каррагінан-індукованого запалення суглобу та при профілактичному введенні хондропротектора. Встановлено, що хондропротекторний препарат на основі хондроїтин сульфату володіє імуномодулюючими, антизапальними та антиоксидантними властивостями, завдяки яким відбувається зниження інтенсивності запальних та вільнорадикальних процесів в організмі при експериментальному запаленні суглобу.

ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота була присвячена оцінці стану певних показників запалення в крові щурів за умов розвитку експериментального запалення суглобу та при профілактичному введенні хондроїтин сульфату. Встановлено, що введення хондроїтин сульфату щурам знижує розвиток запалення у м'яких тканинах суглобу (зменшення набряку, зниження лейкоцитарної інфільтрації тканин) та зниження в крові прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-12В р40, ФНП- α), С-реактивного білка, молекул середньої молекулярної маси, рівня експресії генів, що залучені до розвитку запалення (*Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*, *Nfkb1*) та збільшення рівня антизапального цитокіну ІЛ-10.

1. Показано, що за умов карагінан-індукованого запалення суглобу на гістологічному рівні виявлена запальна реакція в м'яких тканинах суглобу, при цьому у сироватці крові зростала концентрація С-реактивного білка, молекул середньої молекулярної маси, ІЛ-1 β , ІЛ-12В р40, ФНП- α , у той час як рівень ІЛ-4, ІЛ-10 не змінювався. Профілактичне введення хондроїтин сульфату тваринам з запаленням суглобу призводило до зниження концентрації С-реактивного білка – в 1,4 рази, молекул середньої молекулярної маси, ІЛ-1 β та ІЛ-12В р40 – в 1,3 рази, ФНП- α – в 1,6 рази на фоні підвищення протизапального ІЛ-10 відносно групи тварин з експериментальним запаленням.
2. Встановлено, що за умов карагінан-індукованого запалення суглобу у сироватці крові підвищувався вміст активних форм кисню, продуктів окиснення ліпідів та білків відносно контролю. Профілактичне введення хондроїтин сульфату тваринам з запаленням суглобу призводило до зниження вмісту супероксидного радикалу – в 1,4 рази, гідроген пероксиду – в 1,3 рази та продуктів окиснення ліпідів та білків відносно групи тварин з експериментальним запаленням.
3. Виявлено, що за умов карагінан-індукованого запалення суглобу у сироватці крові активність супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази знижувалася, у той час як вміст відновленого глутатіону та активність каталази, глутатіонтрансферази і вміст окисненого глутатіону зростала порівняно з контролем. Профілактичне введення хондроїтин сульфату тваринам з запаленням суглобу сприяло підвищенню активності супероксиддисмутази – в 1,2 рази, глутатіонпероксидази – в 1,4 рази, глутатіонредуктази – в 1,3 рази, вмісту відновленого глутатіону – в 1,5 рази та знижувало активність каталази,

глутатіонтрансферази – в 1,3 рази та вміст окисненого глутатіону – в 1,2 рази відносно групи тварин з експериментальним запаленням.

4. Показано, що за умов карагінан-індукованого запалення суглобу у крові зростає рівень експресії прозапальних генів (*Ptgs2*, *Nos*, *Tgfb1*, *Nfkb1*) порівняно з контролем. Профілактичне введення хондроїтин сульфату тваринам з запаленням суглобу **призводило до зниження** рівня експресії *Ptgs2* – в 1,3 рази, *Nos2* та *Tgfb1* – в 1,2 рази та *Nfkb1* – в 1,4 рази відносно групи тварин з експериментальним запаленням.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Александрова ЛА, Филиппова НА, Субботина ТФ, Алексеевская ЕС, Жлоба АА, Трофимов ВИ. Оценка проявлений окислительно-нитрозильного стресса при системных заболеваниях соединительной ткани. Ученые записки СПбГМУ им. акад. ИП Павлова. 2016;23(1):26-28.
2. Андрійчук ОЯ, Григус ІМ Аналіз стану захворюваності та поширеності хвороб кістково-м'язової системи в Україні та Волинській області. Проблеми фізичного виховання і спорту. 2010; 4: 3-7.
3. Блохіна О, Кот Л, Хілько В, Драницина А, Дворщенко К. Вільнорадикальні процеси у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення задньої кінцівки та тривалого профілактичного введення хондроїтина сульфату. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2018;1(25): 6-9.
4. Блохіна О, Кисельова А, Драницина А, Дворщенко К. Дія хондроїтин сульфату на вільнорадикальні процеси у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення. XVII Міжнародна наукова конференція «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки BioScience Advances»; 2019, квітень, 23 – 25; Київ; 2019; 57-58.
5. Блохіна О, Короткий О, Кот Л, Неграй Д, Дворщенко К Окисна модифікація білків у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення та тривалого профілактичного введення хондроїтина сульфату. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. 2018;2(76): 62-65.
6. Блохіна О, Кот Л, Торгалю Є, Дворщенко К Концентрація С-реактивного білка та молекул низької та середньої молекулярної маси у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення та тривалого

профілактичного введення хондроїтина сульфату. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2019;1(26): 17-21.

7. Бур'янов ОА, Омельченко ТМ. Лікування остеоартрозу в рамках доказової медицини. Здоров'я України. 2011;1: 12-14.

8. Владиміров ЮА. Вільні радикали і антиоксиданти. Вісн. російськ. академії мед.наук. 2003;4: 42-45.

9. Власова СН, Шабуніна ЕІ, Переслегіна ІА. Активність глутатионзависимих ферментів еритроцитів при хронічних захворюваннях печини у дітей. Лаб. Дело. 1990;8: 19-22.

10. Внуков ВВ, Кролевець ІВ, Милютіна НІ, Гуценко ОІ, Забродін, МА, Аніна СБ, Бражников ЮІ. Свободнорадикальное окисление в синовиальной жидкости и апоптоз хондроцитов при гонартрозе. Валеология. 2012;(4): 38.

11. Габріелян НІ. Скринінговий метод визначення середніх молекул в біологічних гідроксидних. Методическі рекомендації. Мир. 1985;11.

12. 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.

13. Головач ІЮ. Остеоартрит: фундаментальні і прикладні аспекти етіопатогенеза захворювання. Нічого не стоїть на місці. Український ревматологічний журнал. 2014;2 (56):4-11.

14. Добротіна НА, Копытова ТВ. Эндоинтоксикация организма человека: методологические и методические аспекты. учебное пособие. Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. Нижний Новгород. 2004:72.

15. Долгов ВВ. [и др.]. Турбидиметрия в лабораторной практике.: Реафарм. 2007; 176.

16. Драницина А, Блохіна О, Короткий О, Дворщенко К, Остапченко Л. Експресія гена Ptgs2 у клітинах хрящової тканини колінного суглоба щурів за умов остеоартрозу та при введенні біологічно-активних речовин. Вісник

Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2018;1(24):36-42.

17. Дубинина ЕЕ, Бурмистров СО, Ходов ДА, Поротов ИГ. Окислительные модификации белков сыворотки крови человека, метод ее определения. Вопросы медицинской химии. 1995;1:24–26.

18. Карякина ЕВ. Эндогенная интоксикация и нарушение метаболизма соединительной ткани у больных ревматоидным артритом. Карякина Е.В. Дисс.д-ра мед.наук. Саратов. 1998; 346.

19. Карякина ЕВ. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) .ЕВ. Карякина, СВ. Белова. Клин. лабор. диагн. 2004;3:3–8.

20. Келина НЮ, Безручко НВ, Рубцов ГК. Биохимические проявления эндотоксикоза: методические аспекты изучения и оценки, прогностическая значимость (аналитический обзор). Вест. Тюмен. госуд. ун-та. 2012;6:143–147.

21. Колесова ОЕ. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах .О.Е. Колесова, АА. Маркин, ТН. Седорова. Лабор. дело. 1984;9:540–546.

22. Королюк МА, Иванова ЛК, Майорова ИГ, Токарева ВА. Метод определения активности каталазы. Клиническая лабораторная диагностика. 1988; (4):44-47.

23. Корпан МІ. Лікування остеоартрозу: пірамідний підхід. Літопис травматології та ортопедії. 2008;1(2):47-52.

24. Лавришин ЮЮ, Вархоляк ІС, Мартишук ТВ, Гута ЗА, Іванків ЛБ, Паладійчук ОР, Мурська СД, Гутий БВ, Гуфрій ДФ. Біологічне значення системи антиоксидантного захисту організму тварин Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. 2016;2(66):100-111.

25. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. 1969; 102–108: 157–167.

26. Меркулов ГА. Курс патологической техники. Медгиз. 1969;339.

27. Нагоев БС, Маржохова МЮ, Афашагова ММ, Маржохова АР. Содержание веществ низкой и средней молекулярной массы в биологических жидкостях у больных рожей. Клинический журнал. 2013;7:41-45.
28. Наумов АВ, Ховасова НО, Мороз ВИ, Ткачева ОН. Место хондроитина сульфата и глюкозамина сульфата в терапии боли при остеоартрите. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2019;119(9):112-117.
29. Орехович ВН. Современные методы в биохимии. Медицина. 1977;С.62-68.
30. Реброва ОЮ. Статистический анализ медицинских данных. М.: Информполиграф. 2002;305.
31. Сидельникова ВИ, Черницкий АЕ, Рецкий МИ. Эндогенная интоксикация и воспаление: последовательность реакций и информативность маркеров. Сельскохозяйственная биология. 2015;50(2):152-161.
32. Сміян СІ, Масик ОМ, Слаба УС. Синдром ендогенної інтоксикації як маркер запального процесу при ревматичних захворюваннях суглобів. Вісник наук. досліджень. 2000;1:40-42.
33. Туровская ЕФ, Алексеева ЛИ, Филатова ЕГ. Современные представления о патогенетических механизмах боли при остеоартрозе. Научно-практическая ревматология. 2014;52(4):23-27.
34. 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.
35. Шевченко СС, Грекова АИ. Оценка уровня молекул средней и низкой массы и пептидов у детей раннего возраста при пневмонии и ОРВИ. Детские инфекции. 2015;1:9-12.
36. 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 var. nicotianae*. Plant Physiology. 1998;117(2):491-499.

37. Abramoff B, Caldera FE. Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *Med Clin North Am.* 2020 Mar;104(2):293-311.
38. Abusarah J, Bentz M, Benabdoune H, Rondon PE, Shi Q, Fernandes JC, Fahmi H, Benderdour M. An overview of the role of lipid peroxidation-derived 4-hydroxynonenal in osteoarthritis. *Inflamm. Re.* 2017;66(8) P.637-651.
39. Ajisaka K, Oyanagi Y, Miyazaki T, Suzuki Y. Effect of the chelation of metal cation on the antioxidant activity of chondroitin sulfates. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2016;80(6):1179-1185. doi: 10.1080/09168451.2016.1141036.
40. Andres R.M, Paya M, Montesinos M.C, Ubeda A, Navalon P, Herrero M, Verges J & Terencio MC. Potential antipsoriatic effect of chondroitin sulfate through inhibition of NF- κ B and STAT3 in human keratinocytes. *Pharmacol Res.* 2013; 70: 20–26.
41. Attur M, Krasnokutsky-Samuels S, Samuels J, Steven B. Abramson S.B. Prognostic biomarkers in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2013;25(1):136–144.
42. Baba S.P. and Bhatnagar A. Role of thiols in oxidative stress. *Curr Opin Toxicol.* 2018 Feb; 7: 133–139.
43. 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.
44. Barcellos-Hoff MH and Dix TA. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Molecular Endocrinology.* 1996;10(9):1077-1083.
45. Benhar M. Roles of mammalian glutathione peroxidase and thioredoxin reductase enzymes in the cellular response to nitrosative stress. *Free Radic Biol Med.* 2018;127:160-164.
46. Beringer A, Miossec P. Systemic effects of IL-17 in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2019;15(8):491-501.

47. 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.
48. Bishnoi M, Jain A, Hurkat P, Jain S.K. Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis. *Glycoconj. J.* 2016;33;5:693-705. doi: 10.1007/s10719-016-9665-3.
49. Blokhina OG, Dvorshchenko KO, Dranitsina AS, Grebinyk DM. Effect of chondroitin sulfate on oxidative balance in blood serum of rats with acute hind paw inflammation. XI Parnas Conference (Kyiv, Ukraine). *Ukr. Biochem. J.* 2018;90, Special Issue 2018:165.
50. Blokhina OG, Dranitsina AS, Dvorshchenko KO, Grebinyk DM, Korotkyi O, Ostapchenko L. Expression of NF- κ B gene in blood of rats with acute hind paw inflammation and with administration of chondroitin sulfate. *Biomed Talks. міжнародна науково-практична конференція-школа студентів та молодих вчених*. 2019;1(1):15-16.
51. Blokhina OG, Dranitsina AS, Dvorshchenko KO, Grebinyk DM, Korotkyi O, Ostapchenko L. Expression of *Ptgs2* and *Nos2* genes in blood serum of rats with acute hind paw inflammation and with administration of chondroitin sulfate. *Матеріали XII українського біохімічного конгресу. Медична та клінічна хімія* 2019;21(3):159-160.
52. Bobula T, Buffa R, Hermannová M, Vágnerová H, Dolečková I, Velebný V. The synthesis of a new unsaturated derivative of chondroitin sulfate with increased antioxidant properties. *Carbohydr. Polym.* 2018 Jun 15;190:175-183.
53. Bolduc JA, Collins JA, Loeser RF. Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis. *Free Radic Biol Med*,. 2019 Feb 20;132:73-82.
54. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008 Jan;214(2):149-160.
55. Breusing N, Grune T. Biomarkers of protein oxidation from a chemical, biological and medical point of view. *Exp. Gerontol.* 2010;45;10:733-737.

56. Campo GM, Avenoso A, Campo S, Ferlazzo AM & Calatroni A Administration of hyaluronic acid and chondroitin-4-sulfate limits endogenous antioxidant depletion and reduces cell damage in experimental acute pancreatitis. *Pancreas*. 2004; 28, e45–e53.
57. Campo GM, Avenoso A, Campo S, Ferlazzo A.M, Calatroni A. Chondroitin sulphate: antioxidant properties and beneficial effects. *Mini Rev. Med. Chem*. 2006;6(12):1311-1320.
58. Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Traina P, Calatroni A. Chondroitin-4-sulphate inhibits NF-kB translocation and caspase activation in collagen-induced arthritis in mice. *Osteoarthritis and cartilage*. 2008;16, Issue 12: 1474–1483.
59. Campo GM, Avenoso A, Campo S, Nastasi G, Traina P, D'Ascola A & Calatroni A Chondroitin-4- sulphate reduced oxidative injury in caerulein-induced pancreatitis in mice: The involvement of NF-jB translocation and apoptosis activation. *Exp Biol Med*. 2008;233, 741–752.
60. Campo GM, Avenoso A, Campo S, Traina P, D'Ascola A, Calatroni A. Glycosaminoglycans reduced inflammatory response by modulating toll-like receptor-4 in LPS-stimulated chondrocytes. *Arch Biochem Biophys* 2009;491:7–15.
61. Canas N, Gorina R, Planas AM, Verg ~ es J, Montell E, Garc□1a AG & Lopez MG. Chondroitin sulfate inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in rat astrocytes by preventing nuclear factor kappa B activation. *Neuroscience* 2010;167, 872–879.
62. Caraglia M, Beninati S, G Giuberti G, D'Alessandro A M, Lentini A, Abbruzzese A, Bove G, Landolfi F, Rossi F, Lampa E, Costantino M. Alternative therapy of earth elements increases the chondroprotective effects of chondroitin sulfate in mice. *Exp Mol Med*. 2005 Oct 31;37(5):476-81.
63. Cha SJ, Han YJ, Hyun-Jun Choi, Hyung-Jun Kim, Kiyoun Kim Glutathione S. Transferase Rescues Motor Neuronal Toxicity in Fly Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Antioxidants (Basel)* 2020 Jul; 9(7): 615.

64. 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.
65. Charlier E, Relic B, Deroyer C, Malaise O, Neuville S, Collée J, Malaise M.G, De Seny D. Insights on Molecular Mechanisms of Chondrocytes Death in Osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(12):Pii: E2146.
66. 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.
67. Chen Z, Bozec A, Ramming A, Schett G. Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2019 Jan;15(1):9-17.
68. 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.
69. Choi MC, Jo J, Park J, Kang HK, Park Y. NF- κ B Signaling Pathways in Osteoarthritic Cartilage Destruction. *Cells*. 2019 Jul 17;8(7):734.
70. 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.
71. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev*. 2020 Jan;40(1):158-189.
72. Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homoeostasis network. *Free Radic Biol Med*. 2016 Jun;95:27-42.
73. Crofford L.J. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *The Journal of Rheumatology. Supplement*, 1997;49:15-19.

74. da Cunha A.L, Aguiar J.A.K, Correa da Silva F.S, Michelacci Y.M. Do chondroitin sulfates with different structures have different activities on chondrocytes and macrophages? *Int J Biol Macromol*. 2017 Oct;103:1019-1031.
75. Daghestani HN, Kraus VB. Inflammatory biomarkers in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015 Nov;23(11):1890-6.
76. Daheshia M. and Yao J.Q. The interleukin 1 β pathway in the pathogenesis of osteoarthritis. *The Journal of rheumatology*. 2008;35(12):2306-2312.
77. Dahl JU, Gray MJ, Jakob U. Protein quality control under oxidative stress conditions. *J. Mol. Biol*. 2015;427;7:1549-1563.
78. Davies MJ. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem. J*. 2016;473;7:805-825.
79. Dinarello CA. The IL-1 family of cytokines and receptors in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2019 Oct;15(10):612-632.
80. Di Paolo NC, Shayakhmetov DM. Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol*. 2016 Jul 19;17(8):906-13.
81. Domingues RM, Domingues P, Melo T. et al. Lipoxidation adducts with peptides and proteins: deleterious modifications or signaling mechanisms?. *J. Proteomics*. 2013;92:110-131.
82. Drevet S, Gavazzi G, Grange L, Dupuy C, Lardy B. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis. *Exp. Gerontol*. 2018;111:107-117.
83. Ellman G. Tissue sulfhydryl groups .G. Ellman. *Arch. Biochem. Biophys*.1959;82;1:70–77.
84. 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.
85. Fang J, Xu L, Li Y, Zhao Z. Roles of TGF-beta 1 signaling in the development of osteoarthritis. *Histol Histopathol*. 2016 Nov;31(11):1161-7.

86. Felson DT. An update on the pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis. *Radiologic Clinics*. 2004;42(1):1-9.
87. Ferrer MD, Busquets-Cortés C, Capó X, Tejada S, Tur JA, Pons A, Sureda A. Cyclooxygenase-2 Inhibitors as a Therapeutic Target in Inflammatory Diseases. *Curr Med Chem*. 2019;26(18):3225-3241.
88. Franco R, Pappa A, Panayiotidis M.I. The central role of glutathione in the pathophysiology of human disease. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2007; 113(4-5):234-58.
89. Franz A, Laura Joseph L, Mayer C. et al. The role of oxidative and nitrosative stress in the pathology of osteoarthritis: Novel candidate biomarkers for quantification of degenerative changes in the knee joint. *Orthop. Rev. (Pavia)*. 2018. Vol. 10(2).: 7460.
90. Gallagher B, Tjoumakaris F.P, Harwood M.I, Good RP, Ciccotti MG, Freedman KB. Chondroprotection and the prevention of osteoarthritis progression of the knee: a systematic review of treatment agents *Am J Sports Med*. 2015 Mar;43(3):734-44.
91. Germolec DR, Shipkowski KA, Frawley RP, Evans E. Markers of Inflammation *Methods Mol Biol*. 2018;1803:57-79.
92. Grondman I, Pirvu A, Riza A, Ioana M, Netea MG. Biomarkers of inflammation and the etiology of sepsis. *Biochem Soc Trans*. 2020 Feb 28;48(1):1-14.
93. Grover AK. and Samson SE. Benefits of antioxidant supplements for knee osteoarthritis: rationale and reality. *Nutrition journal*. 2015;15(1):1.
94. Habuchi O, T Miyachi, S Kaigawa, S Nakashima, C Fujiwara, M Hisada Effects of glutathione depletion on the synthesis of proteoglycan and collagen in cultured chondrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1991 Jul 10;1093(2-3):153-61.
95. Hamidzadeh K, Christensen SM, Dalby E, Chandrasekaran P, Mosser DM. Macrophages and the Recovery from Acute and Chronic Inflammation. *Annu Rev Physiol*. 2017 Feb 10;79:567-592.

96. Hawkins CL, Davies MJ. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *J Biol Chem*. 2019 Dec 20;294(51):19683-19708.
97. 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.
98. Herrero-Beaumont G, Marcos M.E, Sánchez-Pernaute O, Granados R, Ortega L, Montell E, Vergés J, Egido J & Largo R. Effect of chondroitinsulphate in a rabbit model of atherosclerosis aggravated by chronic arthritis. *Br J Pharmacol*. 2008;154, 843–851.
99. Hilgenberg E, Shen P, Dang VD. et al. Interleukin-10-producing B cells and the regulation of immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 2014;380:69-92.
100. Honvo G, Bruyère O, Reginster JY. Update on the role of pharmaceutical-grade chondroitin sulfate in the symptomatic management of knee osteoarthritis. *Aging Clin Exp Res*. 2019 Aug;31(8):1163-1167.
101. Hissin P.J. and Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical biochemistry*. 1976;74(1):214-226.
102. Hochberg M.C, Altman RD, April KT, Benkhalti M, Guyatt G, McGowan J. and Tugwell P. American College of Rheumatology 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.
103. Holoshitz J. The Rheumatoid Arthritis HLA-DRB1 Shared Epitope .*Curr Opin Rheumatol*. 2010 May; 22(3): 293–298.
104. Holzmann J, Brandl N, Zemmann A, Schabus R, Marlovits S, Cowburn R, Huettinger M. Assorted effects of TGFβ and chondroitinsulfate on p38 and ERK1/2 activation levels in human articular chondrocytes stimulated with LPS. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006 Jun;14(6):519-25.
105. Hoxha MA systematic review on the role of eicosanoid pathways in rheumatoid arthritis. *Adv Med Sci*. 2018 Mar;63(1):22-29.

106. Huang J, Zhao L, Chen D. [Growth factor signalling in osteoarthritis.](#) Growth Factors. 2018 Dec;36(5-6):187-195.
107. Hunter D.J., Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis // Lancet. 2019 Apr 27;393(10182):1745-1759.
108. Jakubczyk K, Dec K, Kałduńska J, Kawczuga D, Kochman J, Janda K. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage Pol. Merku.r Lekarsk., 2020 Apr 22;48(284):124-127.
109. Jiang ZY, Woollard AC. and Wolff SP. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. Febs Letters. 1990;268(1):69-71.
110. Jimi E, Fei H, Nakatomi C. NF- κ B Signaling Regulates Physiological and Pathological Chondrogenesis. Int J Mol Sci. 2019 Dec 12;20(24):6275.
111. Jin M, Iwamoto T, Yamada K, Satsu H, Totsuka M. & Shimizu M. Effects of chondroitin sulfate and its oligosaccharides on Toll-like receptor-mediated IL- 6 secretion by macrophage-like J774.1 cells. Biosci Biotechnol Biochem 2011;75, 1283–1289.
112. Jobe KL, Odman-Ghazi SO, Whalen MM & Vercruysse KP. Interleukin-12 release from macrophages by hyaluronan, chondroitin sulfate A and chondroitin sulfate C oligosaccharides. Immunol Lett 2003;89, 99–109.
113. Jomphe C, Gabriac M, Hale T.M, Heroux L, Trudeau LE, Deblois D, et al. Chondroitin sulfate inhibits the nuclear translocation of nuclear factor-kappaB in interleukin-1beta-stimulated chondrocytes. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2008;102:59–65.
114. Jones JT, Xi Qian, Jos L J van der Velden, Shi Biao Chia, David H McMillan, Stevenson Flemer, Sidra M Hoffman, Karolyn G Lahue, Robert W Schneider, James D Nolin, Vikas Anathy, Albert van der Vliet, Danyelle M Townsend, Kenneth D Tew, Yvonne M W Janssen-Heininger Glutathione S-transferase pi modulates NF- κ B activation and pro-inflammatory responses in lung epithelial cells. Redox Biol. 2016 Aug;8:375-82.

115. Ju Y1, Hua J, Sakamoto K, Ogawa H, Nagaoka I. Modulation of TNF- α -induced endothelial cell activation by glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide. *Int J Mol Med*. 2008 Dec;22(6):809-815.
116. Kalliolias G.D, Ivashkiv L.B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*.. 2016 Jan;12(1):49-62.
117. Karna E, Milyk W, Pałka JA, Jarzabek K, Wołczyński S. Hyaluronic acid counteracts interleukin-1-induced inhibition of collagen biosynthesis in cultured human chondrocytes. *Pharmacol Res*. 2006 Oct;54(4):275-81.
118. Katta J, Jin Z, Ingham E, Fisher J Chondroitin sulphate: an effective joint lubricant? *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Aug;17(8):1001-8.
119. Katz J.A. COX-2 inhibition: what we learned—a controversial update on safety data. *Pain medicine*. 2013;14(suppl_1): 29-S34.
120. Kiani C.1, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. Structure and function of aggrecan. *Cell Res*. 2002 Mar;12(1):19-32.
121. 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.
122. Korotkyi O, Vovk A, Blokhina O, Dvorshchenko K, Falalyeyeva T, Abenavoli L, Ostapchenko L. Effect of Chondroitin Sulfate on Blood Serum Cytokine Profile during Carrageenan-induced Edema and Monoiodoacetate-induced Osteoarthritis in Rats. *Rev. Recent. Clin. Trials*. 2019; 14(1):50-55.
123. Kosek E, Altawil R, Kadetoff D, Finn A, Westman M, Le Maître E, Andersson M, Jensen-Urstad M, Lampa J. Evidence of different mediators of central inflammation in dysfunctional and inflammatory pain--interleukin-8 in fibromyalgia and interleukin-1 β in rheumatoid arthritis. *J Neuroimmunol*. 2015 Mar 15;280:49-55.
124. Lanas A, Tornero J. and Zamorano J.L. 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.

125. Lapić I, Padoan A, Bozzato D, Plebani M. Erythrocyte Sedimentation Rate and C-Reactive Protein in Acute Inflammation. *Am J Clin Pathol.* 2020 Jan 1;153(1):14-29.
126. Lauridsen C. From oxidative stress to inflammation: redox balance and immune system. *Poult Sci.* 2019 Oct 1;98(10):4240-4246.
127. Lee M, Rey K, Besler K, Wang C, Choy J. Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Results Probl Cell Differ.* 2017;62:181-207.
128. Legendre P, Bouakka M, Langris M, Pujol J-P, Beliard R, Loyau G, Bocquet J. Proteoglycan biosynthesis by rabbit articular chondrocytes treated with D-penicillamine. *Agents and Actions.* 1988; 25: 171–181.
129. Leonidou A, Lepetsos P, Mintzas M, Eustathios Kenanidis, George Macheras, Maria Tzetis, Michael Potoupnis, Eleftherios Tsiridis Inducible Nitric Oxide Synthase as a Target for Osteoarthritis Treatment. *Expert Opin Ther Targets.* 2018 Apr;22(4):299-318.
130. Lepetsos P, Papavassiliou AG ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Apr;1862(4):576-591.
131. Lepetsos P, Papavassiliou KA, Papavassiliou AG. Redox and NF-κB signaling in osteoarthritis. *Free Radic Biol Med.* 2019 Feb 20;132:90-100.
132. Letterio JJ. and Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-β. *Annual review of immunology.* 1998;16(1):137-161.
133. Lévy E, El Banna N, Baïlle D, Heneman-Masurel A, Truchet S, Rezaei H, Huang ME, Béringue V, Martin D, Vernis L. Causative Links between Protein Aggregation and Oxidative Stress: A Review. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug 9;20(16):3896.
134. Li L., Li Y., Feng D., Xu L., Yin F., Zang H., Liu C., Wang F. Preparation of Low Molecular Weight Chondroitin Sulfates, Screening of a High Anti-Complement Capacity of Low Molecular Weight Chondroitin Sulfate and Its Biological Activity Studies in Attenuating Osteoarthritis *Int J Mol Sci.* 2016 Oct; 17(10): 1685.

135. Li GM, Zhao J, Li B, Zhang XF, Ma JX, Ma XL, Liu J. The anti-inflammatory effects of statins on patients with rheumatoid arthritis: A systemic review and meta-analysis of 15 randomized controlled trials. *Autoimmun Rev.* 2018 Mar;17(3):215-225.
136. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* 1951;193; 1:265–275.
137. 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.
138. Lubberts E. The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2015 Jul;11(7):415-29.
139. Lugrin J., Rosenblatt-Velin N., Parapanov R., Liaudet L. The role of oxidative stress during inflammatory processes // *Biol Chem.* 2014 Feb;395(2):203-30.
140. Luzina IG, Keegan AD, Heller NM. et al. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". *J. Leukoc. Biol.* 2012;92:753-764.
141. Malempati C, Jacobs CA and Lattermann C. The Early Osteoarthritic Knee: Implications for Cartilage Repair. *Clinics in Sports Medicine.* 2017;36(3):587-596.
142. Man GS, Mologhianu G. Osteoarthritis pathogenesis - a complex process that involves the entire joint. *J. Med. Life.* 2014;7;1:37-41.
143. 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.
144. March L, Smith EU, Hoy DG. et al. Burden of disability due to musculoskeletal (MSK) disorders. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol..* 2014. Vol. 28;3: 353-366.

145. Martel-Pelletier J, Farran A, Montell E. et al. Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate. *Molecules*. 2015;20;3:4277-4289.
146. Mathiessen A and Conaghan PG. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. *Arthritis research & therapy*. 2017;19(1):18.
147. McFadyen JD, Zeller J, Potempa LA, Pietersz GA, Eisenhardt SU, Peter K. C-Reactive Protein and Its Structural Isoforms: An Evolutionary Conserved Marker and Central Player in Inflammatory Diseases and Beyond. *Subcell Biochem*. 2020;94:499-520.
148. Messina OD, Vidal Wilman M, Vidal Neira LF. Nutrition, osteoarthritis and cartilage metabolism. *Aging Clin Exp Res*. 2019 Jun;31(6):807-813.
149. Mescher A. Junqueira's basic histology: text and atlas. McGraw-Hill. 2009;12:480.
150. Meyer A. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups .A. Meyer, R. Hell. *Photosynth. Res*.2005;86:435–457.
151. Min JL, Meulenbelt I, Riyazi N, Kloppenburg M, Houwing-Duistermaat JJ, Seymour AB, Pols HA, van Duijn CM, Slagboom PE. Association of the Frizzled-related protein gene with symptomatic osteoarthritis at multiple sites. *Arthritis Rheum*. 2005 Apr;52(4):1077-1080.
152. Minguzzi M, Cetrullo S, D'Adamo S, Silvestri Y, Flamigni F, Borzì R.M. Emerging Players at the Intersection of Chondrocyte Loss of Maturation Arrest, Oxidative Stress, Senescence and Low-Grade Inflammation in Osteoarthritis. *Oxid. Med. Cell Longev*. 2018:3075293.
153. Minozzi S, Bonovas S, Lytras T, Pecoraro V, González-Lorenzo M, Bastiampillai AJ, Gabrielli EM, Lonati AC, Moja L, Cinquini M, Marino V, Matucci A, Milano GM, Tocci G, Scarpa R, Goletti D, Cantini F. Risk of infections using anti-TNF agents in rheumatoid arthritis, psoriaticarthritis, and ankylosing spondylitis: a systematic review and meta-analysis. *Expert Opin Drug Saf*. 2016 Dec;15(sup1):11-34.

154. Mitchell JP, Carmody RJ. NF- κ B and the Transcriptional Control of Inflammation. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2018;335:41-84.
155. Miyamoto K, Tanaka N, Moriguchi K, Ueno R, Kadomatsu K, Kitagawa H. & Kusunoki S. (2014) Chondroitin 6-O-sulfate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glycobiology* 24, 469– 475.
156. 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.
157. Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol. Biol.* 2003;225:115–121.
158. Mou J, Li Q, Qi X, Yang J. Structural comparison, antioxidant and anti-inflammatory properties of fucosylated chondroitin sulphate of three edible sea cucumbers. *Carbohydr Polym*. 2018 Apr 1;185:41-47.
159. Muraoka N, Nara K, Fumiya Tamura, Hidenori Kojima, Hiroyuki Yamakawa, Taketaro Sadahiro, Kazutaka Miyamoto, Mari Isomi, Sho Haginiwa, Hidenori Tani, Shota Kurotsu, Rina Osakabe, Satoru Torii, Shigeomi Shimizu, Hideyuki Okano, Yukihiro Sugimoto, Keiichi Fukuda, Masaki Ieda Role of cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E2-prostaglandin E receptor 4 signaling in cardiac reprogramming. *Nat Commun*. 2019 Feb 20;10(1):674.
160. Nakken B, Papp G, Bosnes V, Zeher M, Nagy G, Szodoray P. Biomarkers for rheumatoid arthritis: From molecular processes to diagnostic applications-current concepts and future perspectives. *Immunol Lett*. 2017 Sep;189:13-18.
161. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Nov 11;2019:9613090.
162. Nazarinassab 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.

163. Noack M, Miossec P. Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol.* 2017 Jun;39(4):365-383.
164. Nørregaard R, Kwon T.-H, Frøkiær J. Physiology and pathophysiology of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in the kidney. *Kidney Res Clin Pract.* 2015 Dec; 34(4): 194–200.
165. Nouroozzadeh J, Tajaddinisarmadi J. and Wolff S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Analytical biochemistry.* 1994;220(2):403-409.
166. Olszewska-Slonina DM, Jung S, Olszewski KJ, Cwynar A, Drewa G. Evaluation of selected parameters of lipid peroxidation and paraoxonase activity in blood of patients with joint osteoarthritis. *Protein Pept Lett.* 2018;25(9):853-861.
167. O'Neill T.W., McCabe P.S., McBeth J. Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis // *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2018 Apr;32(2):312-326.
168. Pajares M, Jiménez-Moreno N, Dias I.H. et al. Redox control of protein degradation. *Redox. Biol.* 2015;6:409-420.
169. Pay JB, Shaw AM. Towards salivary C-reactive protein as a viable biomarker of systemic inflammation. *Clin Biochem.* 2019 Jun;68:1-8.
170. 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.
171. Peng A, Lu X, Huang J, He M, Xu J, Huang H, Chen Q. Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts promote TREM-1 expression in monocytes via COX-2/PGE(2) pathway. *Arthritis Res Ther.* 2019 Jul 8;21(1):169.
172. Perez L. Acute phase protein response to viral infection and vaccination. *Arch Biochem Biophys.* 2019 Aug 15;671:196-202.
173. Pincus T, Castrejon I, Yazici Y, Gibson KA, Bergman MJ, Block JA. Osteoarthritis is as severe as rheumatoid arthritis: evidence over 40 years according to

the same measure in each disease. *Clin Exp Rheumatol*. 2019 Sep-Oct;37 Suppl 120(5):7-17.

174. Placek K, Schultze JL, Aschenbrenner AC. Epigenetic reprogramming of immune cells in injury, repair, and resolution. *J Clin Invest*. 2019 Jul 22;129(8):2994-3005.

175. Prast-Nielsen S, Hsin-Hung Huang, David L Williams Thioredoxin glutathione reductase: its role in redox biology and potential as a target for drugs against neglected diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Dec;1810(12):1262-71.

176. 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.

177. Punzi L, Galozzi P, Luisetto R, Favero M, Ramonda R, Oliviero F, Scanu A. Post-traumatic arthritis: overview on pathogenic mechanisms and role of inflammation. *RMD Open*. 2016 Sep 6;2(2):e000279.

178. Rani A, Baruah R, Goyal A. Physicochemical, antioxidant and biocompatible properties of chondroitinsulphate isolated from chicken keel bone for potential biomedical applications. *Carbohydr Polym*. 2017 Mar 1;159:11-19.

179. Rani A, Patel S, Goyal A. Chondroitin Sulfate (CS) Lyases: Structure, Function and Application in Therapeutics. *Curr Protein Pept Sci*. 2018;19(1):22-33.

180. Ren Y1, Tan B2, Yan P3, You Y4, Wu Y5,6, Wang Y7. Association between polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and osteoarthritis susceptibility: a meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord*.. 2015 Feb 27;16:44.

181. Rezus E, Cardoneanu A, Burlui A, Luca A, Codreanu C, Tamba BI, Stanciu GD, Dima N, Bădescu C, Rezuş C. The Link Between Inflammaging and Degenerative Joint Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 31;20(3):614.

182. Rieder B., Weihs A.M., Weidinger A., Szwarc D., Nürnberger S., Redl H., Rünzler D., Huber-Gries C., Teuschl A.H. Hydrostatic pressure-generated reactive oxygen species induce osteoarthritic conditions in cartilage pellet cultures // *Sci. Rep*. 2018 Nov 19;8(1):17010. doi: 10.1038/s41598-018-34718-8.

183. Rodriguez-Merchan E.C. Synovium and cartilage biomarkers in hemophilic arthropathy. *Expert Rev Hematol.* 2016;9(4):409-14.

184. Rolls A, Cahalon L, Bakalash S, Avidan H, Lider O, Schwartz MA sulfated disaccharide derived from chondroitin sulfate proteoglycan protects against inflammation-associated neurodegeneration. *FASEB J* 2006;20:547–9.

185. Roughley P.R. and Mort J.S. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *J Exp Orthop.* 2014 Dec; 1: 8. Published online 2014 Jul 16.

186. Sánchez-Rodríguez MA, Mendoza-Núñez VM. Oxidative Stress Indexes for Diagnosis of Health or Disease in Humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Nov 25;2019:4128152.

187. Sanjabi S, Oh SA, Li MO. Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017 Jun 1;9(6):a022236.

188. Shan L, Tong L, Hang L, Fan H. Fangchinoline supplementation attenuates inflammatory markers in experimental rheumatoid arthritis-induced rats // *Biomed. Pharmacother.* 2019 Mar;111:142-150. doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.043.

189. Shepeleva A, Blokhina O, Korotkiy A, Dranitsina A, Grebinyk D, Dvorshchenko K. Expression of Tgf b2 gene in blood of rats with acute hind paw inflammation and with administration of chondroitin sulfate. XVIII International conference of students and young scientists «Shevchenkivska vesna: BioScience Advances», 3 – 5 may 2020.Kyiv, 2020:49-50.

190. Sieper J, Poddubnyy D. New evidence on the management of spondyloarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016 May;12(5):282-95.

191. Sirivarasai J, Wananukul W, Sming Kaojarern, Suwannee Chanprasertyothin, Nisakron Thongmung, Wipa Ratanachaiwong, Thanyachai Sura, Piyamit Sritara Association between inflammatory marker, environmental lead exposure, and glutathione S-transferase gene. *Biomed Res Int.* 2013;2013:474963.

192. Smallwood MJ, Nissim A, Knight AR, Whiteman M, Haigh R, Winyard PG. Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. *Free Radic Biol Med*. 2018 Sep;125:3-14.
193. Smolen J.S, Aletaha D, McInnes I. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;388;10055: 2023-2038.
194. Sokolove J, Lepus C.M. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Ther. Adv. Musculoskelet, Dis*. 2013;5;2: 77-94.
195. Sorokin A. Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase Pathways: A Complex Interplay in Cellular Signaling. *Curr Med Chem*. 2016;23(24):2559-2578.
196. Souich P, García A.G, Vergés J, Montell E. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of chondroitin sulphate. *J Cell Mol Med*. 2009 Aug; 13(8a): 1451–1463.
197. Spiller F, Oliveira Formiga R, Fernandes da Silva Coimbra J, Alves-Filho JC, Cunha TM, Cunha FQ. Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and pain. *Nitric Oxide*. 2019 Aug 1;89:32-40.
198. Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol*. 2018 Apr 13;9:754.
199. Stabler T.V, Huang Z, Montell E, Vergés J, Kraus V.B. Chondroitin sulphate inhibits NF- κ B activity induced by interaction of pathogenic and damage associated molecules. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017;25(1):166-174.
200. Steckl AJ, Ray P. Stress Biomarkers in Biological Fluids and Their Point-of-Use Detection. *ACS Sens*. 2018 Oct 26;3(10):2025-2044.
201. Stemmer U, Hermetter A. Protein modification by aldehydophospholipids and its functional consequences. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Oct;1818(10):2436-45.
202. 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.

203. Su X, Ren Y, Li M, Kong L, Kang J Association of glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes with asthma: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2020 Aug 21; 99(34): e21732.

204. Sutherland M.W. and Learmonth B.A. The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase. *Free radical research*. 1997;27(3):283-289.

205. 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.

206. Tan G.-K, Yasuhiko Tabata Y. Chondroitin-6-sulfate Attenuates Inflammatory Responses in Murine Macrophages via Suppression of NF- κ B Nuclear Translocation. *Acta Biomater*. 2014 Jun;10(6):2684-92.

207. Tanaka S. Regulation of bone destruction in rheumatoid arthritis through RANKL-RANK pathways. *World J Orthop*.. 2013 Jan 18; 4(1):1–6.

208. Tanaka T, Narazaki M, Masuda K, Kishimoto T. Regulation of IL-6 in Immunity and Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2016;941:79-88.

209. Tang Y, Cui Y, De Agostini A, Zhang L. Biological mechanisms of glycan- and glycosaminoglycan-based nutraceuticals. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2019;163:445-469.

210. Taraballi F, Corradetti B, Minardi S, Powel S, Cabrera F, Van Eps JL, Weiner BK & Tasciotti E (2016) Biomimetic collagenous scaffold to tune inflammation by targeting macrophages. *J Tissue Eng* 7, 1–13.

211. Theocharis AD, Manou D, Karamanos NK. The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *FEBS J*. 2019 Aug;286(15):2830-2869.

212. 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.

213. 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.

214. Tiku ML, Allison G.T, Naik K. and Karry SK. Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. *Osteoarthritis and cartilage*. 2003;11(3):159-166.

215. 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.

216. Trifunović J, Miller L, Debeljak Ž, Horvat V. Pathologic patterns of interleukin 10 expression--a review. *Biochem. Med. (Zagreb)*. 2015;25;1:36-48.

217. Umesh CS. Yadav, Kota V. Ramana Regulation of NF- κ B-Induced Inflammatory Signaling by Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes. *Oxid. Med. Cell Longev*. 2013:690545.

218. Valcarcel J, Novoa-Carballal R, Pérez-Martín R.I, Reis R.L, Vázquez JA. Glycosaminoglycans from marine sources as therapeutic agents. *Biotechnol Adv*. 2017 Nov 1;35(6):711-725.

219. Valko M, Leibfritz D, Moncol J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*— 2007.— Vol. 39:44–84.

220. van Dalen SCM, Kruisbergen NNL, Walgreen B, Helsen MMA, Slöetjes AW, Cremers NAJ, Koenders MI, van de Loo FAJ, Roth J, Vogl T, Blom AB, van der Kraan PM, van Lent PLEM, van den Bosch MHJ. The role of NOX2-derived reactive oxygen species in collagenase-induced osteoarthritis // *Osteoarthritis Cartilage*. 2018 Dec;26(12):1722-1732. doi: 10.1016/j.joca.2018.08.014.

221. 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.

222. Van Dyke K. Luminescence immunoassay and molecular applications. CRC press. 1990;352.

223. van Meegeren MER, Roosendaal G, van Veghel K et al. A short time window to profit from protection of blood-induced cartilage damage by IL-4 plus IL-10. *Rheumatology*. 2013;52:1563-1571.

224. Vázquez-Torres A. Redox active thiol sensors of oxidative and nitrosative stress. *Antioxid. Redox. Signal*. 2012;17;9:1201-1214.

225. Venditti P. Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxid Med. Cell. Longev*. 2020 Apr 23;2020:9829176.

226. Venkatesha SH, Dudics S, Acharya B, Moudgil K.D. Cytokine-modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy. *Int. J. Mol. Sci*. 2014;16;1:887-906.

227. Verbruggen G, Veys EM () Influence of sulphated glycosaminoglycans upon proteoglycan metabolism of the synovial lining cells. *Acta Rheumatol* 1977; 1:75–92.

228. Volpi N. Chondroitin Sulfate Safety and Quality. *Molecules*. 2019 Apr 12;24(8):1447.

229. 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.

230. Wang CT, Lin Y.T, Chiang BL, Lin YH, Hou SM. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006 Dec;14(12), pp1237-1247.

231. Wang J, Ma L, Yang S, Wang S, Wei X, Song S. IL-10-Expressing Th2 Cells Contribute to the Elevated Antibody Production in Rheumatoid Arthritis. *Inflammation*. 2016 Jun;39(3):1017-24.

232. Wang R, Zhang S, Previn R, Chen D, Jin Y, Zhou G. Role of Forkhead Box O Transcription Factors in Oxidative Stress-Induced Chondrocyte Dysfunction: Possible Therapeutic Target for Osteoarthritis? *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 28;19(12):3794.

233. Wang T, He C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018 Dec;44:38-50.

234. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol*. 2018 Jun 4;217(6):1915-1928.

235. 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.

236. Wasinger VC, Yau Y, Duo X, Zeng M, Campbell B, Shin S, Lubner R, Redmond D, Leong RW. Low Mass Blood Peptides Discriminative of Inflammatory Bowel Disease (IBD) Severity: A Quantitative Proteomic Perspective. *Mol Cell Proteomics*. 2016 Jan;15(1):256-65.

237. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:561459.

238. Woolf A.D. Global burden of osteoarthritis and musculoskeletal diseases. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015; 16(Suppl 1): S3. Published online 2015 Dec 1. doi: 10.1186/1471-2474-16-S1-S3.

239. Wu G, Fang Y.-Z, Yang S, Lupton J.R, Turner N.D. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 2004. Vol.134. P. 489-492.

240. Wu Q., Zhong Z.M., Zhu S.Y., Liao C.R., Pan Y., Zeng J.H., Zheng S., Ding R.T., Lin Q.S., Ye Q., Ye W.B., Li W, Chen J.T. Advanced oxidation protein products induce chondrocyte apoptosis via receptor for advanced glycation end products-mediated, redox-dependent intrinsic apoptosis pathway // *Apoptosis*. 2016 Jan;21(1):36-50. doi: 10.1007/s10495-015-1191-4.

241. Xue L., Li X., Chen Q., He J., Dong Y., Wang J., Shen S., Jia R., Zang Q.J., Zhang T., Li M., Geng Y. Associations between D3R expression in synovial mast cells and disease activity and oxidant status in patients with rheumatoid arthritis // Clin Rheumatol. 2018 Oct;37(10):2621-2632. doi: 10.1007/s10067-018-4168-1.
242. Yan J, Melissa M. Ralston, Xiaomei Meng, Kathleen D. Bongiovanni, Amanda L. Jones, Rainer Benndorf, Leif D. Nelin, W. Joshua Frazier, Lynette K. Rogers, Charles V. Smith, Yusen Liu Glutathione Reductase Is Essential for Host Defense against Bacterial Infection. Free Radic Biol Med. 2013 Aug; 0: 320–332.
243. Yang S-A Lack of association between glutathione s-transferase mu 1 (GSTM1) gene polymorphisms and obesity. J Exerc Rehabil. 2017 Oct; 13(5): 608–612.
244. Yao Z, Zhang Y, Wu H. Regulation of C-reactive protein conformation in inflammation. Inflamm Res. 2019 Oct;68(10):815-823.
245. Yin G, Li Y, Yang M, Cen XM, Xie QB. Pim-2/mTORC1 Pathway Shapes Inflammatory Capacity in Rheumatoid Arthritis Synovial Cells Exposed to Lipid Peroxidations // Biomed. Res. Int. 2015;2015:240210. doi: 10.1155/2015/240210.
246. Zahan OM, Serban O, Gherman C, Fodor D. The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis. Med Pharm Rep. 2020 Jan;93(1):12-22.
247. Zhai G, Doré J, Rahman P. TGF- β signal transduction pathways and osteoarthritis. Rheumatol Int. 2015 Aug;35(8):1283-92.
248. 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.
249. Zhou J, Nagarkatti P, Zhonga Y. & Nagarkatti M. Immune modulation by chondroitin sulfate and its degraded disaccharide product in the development of an experimental model of multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2010; 223, 55–64.
250. Zhu W, Ji Y, Wang Y, He D, Yan Y, Su N, Zhang C, Xing X.H. Structural characterization and in vitro antioxidant activities of chondroitinsulfate purified from *Andrias davidianus* cartilage Carbohydr Polym. 2018 Sep 15; 196:398-404.

251. Zou Z, Wei M, Fang J, Dai W, Sun T, Liu Q, Gong G, Liu Y, Song S, Ma F, Wang L, Huang L, Wang Z. Preparation of chondroitin sulfates with different molecular weights from bovine nasal cartilage and their antioxidant activities. *Int. J. Biol Macromol.* 2020 Jun 1;152:1047-1055.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

За темою дисертації опубліковано 10 наукових праць, із яких 4 наукові статті у фахових виданнях, що входять до переліку, затвердженого МОН, одна стаття у виданні, що входить до міжнародної наукометричної бази SCOPUS, а також 5 матеріалів і тез доповідей на всеукраїнських та міжнародних наукових конференціях.

1. Блохіна О, Короткий О, Кот Л, Неграй Д, Дворщенко К Окисна модифікація білків у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення та тривалого профілактичного введення хондроїтина сульфату. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Серія: Біологія. 2018; 2(76):62-65.

2. Драницина А, Блохіна О, Короткий О, Дворщенко К, Остапченко Л Експресія гена *Ptgs2* у клітинах хрящової тканини колінного суглоба щурів за умов остеоартрозу та при введенні біологічно-активних речовин. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2018;1(24):36-42.

3. Блохіна О, Кот Л, Хілько В, Драницина А, Дворщенко К Вільнорадикальні процеси у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення задньої кінцівки та тривалого профілактичного введення хондроїтина сульфату. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2018; 1(25):6-9.

4. Korotkyi O, Vovk A, Blokhina O, Dvorshchenko K, Falalyeyeva T, Abenavoli L, Ostapchenko L Effect of Chondroitin Sulfate on Blood Serum Cytokine Profile during Carrageenan-induced Edema and Monoiodoacetate-induced Osteoarthritis in Rats. Rev. Recent. Clin. Trials. 2019;14(1):50-55.

5. Блохіна О, Кот Л, Торгалю Є, Дворщенко К Концентрація С-реактивного білка та молекул низької та середньої молекулярної маси у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення та тривалого профілактичного введення хондроїтина сульфату. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2019; 1(26) :17-21.

6. Blokhina OG, Dvorshchenko KO, Dranitsina AS, Grebinyk DM Effect of chondroitin sulfate on oxidative balance in blood serum of rats with acute hind paw inflammation. XI Parnas Conference (Kyiv, Ukraine). Ukr. Biochem. J. 2018;90, Special Issue 2018;165.

7. Блохіна О, Кисельова А, Драницина А, Дворщенко К Дія хондроїтин сульфату на вільнорадикальні процеси у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення. XVII Міжнародна наукова конференція «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки . BioScience Advances», 23 – 25 квітня 2019; Київ, 2019; С. 57-58.

8. Blokhina OG, Dranitsina AS, Dvorshchenko KO, Grebinyk DM, Korotkiy O, Ostapchenko L Expression of NF- κ B gene in blood of rats with acute hind paw inflammation and with administration of chondroitin sulfate. Biomed Talks. Міжнародна науково-практична конференція-школа студентів та молодих вчених 2019; 1(1):15-16.

9. Blokhina OG, Dranitsina AS, Dvorshchenko KO, Grebinyk DM, Korotkiy O, Ostapchenko L Expression of Ptg2 and Nos2 genes in blood serum of rats with acute hind paw inflammation and with administration of chondroitin sulfate. Матеріали XII українського біохімічного конгресу. Медична та клінічна хімія. 2019;21(3): 159-160.

10. Shepeleva A, Blokhina O, Korotkiy A, Dranitsina A, Grebinyk D, Dvorshchenko K Expression of Tgf b2 gene in blood of rats with acute hind paw inflammation and with administration of chondroitin sulfate. XVIII International conference of students and young scientists «Shevchenkivska vesna: BioScience Advances», 2020 may 3 – 5; Kyiv; 2020; 49-50.