

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *NOS2* ТА *ACAN* У ХРЯЩАХ КОЛІННОГО СУГЛОБА ЩУРІВ ЗА УМОВ ОСТЕОАРТРОЗУ

А.С. ДРАНИЦИНА, К.О. ДВОРЩЕНКО, О.Г. КОРОТКИЙ, А.А. ВОВК, Т.М. ФАЛАЛЄЄВА, Л.І. ОСТАПЧЕНКО

Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка
01601, г. Київ, ул. Володимирська 64/13

E-mail: alevtina.dranitsina@gmail.com, andriiovk@ukr.net

*Під час гістологічного дослідження нами було виявлено дегенеративні зміни у хрящовій тканині щурів з індуктованим моноіодоацетатом натрію остеоартрозом та оцінено вплив хондроїтину сульфату та мультипробіотичного препарату на процеси загоєння, а саме: відсутність пост-некротичних змін та фіброзних елементів при сумісному введенні зазначених препаратів. Молекулярний аналіз хрящової тканини щурів з експериментальним артрозом виявив підвищення рівня експресії гена *Nos2* та зниження рівня експресії гена *Acap* у порівнянні з контрольною групою тварин, що вказує на активацію запальних та деструктивних процесів у тканині. За комбінованого введення хондроїтину сульфату та мультипробіотика за тих самих умов патерн експресії генів *Nos2* та *Acap* повертався до контрольних значень, що свідчить про перспективність використання мультипробіотика як речовини, яка підсилює протизапальну та антиоксидантну дію цього хондропротектора за умов остеоартрозу.*

Ключові слова: хрящ, остеоартроз, щури, експресія генів *Nos2* та *Acap*, хондропротектор, мультипробіотик.

Вступ. Важливою ланкою сучасної генетики є вивчення закономірностей та механізмів метаболічних зсувів у різних органах в умовах патології, що сприяє виявленню молекулярно-генетичних маркерів патогенезу багатьох захворювань і дозволяє встановити найбільш чутливі параметри, наприклад, зміни генної експресії, для своєчасного прогнозування важкості процесу та формуванню обґрунтованої програми лікування [1–3].

Серед порушень опорно-рухового апарату важливе місце займають дегенеративно-дистрофічні захворювання суглобів, основним з яких є остеоартроз (ОА, osteoarthritis (англ.)) [3, 4]. Дегенеративні зміни хряща та субхондральної кісткової тканини зумовлені порушенням

обмінних процесів у суглобі внаслідок травм, вроджених вад розвитку, генетичної схильності (зокрема, мутації в гені колагену 2 типу), ожиріння, активації вільнорадикальних процесів тощо [4–6]. Такі фактори можуть призвести до надлишку синтезу прозапальних цитокінів, які, у свою чергу, стимулюють експресію про-запальних генів, наприклад – *Nos2* (кодує в щурів індукцибельну нітрооксидсинтазу – іNOS, яка є важливим медіатором запальної реакції) [4, 7]. Адаже після індукції іNOS виробляє значну кількість NO неспецифічної мікробіцидної дії, що є шкідливим для оточуючих клітин [4, 7]. Показано кореляцію між рівнем експресії цього гена в хондроцитах, синовіоцитах, фібробластах, макрофагах та проявами захворювання при розвитку ОА на деяких тваринних моделях та в людини. Зокрема виявлено, що гранулоцити синовіальної рідини локально задіяні в продукуванні NO на доданок до лейкоцитів крові [7].

Агрекан (англ. Aggrecan) – білок, також відомий як хрящовий специфічний протеоглікановий ядерний білок або протеоглікановий хондроїтинсульфат 1, наявний лише в хребетних [8–10]. У щурів кодується геном *Acap*. Агрекан має переплетену структуру, де ланцюги хондроїтину сульфату (ХС) та кератансульфату прикріплені до витягнутої білкової серцевини. Агрекан дуже важливий у гіалінових хрящах, так як зв'язує фібрили колагену II типу і утримує воду, чим забезпечує осмос, необхідний для нормального функціонування хрящової тканини, та надає стійкості до великих навантажень. Було показано, що мутація гена *ACAN* у людини може привести до дисплазії, у той час як нестача агрекана може зумовити артрити різної етіології, а також інші захворювання суглобів [8].

Дистрофічні порушення суглобів, у першу чергу, пов'язані зі змінами структури хрящо-

вої тканини поверхні суглоба та недостатністю ХС — основного полісахариду хряща [11–16]. Тому є доцільним застосування препаратів, які містять сульфатовану форму цієї речовини, при захворюваннях суглобів задля відновлення структури тканини, гальмування процесів деградації та пригнічення запалення. Хоча хондропротектори застосовуються в медицині протягом тривалого часу, сировиною для них є суміш молекул ХС із різною довжиною та варіаціями в положенні сульфатних груп, яка має різні рівні очищення, що часом викликає небажані ефекти [12–16].

На сьогодні велика увага приділяється пошуку терапевтичних речовин, які б не лише полегшували симптоми, але забезпечували антиоксидантну терапію та відновлювали рівновагу процесів синтезу й деградації з мінімальними побічними ефектами [15, 16]. Відомо, що мікробіом шлунково-кишкового тракту (ШКТ) впливає як на метаболічний потенціал хазяїна, так і на вроджений і набутий імунітет [1]. У той же час нещодавні дослідження виявили, що ХС може модифікувати функціональний стан мікрофлори ШКТ за фізіологічних умов і під час дії стресорів [17], модулюючи й імунну відповідь організму. Показано, що лікування пробіотиками сприяє покращенню метаболізму кістки, зменшує біль і запальні реакції при порушеннях опорно-рухового апарату, можливо, через зниження рівня с-реактивного білка в сироватці крові [2, 18–21]. Отже, одночасне застосування мультипробіотичних препаратів із хондропротектором може модулювати запальну відповідь, ймовірно блокуючи ремоделювання хряща при розвитку ОА.

Мультипробіотичні препарати групи «Симбітер® ацидофільний» концентрований (далі «Симбітер») характеризуються полікомпонентністю, широким спектром біологічної активності та складом, максимально наближеним до природних мікробіоценозів організму людини та тварин [1, 22].

На сьогодні недостатньо вивчено вплив вищезазначених препаратів на профіль експресії генів прозапальних цитокінів та структурних білків хрящової тканини при дегенеративно-дистрофічних захворюваннях суглобів, окрім цього, лишається невисвітленою дія мульти-

пробіотика на експресію генів *Nos2* та *Acan* за таких умов.

Тому, метою роботи було визначення рівня експресії генів, залучених до розвитку запалення: *Nos2*, і ремоделювання матриксу: *Acan* у хрящовій тканині щурів за умов індукованого моноіодоацетатом натрію ОА та його хондропротекторної та мультипробіотичної корекції, а також проведення гістологічного дослідження для оцінки дегенеративних порушень суглоба.

Матеріали і методи. При роботі з тваринами дотримувались загальних етичних норм проведення експериментів на тваринах відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для наукових експериментів або в інших наукових цілях, Першого національного конгресу України з біоетики (вересень 2001 р.) та засідання комісії з питань біоетики ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 3, 25.09.2017). Роботу було виконано на білих нелінійних щурах самцях масою 180–240 г, які утримувалися в групових клітках (у кожній клітці знаходилося п'ять тварин) за контрольованих умов температури (22 ± 3 °C), світла (12 год світлого/темного циклу) та відносної вологості (60 ± 5 %). Тварини отримали стандартну лабораторну дієту («Резон-1», Україна) та деклоровану водопровідну воду *ad libitum*. Ветеринар вивчав акліматизацію тварин впродовж п'яти днів, потім щури випадково ділилися на групи та маркувалися.

Експериментальний дизайн. Щури були розділені на 9 груп по 10 тварин кожна. Щури першої групи — інтактні — не зазнавали впливів жодного з препаратів чи речовин. Анестезовані щури груп МІА (індукований моноіодоацетатом натрію ОА), МІА + ХС (МІА + розчин хондроїтину сульфату), МІА + МПБ (МІА + розчин мультипробіотичного препарату) та МІА + ХС + МПБ одноразово отримали 0,05 мл 2%-ного розчину МІА («Sigma», Франція) у колінний суглоб (в інфрапателлярний лігамент) правої задньої кінцівки (замість розчину МІА рівний об'єм фізіологічного розчину (ФР) було введено щурам контрольних груп), який використовується для імітації дегенеративно-дистрофічних змін у колінному

суглобі [23]. Тварини груп ХС, ХС + МПБ, МІА + ХС та МІА + ХС + МПБ впродовж 28 діб, з 2-ої по 29-ту добу експерименту, отримували розчин ХС препарату «Драстоп» («World Medicine», Велика Британія), що містить 100 мг/мл активної речовини. Препарат розводили ФР 1:5 та вводили внутрішньом'язево почергово в праву та ліву задню гомілку тварини, в об'ємі 0,5 мл розчину на 1 кг маси тварини (інші групи тварин отримували ФР). Щурам груп МПБ, ХС + МПБ, МІА + МПБ та МІА + ХС + МПБ протягом 14 діб, з 8-ої по 22-гу добу експерименту, вводився перорально, за допомогою м'якого катетеру, в об'ємі 1 мл розчину (розведення 0,14 г препарату на 1 мл води) на 1 кг маси тіла оральний розчин мультипробиотику «Симбітер» (являє собою біомасу живих клітин симбіозу 14 штамів фізіологічних для кишечника ссавців мікроорганізмів, що належать до 10 видів: *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *P. acidipropionici*, *Lactococcus lactis*, *Acetobacter aceti*, *Streptococcus salivarius*; «Пролісок», Україна); вода використовувалася для тварин інших груп. Задні колінні суглоби щурів були видалені на 30-й день після ін'єкцій МІА/ФР. Одразу видаляли гіалінові хрящі колінних суглобів і зберігали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до початку експериментів.

Гістологічний аналіз. Матеріал фіксували в 10%-ному нейтральному формаліні та зберігали не більше 1 місяця. Потім суглоби декальцифували в швидкому декальцифіканти («Kalktek», Італія). Зразки готували в гістопроекторі карусельного типу «STP-12». Далі використовували станцію «ЕС-350» для наповнення парафінових блоків, ротаційний мікротом серії «НМ-340Е» для підготовки гістологічних зрізів та прилад «Robot-Stainer HMS-740» для забарвлення гістологічних препаратів (усі «MIRROM», Німеччина). Препарати забарвлювали гематоксиліном та еозином (Г&Е) за Бюмером [24]. Мікрофотографії (збільшення $\times 200$) зроблені мікроскопами «Axioskop 40» і «Axio Cam MRc5» («Carl Zeiss», Німеччина).

Кількісна ЗТ-ПЛР у реальному часі. РНК отримували за методом Chomczynski [25]; синтез кДНК та кількісну полімеразну ланцюго-

ву реакцію в реальному часі (Real-time PCR, кПЛР) за допомогою комерційного набору «Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix» («Thermo Scientific», Литва), використовуючи по 0,4 мкмоль/л кожного праймера, проводили за таких, рекомендованих фірмою-виробником, температурних умов: синтез кДНК $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 30 хв; ініціююча денатурація $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 15 хв; далі 40 циклів: денатурація ДНК $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 15 с; гібридизація праймерів 50 або $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 35 с; будова ланцюга $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 30 с; елонгація ампліфікатів $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 5 хв.

У реакціях було використано такі послідовності праймерів (підібрано з використанням Primer-BLAST): для *Nos2* – прямий – GTGTTCCACCAGGAGATGTTG та зворотний – TGTCAGAAACTCAGGCGTAGT; для *Acan* прямий AGATGGCACCTCCGATACC та зворотний – GACACACCTCGGAAGCA-GAA; для *Actb* (ген β -актину, що використовується в якості внутрішнього контролю реакції завдяки конститутивній експресії) – прямий – TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотний – ATTGCCGATAGTGATGACCT. Відтворюваність результатів ампліфікації було перевірено в паралельних експериментах шляхом повторення кПЛР на зразках РНК усіх тварин, із кожним праймером не менше трьох разів. Після кожного циклу ампліфікації зчитувалась флуоресценція барвника SYBR Green I, а по закінченні реакції будувалась крива плавлення для контролю утворення димерів праймерів та специфічності реакції. Початкову кількість мРНК обраховували за порівняльним C_T методом « $\Delta\Delta C_T$ Method», ефективність ПЛР реакцій була однаковою ($E_x = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$, $\text{slope} < 0$ ($-3,4$). Відносну кількість мРНК зазначених генів нормалізували до мРНК *Actb* [26].

Статистична обробка результатів досліджень. Математичну та статистичну обробку результатів досліджень проводили на комп'ютері з використанням програмного пакета «GraphPad Prism 5.04» («GraphPad Software Inc.», США). Їх перевіряли на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Уїлка. Подальший обрахунок відбувався за допомогою односпрямованого дисперсійного аналізу (one-way ANOVA) із пост-тестом Тьюкі. Отримані результати наведені у вигляді середнього

арифметичного \pm середньоквадратичне відхилення (дисперсія) – SD. Результати вважали значущими, коли $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. При проведенні гістологічного аналізу зрізи суглобів тварин груп Контроль, ХС, МПБ, ХС + МПБ не мали достовірних відмінностей у порівнянні з інтактною групою щурів. Класичний опис зрізів колінних суглобів інтактної групи характеризувався наступними ознаками: хрящова поверхня щурів була твердою, зберігалася шарова структура гіалінового хряща, глибинний шар містив великі гіпертрофовані хондроцити тощо. Відразу під суглобовим хрящом знаходилася субхондральна кісткова тканина з численними судинами, які забезпечують мікроциркуляцію (рис. 1).

Введення МІА викликало значну дезорганізацію в структурі гіалінових хрящів та порушенні його гістоархітектоніки. Наслідком руйнування гіалінового хряща була заміна тканин на фіброзну сполучну тканину. Кількість та розміри хондроцитів знизились. Фіброзна тканина повністю замінила поверхню хряща, що робить неможливим відновлення нормального функціонування хрящової тканини шляхом регенерації хондроцитів із клітин глибокого шару (рис. 2). Використана нами доза МІА викликала хондро- та субхондральні зміни з гальмуванням синтезу колагену та протеоглікану. Зменшились відстані між клітинами, позаклітинний матрикс зазнав суттєвої дистрофії. Отримані нами результати узгоджуються з клінічними дослідженнями, які показали зниженні колагену типу II та VI у хондроцитах пацієнтів з ОА [27].

Після хондропротекторної терапії з ХС фіброз був виражений мінімально, і зберігалась рівність хрящової поверхні. Проявилась тенденція до збереження морфологічної структури хряща, диференціація хондроцитів частково зберігалась. Проте загальна гістоархітектоніка була порушена, спостерігались ділянки відсутності хондроцитів та частковий фіброз субхондральної поверхні, секційна втрата клітинних елементів у поверхні та перехідному шару гіалінового хряща. Глибокий шар містив гіпертрофовані та вауколізовані хондроцити. Зональність хондроцитів лишалась порушеною (рис. 3).

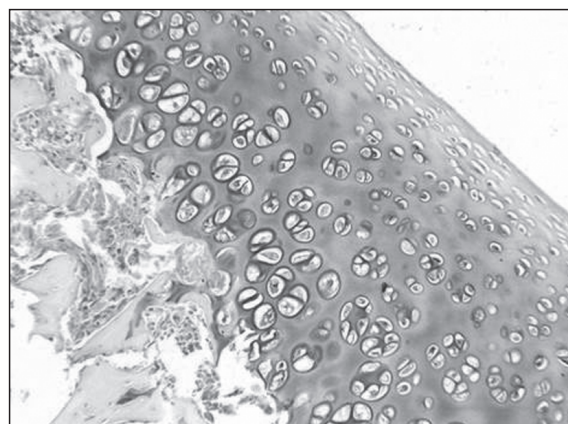


Рис. 1. Хрящова тканина колінного суглобу щура інтактної групи. Г&Е, $\times 200$

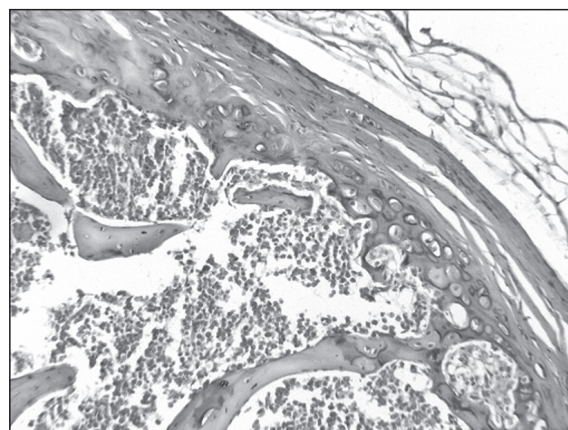


Рис. 2. Заміна фіброзною тканиною поверхні хряща колінного суглобу з суттєвою дистрофією позаклітинного матриксу (група МІА). Г&Е, $\times 200$

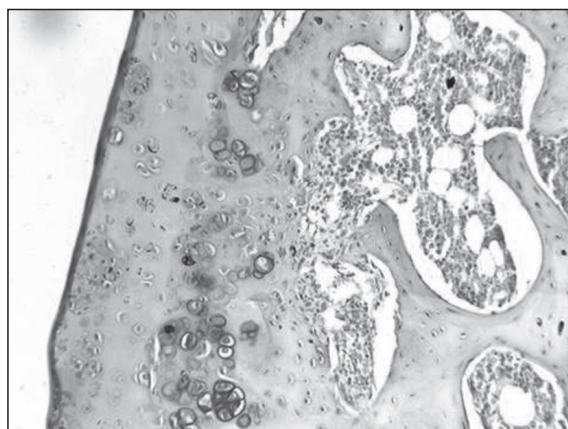


Рис. 3. Частковий фіброз субхондральної поверхні, секційна втрата клітинних елементів в колінному суглобі (група МІА + ХС). Г&Е, $\times 200$

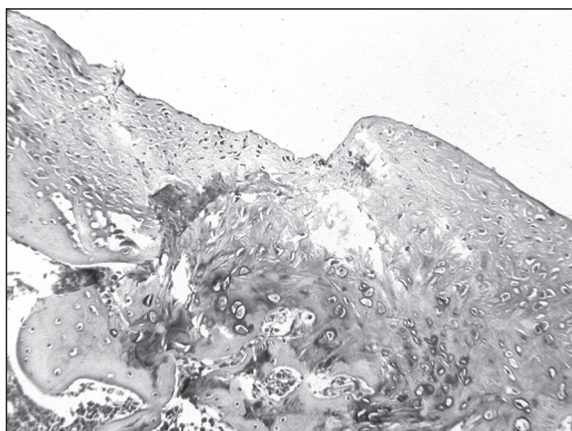


Рис. 4. Заміна фіброзною тканиною поверхні хряща та прояв некротичних дефектів у колінному суглобі (група МІА + МПБ). Г&Е, $\times 200$

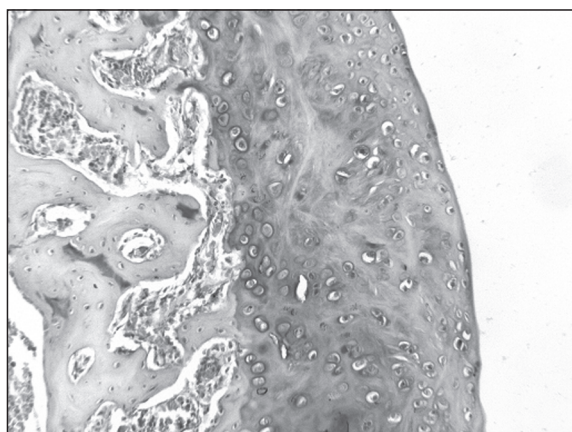


Рис. 5. Порушення зонування хондроцитів колінного суглобу (група МІА + ХС + МПБ). Г&Е, $\times 200$

При порівнянні зрізів суглобів щурів груп МІА та МІА + МПБ треба відзначити, що введення мультипробіотика не спричинювало збереження однорідності поверхні суглобів, з'являлися пошкодження та некротичні дефекти. Крім того, хрящові тканини заміщувалися на фібротичні, але вони покривали меншу площу в порівнянні з гістологічними зрізами групи МІА. Хондроцити глибокого шару зберігалися як і здатність тканин до регенерації (рис. 4).

Комбіноване введення МПБ та ХС показало найбільш значимі результати (рис. 5). Фіброз не прослідковувався, кількість хондроцитів наближалась до норми, хондроцити глибокого шару не були гіпертрофованими; зон без хондроци-

тів було виявлено набагато менше. Поверхня хряща була рівною, пост-некротичні зміни та фіброзні елементи були відсутніми. Негативні зміни обмежувалися порушеннями в зонуванні клітин та незначною втратою їх кількості.

Отже, під час гістологічного дослідження нами було виявлено дегенеративні зміни в суглобах та оцінено вплив ХС та мультипробіотичного препарату на процеси загоєння, а саме: відсутність пост-некротичних змін та фіброзних елементів саме при сумісному введенні зазначених препаратів.

У результаті подальших експериментальних молекулярно-генетичних досліджень було показано, що рівень експресії гена *Nos2* в групі тварин з експериментальним ОА був вищим у 5,8 раза ($p \leq 0,001$) в порівнянні з контрольними тваринами (рис. 6). У групах щурів: ХС, МПБ та ХС + МПБ рівень експресії цього гена знаходився в межах значень контрольної групи, які достовірно не відрізнялися від показників інтактної групи тварин.

Проте, при одночасному введенні з МІА ХС рівень відповідного гена знижувався у 2,8 ($p \leq 0,001$) раза відносно тварин з ОА; проте був підвищеним у 2,1 раза в порівнянні з контрольними тваринами ($p \leq 0,001$). При одночасному введенні разом із МІА МПБ рівень мРНК гена *Nos2* був у 3,5 ($p \leq 0,001$) раза нижчим, ніж у тварин групи МІА; але лишався підвищеним у відносно контролю майже в 1,7 раза ($p \leq 0,05$). За комбінованої дії ХС + МПБ у щурів із МІА-індукованим ОА рівень експресії цього гена повертався до контрольних значень.

На початку ОА в хондроцитах і синовіоцитах активуються вільнорадикальні процеси, збільшується утворення активних форм кисню (АФК), значно посилюються процеси окиснення, що призводить до розвитку окисного стресу – ОС (зокрема, перекисне окиснення ліпідів – ПОЛ), які порушують метаболізм клітин [16], ушкоджують ферменти й структурні білки хрящової тканини, що призводить до загибелі клітин [1, 16]. Так, раніше нами було виявлено суттєве підвищення концентрації первинних, вторинних і кінцевих продуктів ПОЛ у хрящовій тканині щурів при експериментальному ОА і зниження цих показників при одночасному введенні з МІА «Драстопу».

Також було показано активування вільнорадикальних процесів у тварин при колінному ОА (що вказує на порушення редокс-балансу клітин та розвиток системного запалення в організмі щурів з МЙА-індукованим ОА), так само як і більш швидке наближення вмісту супероксидного радикалу та органічних гідропероксидів до контрольних значень при застосуванні цього хондропротектору за тих самих умов [28]. Окрім цього, показане нами зростання експресії прозапального гена *Nos2* корелює з нашими попередніми результатами стосовно значущого посилення експресії *Ptgs2* (кодує фермент циклооксигеназу-2 (COX-2)) у хрящовій тканині щурів з експериментальним ОА. Введення препарату на основі ХС так само сприяло зменшенню експресії цього гена [28].

На наступному етапі дослідження нами було показано, що рівень експресії гена *Acan* в групі тварин з патологією знижувався у 2 рази ($p \leq 0,001$) в порівнянні з контролем (рис. 7). У групах щурів: ХС, МПБ та ХС + МПБ рівень експресії зазначеного гена знаходився на рівні контрольних значень, які вірогідно не відрізнялися від відповідних показників інтактної групи тварин.

У той же час, при одночасному введенні з МЙА ХС рівень відповідної мРНК зростав в 1,5 ($p \leq 0,01$) рази відносно тварин з ОА, однак був нижчим за контрольні значення в 1,3 рази ($p \leq 0,05$). При одночасному введенні разом із МЙА МПБ рівень мРНК гена *Acan* був в 1,4 ($p \leq 0,05$) рази вищим, ніж у тварин групи МЙА; але лишався зниженим в 1,4 рази в порівнянні з контрольними тваринами ($p \leq 0,01$).

За комбінованої дії ХС+МПБ у щурів із МЙА рівень експресії зазначеного гена був на рівні контрольних значень.

З літератури відомо, що посилення транскрипції генів, відповідальних за синтез іNOS, COX-2, ІЛ-6 та інших генів, залучених у каскад запальних реакцій, може регулюватися ІЛ-1 β , надлишок синтезу якого, у свою чергу, був зумовлений різними чинниками, у тому числі ОС (АФК (супероксидний аніон ($O_2 \cdot^-$), гідроксильний радикал ($\cdot OH$), перекис водню (H_2O_2) тощо), наприклад, при дегенерації хрящової тканини та розвитку запалення [3].

У хондроцитах АФК регулюють внутрішньоклітинні молекули сигналізації, такі як, на-

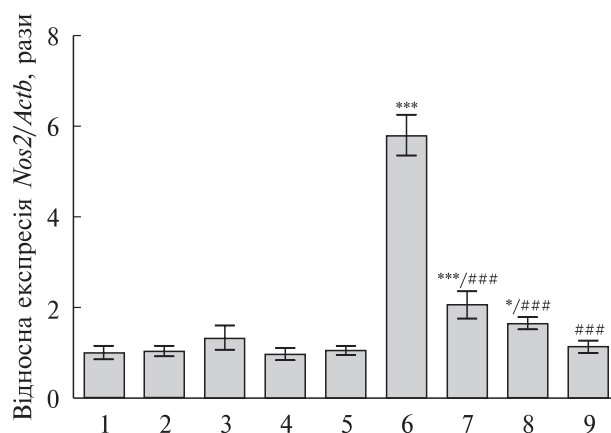


Рис. 6. Рівень експресії гена *Nos2* в хрящах колінного суглоба щурів за умов ОА та при введенні ХС та МПБ. 1 – інтактні; 2 – контроль; 3 – ХС, 4 – МПБ, 5 – ХС + МПБ, 6 – МЙА, 7 – МЙА + ХС, 8 – МЙА + МПБ, 9 – МЙА + ХС + МПБ; *** – $p \leq 0,001$, * – $p \leq 0,05$ відносно контрольних тварин; ### – $p \leq 0,001$ відносно тварин, яким вводили лише МЙА

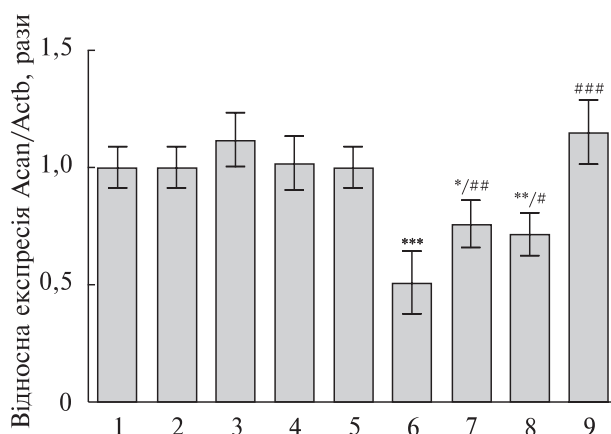


Рис. 7. Рівень експресії мРНК гена *Acan* в хрящах колінного суглоба щурів за умов ОА та при введенні ХС та МПБ. 1 – інтактні; 2 – контроль; 3 – ХС, 4 – МПБ, 5 – ХС + МПБ, 6 – МЙА, 7 – МЙА + ХС, 8 – МЙА + МПБ, 9 – МЙА + ХС + МПБ; *** – $p \leq 0,001$, ** – $p \leq 0,01$, * – $p \leq 0,05$ відносно контрольних тварин; ### – $p \leq 0,001$, ## – $p \leq 0,01$, # – $p \leq 0,05$ відносно тварин, яким вводили лише МЙА

приклад, фосфатази та фактори транскрипції (ядерний фактор-каппа В (NF- κ B), p53 тощо), які беруть участь у сигнальних шляхах, що регулюють синтез та деградацію хрящової тканини. Так, на тлі вивільнення прозапальних цитокінів у хондроцитах (наприклад, ІЛ-2, ІЛ-8

тощо), відбувається міграція нейтрофілів із мікроциркуляторного русла в хондроцити, подальше збільшення вироблення прозапальних цитокінів і простагландинів, генерація АФК тощо [3, 28, 29]. Тому зростання рівня АФК може активізувати катаболічну сигналізацію, викликати ОС, пригнічувати анаболічні сигнальні шляхи і збільшити експресію ряду генів, залучених у розвиток запалення, та тих, що кодуєть матриксні металопротеїнази, (ММП)-1, -8, -13 [3]. Також під час дегенерації хряща стромелізін (ММП-3) вважається основним ферментом, який впливає на матриксні компоненти, включаючи агрекан. Іноді до нестачі агрекана може бути причетна металопротеаза ADAMTS5 [8].

Матрикс хрящової тканини складається, в основному, із фібрил колагену II типу, що перетинається з колагеном IX типу, великих сульфатованих (в основному агрекан) і дрібних протеогліканів, гіалуронової кислоти, катіонів і води [8–10]. При ОА змінюється структура хрящової тканини, а мутації можуть призводити до порушення функцій суглобів. Тому в роботі було проведено аналіз експресії гена *Acan*. Отримані нами дані підтверджують наші попередні результати [дані в друці] про значуще зменшення експресії гена *Col2a1* за умов експериментального ОА у щурів, що узгоджується з гістологічними даними, на яких було помічено деградацію міжклітинної речовини та втрату волокнами впорядкованого розташування. ХС як коректор метаболізму був здатний відновлювати певною мірою рівень експресії генів *Col2a1* та *Acan*, що і було продемонстровано нами у ході гістологічного аналізу суглобів щурів проаналізованих груп та при аналізі експресії гена *Acan*.

Отже, незважаючи на класичні знання про ОА як незапальну хворобу, встановлені зміни експресії генів *Nos2* та *Acan* в хрящах колінного суглоба щурів за умов експериментального остеоартрозу на тлі вищезазначених результатів гістологічного аналізу свідчать про розвиток патологічних процесів у хрящовій тканині, зокрема дегенерації та запалення, що узгоджується з сучасними даними літератури [8, 11–16].

Як було зазначено, ХС є основним компонентом протеогліканів, складовою хрящового матриксу [11–16]. На деяких тваринних мо-

делях хронічного ОА було показано, що при його введенні знижувалась експресія та синтез СОХ-2, іNOS, ІЛ-1 β [30] та інших медіаторів запалення, крім того, пригнічувалась індукований синтез ММП-3, -9, -13 у хондроцитах [31]. Отже, хондропротектори інгібують синтез вільних радикалів, знижують запалення, перешкоджаючи апоптозу хондроцитів [11–16, 32].

Відновлювальна дія ХС може бути пов'язана зі збільшенням експресії генів *Col2a1* і *Acan* [33] та пригніченням експресії гена *Nfkb1* (NF κ B, зв'язуючись із промотором відповідного гена, активує транскрипцію прозапальних цитокінів, нітрооксидсинтази, СОХ-2, ММП, чим поглиблює руйнівні процеси в хрящовій тканині) [28, 32]. Також у досліджах *in vitro* було показано, що хондропротектор може взаємодіяти з компонентами позаклітинного матриксу, сприяє редиференціюванню хондроцитів шляхом активації мезенхімальних клітин-попередників [34].

На тваринних моделях ОА за допомогою ПЛР було виявлено бактеріальну ДНК [19, 35], що підтверджує присутність продуктів життєдіяльності бактерій у суглобі під час прогресування хвороби, а отже, подальше збільшення вироблення прозапальних цитокінів, АФК тощо та активування катаболічних шляхів. При сумісному введенні з індометацином чи колагеном II типу пробіотиків (*Lactobacillus casei* та *L. acidophilus*) було також продемонстровано їх синергічну дію: зменшення болю, деструкції хрящової тканини та інфільтрації лімфоцитів; зниження експресії генів численних прозапальних цитокінів та ММП тощо [19, 35].

Щодо можливих механізмів впливу мультіпробіотика на експресію генів у хрящовій тканині, перш за все, слід відзначити його здатність еліминувати бактеріальну колонізацію ШКТ і дисбіоз [1, 36]. Ефективність його дії пов'язана з широким спектром біологічної активності, так як продукти життєдіяльності бактеріальних штамів, представлених у препараті (вітаміни, амінокислоти, коротколанцюгові жирні кислоти, імуномодулятори тощо) мають антиоксидантні властивості, завдяки чому вони здатні гальмувати розвиток ОС і знижувати інтенсивність запальних і деструктивних процесів у клітинах ШКТ [1, 36].

Отже, здатність вищезазначених препаратів за їх спільної дії повертати проаналізовані нами показники до контрольних значень та покращувати стан суглобів при ОА робить їх ефективними при лікуванні цього захворювання.

Висновки. Під час гістологічного дослідження було показано дегенеративні зміни в суглобах та оцінено вплив хондроїтину сульфату та мультипробіотика на процеси загоєння, а саме: відсутність пост-некротичних змін та заміни фіброзною тканиною поверхні хряща при сумісному введенні зазначених препаратів. Молекулярно-генетичний аналіз хрящової тканини щурів з індукованим моноіодоацетатом натрію ОА виявив підвищення рівня експресії гена *Nos2* та зниження рівня експресії гена *Acan* у порівнянні з контрольною групою тварин, що вказує на активацію запальних та деструктивних процесів у тканині. За комбінованого введення хондроїтину сульфату та мультипробіотика патерн експресії генів *Nos2* та *Acan* повертався до контрольних значень, що свідчить про перспективність використання пробіотика як речовини, яка підсилює протизапальну та антиоксидантну дію цього хондропротектора за умов ОА.

Дотримання етичних стандартів. При роботі з тваринами дотримувались загальних етичних норм проведення експериментів на тваринах відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для наукових експериментів або в інших наукових цілях, Першого національного конгресу України з біоетики (вересень 2001 р.) та засідання комісії з питань біоетики ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 3, 25.09.2017).

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Робота не фінансувалась з будь-яких джерел.

EXPRESSION OF *NOS2* AND *ACAN* GENES IN RAT CARTILAGE OF A KNEE UNDER CONDITIONS OF OSTEOARTHRITIS

A.S. Dranitsina, K.O. Dvorshchenko, A.G. Korotkiy, A.A. Vovk, T.M. Falalyeyeva, L.I. Ostapchenko

Educational and Scientific Center «Institute of Biology and Medicine», Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13, Volodymyrska Str., Kyiv, 01601, Ukraine

E-mail: alevtina.dranitsina@gmail.com, andriivovk@ukr.net

During the histological study, we detected degenerative changes in the cartilage tissue of rats with sodium monoiodoacetate-induced osteoarthritis and evaluated the effect of chondroitin sulfate and multiprobiotic preparation on healing processes: the absence of post-necrotic changes and fibrous elements with the co-administration of these drugs. Molecular analysis of rat cartilage tissue with experimental osteoarthritis revealed increased expression of *Nos2* gene and decreased expression of *Acan* gene compared to the control group of animals indicating the activation of inflammatory and destructive processes in the tissue. By the combined administration of chondroitin sulfate and multiprobiotic under the same conditions, the expression pattern of *Nos2* and *Acan* genes returned to control values, indicating the promising use of multiprobiotics as a substance that increases the anti-inflammatory and antioxidant action of this chondroprotector in osteoarthritis treatment.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *NOS2* И *ACAN* В ХРЯЩЕ КОЛЕННОГО СУСТАВА КРЫС ПРИ ОСТЕОАРТРОЗЕ

А.С. Драницина, Е.А. Дворщченко, А.Г. Короткий, А.А. Вовк, Т.М. Фалалеева, Л.И. Остапченко

В ходе гистологического исследования нами выявлено дегенеративные изменения в хрящевой ткани крыс с индуцированным моноіодоацетатом натрия остеоартрозом и оценено влияние хондроитина сульфата и мультипробиотического препарата на процессы заживления, а именно: отсутствие постнекротических изменений и фиброзных элементов при совместном введении указанных препаратов. Молекулярный анализ хрящевой ткани крыс с экспериментальным артрозом обнаружил повышение уровня экспрессии гена *Nos2* и снижение уровня экспрессии гена *Acan* по сравнению с контрольной группой животных, что указывает на активацию воспалительных и деструктивных процессов в ткани. При комбинированном введении хондроитина сульфата и мультипробіотика при тех же условиях паттерн экспрессии генов *Nos2* и *Acan* возвращался к контрольным значениям, что свидетельствует о перспективности использования мультипробіотика как вещества, которое усиливает противовоспалительное и антиоксидантное действие хондропротектора в условиях остеоартроза.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Dranitsina, A.S., Dvorshchenko, K.O., Grebinyk, D.M., and Ostapchenko, L.I., The impact of oxidative stress on *Par2*, *Ptgs2* genes expression in rat duodenal epithelial cells under conditions of prolonged gastric hypochlorhydria and with administration of multiprobiotic, *J. Appl. Pharmac. Sci.*, 2016, vol. 6, no. 12, pp. 162–9. doi: 10.7324/JAPS.2016.601223.
2. Abdollahi-Roodsaz, S., Abramson, S.B., and Scher, J.U., The metabolic role of the gut microbiota in health and rheumatic disease: mechanisms and interventions, *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2016, vol. 12, pp. 446–55. doi: 10.1038/nrrheum.2016.68.
3. Löfgren, M., Svala, E., Lindahl, A., Skiöldebrand, E., and Ekman, S., Time-dependent changes in gene expression induced in vitro by interleukin-1 β in equine articular cartilage, *Res. Veter. Sci.*, 2018, vol. 118, pp. 466–76. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.04.013.
4. Christiansen, B.A., Bhatti, S., Goudarzi, R., and Emami, S., Management of osteoarthritis with avocado/soybean unsaponifiables, *Cartilage*, 2015, vol. 6, no. 1, pp 30–44. doi: 10.1177/1947603514554992.
5. Musumeci, G., Aiello, F.C., Szychlinska, M.A., Di Rosa, M., Castrogiovanni, P., and Mobasher, A., Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression, *Inter. J. Mol. Sci.*, 2015, vol. 16, no. 3, pp. 6093–112. doi: 10.3390/ijms16036093.
6. Bay-Jensen, A.C., Byrjalsen, I., Bihlet, A., Musa, K., Riis, B.J., Christiansen, C., and Karsdal, M.A., Segregating OA patients with and without joint inflammation using two biomarkers of connective tissue inflammation, *Osteoarthritis and Cartilage*, 2015, vol. 23, pp. 88–9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.02.795>.
7. Lepetsos, P., Papavassiliou, A.G., ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*, 2016, vol. 1862, no. 4, pp. 576–91. doi: 10.1016/j.bbdis.2016.01.003.
8. Stöve, J., Gerlach, C., Huch, K., Günther, K.P., Brenner, R., Puhl, W., and Scharf, H.P., Gene expression of stromelysin and aggrecan in osteoarthritic cartilage, *Pathobiol.*, 2001, vol. 69, no. 6, pp. 333–8. doi: 10.1159/000064641.
9. Cancel, M., Grimard, G., Thuillard-Crisinel, D., Moldovan, F., and Villemure, I., Effects of in vivo static compressive loading on aggrecan and type II and X collagens in the rat growth plate extracellular matrix, *Bone*, 2009, vol. 44, no. 2, pp. 306–15. doi: 10.1016/j.bone.2008.09.005.
10. Xu, H.G., Zheng, Q., Song, J.X., Li, J., Wang, H., Liu, P., Wang, J., Wang, C.D., and Zhang, X.L., Intermittent cyclic mechanical tension promotes endplate cartilage degeneration via canonical Wnt signaling pathway and E-cadherin/ β -catenin complex cross-talk, *Osteoarthritis and Cartilage*, 2016, vol. 24, no. 1, pp. 158–68. doi: 10.1016/j.joca.2015.07.019.
11. Hochberg, M.C., Martel-Pelletier, J., Monfort, J., Möller, I., Castillo, J.R., Arden, N., Berenbaum, F., Blanco, F.J., Conaghan, P.G., Domínech, G., and Henrotin, Y., Combined chondroitin sulfate and glucosamine for painful knee osteoarthritis: a multicentre, randomised, double-blind, non-inferiority trial versus celecoxib, *Annal. Rheumat. Dis.*, 2016, vol. 75, no. 1, pp. 37–44. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206792.
12. Gallagher, B., Tjoumakaris, F.P., Harwood, M.I., Good, R.P., Ciccotti, M.G., and Freedman, K.B., Chondroprotection and the prevention of osteoarthritis progression of the knee: a systematic review of treatment agents, *Amer. J. Sports Med.*, vol. 43, no. 3, pp. 734–44. doi: 10.1177/0363546514533777.
13. Volpi, N., Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2009, vol. 61, no. 10, pp. 1271–80. doi: 10.1211/jpp.61.10.0002.
14. Basu, A., Kunduru, K.R., Abteew, E., and Domb, A.J., Polysaccharide-based conjugates for biomedical applications, *Bioconjugate Chemistry*, 2015, vol. 26, no. 8, pp. 1396–412. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00242.
15. Henrotin, Y., Marty, M., and Mobasher, A., What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis? *Maturitas*, 2014, vol. 78, no. 3, 184–7. doi: 10.1016/j.maturitas.2014.04.015.
16. Largo, R., Roman-Blas, J.A., and Moreno-Rubio, J., Chondroitin sulfate improves synovitis in rabbits with chronic antigeninduced arthritis, *Osteoarthritis and Cartilage*, 2010, vol. 18, no. 1, pp. 17–23. doi: 10.1016/j.joca.2010.01.017i.
17. Liu, F., Zhang, N., Li, Z., Wang, X., Shi, H., Xue, C., Li, R.W., and Tang, Q., Chondroitin sulfate disaccharides modified the structure and function of the murine gut microbiome under healthy and stressed conditions, *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 67–83. doi: 10.1038/s41598-017-05860-6.
18. Janssen, A.W., Kersten, S., The role of the gut microbiota in metabolic health, *FASEB Journal*, 2015, vol. 29, no. 8, pp. 3111–23. doi: 10.1096/fj.14-269514.
19. Lei, M., Guo, C., Wang, D., Zhang, C., and Hua, L., The effect of probiotic *Lactobacillus casei* Shirota on knee osteoarthritis: a randomised double-blind, placebo-controlled clinical trial, *Benefic. Microbiol.*, 2017, vol. 8, no. 5, pp. 697–703. doi: 0.3920/BM-2016.0207.

20. Vitetta, L., Coulson, S., Linnane, A.W., and Butt, H., The gastrointestinal microbiome and musculoskeletal diseases: a beneficial role for probiotics and prebiotics, *Pathogens*, 2013, vol. 2, no. 4, pp. 606–26. doi: 10.3390/pathogens2040606.
21. Steves, C.J., Bird, S., Williams, F.M., and Spector, T.D., The microbiome and musculoskeletal conditions of aging: a review of evidence for impact and potential therapeutics, *J. Bone. Mineral Res.*, 2016, vol. 31, no. 2, pp. 261–9. doi: 10.1002/jbmr.2765.
22. Iankovsky, D., Shirobokov, V., and Dyment, G., *Microbiome*, Kyiv: BC-Book, 2017.
23. Jacobs, B.Y., Dunnigan, K., Pires-Fernandes, M., and Allen, K.D., Unique spatiotemporal and dynamic gait compensations in the rat monoiodoacetate injection and medial meniscus transection models of knee osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage*, 2017, vol. 25, no. 5, pp. 750–8. doi: 10.1016/j.joca.2016.12.012.
24. Lily, R., *Histopathological technique and practical histochemistry*, Moscow: Mir, 1969.
25. Chomczynski, P., Sacchi, N., The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thio-cyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on, *Nature protocols*, 2006, vol. 1, no. 2, pp. 581–5. doi: 10.1038/nprot.2006.83.
26. Livak, K.J., Schmittgen, T.D., Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method, *Methods*, 2001, vol. 25, pp. 402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
27. Kozhemyakina, E., Lassar, A.B., and Zelzer, E., A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation, *Development*, 2015, vol. 142, no. 5, pp. 817–31. doi: 10.1242/dev.105536.
28. Dranitsina, A.S., Dvorshchenko, K.O., Korotkiy, A.G., Grebinyk, D.M., and Ostapchenko, L.I., Expression of *Ptgs2* and *Tgfb1* genes in rat cartilage cells of the knee under conditions of osteoarthritis, *Cytol. Genet.*, 2018, vol. 52, no. 3, pp. 192–7. doi: 10.3103/S0095452718030039.
29. Kamata, H., Hirata, H., Redox regulation of cellular signalling, *Cell. Signall.*, 1999, vol. 11, pp. 1–14. doi: 10.1016/S0898-6568(98)00037-0.
30. Robinson, W.H., Lepus, C.M., Wang, Q., Raghu, H., Mao, R., Lindstrom, T.M., and Sokolove, J., Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis, *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2016, vol. 12, no. 10, pp. 580–92. doi: 10.1038/nrrheum.2016.136.
31. Chan, P.S., Caron, J.P., Rosa, G.J., and Orth, M.W., Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E(2) in articular cartilage explants, *Osteoarthritis and Cartilage*, 2005, vol. 13, no. 5, pp. 387–94. doi: 10.1016/j.joca.2005.01.003.
32. Stabler, T.V., Huang, Z., Montell, E., Vergys, J., and Kraus, V.B., Chondroitin sulphate inhibits NF- κ B activity induced by interaction of pathogenic and damage associated molecules. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2017, vol. 25, no. 1, pp.166–74. doi: 10.1016/j.joca.2016.08.012.
33. Shang, Q., Shi, J., Song, G., Zhang, M., Cai, C., Hao, J., Li, G., and Yu, G., Structural modulation of gut microbiota by chondroitin sulfate and its oligosaccharide, *Inter. J. Biol. Macromol.*, 2016, vol. 89, pp. 489–98. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.091.
34. Opoka-Winiarska, V., Jurecka, A., Emeryk, A., and Tylki-Szymanska, A., Osteoimmunology in mucopolysaccharidoses type I, II, VI and VII. Immunological regulation of the osteoarticular system in the course of metabolic inflammation, *Osteoarthritis and Cartilage*, 2013, vol. 21, pp. 1813–23. doi: 10.1016/j.joca.2013.08.001.
35. Amdekar, S., Singh, V., Kumar, A., Sharma, P., and Singh, R., *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* regulate inflammatory pathway and improve antioxidant status in collagen-induced arthritic rats, *J. Interfer. Cytok. Res.*, 2013, vol. 33, no. 1, pp. 1–8. doi: 10.1089/jir.2012.0034.
36. Dranitsina, A.S., Savko, U.V., Dvorshchenko, K.O., and Ostapchenko, L.I., Expression of *Gast*, *Cckbr*, *Reg1a* genes in rat duodenal epithelial cells upon long-term gastric hypoacidity and with administration of multiprobiotic, *Biopol. Cell*, 2014, vol. 30, no. 5, pp. 365–71. doi: http://dx.doi.org/10.7124/bc.0008B3.

Надійшла в редакцію 30.11.18
Після доопрацювання 31.01.19
Прийнята до друку 18.11.19