

Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

БЛОХІНА ОКСАНА ГРИГОРІВНА

УДК 616.7:615.2/.3:577.125.8

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

03.00.04 – біохімія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Дворщенко Катерина Олександрівна,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України,
завідувач науково-дослідної лабораторії «Біохімії»

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Кучмеровська Тамара Муратівна,
Інститут біохімії імені О.В. Палладіна НАН України,
провідний науковий співробітник відділу біохімії вітамінів і коензимів;

доктор біологічних наук, доцент
Калачнюк Лілія Григорівна,
Національний університет біоресурсів і природокористування України МОН України
професор кафедри біохімії і фізіології тварин

Захист відбудеться “05” травня 2021 року о 16⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434.

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

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала 12.

Автореферат розісланий « ____ » _____ 2021 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24,
доктор біологічних наук

Н.Г. Ракша

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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. Значне 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 [Головач І.Ю., 2014; Man G.S., 2014; Woolf A.D., 2015; Messina O.D., 2019]. Одним із основних чинників, які призводять до розвитку та прогресування запалення у суглобах є оксидативний стрес, його виникнення обумовлено постійною генерацією вільних радикалів активованими фагоцитами, гіпоксичними процесами 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 системи антиоксидантного захисту, що також посилює формування пошкоджень тканин суглобового апарату [Drevet S., 2018].

Оскільки захворювання опорно-рухового апарату, зокрема суглобів, як правило прогресують, необхідно своєчасно приймати міри для того, щоб зупинити або пригальмувати розвиток в них патологічних процесів. Важливим є проведення ефективної профілактики даних захворювань, особливо за умов генетичної схильності до розвитку хвороб суглобів, професійної ймовірності перевантаження опорно-рухового апарату, переохолодження, а також у людей похилого віку.

У зв'язку з цим, важливим питанням є пошук засобів для відновлення функцій 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 [Stabler T.V., 2017; Mou J., 2018; Zou Z., 2020]. 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 карагінан-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. З'ясувати рівень вільнорадикальних процесів у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичному введенні хондроїтин сульфату.

3. Оцінити стан системи антиоксидантного захисту у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичному введенні хондроїтин сульфату.

4. Дослідити рівень експресії генів, які залучені до розвитку каррагінан-індукованого запалення суглобу та профілактичному введенні хондроїтин сульфату у крові.

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, гідроген пероксиду, продуктів пероксидного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків, каталазної, супероксиддизмутазної, 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*), індукцйбельної 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. Встановлено наявність взаємозв'язку між запаленням, 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 супроводжувалося збільшенням концентрації С-реактивного білка та вмісту молекул середньої молекулярної маси, які є індикаторами розвитку ендогенної інтоксикації та проявом прогресування запалення. За даних експериментальних умов рівень антизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10) залишався 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 виявлено зсув окисно-антиоксидантної рівноваги в напрямку інтенсифікації прооксидантних процесів та розвитку окисдатовного стресу на фоні порушення функцій антиоксидантної системи. Зокрема, у сироватці крові при каррагінан-індукованому запаленні суглобу зростає вміст супероксидного радикалу, гідроген пероксиду, підвищувався вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів (дієнових кон'югатів, ТБК-активних сполук, шиффових основ) та збільшувався рівень продуктів окисної модифікації білків (альдо- і кетопохідних нейтрального та основного характеру). Встановлено, що при експериментальному запаленні суглобу у сироватці крові знижувалася супероксиддисмутазна та зростала каталазна активність порівняно з контролем. За даних експериментальних умов у сироватці крові знижувалися глутатіонпероксидазна, глутатіонредуктазна активності та вміст відновленого глутатіону, при цьому зростали глутатіонтрансферазна активність та вміст окисненого глутатіону відносно контрольних значень. При профілактичному введенні хондроїтин сульфату щурам з гострим запаленням суглобу у сироватці крові відновлювався окисно-антиоксидантний гомеостаз порівняно з групою тварин з каррагінан-індукованим запаленням.

Розширено наукові дані про особливості профілактичної дії хондропротекторного препарату на основі хондроїтин сульфату (імуномодулюючі, 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, ортопедії, практичній травматології 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 у проведенні даних досліджень. Всі дані, отримані у співавторстві, відображені у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові результати дисертаційної роботи були представлені на XI Парнасівській 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 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

У досліджах використовували білих нелінійних статевозрілих шурів-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 поділено на чотири експериментальні групи. Перша група – контроль: тваринам субплантарно (під підошовний 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 сульфату (препарат «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.). 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 кінцівки: тваринам субплантарно вводили 0,1 мл 1% розчин каррагінану у задню праву кінцівку [Morris C.J., 2003]. 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 декапітували через 3 години після ін'єкції розчину каррагінану згідно протоколу етичного комітету, після чого швидко здійснювали забір гіалінових хрящів 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, були тестовані метрологічним контролем.

Гістологічний аналіз зрізів хрящів щурів проводили за стандартною методикою [Mescher A., 2009]. Для фарбування парафінових зрізів використовували метод подвійного фарбування гематоксиліном і еозином за Бюмером [Лілі Р., 1969]. Гістологічні препарати аналізували при збільшенні мікроскопа $\times 100$ (Olympus BX-41). Вміст цитокінів ІЛ-1 β , ІЛ-12В р40, ІЛ-4, ІЛ-10, ФНП- α було визначено за допомогою імуноферментного методу [Towbin H., 1994]. Концентрацію С-реактивного білка оцінено імунотурбідиметричним методом [Долгов В.В., 2007]. Рівень молекул середньої молекулярної маси було визначено скринінговим методом [Габриэлян Н., 1985]. Вміст супероксидного радикалу було визначено за утворенням ХТТ-формазану [Able A., 1998]. Вміст гідроген пероксиду вимірювали у системі сорбітол-ксиленол оранж [Jiang Z., 1990]. Вміст дієнових кон'югатів та шиффових основ визначено спектрофотометрично та флуориметрично у верхній фазі гептан-ізопропанольної фракції [Колесова О., 1984, Гаврилов В., 1988]. Рівень ТБК-активних продуктів визначали у безбілковій фракції із додаванням тіобарбітурової кислоти (ТБК) [Стальная И., 1977]. Вміст продуктів окисної модифікації білків визначено за утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів

нейтрального та основного характеру [Дубинина Е., 1995]. Визначення вмісту сульфгідрильних (SH) груп проводили за методом Елмана [Ellman G.L., 1959]. Супероксиддисмутазну (СОД) активність було оцінено за здатністю СОД конкурувати із нітросинім тетразолієм за супероксидні радикали [Чевари С., 1985]. Каталазну активність було виміряно за кількістю незруйнованого пероксиду водню у пробі [Королук М., 1988]. Вміст відновленого (GSH) та окисненого глутатіону (GSSG) було визначено спектрофлуориметрично з використанням ортофталевого альдегіду [Hissin P., 1976]. Глутатіонпероксидазну (ГЛП) активність було оцінено за зменшенням вмісту GSH в реакції з реактивом Елмана [Власова С., 1990]. Глутатіонредуктазну (ГЛР) активність було виміряно за зменшенням оптичної густини проб в результаті окиснення НАДФН [Власова С., 1990]. Глутатіонтрансферазну (ГЛТ) активність було визначено за швидкістю утворення кон'югату GSH з 1-хлор-2,4-динітробензолом [Власова С., 1990]. Рівень загальних, білок-зв'язаних та небілкових SH-груп було визначено за методом Елмана [Ellman G., 1959]. Визначення концентрації білка було проведено за методом Лоурі [Lowry O.H., 1951]. РНК було отримано за методом Chomczynski [Chomczynski P., 1987]. Синтез кДНК та кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (Real-time quantitative RT-PCR, qRT-PCR, кПЛР) було проведено за допомогою комерційного набору "Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix" ("Thermo Scientific", Литва). Рівень експресії генів *Nos2*, *Ptgs2*, *Tgfb1*, *NF-κB* та бета-актину (*Actb*) було визначено методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі [Livak K.A., 2001].

Математичну та статистичну обробку результатів досліджень було проведено на комп'ютері з використанням програмного пакету "GraphPad Prism 5.04" ("GraphPad Software Inc.", США) та перевіряли на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Уїлка. Подальше обчислення було визначено 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 достовірними при $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Оцінка ступеню запалення в організмі щурів за умов каррагінан-індукованого запалення суглобу та тривалого профілактичного введення хондроїтин сульфату. Для оцінки розвитку гострої запальної реакції (набряку), спричиненого введенням у задню кінцівку каррагінану, першим етапом наших досліджень було проведення гістологічного аналізу стану навколосуглобової м'язової тканини. Встановлено, що у контрольній групі щурів в структурі м'язової тканини навколо суглобу, виявлено невелика кількість міжклітинної рідини. При гістологічній оцінці навколосуглобової м'язової тканини щурів, яким вводили хондроїтин сульфат, показано, що ця тканина має структуру в межах анатомічної норми. Встановлено, що у щурів при субплантарному введенні каррагінану, спостерігається значний набряк тканин задньої кінцівки. У навколосуглобовій

м'язовій тканині виявлені вогнищеві інфільтрати, що містили лейкоцити і гістіоцити та десквамовані фрагменти. Встановлені деструктивні зміни свідчать про розвиток вираженої запальної реакції в м'яких тканинах суглобу. При 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 пригнічення розвитку запалення у м'яких тканинах суглобу.

Запалення, як системний процес, індукує відповідні реакції на рівні організму. Навіть при наявності чітко обмеженого вогнища запалення, з'являється комплекс білків гострої фази або «адаптивних білків», продукція яких в організмі ініціюється антигенами, імунними комплексами, бактеріями та грибами [Perez L., 2019]. Інформативним маркером серед даної групи білків є С-реактивний білок (СРБ) у сироватці крові [Yao Z., 2019]. У клінічній практиці С-реактивний білок розглядається в якості основного, хоча і досить неспецифічного, маркера запалення [McFadyen J.D., 2020].

Встановлено, що у щурів при запаленні суглобу, індукованому каррагінаном, у сироватці крові концентрація С-реактивного білка зростала в 1,9 рази порівняно з контролем (Рис. 1А). При введенні препарату на основі хондроїтин сульфату щурам з експериментальним запаленням суглобу в сироватці крові знижувалася концентрація С-реактивного білка в 1,4 рази відносно групи тварин, яким вводили лише каррагінан. Виявлено, що хондроїтин сульфат не впливав на концентрацію С-реактивного білка у сироватці крові контрольної групи тварин (Рис. 1А).

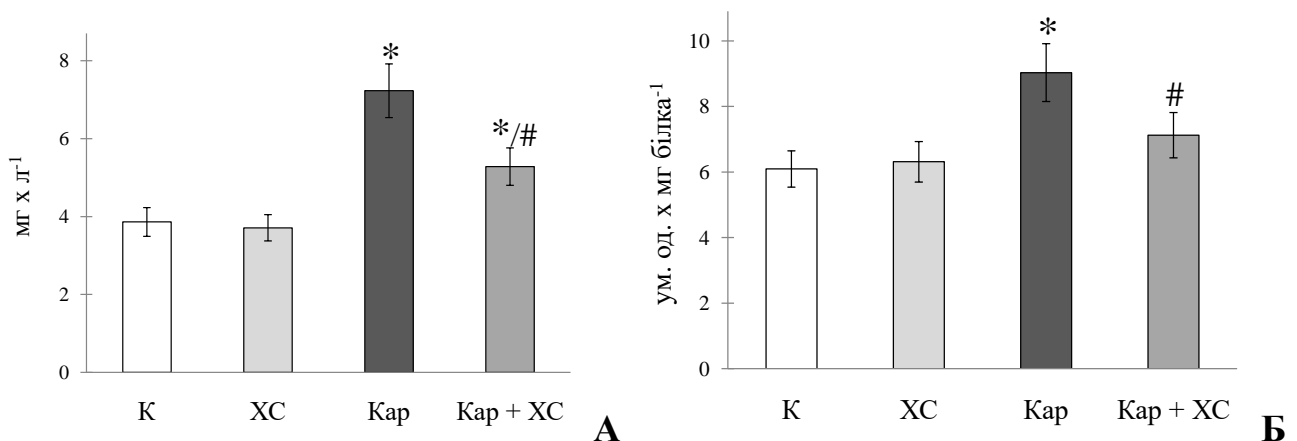


Рис. 1. Концентрація С-реактивного білка (А) та вміст молекул середньої молекулярної маси (Б) у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичному введенні хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Біохімічним проявом прогресуючого 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 [Нагоев Б.С., 2013; Шевченко С.С., 2015; Steckl A.J., 2018]. В ході проведених експериментальних досліджень нами встановлено, що у щурів при запаленні суглобу, індукованому каррагінаном, у сироватці крові зростає вміст молекул середньої молекулярної маси – в 1,5 рази відносно контролю (Рис. 1Б). При профілактичному введенні хондроїтин сульфату тваринам з каррагінан-індукованим запаленням у сироватці крові знижується рівень молекул середньої молекулярної маси – в 1,3 рази порівняно з групою тварин з експериментальним запаленням суглобу. Показано, що хондропротектор не впливає на рівень досліджуваного показника у сироватці крові контрольної групи тварин (Рис. 1Б).

Патогенез багатьох захворювань значною мірою пов'язаний з порушенням продукції цитокінів, які є ендогенними медіаторами, що регулюють інтенсивність і тривалість імунзапальної відповіді [Tanaka T, 2016; Dinarello C.A., 2019]. Нами показано, що при запаленні суглобу, індукованого каррагінаном, у сироватці крові зростає концентрація інтерлейкіну-1 β – в 1,9 рази (рис. 2А) та інтерлейкіну-12В р40 – в 1,6 рази (рис. 2Б) порівняно з контрольною групою тварин. У групі тварин з експериментальним запаленням, яким профілактично вводили хондроїтин сульфат, в сироватці крові концентрація інтерлейкіну-1 β та інтерлейкіну-12В р40 знижується в 1,3 рази відносно групи щурів з патологією (Рис. 2А, Б).

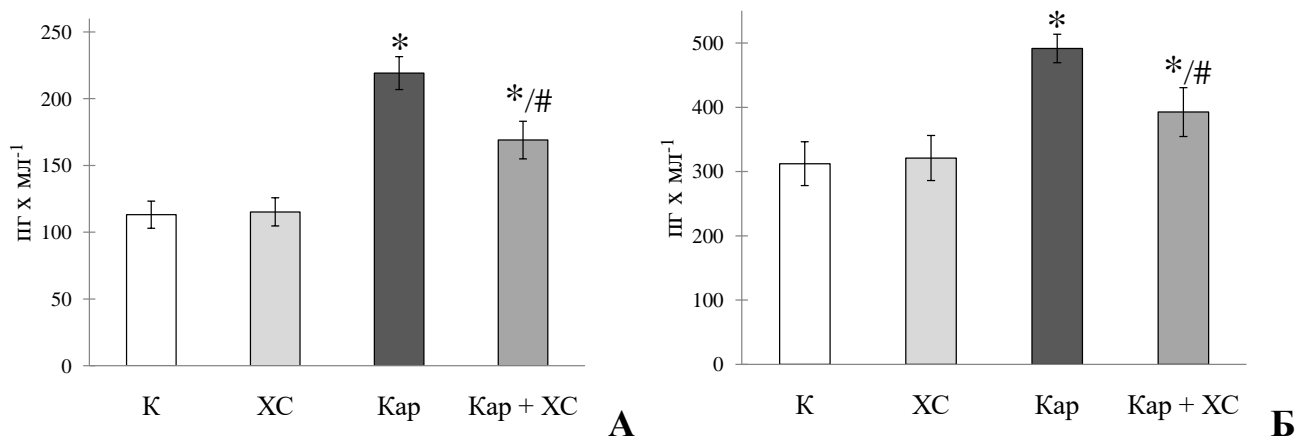


Рис. 2. Концентрація інтерлейкіну 1 β (А) та інтерлейкіну-12В р40 (Б) у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичному введенні хондроїтин сульфату (К – контроль, XS – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + XS – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n = 10$).

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

Встановлено, що у щурів при запаленні суглобу, індукованому каррагінаном, у сироватці крові концентрація ФНП- α зростає в 5 разів порівняно з контролем

(Рис. 3А). При профілактичному введенні хондроїтин сульфату тваринам з запаленням суглобу концентрація ФНП- α знижувалася в 1,6 рази відносно групи щурів з запаленням. Виявлено, що введення щурам хондроїтин сульфату не впливало на вміст досліджуваного показника у крові контрольної групи тварин (Рис. 3А).

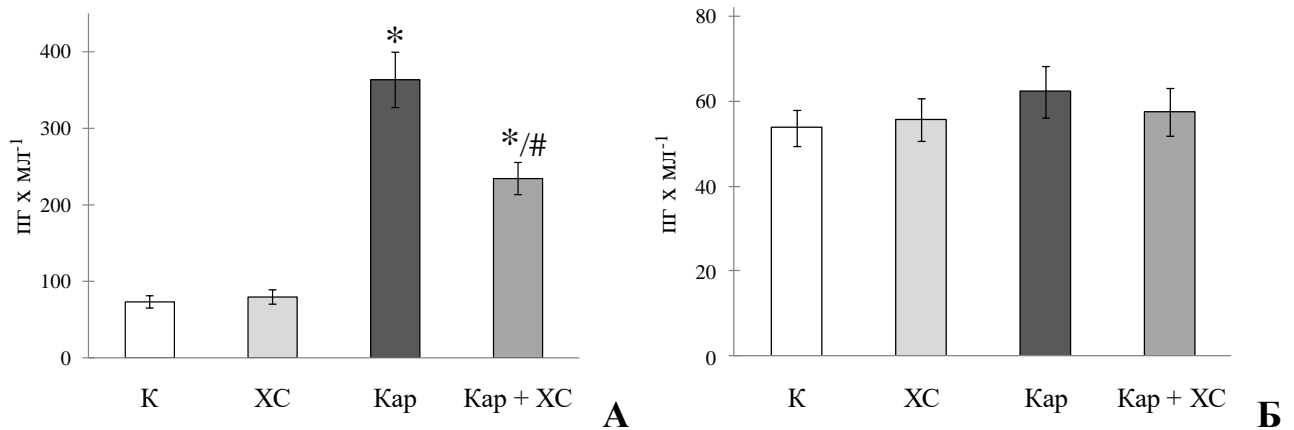


Рис. 3. Концентрація фактору некрозу пухлин- α (А) та трансформуючого фактору росту β (Б) у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичному введенні хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин 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 щурів концентрація трансформуючого фактору росту β залишався в межах контрольних величин в усіх досліджуваних групах (Рис. 3Б).

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 регулювати зниження щільності прозапальних рецепторів на клітинах [Wang J., 2016; Chen Z., 2019].

Виявлено, що у щурів при гострому запаленні суглобу, індукованого каррагінаном, у сироватці крові концентрація ІЛ-4 та ІЛ-10 залишалася в межах контрольних значень (Рис. 4А, Б). При профілактичному введенні хондроїтин сульфату тваринам з запаленням суглобу концентрація ІЛ-10 зростала в 1,7 рази відносно як контролю, так і групи тварин, яким вводили каррагінан (Рис. 4Б).

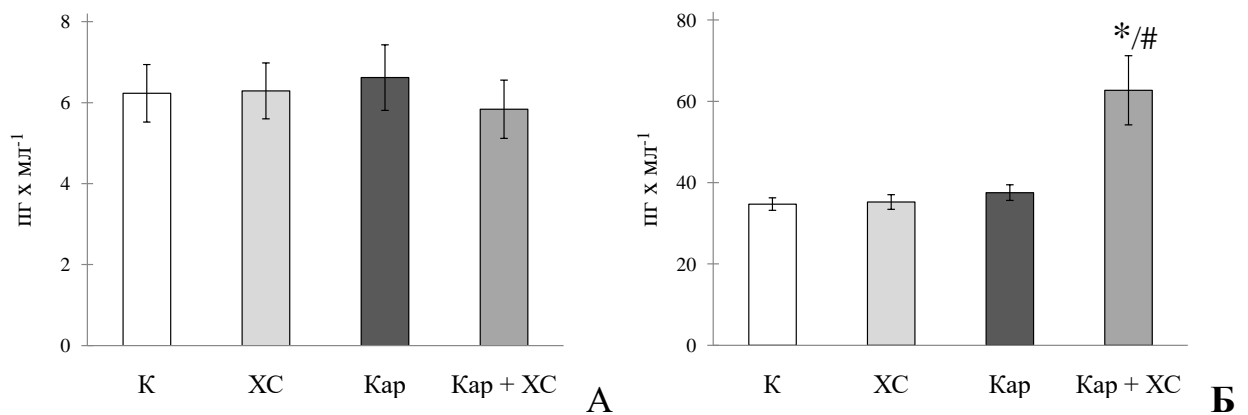


Рис. 4. Концентрація інтерлейкіну 4 (А) та інтерлейкіну 10 (Б) у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичному введенні хондроїтин сульфату (К – контроль, ХС – хондроїтин сульфат, Кар – каррагінан, Кар + ХС – каррагінан + хондроїтин сульфат), ($M \pm m$, $n =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

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

Таким чином, аналіз даних гістологічних та біохімічних досліджень дозволив виявити гостру стадію запалення у м'язево-суглобовому компоненті задньої кінцівки щурів при введенні каррагінану. Маніфестація запалення відбувається за участю активації імунітокінової системи, внаслідок активації прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-12В р40, ФНП- α). Підтвердженням розвитку гострого запалення є зростання в крові рівня білка гострої фази – СРБ та молекул середньої молекулярної маси, які належать до маркерів запальних процесів та ендогенної інтоксикації. Профілактичне введення хондроїтин сульфату, виявилось ефективним для пригнічення розвитку запалення як місцево в суглобі (гістологічний аналіз), так і системно (показники запалення в крові) на рівні організму.

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 оксидативного стресу. Дисбаланс між утворенням вільних радикалів та ендогенними механізмами антиоксидантного захисту викликає окисну модифікацію основних клітинних компонентів, що є характерним у генезі різних патологічних станів. Відомо, що розвиток запального процесу супроводжується активацією вільнорадикальних процесів [Drevet S., 2018].

Встановлено, що у щурів при експериментальному запаленні суглобу у сироватці крові вміст АФК зростає: супероксидного радикалу – в 1,7 рази та гідроген пероксиду – в 1,5 рази відносно контролю (табл. 1). У групі тварин з експериментальним запаленням, яким профілактично вводили хондроїтин сульфат, в сироватці крові знижується рівень супероксидного радикалу – в 1,4 рази та гідроген пероксиду – в 1,3 рази порівняно з групою щурів з гострим

запаленням. Показано, що хондропротектор не впливає на рівень досліджуваних показників у сироватці крові контрольної групи тварин (табл. 1).

Таблиця 1

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

Групи тварин \ Показник	Супероксидний радикал, мкмоль ХТТ-формазау × мг білка ⁻¹	Гідроген пероксид, мкмоль × мг білка ⁻¹
Контроль	4,63 ± 0,45	0,28 ± 0,03
Хондрітин сульфат	4,24 ± 0,42	0,31 ± 0,03
Каррагінан	7,83 ± 0,75*	0,43 ± 0,04*
Каррагінан + хондрітин сульфат	5,75 ± 0,54*/#	0,34 ± 0,03#

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

Статичним індикатором наслідків інтенсифікації вільнорадикальних процесів є вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). У ході проведених експериментів нами виявлено, що у сироватці крові щурів при експериментальному запаленні суглобу зростає рівень дієнових кон'югатів – в 1,6 рази, ТБК-активних продуктів – в 1,5 рази та шиффових основ – в 1,3 рази порівняно з контролем (табл. 2).

Таблиця 2

Вміст продуктів пероксидного окиснення у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та тривалого профілактичного введення хондрітин сульфату ($M \pm m, n = 10$)

Групи тварин \ Показник	Дієнові кон'югати, нмоль × мг білка ⁻¹	ТБК-активні сполуки, нмоль × мг білка ⁻¹	Шиффові основи, ум. од. × мг білка ⁻¹
Контроль	46,38 ± 4,27	18,23 ± 1,79	3,54 ± 0,33
Хондрітин сульфат	48,23 ± 4,52	16,92 ± 1,68	3,62 ± 0,35
Каррагінан	75,67 ± 7,31*	27,89 ± 2,61*	4,72 ± 0,43*
Каррагінан + хондрітин сульфат	58,19 ± 5,42*/#	22,11 ± 2,14#	3,82 ± 0,36#

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

При профілактичному введенні хондрітин сульфату тваринам з запаленням суглобу у сироватці крові знижується вміст дієнових кон'югатів, ТБК-активних

продуктів – в 1,3 рази та шиффових основ – в 1,2 рази відносно групи тварин з гострим запаленням (табл. 2). Виявлено, що введення щурам хондроїтин сульфату не впливає на вміст досліджуваних параметрів ліпідної пероксидації у сироватці крові контрольної групи тварин (табл. 2).

Раннім та надійним індикатором розвитку окислювального стресу в організмі є окисне пошкодження білків [Dahl J.U., 2015; Rajares M., 2015]. Індукторами продукції окисно-модифікованих білків виступають АФК, збільшення вільного заліза, продукти ПОЛ на фоні зниження функціонування антиоксидантної системи. Встановлено, що у щурів при запаленні суглобу у сироватці крові вміст окисно-модифікованих білків (ОМБ) зростає: збільшується рівень нейтральних альдегідних продуктів (макс. абсорбції при 356 нм) – у 2,1 рази, нейтральних кетонних продуктів ($E_{max} = 370$ нм) – в 1,8 рази, основних альдегідних продуктів (максимум поглинання при 430 нм) – в 1,6 рази, основних кетонних продуктів ($E_{max} = 530$ нм) – в 1,3 рази порівняно з показниками контролю (табл. 3).

Таблиця 3

Вміст продуктів окисної модифікації білків у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та профілактичному введенні 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

При введенні хондроїтин сульфату щурам з експериментальним запаленням суглобу в сироватці крові знижувався вміст нейтральних альдегідних продуктів – в 1,6 рази, нейтральних кетонних продуктів – в 1,5 рази, основних альдегідних продуктів – в 1,3 рази та основних кетонних продуктів – в 1,2 рази порівняно з групою тварин з експериментальним запаленням. Показано, що хондропротектор не впливав на рівень досліджуваних показників ОМБ у сироватці крові контрольної групи тварин (табл. 3).

Показником білкової модифікації є окиснення їх сульфгідрильних груп, які в першу чергу зазнають окиснення. Виявлено, що за умов гострого запалення суглобу у сироватці крові щурів вміст сульфгідрильних груп знижувався:

небілкових SH-груп – в 1,6 рази, білкових та загальних SH-груп – в 1,8 рази відносно контролю (табл. 4). Встановлене зниження вмісту сульфгидрильних груп у сироватці крові щурів за умов гострого запалення, індукованого каррагінаном, може свідчити про утворення нових 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 у сироватці крові рівень білкових та загальних сульфгидрильних груп зростає в 1,5 рази відносно групи щурів, яким вводили лише каррагінан. За даних експериментальних умов вміст небілкових тіолових груп залишається на рівні групи щурів при експериментальному запаленні суглобу (табл. 4).

Таблиця 4

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

Групи тварин \ Показник	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

Таким чином, за умов запалення суглобу у сироватці крові інтенсифікуються вільнорадикальні процеси, що призводить до окиснення ліпідних та білкових молекул. Профілактичне введення хондроїтин сульфату щурам з експериментальним запаленням суглобу призводить до часткового зниження інтенсивності прооксидантних процесів у крові.

Стан антиоксидантної системи у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення суглобу та профілактичному введенні хондроїтин сульфату. Для захисту від пошкоджуючої дії вільних радикалів та їх продуктів в організмі існує розвинена антиоксидантна система (АОС), яка підтримує активність перебігу процесів вільнорадикального окиснення на фізіологічному рівні, що забезпечує редокс-гомеостаз клітин. У наших дослідженнях АОС ми оцінювали за активністю антиоксидантних ферментів та вмістом відновленого та окисненого глутатіону.

Встановлено, що при каррагінан-індукованому запаленні суглобу у сироватці крові супероксиддисмутазна активність знижувалася в 1,5 рази, при цьому каталазна активність зростає в 2,1 рази порівняно з контролем (табл. 5). В групі з

запаленням суглобу, що отримувала профілактичне введення хондроїтин сульфату, активність супероксиддисмутази зростає в 1,2 рази, активність каталази знижується в 1,3 рази порівняно з групою тварин з експериментальним запаленням. Показано, що при каррагінан-індукованому запаленні суглобу, у сироватці крові знижувалась глутатіонпероксидазна активність – в 1,6 рази, глутатіонредуктазна активність – в 1,8 рази та вміст відновленого глутатіону – в 1,7 рази, при цьому зростає глутатіонтрансферазна активність в 1,7 рази та вміст окисненого глутатіону – в 1,4 рази порівняно з контролем (табл. 5).

Таблиця 5

Показники антиоксидантної системи у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та тривалому профілактичному введенні хондроїтин сульфату ($M \pm m$, $n = 10$)

Показник	Групи тварин	Контроль	Хондроїтин сульфат	Каррагінан	Каррагінан + хондроїтин сульфат
Супероксиддисмутазна активність, ум. од. \times xv^{-1} \times мг білка ⁻¹		0,22 \pm 0,02	0,21 \pm 0,02	0,15 \pm 0,02*	0,18 \pm 0,02
Каталазна активність, нмоль \times xv^{-1} \times мг білка ⁻¹		0,75 \pm 0,07	0,71 \pm 0,06	1,58 \pm 0,14*	1,21 \pm 0,11*/#
Глутатіонпероксидазна активність, нмоль GSH \times xv^{-1} \times мг білка ⁻¹		34,71 \pm 3,19	36,54 \pm 3,58	21,17 \pm 2,03*	29,15 \pm 2,63*/#
Глутатіонтрансферазна активність, нмоль \times xv^{-1} \times мг білка ⁻¹		6,12 \pm 0,55	6,41 \pm 0,61	10,38 \pm 0,87*	7,84 \pm 0,65*/#
Глутатіонредуктазна активність, нмоль НАДФН \times xv^{-1} \times мг білка ⁻¹		0,34 \pm 0,03	0,32 \pm 0,03	0,19 \pm 0,02*	0,25 \pm 0,02*/#
Глутатіон відновлений, нмоль \times мг білка ⁻¹		18,01 \pm 1,67	18,52 \pm 1,73	10,79 \pm 1,05*	14,56 \pm 1,42*/#
Глутатіон окиснений, нмоль \times мг білка ⁻¹		6,13 \pm 0,57	5,87 \pm 0,54	8,42 \pm 0,79*	7,05 \pm 0,59#

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

При введенні препарату на основі хондроїтин сульфату щурам з експериментальним запаленням суглобу в сироватці крові зростала глутатіонпероксидазна активність – в 1,4 рази, глутатіонредуктазна активність – в 1,3 рази, вміст відновленого глутатіону – в 1,5 рази, при цьому знижувалася глутатіонтрансферазна – в 1,3 рази та вміст окисненого глутатіону – в 1,2 рази відносно групи тварин за умов гострого запалення (табл. 5). Виявлено, що введення щурам хондроїтин сульфату не впливає на вміст досліджуваних показників у сироватці крові контрольної групи тварин (табл. 5). Таким чином, показано, що при експериментальному запаленні суглобу в крові щурів порушується функціонування системи антиоксидантного захисту. Профілактичне введення хондроїтин сульфату щурам з запаленням суглобу сприяло частковому відновленню функції антиоксидантної системи, що супроводжувалося зниженням розвитку оксидативного стресу в організмі.

Рівень експресії ряду генів, залучених до розвитку запалення у крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення суглобу та тривалому

профілактичному введенні хондроїтин сульфату. Нами було проведено вивчення молекулярно-генетичних основ виникнення запальних процесів. 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.

Встановлено, що у щурів при запаленні суглобу, індукованому каррагінаном, у крові зростає рівень експресії *Ptgs2* – в 1,6 рази, *Nos2* – в 1,4 рази, *Tgfb1* – в 1,3 рази та *Nfkb1* – в 1,8 рази відносно показників контролю (табл. 6).

Таблиця 6

Відносна експресія генів у крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні суглобу та тривалому профілактичному введенні хондроїтин сульфату (M ± m, n = 10)

Показник \ Групи тварин	Контроль	Хондроїтин сульфат	Каррагінан	Каррагінан + хондроїтин сульфат
<i>Ptgs2/Actb</i>	1,0 ± 0,09	1,0 ± 0,14	1,6 ± 0,19*	1,25 ± 0,12*/#
<i>Nos2/Actb</i>	1 ± 0,08	1,1 ± 0,12	1,4 ± 0,12*	1,2 ± 0,11
<i>Tgfb1/Actb</i>	1 ± 0,07	1,1 ± 0,15	1,3 ± 0,13*	1,1 ± 0,1
<i>Nfkb1/Actb</i>	1 ± 0,07	1,0 ± 0,15	1,8 ± 0,19*	1,3 ± 0,13*/#

Примітки: * – 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 у крові знижувався рівень експресії *Ptgs2* – в 1,3 рази та *Nos2* – в 1,2 рази, *Nfkb1* – в 1,4 рази у порівнянні з щурами з патологією, при цьому рівень експресії *Tgfb1* нормалізувався. Показано, що хондропротектор не впливав на рівень досліджуваних показників у крові контрольної групи тварин (табл. 6).

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 функціонування системи антиоксидантного захисту. Профілактичне введення хондроїтин сульфату щурам з експериментальним запаленням призводить до пригнічення проявів запальних явищ у крові (зниження концентрації прозапальних цитокінів, С-реактивного білка, молекул низької молекулярної маси, рівня експресії генів *Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*, *Nfkb1* та відновлення окисно-антиоксидантної рівноваги (зниження утворення АФК, продуктів окиснення ліпідів та білків, нормалізації активності ферментів антиоксидантної системи).

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі оцінено стан характерних показників запалення у крові щурів за умов розвитку каррагінан-індукованого запалення суглобу та за

профілактичного введення хондроїтин сульфату. Встановлено, що введення хондроїтин сульфату щурам знижувало 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 зростав 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 ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ 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. *(Особистий внесок здобувача — проведення досліджень, аналіз результатів, написання тексту статті, підготовка матеріалів до друку).*
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. *(Особистий внесок здобувача — проведення досліджень, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
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. *(Особистий внесок здобувача — проведення досліджень, аналіз результатів, написання тексту статті, підготовка матеріалів до друку).*
4. Korotkiy 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. Impact Factor: 2.67 (Scopus). *(Здобувачкою особисто виконано частину експериментальних досліджень, що стосується моделі каррагінан-індукованого запалення суглобу).*
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. *(Особистий внесок здобувача — проведення досліджень, аналіз результатів, написання тексту статті, підготовка матеріалів до друку).*
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 *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.

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.

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.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню профілактичної дії хондроїтин сульфату на біохімічні показники крові щурів за умов розвитку каррагінан-індукованого запалення суглобу. При каррагінан-індукованому запаленні суглобу в крові зростала концентрація прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-12В р40, ФНП- α), С-реактивного білка та молекул низької молекулярної маси, при цьому рівень антизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10) залишався незмінним. За даних експериментальних умов у крові щурів збільшувався рівень експресії генів, що залучені до розвитку запалення (*Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*, *Nfkb1*). При профілактичному введенні хондроїтин сульфату щурам з запаленням суглобу у крові спостерігали нормалізацію досліджуваних показників, при цьому рівень ІЛ-10 зростав порівняно з групою тварин з патологією. При експериментальному запаленні суглобу у крові інтенсифікувалися вільнорадикальні процеси (зростав вміст супероксидного радикалу, гідроген пероксиду, продуктів окиснення ліпідів та білків) та порушувалися функції антиоксидантної системи (знижувалася супероксиддисмутазна, глутатіонпероксидазна, глутатіонредуктазна активності та вміст відновленого глутатіону, при цьому зростала каталазна, глутатіонтрансферазна активність і вміст окисненого глутатіону порівняно з

контролем). При профілактичному введенні хондроїтин сульфату щурам з експериментальним запаленням суглобу у крові відновлювався окисно-антиоксидантний гомеостаз. 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.

АННОТАЦІЯ

Блохина А.Г. Биохимические показатели крови при развитии экспериментального воспаления сустава и при условии профилактического введения хондроитин сульфата. – Квалификационная научная работа на правах рукописи диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2021.

Диссертационная работа посвящена исследованию профилактического действия хондроитин сульфата на биохимические показатели крови крыс в условиях развития каррагинан-индуцированного воспаления сустава.

При каррагинан-индуцированном воспалении сустава на уровне целостного организма наблюдается развитие воспаления и эндогенная интоксикация: в крови животных возрастает концентрация провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-12В р40, ФНО- α), концентрация С-реактивного белка и содержание молекул низкой молекулярной массы, при этом уровень противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10) остается неизменным. Также показано, что при данных экспериментальных условиях в крови крыс увеличивается уровень экспрессии генов, задействованных в развитии воспаления (*Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*, *Nfkb1*). При профилактическом введении хондроитин сульфата крысам с воспалением сустава в крови исследуемые показатели восстанавливаются, при этом уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-10 возрастает по сравнению с группой животных с патологией. При экспериментальном воспалении сустава в крови крыс интенсифицируются свободнорадикальные процессы: увеличивается содержание супероксидного радикала, перекиси водорода, содержание продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов, ТБК-активных соединений, шиффовых оснований) и уровень продуктов окислительной модификации белков (альдо- и кетопроизводных нейтрального и основного характера). При данных экспериментальных условиях в крови нарушается работа антиоксидантной системы: снижается супероксиддисмутазная, глутатионпероксидазная, глутатионредуктазная активности и содержание восстановленного глутатиона, при этом растет каталазная, глутатионтрансферазная активности и содержание окисленного глутатиона сравнению с контролем. При профилактическом введении хондроитин сульфата крысам с экспериментальным воспалением сустава в крови восстанавливается

окислительно-антиоксидантный гомеостаз по сравнению с группой животных с каррагинан-индуцированным воспалением сустава.

Таким образом, в данном диссертационном исследовании впервые показано, что профилактическое введение хондроитин сульфата крысам с каррагинан-индуцированным воспалением сустава на системном уровне способствует снижению интенсивности воспаления и свободнорадикальных процессов в крови. Полученные данные свидетельствуют про иммуномодулирующие, противовоспалительные и антиоксидантные свойства исследуемого препарата на основе хондроитин сульфата на организм при экспериментальном воспалении сустава.

Ключевые слова: острое воспаление сустава, хондроитин сульфат, свободнорадикальные процессы, антиоксидантная система.

SUMMARY

Blokhina O.G. Biochemical parameters of blood under the development of experimental joint inflammation and chondroitin sulfate prophylactical addition. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript. Thesis for degree in specialty 03.00.04 – biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2021.

The thesis for candidate of biological science degree is devoted to the research of chondroitin sulfate prophylactic action onto the rat blood biochemical parameters in the case of carrageenan-induced joint inflammation. During the carrageenan-induced joint inflammation in whole organism the development of inflammation and endogenic intoxication were observed: the increase in levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-12B p40, TNF- α), C-reactive protein concentration and low molecular mass molecules amount are evident, while the levels of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10) remain unchanged. It was also shown that in the blood under these experimental conditions there was the expression level increase of the genes, taking part in inflammation development (*Ptgs2*, *Nos2*, *Tgfb1*, *Nfkb1*). In the case of prolonged prophylactic injection of chondroitin sulfate to rats with joint inflammation the beforementioned parameters become normal, while the level of IL-10 was increased in comparison with the animal group with the pathology. During experimental joint inflammation intensification of free radical formation process in the rat blood was detected: the amounts of superoxide, hydrogen peroxide and lipid and protein oxidation products were increased. Under these experimental conditions the blood antioxidant system function was compromised: the activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase as well as the amount of reduced glutathione were decreased, while the catalase and glutathione transferase activity, as well as the amount of oxidized glutathione, were found to be increased as compared to the controls. During the prophylactic injection of chondroitin sulfate to rats with experimental joint inflammation oxidative homeostasis restoration was observed as opposed to the animal group with carrageenan-induced joint inflammation. The data obtained indicates immuno-modulative, anti-inflammatory and antioxidative properties of investigated

chondroitin sulfate based preparation on the whole organism during experimental joint inflammation.

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

