

Статья

Экстракт Kaempferia parviflora облегчает артрит у крыс Хондропротекторные свойства *in vitro* и снижение экспрессии генов, связанных с воспалительным артритом

Сириван Оngchай 1,2, Наттхакарн Чирангант 3, Пативат Конгданг 6,* 

Сириван Тангьюэнонг

4 , Наварат Вириякхасем5 

Таиланд

- 1 Таиландский передовой центр тканевой инженерии и стволовых клеток, кафедра биоиммунологии, медицинский факультет, Чiangmai University, Chiangmai 50200, Таиланд; siriwan.ongchai@cmu.ac.th Центр исследований и разработок натуральных продуктов для здоровья, Chiangmai University, Chiangmai 50200, Таиланд;
- 2 Кафедра фармакологии, медицинский факультет, Chiangmai University, Chiangmai 50200, Таиланд; natthakarn.c@cmu.ac.th
- 3 Клиника лошадей, Отделение клиники домашних животных и диких животных, Факультет ветеринарной медицины Chiangmai University, Chiangmai 50100, Таиланд; siriwan.tangy@cmu.ac.th
- 4 Школа традиционной и альтернативной медицины Университета Чанграй Раджабхат, Chiangrai 57100, Таиланд; nawaratw@gmail.com
- 5 Центр изучения опорно-двигательного аппарата и травматологии исследований, кафедра ортопедии, медицинский факультет, Chiangmai University, Chiangmai 50200, Таиланд

* Переписка: patiwat.kongdang@gmail.com

образец цитирования : Onghai, S.;

Чирангант, N.; Tangyuenong, C.;

Вириякхасем, H.; Kongdang, Extract of R.

Kaempferia parviflora облегчал артрит у крыс, проявляясь в виде хондропротекторных свойств *in vitro* и снижал экспрессию генов, связанных с воспалительными процессами.Артрит. Молекулы2021, 26, 1527.
<https://doi.org/10.3390/>

молекулы26061527

Академические редакторы Яюэ Си Минята, Вон Супли, Дэх ай Ли, Наттида Вирарапрея кули и Киттисак Лихитвитая вуйд

Получено: 22 февраля 2021 г.

Принято: 8 марта 2021 г.

Опубликовано: 11 марта 2021 г.

Примечание издателя: MDPI остается нейтральным в отношении юрисдикционных претензий в опубликованных картах и институциональной принадлежности.

Ключевые слова: антиартрит; противовоспалительное; хондропротекция; воспалительное заболевание суставов; Кемпферия мелкоцветковая

1. Введение

Артрит определяется как воспаление суставов, которое обычно сопровождается повреждением хрящей и суставов [1]. Двумя наиболее распространеными формами артрита являются остеоартрит (OA) и ревматоидный артрит (RA) [1]. У них есть некоторые общие черты, включая боль в суставах, воспаление и разрушение хрящей [2]. Однако эти формы артрита можно дифференцировать по клинической картине и молекуларному механизму патогенеза. Ключевым фактором патогенеза OA является хроническое воспаление в суставах, которое способствует постепенному прогрессированию деструкции хрящей [3]. RA включает системные autoimmunные нарушения, направленные на вспышки синovиальной ткани суставной капсулы, что приводит к хроническому воспалению суставов.

 Copyright: © 2021 авторы

Лицензиат MDPI, Базель, Швейцария.

Эта статья находится в открытом доступе. Распространяется на условиях Creative Commons

Лицензия с указанием авторства (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

степень системного воспаления и прогрессирующее повреждение хряща и костей, что приводит к постоянной инвалидности суставов [1].

Несколько провоспалительных цитокинов играют ключевую роль в патогенезе ОА и РА и включают интерлейкин(ИЛ)-1 β , фактор некроза опухоли (ФНО- α , ИЛ-6 и ИЛ-17А [4,5]. Установлено усиление продукции этих цитокинов при этих формах артрита [4,5], что вызывает воспаление суставов и способствует активации экспрессии ферментов, разлагающих ткани, особенно матриксной металлопротеиназы(ММП)-13. Эти ферменты находятся в ионах цинка в качестве кофактора. ZIP8, белок-транспортер цинка, который, как сообщается, увеличивается при артрите, способствует накоплению в нутриклеточном лабильном цинке [6]. Кроме того, высокие уровни провоспалительных цитокинов при ОА вызывают активацию апоптического процесса хондроцитов [7] и продукцию синовиоцитов, ключевые клетки в патогенезе РА, для повышения устойчивости к гибели клеток [8]. Активация этих провоспалительных цитокинов и последующих факторов включает избирательную активацию в нутриклеточных сигнальных путей, включая ядерный фактор транскрипции каппа В (NF- κ B) и митогенактивируемую протеинкиназу (MAPK) [4,5]. Избирательное подавление воздействия на сигнальные пути является одной из целей терапевтического подхода к артриту.

Фармакологическое лечение ОА и РА обычно включает противовоспалительные препараты для уменьшения симптомов боли и воспаления, особенно стероидные и нестероидные противовоспалительные препараты [2,9]. Натуральные продукты полученные из растений, считались альтернативными средствами лечения артрита с древних времен до наших дней. Кемпферия мелкоцветковая Стена.ех Baker (КР), трава, принадлежащая к семейству Zingiberaceae, как сообщается, оказывает противоартирное действие. В крысиной модели ОА, индуцированного моноядоуксусной кислотой, экстракт корня КР уменьшил повреждения хряща, а егоактивные компоненты 5,7,40-триметоксифлавон(T) и 5,7-диметоксифлавон(D), подавляли экспрессию хрящевой ткани, деградирующих ферментов и ММП [10]. Сообщалось, что другое активное соединение КП, 5,7,30,40-тетраметоксифлавон(Те), улучшает уровни провоспалительных цитокинов в синовиальной жидкости коленного сустава у крыс, индуцированных ОА, путем рассечения передней крестообразной связки [11]. Было обнаружено, что этот активный компонент снижает скорость апоптоза хондроцитов [11,12]. Недавно мы сообщили, что экстракт КР и егоактивные компоненты D, T и 3,5,7,30,40-пентаметоксифлавон(P), подавляют межанизмы связанные с РА, в модели культуры клеток SW982 путем селективного подавления p38/Пути STAT1 и STAT3 [13].

Настоящее исследование было направлено на получение дополнительных доказательств антиартиритного потенциала КП с использованием многоуровневых моделей, включая модель артрита у крыс, индуцированную полным адьютивом Фрейнда (СFA), и модель культуры экспланата хряща, чтобы продемонстрировать хондропротекторный потенциал, а также исследовать молекулярные механизмы анизии сигнальные пути в нутриклетках, связанных с артритом, особенно экспрессию генов провоспалительных цитокинов и генов, связанных с гибелью клеток.

2. Результаты

2.1. Ослабляющий эффект экстракта КП на артрит крыс, выявленный СFA

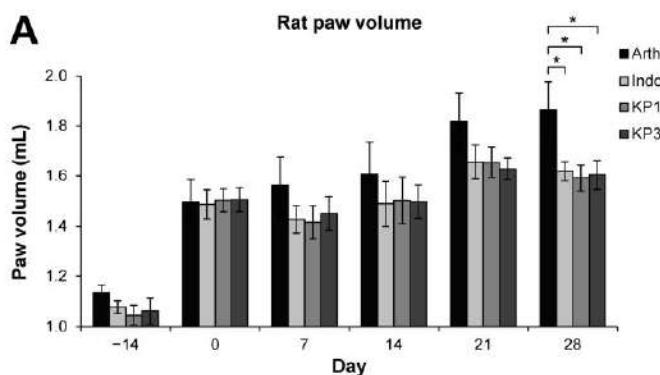
Модель СFA-индуцированного артрита у крыс была принята для оценки противовоспалительного действия экстракта КР у живых крыс. Группой положительного контроля были живые, которым первоначально вводили индометацин. На фигуре 1A показано увеличение объема крысиной лапы в всех группах в первый день лечения (день 0), что указывает на начало РА. Тенденция к уменьшению отека лапы крыс в трех группах крыс с артритом, получавших индометацин (3 мг/кг/день) и экстракт КП (150 и 300 мг/кг/день), наблюдалась на протяжении всего периода исследования и показала значительные различия в объеме лап по сравнению с контрольной группой артрита за последнюю неделю. Ингибирующая активность группы получавшей индометацин, существенно отличалась от такой у крыс с артритом, которых получали экстракт КР (150 и 300 мг/кг/день), наблюдалось значительное снижение показателя жести артрита на 25,0%, 43,8% и 31,3% соответственно (рис. 1B).

Гистопатологический анализ синовиальных оболочек в группе артрита ясно продемонстрировал характеристики артрита по сравнению с таковыми в нормальной группе (рис. 1C).

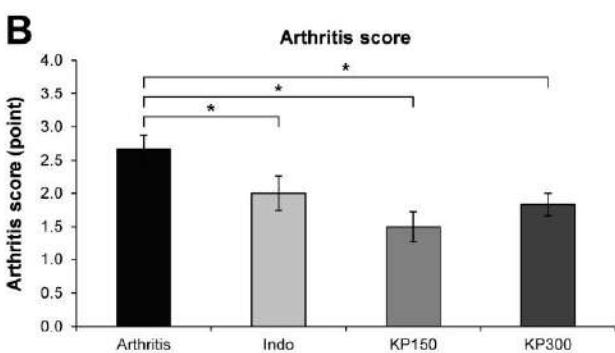
Утолщение клеток наблюдалось вдоль синовиальной влагалищной оболочки. Отмечалось увеличение количества и размеров кровеносных сосудов на фоне высокой инфильтрации воспалительных клеток, которые повсеместно встречались в синовиальных оболочках при артритах. Количество и размер 3 из 19 кровеносных сосудов и воспалительных клеток были уменьшены крыс с артритом, получавших индометацину экстракты KP.

Молекулы 2021, 26, 1527

A



B



C

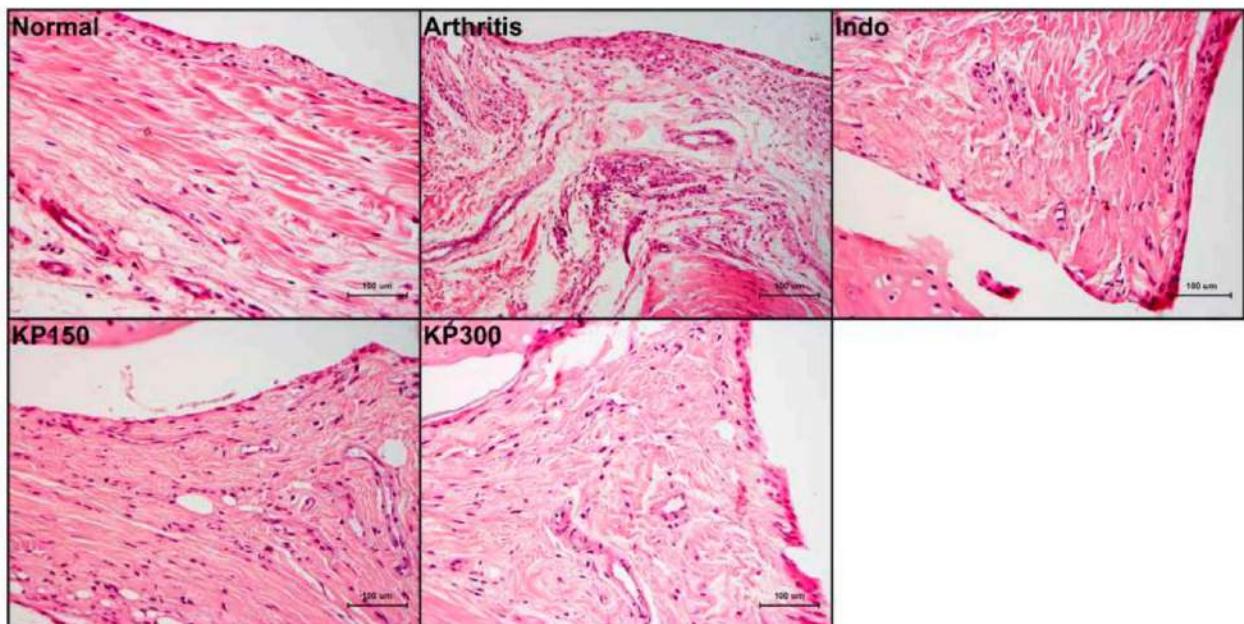


Рисунок 1. Экстракт KP ослабляет CFA-индуцированный артрит у крыс. (A) График показывает увеличение объема правой лапы во всех группах день 0, что указывает на начало экспериментального РА, индуцированного инъекцией СФА. Затем индуцированных крыс кормили группами в день 0, что указывает на начало экспериментального РА, индуцированного инъекцией СФА. Затем индуцированных крыс кормили с 3 мг/кг/день индометацин (Indo), 150 мг/кг/день экстракта KP (KP150) или 300 мг/кг/день экстракта KP (KP300) с 3 мг/кг/день индометацина (Indo), 150 мг/кг/день экстракта KP (KP150) или 300 мг/кг/день экстракта KP (KP300) еще на 28-й день. Результаты показывают, что Indo, KP150 и KP300 относятся к меньшим объемам лап крысы 7-го дня и в течение следующих 28 дней. Результаты показывают, что Indo, KP150 и KP300 относятся к меньшим объемам лап крысы 7-го дня и в течение следующих 28 дней. (B) значительное снижение тяжесть артрита значительно на 28-й день по сравнению с контролем и группой Indo (KP150 и KP300). Результаты показывают, что баллы, которые оценивались на 28-й день, наблюдали у пораженных крыс индометацином, KP150 и KP300, тогда как баллы, которые оценивались на 28-й день, наблюдали у пораженных крыс индометацином, KP150 и KP300. Результаты представляют собой среднее значение ± стандартная ошибка среднего для 3 крыс (нормальный результат) и фактор (обработка крысы). Однофакторный ANOVA с последующим критерием Фишера использовал для анализа статистическая разница (* $p < 0.05$). Однофакторный дисперсионный анализ с последующим критерием Фишера был использован для анализа статистическая разница (* $p < 0.05$).

Синовиальные оболочки сустава задней лапы на срезах, окрашенных H&E, использовали для оценки гиперплазии синовиальной оболочки и обнаружения воспалительных клеток (таблица 1).

в группе, получившей демексир, и в контроле средней группы, преодолевшие нормальной группе (рис. 1C). Утолщение влагалищной оболочки. В группе контролю было меньше воспалительных клеток и увеличенный размер кровеносных сосудов в сочетании с высокой инфильтрацией воспалительными клетками, которые были повсеместно обнаружены в синовиальных оболочках группы артрита. Количество и размер кровеносных сосудов и воспалительных клеток были уменьшены крыс с артритом, получавших лечение с экстрактами индометацина и KP.

Использовались синовиальные оболочки суставов задних лап на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, оценить уровень синовиального воспаления с помощью системы Гюнгера (таблица 1). Тота группа, не получавшая лечения, имела самые низкие средние показатели слоев синовиальной оболочки, воспалительной инфильтрации и наличие воспалительных клеток. В группе артрита уровень синовиальной гиперплазии, наблюдалась пролиферация кровеносных сосудов и инфильтрация воспалительными клетками. Эти

уровни были снижены в группах, получавших индометацин и экстракты КП, за исключением оценки слоев синовиальной оболочки, которая все еще была высокой в группе индометацина.

Таблица 1. Гистологическая оценка синовиального воспаления в суставе задней лапы экспериментального крыса по системе Гюнгера [14].

Группа	Синовиальная подкладка Слои (точка)	Сосудистость (точка)	Воспалительные клетки (точка)
Обычный	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,3	0,7 ± 0,7
Артрит	1,5 ± 0,3 *	1,8 ± 0,5 *	6,8 ± 2,0 *
Индо	1,3 ± 0,3 *	0,6 ± 0,2 #	2,6 ± 0,7 #
КП150	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,2 #	1,6 ± 0,7 #
КП300	0,4 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,6 ± 0,4 #

Индуцированье крысы после кормления 3 мг/кг/сутки индометацина (Indo), 150 мг/кг/сутки экстракта КП (КР 150) или 300 мг/кг/день экстракта КП (КР 300) в течение 28 дней наблюдали при гистопатологической оценке синовита. в слепых образцах. Результаты представляют собой среднее значение ± стандартная ошибка среднегодля 3 крыс (нормальная группа) или 6 крыс (обработанная группа). В одну сторону ANOVA с последующим постэпирорным тестом множественных сравнений Тьюки использовали для анализа статистической разницы (* p < 0,05 по сравнению с нормальной группой и # p < 0,05 по сравнению с группой артрита).

Оценивали влияние лечения на биологические параметры такие как масса органов, гематологические особенности и биохимический состав крови, при лечении крыс с артритом, параллельно с индометацином (табл. 2). В отличие от обычного контроля, у крыс с артритом, получавших индометацин, наблюдалось значительное увеличение массы селезенки 42,9% и некоторые изменения гематологических показателей, в том числе снижение красной крови и клеток, гемоглобина и гематокрита на 24,8%, 22,0% и 18,3% соответственно, но без изменений в других биохимических маркерах крови не наблюдалось. Количество тромбоцитов в этой группе было увеличено на 53,8% по сравнению с нормальным контролем, хотя это число все еще находилось в пределах нормального диапазона. У крыс с артритом, получавших экстракт КП, существенные изменения биологических показателей, как указано выше, не наблюдалось, за исключением снижения почечной недостаточности в 14,6% у крыс с артритом, получавших КП в дозе 150 мг/кг/день.

Таблица 2. Биологические параметры подопытных крыс.

	Обычный	Артрит	Индо	КП150	КП300
Вес органов					
Печень (г)	5,20 ± 0,19	4,94 ± 0,41	5,18 ± 0,28	4,38 ± 0,10	5,11 ± 0,17
Селезенка (г)	0,42 ± 0,01	0,41 ± 0,02	0,60 ± 0,07 *	0,37 ± 0,01	0,42 ± 0,01
Почки (г)	1,37 ± 0,00	1,33 ± 0,04	1,24 ± 0,03	1,17 ± 0,02 *	1,35 ± 0,06
Тимус (г)	0,22 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,23 ± 0,02
Гематологические параметры					
Лейкоциты (103/мкл)	2,49 ± 0,42	2,46 ± 0,30	4,09 ± 0,49	2,55 ± 0,42	3,00 ± 0,39
Эритроцит (106/мкл)	7,03 ± 0,12	7,09 ± 0,14	5,29 ± 0,34 *	7,40 ± 0,14	7,32 ± 0,12
Гемоглобин (г/дл)	13,2 ± 0,2	13,5 ± 0,2	10,3 ± 0,6 *	13,9 ± 0,2	13,7 ± 0,2
Гематокрит (%)	40,5 ± 0,7	40,9 ± 0,6	33,1 ± 1,7 *	41,8 ± 0,5	41,6 ± 0,7
Тромбоциты (103/мкл)	679 ± 61	695 ± 18	1044 ± 147	677 ± 20	571 ± 38
Анализы на биохимии крови					
Глюкоза (мг/дл)	130 ± 8	110 ± 9	84 ± 11	116 ± 7	122 ± 12
Аспартатаминотрансфераза (ЕД/л)	110 ± 2	122 ± 15	122 ± 12	120 ± 11	106 ± 22
Аланинаминотрансфераза (ЕД/л)	44 ± 5	48 ± 2	33 ± 3	37 ± 1	46 ± 3
Цитохром C-тест (ЕД/л)	106 ± 5	113 ± 5	139 ± 34	114 ± 5	131 ± 10
Азот мочевины (мг/дл)	16,1 ± 1,2	19,6 ± 2,0	18,9 ± 1,0	16,3 ± 0,8	17,8 ± 1,0
Креатинин (мг/дл)	0,56 ± 0,03	0,58 ± 0,02	0,54 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,54 ± 0,01

Индуцированье крысы после кормления 3 мг/кг/сутки индометацина (Indo), 150 мг/кг/сутки экстракта КП (КР 150) или 300 мг/кг/сутки КП экстракта (КР 300) в течение 28 дней измеряли массу органов, гематологические параметры и параметры биохимии крови сразу после эвтаназии. Результаты представляют собой среднее значение ± стандартная ошибка среднегодля 3 крыс (нормальная группа) или 6 крыс (обработанная группа). Односторонний ANOVA, за которым следует пост-тест Критерий множественного сравнения Тьюки использовали для анализа статистической разницы (* p < 0,05 по сравнению с нормальной группой).

2.2. Хондропротекторное действие экстракта КП на деградацию эксплангата хряща 2.2.

Хондропротекторное действие экстракта КП на деградацию эксплангата хряща

Модель долговременного культивирования деградации свиных хрящевого эксплангата, индуцированной комбинацией цитокинов IL-1 β и IL-17A, использовали для исследования

хондропротекторный потенциал экстракта КП. Значительное увеличение накопления хондропротекторного потенциала экстракта КП. Значительное увеличение накопления повторно въск обожженых S-GAG наблюдалось в группе, получавшей комбинированное лечение цитокинами, по сравнению с таковой в группе, получавшей комбинированное лечение цитокинами в необработанном контроле (рис. 2A). Это увеличение въск обожженых S-GAG было значительно выше, чем в обработанном контроле (рис. 2A). Это увеличение въск обожженных S-GAG было значимо снижено при совместной обработке экстрактом КПили диацерином, что было аналогично результату для ди при совместной обработке экстрактом КП, который был аналогичен результату в группе, обработанной диацерином. Группа, получавшая ацерин препарат против артрита, который использовался в качестве положительного контроля. Гистологическое исследование логическое исследование хрящевого диска в группе, получавшей комбинированное лечение цитокинами, показало, что хрящевой диск в группе, получавшей комбинированное лечение цитокинами, был в снижение количества клеток, снижение количества клеток и интенсивности сафранина. Она 17,2% и 26,0% соответственно от носительного уровня от носительного уровня в необработанном контроле (рис. 2C, D). Эти уровни были значительно выше, когда улучшается при совместной обработке экстрактом КПили диацерином. На фигурах 2B показана незначительная совместная обработка экстрактом КПили диацерином. На рисунке 2B показывает незначительные различия в не может быть различий в накоплении лактатдегидрогеназы в культуральной среде среди всех групп лечения и лечебные группы контроль. контроль.

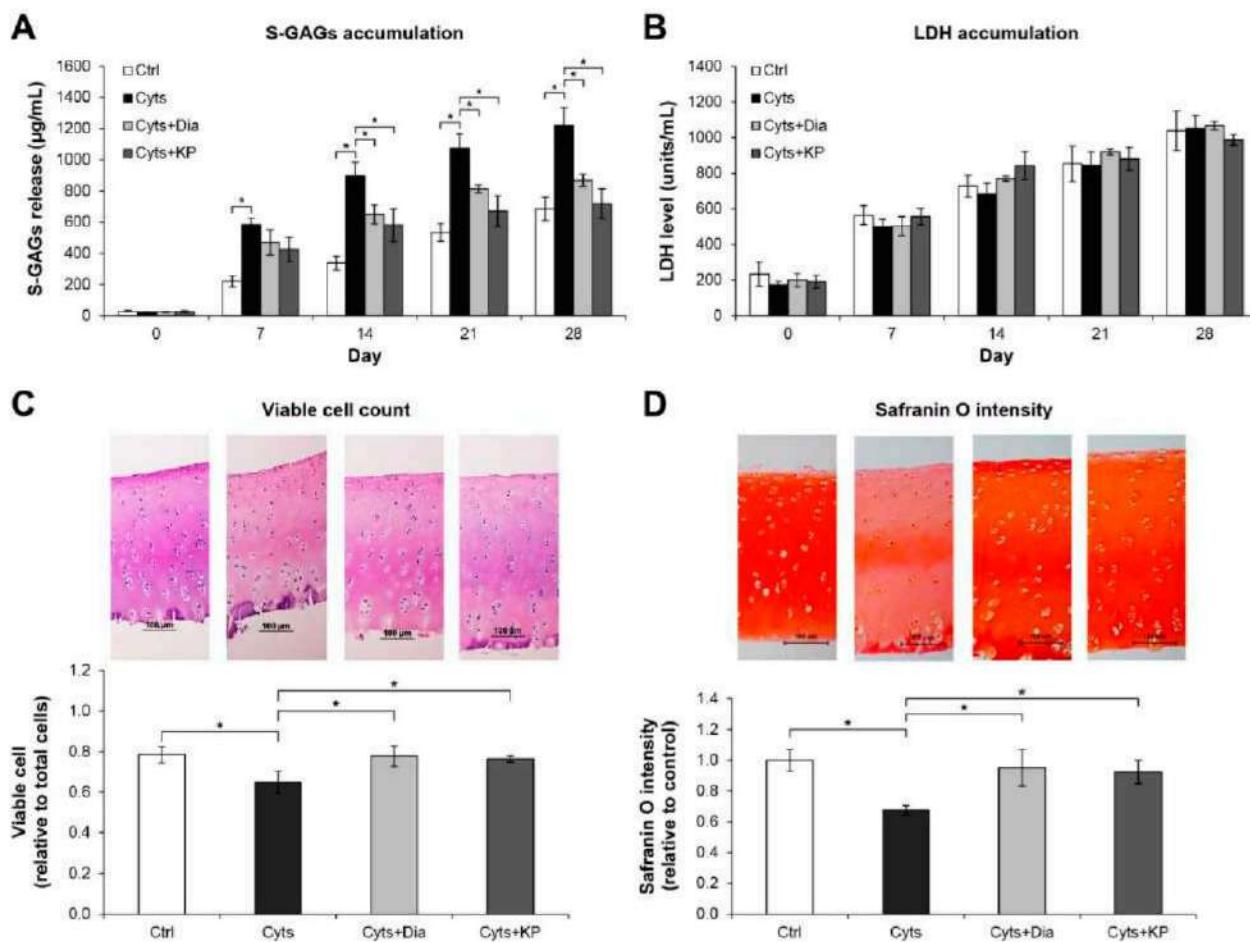


Рисунок 2. Экстракт КП защищает эксплангат хряща от деградации. Разрушение эксплангата свиных хрящей стимулировали с помощью экстракта комбинации 2 нг/мл IL-1 β и 4 нг/мл IL-17A (Cysts) с экстрактом КПили без него (25 мкг/мл) или 50 мкг/мл диацерина (диа) в течение 28 дней. Контрольные (Ctrl) эксплангаты обрабатывали. Значительное увеличение накопления въск обожженных S-GAG. Количество ГАГ, индуцированное комбинированными цитокинами, было значительно снижено при совместном лечении экстрактом КПили диацерином (A). Незначительные различия в накоплении лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в культуральной среде между всеми группами лечения. Незначительные различия в накоплении лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в культуральной среде среди всех групп лечения.

и контроль указывают на нецитотоксическое действие реагентов и экстракта КП на клетки хряща (Б). Гистопатологический исследование хрящевого диска (день 28) иллюстрирует восстановление числа жизнеспособных клеток (С) и интенсивности сафранина О (Д) в совместной обработке комбинированных цитокинов экстрактом КПили диацерином. Результаты представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Для анализа статистической разницы (* $p < 0,05$).

группы контролльные указывают на нецитотоксическое действие реагентов и экстракта КП на клетки хряща (Б). Гистопатологическое исследование хряща огодиска (день 28) иллюстрирует восстановление числа жизнеспособных клеток (С) и интенсивности сафранина О(Д) при совместном лечении комбинированными цитокинами с экстрактом КП или диацерином. Результаты представляют собой среднее ± стандартное отклонение трех экспериментов. Для анализа статистической разницы использовали односторонний ANOVA с последующим постхордовым критерием множественных сравнений Тьюки (* p < 0,05).

2.3. Подавление действия экстракта КП и его основных компонентов на ген, связанный с артритом

Экспрессия и сигнальные пути в клетках SW1353

Экспрессия и сигнальные пути в клетках SW1353

Клеточная линия хондроцитов SW1353, стимулированная комбинированными цитокинами, IL-1β

и IL-17A, был выбран для оценки эффектов экстракта КП и его основных компонентов на IL-17A. Клеточная линия хондроцитов SW1353, стимулированная комбинированными цитокинами, IL-1β и IL-17A, был выбран для оценки эффектов экстракта КП и его основных компонентов на IL-17A. Клеточный уровень. Фигура 3 иллюстрирует сильное увеличение экспрессии мРНК альфа-ассоциированных генов оспалительных цитокинов, IL1B, IL6 и TNF, когда клетки представляли собой генетически модифицированные гены с артропатией, IL1B, IL6 и TNF, когда клетки лечение комбинированными цитокинами. Фермент разлагающий хрящ MMP13, и обрабатывали комбинированными цитокинами. Фермент разлагался, разрушаящий хрящ MMP13 и ген переносчика цинка, ZIP8, также сильно активировался. Они значительно превосходили ген переносчика цинка, ZIP8, и также были сильно активированы. Этобы значительно прессован экстрактом КП в концентрации 10 нг/мл. Стандартные соединения, D, T и подавленные экстрактом КП в концентрации 10 нг/мл. Стандартные соединения, D, T и подавленные экстрактом КП, который, как было установлено, является основным компонентом экстракта КП (рисунок S1), был в концентрации 3,3, 2,6 и 2,2 мкг/мл соответственно. Они были равны приготовленным при расчетные пропорции в экстракте КП при 10 мкг/мл. Среди этих компонентов D показал сильнейшие ингибирующие эффекты на экспрессию этих генов. Обработка клеток показала, что сочетание этих компонентов сильно подавляет экспрессию генов. Сочетание компонентов свидетельствует о том, что действие экстракта КП в концентрации 10 мкг/мл диацерин показалось слабее, чем действие на экспрессию IL6 и TNF, чем стандартные компоненты, что и экстракт КП в концентрации 10 мкг/мл.

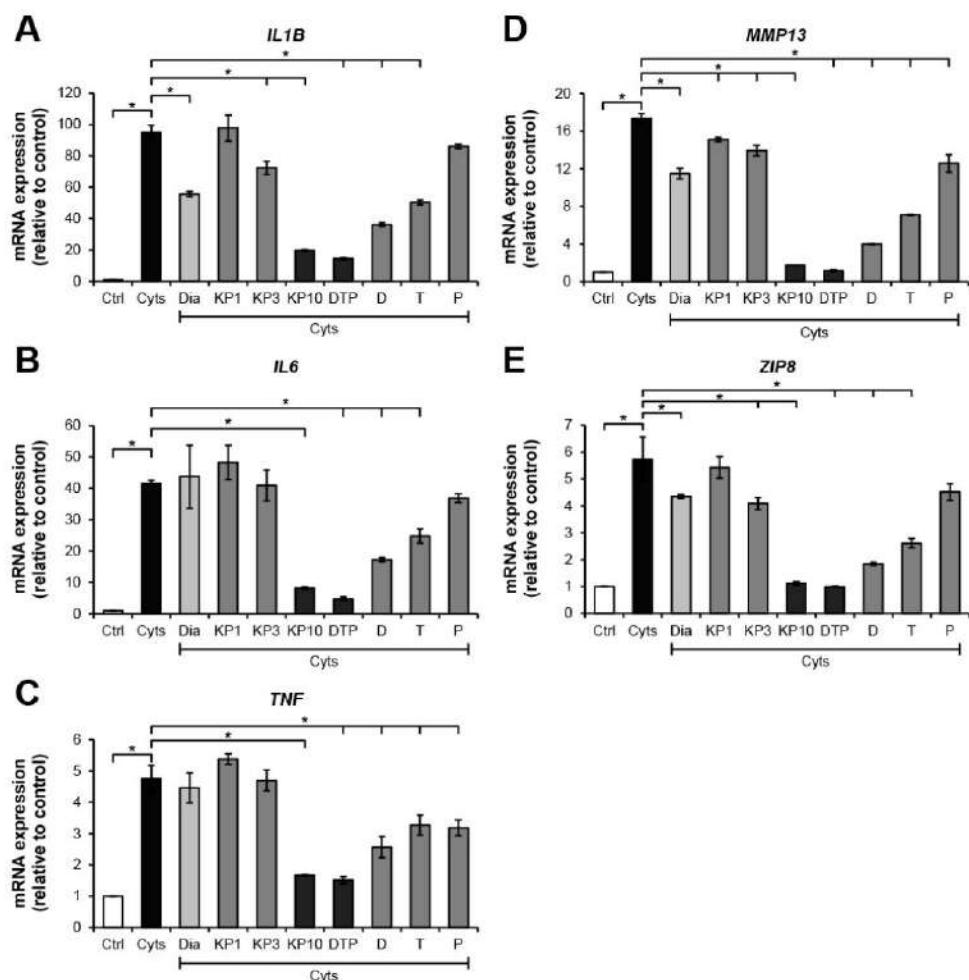


Рисунок 3. Экстракт КП и его основные компоненты подавляют экспрессию генов, связанных с артритом, в клетках SW1353. SW1353 был активирован комбинацией 2 нг/мл IL-1β и 4 нг/мл IL-17A (Cysts) в течение 24 часов с диацерином или без него (Dia; 50 мкМ), экстракт КП (1, 3 и 10 мкг/мл), 5,7-диметоксифлавон (D; 3,3 мкг/мл), 5,7,40-триметоксифлавон (T; 2,6 мкг/мл), 3,5,7,30,40-пентаметоксифлавон (P; 2,2 мкг/мл) или смесь трех основных соединений (DTP), что равно расчетные пропорции в экстракте КП при 10 мкг/мл (D: T: P = 3,3: 2,6: 2,2 мкг/мл). Ctrl — это необработанный элемент управления. То резкое увеличение экспрессии мРНК генов в оспалительных цитокинов, связанных с артропатией, IL1B (А), IL6 (В) и

TNF (C), фермент, разрушающий хрящ ген MMP13 (D) и ген переносчика цинка 8 (ZIP8) (E), был обнаружен при обработке клеток комбинированными цитокинами. Эти повышенные проявления были значительно подавлены экстрактом КП в концентрации 10 мкг/мл, чтобы оно же на эффект смеси трех основных соединений, равных их количествам в 10 мкг/мл экстракта КП. Результаты представляют собой среднее ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Для анализа статистической разницы использовали односторонний ANOVA с последующим апостериорным тестом множественных сравнений Тьюки (* p <0,05).

Далее мы исследовали молекуляrende действие экстракта КП и его основных компонентов на передачу сигналов путей NF-кБ и MAPK, которые участвуют в патогенезе артрита. Эти пути активировались при обработке клеток SW1353 IL-1 β и IL-17A и подавлялись их специфическими ингибиторами. Часто касается пути NF-кБ (рис. 4А), по сравнению с эффектом, наблюдаемым в группах, получавших цитокины fosфорилирование IKK и p65 было значительно подавлено экстрактом КП на 20,3% и 61,2% соответственно. Соответственно, fosфорилирование сигнальных молекул JNK, ERK и p38 MAPK было значительно снижено на 29,8%, 40,6% и 39,0% соответственно с помощью экстракта КП (рис. 4В). Смесь его основных компонентов незначительно снижала fosфорилирование JNK на 15,7%; однако это не влияло на fosфорилирование путей NF-кБ и MAPK.

2.4. Защитные эффекты экстракта КП от путей гибели клеток

На рис. 5 показано влияние экстракта КП на экспрессию генов, связанных с гибелю клеток. Группа, получавшая TNF- α , показала слегка повышенную экспрессию BCL2 (рис. 5А), ген, препятствующий апоптозу, вместе с BAX (рис. 5В), проапоптозного гена, что не привело к изменению соотношения BCL2:BAX. экспрессии генов (рис. 5С). При совместном лечении экстрактом КП наблюдалась тенденция к увеличению соотношения экспрессий генов BCL2:BAX, которое достигало значительных уровней по сравнению с небообработанным контролем при обработке экстрактом КП в концентрации 10 мкг/мл. Часто касается экспрессии генов, связанных с путем некроптоза, TNF- α вызывал значительное повышение экспрессии генов рецептор-взаимодействия протеинкиназы1 (RIPK1) и RIPK3, которые значительно подавлялись экстрактом КП в концентрации 10 мкг/мл (рис. 5Д, Е). Значительное увеличение количества апоптотических клеток, оцененное с помощью проточной цитометрии, было обнаружено, когда клетки обрабатывали TNF- α в концентрации 50 нг/мл или ДМСО группы положительного контроля (рис. 6). Совместная обработка этим цитокином с экстрактом КП приводила к тенденции к снижению количества апоптотических клеток, даже несмотря на отсутствие существенной разницы по срав-

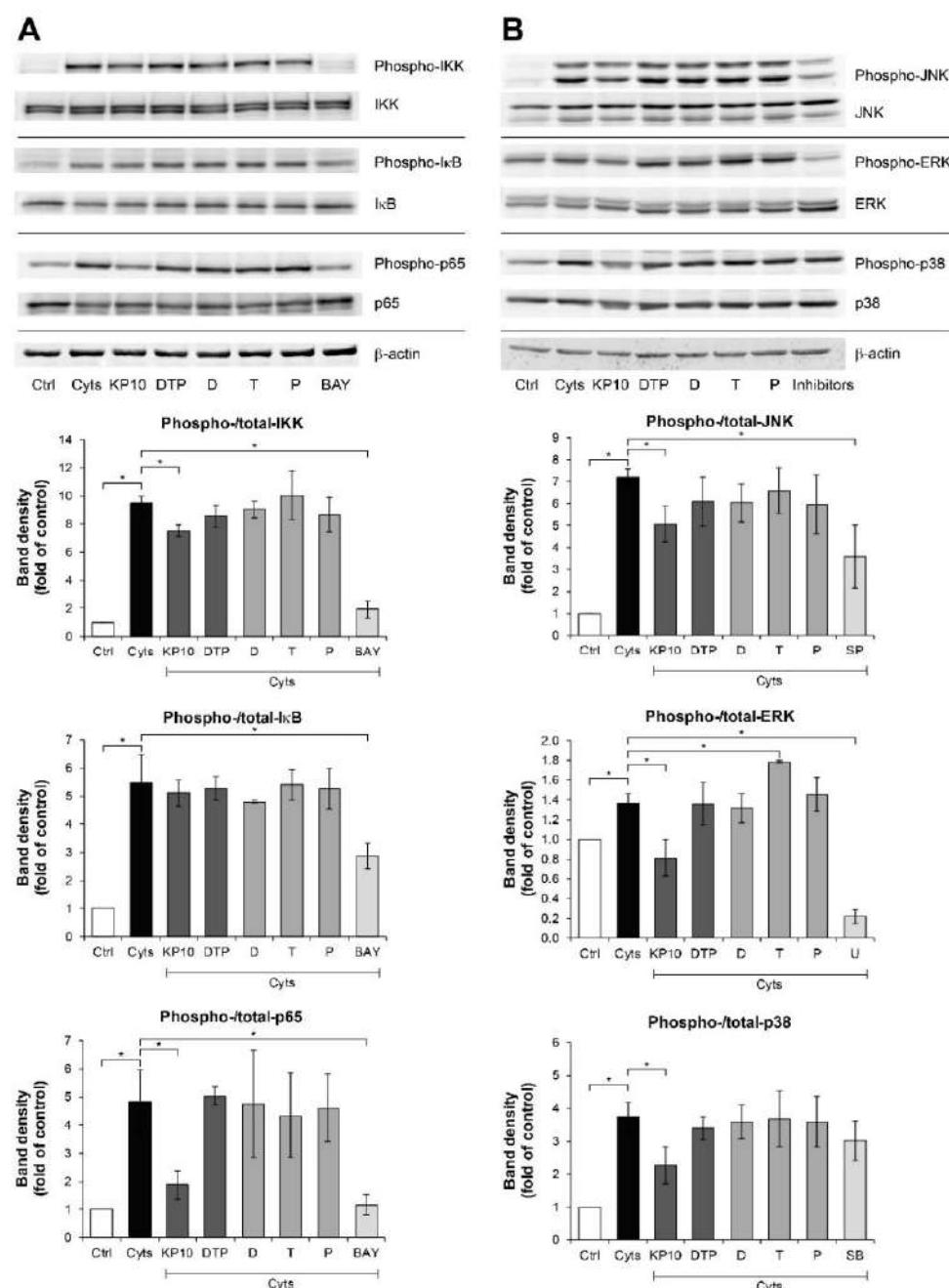
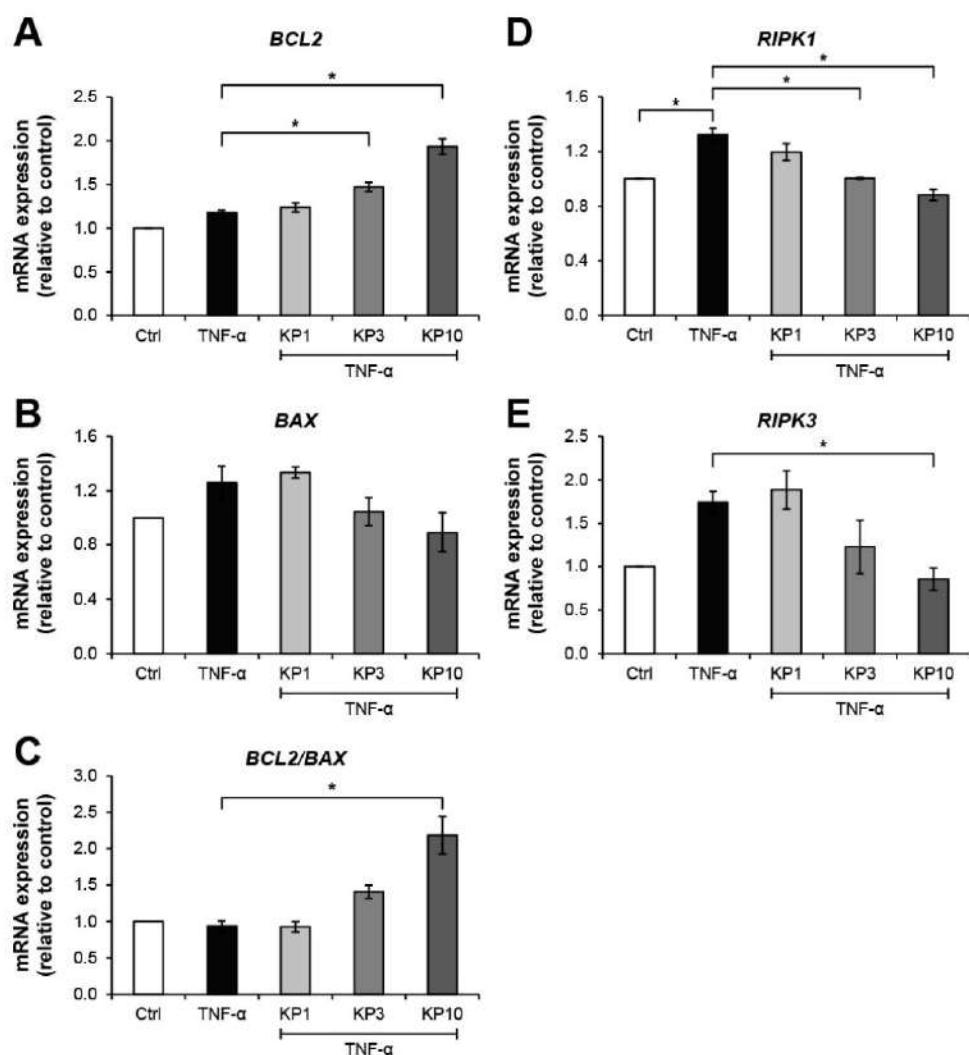


Рисунок 4. Экстракт KP подавляет пути NF-κB и MAPK в клетках SW1353. Клетки SW1353, предварительно обработанные в течение 2 ч экстрактом КП (10 мкг/мл), 5,7-диметоксифлавоном (D; 3,3 мкг/мл), 5,7,4'-триметоксифлавоном (T; 2,6 мкг/мл), 3,5,7,3',4'-пентаметоксифлавоном (P; 2,2 мкг/мл) и смесь пентаметоксифлавона (R; 2,2 мкг/мл) и ингибиторы передачи сигналов, включая BAY11-7082 (BAY; 20 мкМ), SP600125 (SP; 10 мкМ), U0126 (U; 5 мМ) и SB203580 (SB; 1 мкМ), затем клетки сначала обрабатываются IL-1β (Cysts) в течение 25 мин, а затем в течение 2 ч определяется экспрессия белка в клетках. Время обработки группы была 20 мин. Статистическая обработка групп показана в виде полос для каждого образца на Western blotting. Полосы нормализованы к β-актину. Полные дополнительные изображения тенденции представлены дополнительных данных (рис. S6 и S7).

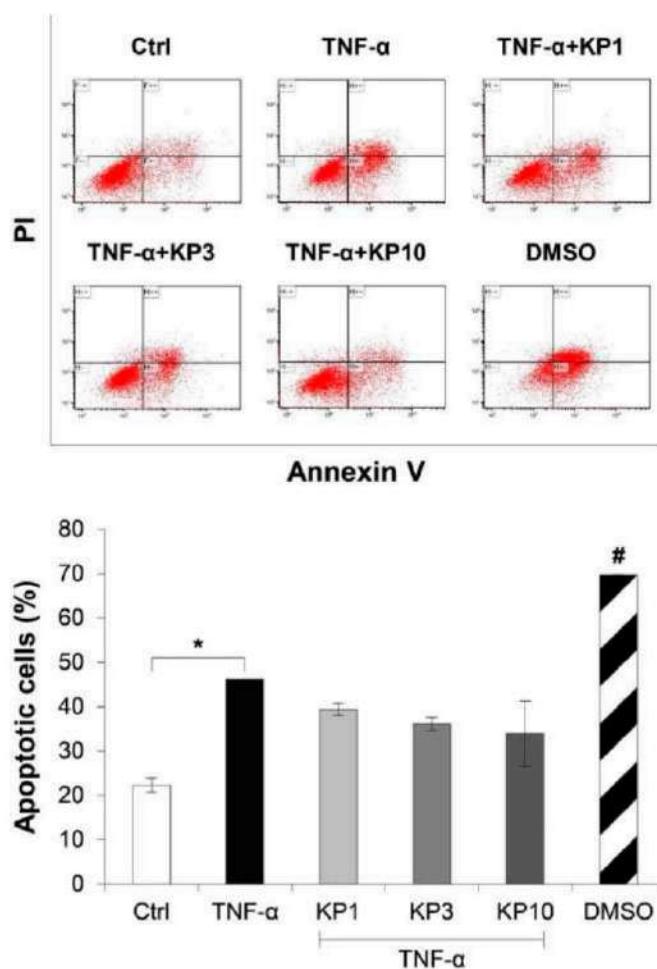
2021, 26, 1527 тот же экстракт КП в концентрации 10 мкг/мл. Результаты показывают, что обработка альфа-TNF- α в концентрации 50 нг/мл или ДМСО группы положительного контроля (фиг. 6).

Совместная обработка этим цитокином с экстрактом КП приводила к тенденции к снижению количества апоптотических клеток, даже несмотря на отсутствие существенной разницы по сравнению с эффектом в группе, получавшей альфа-TNF- α .



стимулирует антиапоптозный эффект КП, подавляя экспрессию генов, связанных с некротозом, но в течение 2 ч, генапотоза. Клетки SW1353 предварительно обрабатывали 10 нг/мл альфа-TNF- α в концентрации 10 мкг/мл 24 часа обработки экстрактом КП (1, 3 и 10 мкг/мл) в течение 24 часов. Необработанная группа была оставлена в качестве контроля (Ctrl). В группах, получавших совместно экстракт КП, в группах, получавших совместное лечение, наблюдалась растущая тенденция к процессу антиапотозного процесса наблюдалась по усилению экспрессии гена BCL2 (A) и подавление экспрессии гена BAX (B), что способствовало увеличению соотношения экспрессий генов BCL2:BAX (C) и подавление экспрессии гена BAX (B), что способствовало увеличению коэффициента (C). Повышение экспрессии генов, связанных с некротозом, RIPK1 (D) и RIPK3 (E), индуцированное альфа-TNF- α , было значительно подавлено экстрактом КП в концентрации 10 мкг/мл. Результаты представляют собой среднее ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов. В одну сторону ANOVA с последующим апстериорным тестом множественного сравнения Тьюки использовали для анализа статистической разницы (* p < 0,05).

Результаты представляются собой среднее \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Для анализа статистической разницы использовали односторонний ANOVA с последующим апостериорным тестом множественных сравнений Тьюки ($* p < 0,05$).



Экстракт КР снижает количество апоптических клеток. Клетки SW1353 предварительно обрабатывали фиг. 6. Флоу 50 нг/мл в течение 2 ч с последующей совместной обработкой экстрактом КР (1, 3 и 10 мкг/мл) в дозе 50 нг/мл в течение 2 ч и последующей совместной обработкой экстрактом КП (1, 3 и 10 мкг/мл) для другого часа. ДМСО (2,5%) использовали в качестве положительного контроля. Необработанную группу оставили в качестве контрольной на 48 часов. ДМСО (2,5%) использовали в качестве положительного контроля. Необработанная группа была оставлена в качестве контроля (Ctrl). Количество апоптических клеток подсчитывали с помощью прямой цитометрии. Значительное увеличение апоптоза в апоптических клетках индуцируется аномальным TNF- α и противодействует экстракту КР, что приходит к тенденции к снижению апоптоза. Клетки, индуцированные TNF- α , противодействуют экстракту КР, приводят к тенденции к снижению апоптоза (результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение двух независимых экспериментов, один способ ANOVA с последующим апостериорным тестом множественных сравнений Тьюки, используется для анализа следующих апостериорных различий, то есть, сравнения каждого эксперимента с контролем или экстрактом КР для проверки статистической разницы (* $p < 0,05$ и # сравнению с необработанным контролем).

3. Обсуждение

3. Обсуждение

В последнее время в ряде исследований была продемонстрирована потенциальная активность экстракта КП в последнее время в ряде исследований продемонстрирована потенциальная активность экстракта КП и его основные составляющие, полезные при лечении различных заболеваний и его основные составляющие, полезные при лечении различных заболеваний [15, 16]. Тем не менее, за последние десятилетия было лишь несколько сообщений об ангиартритных средствах. Ангиартитный потенциал экстракта КП [13, 15]. Настоящее исследование предоставляет более доказательств того, что экстракт КП обладает большим потенциалом [13, 15]. Настоящее исследование предоставляет более доказательств в поддержку ангиартитного потенциала корня и штока экстракта КР в СФА-индуцированном артите у крыс. Ангиартитный потенциал корня и штока экстракта КР в модели СФА-индуцированного артита у крыс модели в дополнение к демонстрации его ондропротекторной активности *in vitro*, которые оценивались в дополнение к демонстрации его ондропротекторной активности *in vitro*, которые оценивались в оценке или на модели экспланата хряща. На клеточном уровне экстракт КР показал подавление модели экспланата хряща. На клеточном уровне не экстракт КП показал подавляющее действие. Сильное влияние на экспрессию генов, участвующих в воспалительном артите и хрящевой ткани, в меньшей степени на экспрессию генов, участвующих в воспалительном артите и деградации хряща. Терапевтический потенциал комбинации трех основных метоксифлавонов (DГИР) этанолового экстракта, который был приготовлен в концентрациях, эквивалентных их концентрации в экстракте КП, очевидно. Экстракт КР ясно продемонстрировал синергетические эффекты, подавляя экспрессию генов, связанных с артритом аналогично действию экстракта КП. По поводу сигнализации пути, участвующие в ангиартитных эффектах, экстракт КП показал сильный селективный подавление фосфорилирования некоторых белков, в которых участвуют NF-кБ и

Пути MAPK. Кроме того, экстракт обладает защитной активностью против апоптоза и некротоза, индуцированных TNF-α.

Спиртовой экстракт корневищ КР, который был оценен с помощью анализа ВЭЖХ, показал три основных метоксифлавона: D, T и R в пропорциях 36,74%, 26,72% и 30,91% соответственно (рис. S1). Эти пропорции были аналогичны результатам предыдущего отчета [17]. Сообщалось, что эти три компонента варьировались в кровоток в течение 1–2 ч после перорального приема 750 мг/кг экстракта КР с последующим обнаружением этих соединений в различных органах, включая печень, почки, легкие, яички и головного мозга и, наконец, выводились из организма с периодом полувыведения от 3 до 6 часов [17]. Исследование хронической токсичности было проведено на крысях. Вистар при пероральном введении экстракта КР в течение 6 месяцев в дозах 500 мг/кг/сут, что эквивалентно 100-кратной дозе для человека [18]. Результаты показали значительно более низкую массу тела при незначительных изменениях гематологических показателей. Однако наши результаты не показали значительные изменения биологических параметров. Средний вес крыс в всех группах демонстрировал тенденцию к увеличению в течение экспериментального периода, но разница была незначительной (рис. S2). Эти результаты указывают на возможный безопасный диапазон доз экстракта КР для человека. Как сообщается в системном обзоре, при употреблении этого растения в дозе до 1,35 г/день не было никаких неблагоприятных последствий для здоровья человека [15].

В настоящем исследовании воспаление в нескольких суставах крыс, которым вводили СФА, было успешно достигнуто на модели крыс с артритом, чтобы определить результаты, о которых сообщалось ранее [19]. Наши результаты показали индукцию отека суставов с высоким накоплением лимфоцитарной инфильтрации, но признаков разрушения хряща в этом исследовании не наблюдалось. Эта модель артрита на крысях широко используется, потому что крысы с РА имеют общие симптомы с симптомами людей с РА, включая полиартрикулярное воспаление, синовиальную гиперплазию и деградацию хряща [20]. На протяжении всего экспериментального периода у крыс с артритом, получавших индометацин (3 мг/кг/день) и экстракт КР (150 и 300 мг/кг/день), наблюдалась тенденция к уменьшению объема лап, которая в последнюю неделю достигла значительно отличающихся уровней по сравнению с объемом лап в контрольной группе артрита. Это подтверждается наличием значительного снижения показателей артрита у крыс с артритом, получавших экстракт КР и индометацин.

Эти результаты свидетельствуют о том, что экстракт КР в концентрации 1:50 и 1:100 раз превышающих индометацин, обладает сходным антиартиритическим потенциалом. Индометацин — нестероидный противовоспалительный препарат, который используется для облегчения лихорадки, боли и отека. Сообщалось, что этот препарат снижает уровень простагландин E2 (PGE2) и TNF-α при остром воспалении, взвешенном каррагинаном, у крыс [21]. Недавний отчет об использовании индометацина в дозе 2,5 мг/кг/день при СФА-индуцированном артите у крыс не показал существенных изменений в гематологическом профиле по сравнению с таковым в контроле артрита [22]. Однако наше исследование показало, что пероральная доза индометацина 3 мг/кг/день значительно усиливала гиперспленоз и некоторые гематологические параметры.

Гистопатологические изменения в срезах суставной ткани исследовали с помощью окрашивания гематоксилином-эозином. Признаки синовита, которые были повышены в суставах крыс с артритом, включая синовиальную гиперплазию, пролиферацию кровеносных сосудов и инфильтрацию воспалительных клеток, улучшились как в группах КР, так и в группе индометацина. Тем не менее, экстракт КР не проявлял антиартиритического действия в зависимости от концентрации. Хотя лечение более высокой дозой экстракта КР в дозе 300 мг/кг/день не дало лучших результатов, чем лечение в дозе 150 мг/кг/день, результаты указывают на мощную противовоспалительную активность экстракта КР в организме. Модель живого организма. Эти результаты подтверждаются результатами нашего предыдущего исследования, в котором использовалась клеточная линия синовиальной саркомы SW982 [13]. Результаты предыдущего исследования показали, что экстракт КР и его три основных компонента, D, T и R, подавляют несколько факторов, связанных с РА, включая экспрессию провоспалительных цитокинов, медиаторов воспаления и ферментов, разрушающих хрящ. Экстракт подавляет генетическое аутофагосомы и некротозомы и подавляет миграцию клеток, но не устраняет резистентность к апоптозу и не изменяет клеточный цикл. Хотя текущее исследование не предоставило убедительных доказательств мощного противовоспалительного действия экстракта КР, оно показало, что он может быть потенциальным средством для лечения артрита.

х ондропротекторный потенциал экстракта КП в условия х воспаления суставов на этой же витной модели не наблюдался.

Модель экспланатах ря ща использовали для оценки ондропротекторного потенциала КП *in vitro*. Эта модель имитирует трехмерную среду нативного ря ща, что полезно для базового скрининга х ондропротекторного потенциала кандидатов в лекарства против артрита [23]. Оптере молекул х ря ща в огоматрикса свидетельствовало азимутальное снижение уровня S-GAG в культуральной среде, что соответствовало высокому остаточному содержанию протеогликанов, как показано на срезах тканей, окрашенных сафранином Q. Снижение количества жизнеспособных клеток, ввванное обработкой цитокинами, было обратным, когда клетки обрабатывали совместно с экстрактом. Эти результаты свидетельствуют ох ондропротекторном потенциале экстракта КП против индуцированной цитокинами деградации х ря ща. Этот защитный эффект может быть связан с подавлением действием экстракта КП на клеточные механизмы связанные с деградацией х ря ща и гибелью хондроцитов в экспланатах, которые индуцируются ИЛ-1 β и ИЛ-17A [24,25]. Наши результаты подтверждают результаты предыдущих исследований о ондропротекторного потенциала на животных моделях экстракта КР [10] и Те [11]. Уровни ЛДГ в культуральных средах всех обработок существенно отличались от таковых в контроле, что свидетельствует о том, что изменения в всех параметрах в этом исследовании не были ввязаны с ионтоактивным действием реагентов и экстракта.

SW1353, клеточную линию хондросаркомы использовали для лучшего понимания защитных механизмов КП на клеточном уровне. Эта клеточная линия хорошо зарекомендовала себя как репрезентативная для хондроцитов в многих предыдущих исследованиях [26-28]. Сообщалось, что клеточная линия SW1353 активируется ИЛ-1 β и способствует увеличению экспрессии катаболических факторов, участвующих в развитии ОА и РА, включая провоспалительные цитокины TNF- α , ИЛ-6 и ИЛ-8, и фермент, разрушающий х ря ща MMP-13 [29]. Хорошо известно, что эти провоспалительные медиаторы особенно TNF- α и ИЛ-6, участвуют в патогенезе. В соответствии с предыдущими сообщениями, эти гены также значительно активировались комбинированым ИЛ-1 β и ИЛ-17A. Эти гены подавлялись экстрактом КП в концентрации 10 мкг/мл и его основными компонентами, D, T и P, в соответствующих концентрациях, сх однократно в экстракте КП в концентрации 10 мкг/мл. Эти результаты свидетельствуют о том, что эти три основных компонента не обладают противовоспалительными механизмами в качестве активных вторичных метаболитов КП, что они помогли смягчить воспалительные показатели у крыс с артритом, получавших экстракт КП, что оценивалось по объему лапы показателя мартрита и показателя мышонита.

Среди трех основных компонентов КП D показал более сильное ингибирующее действие на экспрессию катаболических факторов, чем Т и Р. Однако комбинированный DTP показал гораздо более высокий ингибирующий эффект, чем D, T и P. Был выражен мощный синергетический эффект подавления. Выведено при смешивании трех основных компонентов в концентрации 10 мкг/мл их предполагаемые пропорции в 10 мкг/мл экстракта КП. Подобный способ был показан в нашем предыдущем отчете с использованием клеточной линии синовиальной саркомы человека, SW982, которая была индуцирована комбинацией ИЛ-1 β и ИЛ-17A [13]. Мы обнаружили, что эта новая экстракты КР, D и T значительно подавляли ли экспрессию генов IL1B, TNF и COX2 в клетках SW982, тогда как Рселективно подавляла только экспрессию гена TNF. Экстракт КР не был способен снижать экспрессию гена IL6 в клетках SW982, тогда как комбинация D, T и P сильно подавляла в высокую экспрессию этих провоспалительных генов в клетках SW982, подобно подавляющую активацию в клетках SW1353. Клетки, описаны выше. Аналогичная подавляющая активность смеси экстракта КП позволяет предположить, что эти соединения являются основными компонентами КП и вместе играют ключевую роль в усилении биологической активности экстракта. Кроме того, различные методы экстракции КП давали различные образцы активных компонентов, которые могли способствовать их особой биологической активности. Эти результаты свидетельствуют о том, что комбинация этих основных активных компонентов может обеспечить большую пользу по сравнению с использованием экстракта КП в стратегии лечения ОА.

ММТ-13 я вляется индуцируемым ферментом, стимулируемым провоспалительными цитокинами, связанными с патогенезом ОА и РА. Этот фермент в основном врабатывается хондроцитами и играет роль в деградации молекул х ря ща в огоматрикса, включая коллаген, протео-

гликаны агрекан [31]. Сообщалось, что продукция других МП, которые способны расщеплять неколлагеновый матриксный белок, увеличивается при артрите [32,33]. Эти ферменты нуждаются в ионах цинка в качестве кофактора; следовательно, экспрессия белков-переносчиков цинка, особенно ZIP8, который способствует клеточному накоплению иона цинка, также была повышена при OA [6]. Соответственно, подавление производства MMP-13 и ZIP8 было предложено в качестве мишени для лечения OA [34,35]. Наши настоящие результаты показали, что экстракт КР и три его основных компонента, особенно в комбинированном лечении, эффективно снижают экспрессию фермента, разрушающегося в клетках SW1353, аналогично результатам нашего предыдущего исследования, которое проводили на модели культуры клеток SW982 [13]. Сообщалось, что подавление ZIP8 уменьшает деградацию хряща у животных при OA, в виванном тесте стабилизацией операции на медиальном мениске [36]. На крысиных моделях OA было обнаружено, что пероральное введение экстракта КР уменьшает повреждения хряща и подавляет IL-1 β -индуцированную экспрессию разрушающих хрящ ферментов, MMP1, MMP3 и ADAMTS4, в хондроцитах человека [10]. Было высказано предположение, что D и T участвуют в этих механизмах, поскольку они являются основными абсорбентами. Соответственно, мы предположили, что один из механизмов, связанных с хондропротекторной активностью КР, который был продемонстрирован на модели культуры экспланната хряща, включает эффективное подавление продукции МП и ZIP8.

В настоящее время известно, что пути NF-кБ и MAPK участвуют в патогенезе OA и RA [37,38]. Сообщалось, что активация этих путей усиливает экспрессию провоспалительных цитокинов и ферментов, разрушающих хрящ [37,39]. Наше предыдущее исследование на модели культуры синовиальных клеток SW982, индуцированной теми же комбинированными цитокинами, показало, что экстракт КР селективно подавляет фосфорилирование p38 MAPK, но не путь NF-кБ [13]. Между тем, настоящее исследование на клеточной линии хондроцитов SW1353 неожиданно продемонстрировало, что экстракт КР оказывает потенциальное ингибирующее действие на подавление путей NF-кБ и MAPK. Этого говорит о том, что разнообразные реакции экстракта КР на внутренние воспалительные пути могут зависеть от конкретных типов клеток. Предлагается провести дальнейшие углубленные исследования различных путей в первичных хондроцитах и синовиоцитах. Помимо экстракта КР, комбинация трех основных соединений показала лишь слабое ингибирующее действие на эти сигнальные пути, даже несмотря на то, что она резко подавляла экспрессию связанных с генами в воспалительных заболеваниях суставов. Это открытие предполагает, что комбинированное действие основных соединений может принимать участие в других путях перекрестных помех, связанных с воспалительными заболеваниями суставов, таких как пути JAK/STAT и PI-3K/AKT/mTOR, что приводит к окончательному облегчению воспалительных процессов [37]. Следовательно, необходимо однодополнительно снять избирательное действие комбинированного основного соединения экстракта КР на внутренние сигнальные пути, связанные с воспалением суставов.

Хотя повышение уровня провоспалительных цитокинов в микроокружении суставов было одинаковым при OA и RA, ключевые клетки при этих заболеваниях по-разному реагировали на условия, особенно на процесс клеточной гибели. Провоспалительные цитокины активируют пути апоптоза в хондроцитах, что приводит к уменьшению числа хондроцитов в хряще OA и к деградации хряща [7]. При RA хроническое воспаление вызывает стойкое повышение продукции провоспалительных цитокинов, что способствует изменению синовиоцитов до опухолеподобного фенотипа, повышению устойчивости к апоптозу и разрастанию синовиальной оболочки и стромальных клеток [40,41]. Защита воспаленных хондроцитов от индукции апоптоза при одновременном подавлении опухолеподобной трансформации и обратной апоптотической резистентности воспаленных синовиоцитов является объектами исследования для разработки противогартритных препаратов [42]. Настоящее исследование продемонстрировало индукцию процессов апоптоза и некротоза в клетках хондроаркомы SW1353 с помощью TNF- α , которые были изменены экстрактом КР. Хотя экстракт КР эффективно изменяет эти процессы, он не влияет на клеточный цикл (рис. S3). Эти результаты показывают защитный потенциал КР против процессов гибели клеток в этой клеточной линии хондроцитов. Как обсуждалось выше, эти результаты подтверждают хондропротекторную активность КР в модели экспланната хряща, очевидно, это подтверждается восстановлением числа жизнеспособных хондроцитов. Хондропротекторная

Ранее сообщалось о стимулированном стрессом апоптозе хондроцитов путем подавления экспрессии GSK-3β [12].

В совокупности это исследование ясно продемонстрировало противартритный потенциал экстракта КП на крысиной модели, индуцированной активацией CFA. Модели эксплангатах *in vitro* и культуры клеточных линий хондросаркомы дали результаты подтверждающие участие механизмов анизмов артрита экстракта КР и его основных компонентов, D, T и P, включая хондропroteкцию, противовоспалительное действие и защиту хондроцитов. Поэтому мы считаем, что эти эффекты экстракта КР были вовлечены синергетическим действием трех основных компонентов. Соответственно, мы предполагаем, что комбинация этих основных компонентов может быть использована в терапевтических стратегиях.

4. Материалы и методы

4.1. Химические

реагенты CFA, модифицированная Дульбекко среда Игла (DMEM), фетальная мышьяк сыворотка (FBS) и другие культуральные реагенты были получены от Gibco (Grand Island, NY, USA). Рекомбинантные человеческие IL-1β и IL-17A были приобретены у ProSpec Protein Specialist (Ness-Ziona, Израиль). Стандартные соединения D (чистота 99%), T (чистота 99%), Te (чистота 99%) и 3,5,7,30,40 - пентаметоксифлавон (P; чистота 95%) были приобретены Химическая компания INDOFINE (рис. S8). Индометацин был приобретен Sigma-Aldrich. Пентобарбитал (неймбутал) был получен от Ceva Santé Animale, Франция. BAY11-7082, SB203580 и SP600125 были получены от Calbiochem, а U0126 - от Cell Signaling Technology.

4.2. Экстракция растений

подготовка. Экстракцию КР этанолом (номер образца в аучере 023202) проводили, как описано ранее [13], и дали в ёмкость 4,91% (мас./мас.). В кратце, порошок в высушенного корня вишни замачивали в 95% этаноле в течение трех дней, а затем повторно доводили экстрагировали. Объединение супернатанты упаривали, чтобы получить неочищенный экстракт, который хранили при -20 °C. Процесс в высокой эффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) экстракта КР показан на рисунке 1. Основными компонентами были D (36,74%), T (26,72%) и P (30,91%). Экстракт растворялся в 5% полисорбате 80 (Tween 80; Merck Millipore) для экспериментов на животных и в 100% диметилсульфоксида (ДМСО VWR), в котором конечные концентрации составляли менее 0,05%, для обработки эксплангатах *in vitro* и клеток культуры.

4.3. Полная модель крыс, индуцированная адьювантом Фрейнда

Самцов крыс Sprague-Dawley весом 140–160 г приобретали у Nomura Siam International Co., Ltd., Бангкок, Таиланд. Крысы содержали в клетке в контролируемых условиях окружающей среды при температуре 24 °C ± 1 °C и 12-часовом цикле свет/темнота с гранулированным кормом и водой без ограничений. Экспериментальные процедуры проводились, как описано ранее [43] и одобрены Комитетом по этике животных медицинского факультета Чiangmaiского университета, Таиланд (номер утверждения протокола: 13/2561). Все эксперименты на животных проводились в соответствии с соответствующими руководствами и правилами. После акклиматизации в течение 1 недели крысам вводили 0,1 мл CFA в подподшенную поверхность правой лапы. Неинфицированные крысы использовали в качестве нормального контроля (3 крысы). Через 14 дней отбирали крысы с артритом и случайным образом делили на четыре группы (по 6 крыс в группе) следующим образом: группа 1 = контрольная группа с артритом, получавшая 5% Tween 80 в дозе 5 мл/кг; 2 группа = группа сравнения, получавшая индометацин в дозе 3 мг/кг; 3 и 4 группы = опытные группы получавшие экстракт КР в дозах 150 и 300 мг/кг соответственно.

Крысам перорально вводили испытуемые вещества один раз в день в одно и тоже время в течение 28 дней, а их массу тела и объем правой лапы измеряли с помощью глетчиметра (модель 7140; Уго Базиле, Варезе, Италия) каждые 7 дней. На 28-й день крыс евтаназировали внутривенно введение пентобарбитала (50–90 мг/кг). Проба крови-

Образцы крови собирали с помощью функции сердца для оценки гематологических параметров и биохимического состава крови, включая глюкозу, функциональные пробиотики и почек. Больница мелких животных, Факультет ветеринарной медицины КМУ, Таиланд. Печень, селезенку, почки и тимус извлекали с использованием электронных цифровых весов (Ohaus, Parsippany, NJ, USA).

4.4. Оценка степени тяжести артрита

Оценка тяжести артрита проводилась ветеринарным врачом по слепому сценарию на последней неделе. Тяжесть артрита оценивали по шкале от 0 до 4 в соответствии с системой оценки Nature Protocol [44] следующим образом: 0 = норма; 1 = легкая припухлость предплечья или голеностопного сустава; 2 = легкая опухоль от лодыжки до предплечья; 3 = умеренная припухлость от лодыжки до плюсневых суставов; 4 = сильный отек, включая лодыжку, стопу и пальцы.

4.5. Гистопатологическое исследование

Правые лапы отрезали после умерщвления и консервировали в 4% (об./об.) формальдегиде (RCI LabScan) для заливки в парафин. Слепая гистопатологическая оценка синовита с использованием системы Гюнтера [14] проводилась под руководством патолога. Окрашивание гематоксилиновым (H&E) срезами (толщина 5 мкм) оценивали по следующим параметрам. Слои синовиальной оболочки оценивали по степени синовиальной гиперплазии, используя следующие степени: 0 = нормальный (1-2 слоя клеток); 1 = легкая гиперплазия (2-3 слоя клеток); 2 = умеренная гиперплазия (3-5 слоев клеток); 3 = сильная гиперплазия (более 5 слоев клеток). Количество и размер кровеносных сосудов в синовиальной оболочке оценивали как 0 = менее 5 мелких кровеносных сосудов/мм²; 1 = 5-10 мелких кровеносных сосудов/мм²; 2 = 11-15 мелких или средних кровеносных сосудов/мм²; 3 = более 15 мелких, средних и крупных кровеносных сосудов/мм². Наличие воспалительных клеток в синовиальной оболочке оценивали как 0 = менее 2 воспалительных клеток/мм²; 2 = 3-10 воспалительных клеток/мм²; 5 = 11-50 воспалительных клеток/мм²; 10 = более 50 воспалительных клеток/мм². Инвертированный конфокальный микроскоп (Zeiss Axio, Йена, Германия, с IMTcamCCD5 PLUS, IMT i-Solution, Inc., Ванкувер, Британская Колумбия, Канада) использовали для захвата и масштабирования гистопатологических изображений при 40-кратному увеличению.

4.6. Модель эксплангата свиного ряда

Свежие ноги свиней (*Sus scrofa domesticus*) в возрасте 20-24 недель были получены местного рынка в Чiangmai, Таиланд. Ряд центральных дисков вырезали и культивировали в 24-лучочном планшете потри штуки (всего примерно 30-35 мг) на лунку в соответствии с предыдущей работой [29]. Эксплангаты ряда предварительно обрабатывали 2 нг/мл IL-1β в сочетании с 4 нг/мл IL-17A в течение 12 часов с последующей обработкой экстрактом КР и диацерином (Артродар; препарат против артрита) в течение 28 дней, который заменил лечения каждые 7 дней. Тест на жизнеспособность ряда оценивали с помощью анализа лактатдегидрогеназы (ЛДГ), как описано ранее [45]. Въездование ЛДГ в культуральную среду измеряли еженедельно, а накопление уровня анализировали до конца эксперимента.

4.7. Оценка деградации хряща

Въездование сульфатированых гликозаминогликанов (S-GAG) в культуральную среду указывало на разрушение хряща в неклеточном матриксе, которое еженедельно измеряли с помощью анализа с диметилметиловым синим, как описано ранее [46]. В последний день лечения хряща центральные диски фиксировали в 4% (об./об.) формальдегиде и делали срезы парафина. Затем срезы ряда окрашивали красителем H&E и сафранином O. Жизнеспособность хондроцитов, определяемая количеством клеток-лакун на общем количестве клеток, наблюдалась на срезах, окрашенных гематоксилиновым. Оставшиеся протеогликаны в хряще на дисках оценивали с помощью программного обеспечения ImageJ для измерения интенсивности окраски сафранина O, что отражало ондропротекторный эффект лечения.

4.8. Модель клеточной культуры

Линию клеток хондроцитов человека (SW1353; ATCC, HTB-94, пассажиб-10) использовали для исследования влияния экстракта КП на уровень экспрессии генов. Клетки были аутентифицированы компанией DiagCor Bioscience Incorporation Limited (Гонконг, Китай). Их выращивали в среде DMEM с 10% FBS в влажном инкубаторе с 5% CO₂ при 37 °C. Клетки при 80% слиянии высевали в 6-луночные планшеты и голодали в течение 24 ч перед предварительной обработкой комбинацией IL-1β 2 нг/мл и IL-17A 4 нг/мл для стимуляции воспаления. Экстракт КП (1, 3 и 10 мкг/мл), стандартные активные соединения ($D = 3,3 \text{ мкг/мл}$, $T = 2,6 \text{ мкг/мл}$, $R = 2,2 \text{ мкг/мл}$, $D + T + R = 3,3 + 2,6 + 2,2 \text{ мкг/мл}$) и диацерин (50 мкМ) совместно обрабатывали комбинированными цитокинами в течение 24 часов. Кроме того, проводили предварительную обработку TNF-α в дозе 10 нг/мл для запуска генов, связанных с гибелю клеток, с последующей совместной обработкой экстрактом КР до 24 часов для анализа генов и 48 часов для анализа методом проточного цитометрии. Уровень ЛДГ в культуральной среде измеряли с помощью анализа ЛДГ, как описано ранее [45] (рис. S4). Кроме того, IC50 экстракта КР в клетках SW1353, составленных из хондроцитов человека и хондроцитов свиньи с помощью анализа МТТ составляла 70,4, 43,8 и 162,3 мкг/мл (рис. S5).

4.9. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени (RT-PCR)

Клетки лизировали и выделяли общую РНК с использованием мини-набора RNAspin (GE Healthcare). Мастер-микс RevertA Ace qPCR RT (TOYOBO, Осака, Япония) использовали для синтеза кДНК из 1 мкг РНК. ПЦР в реальном времени проводили на системе 7500 Fast Real-time PCR (Applied Biosystems, Дармштадт, Германия) с использованием реагента SensiFast SYBR Lo-ROX (Bioline, Лондон, Великобритания). Конкретные последовательности праймеров были разработаны с использованием инструмента NCBI Primer-BLAST (таблица S1). Данные были рассчитаны с использованием метода 2-Сt и нормализованы с эталонным геном GAPDH.

4.10. Вестернблот-анализ SW1353

высевали в колбу для культивирования объемом 25 см² при 80% слияния и выдерживали в течение 24 часов. Предварительная обработка экстрактом КП (10 мкг/мл), стандартными активными соединениями ($D = 3,3 \text{ мкг/мл}$, $T = 2,6 \text{ мкг/мл}$, $R = 2,2 \text{ мкг/мл}$ и $D + T + R = 3,3 + 2,6 + 2,2 \text{ мкг/мл}$) и сигнальные ингибиторы включая BAY11-7082 (ингибитор NF-κB; 20 мкМ), SB203580 (ингибитор p38; 1 мкМ), SP600125 (ингибитор JNK; 10 мкМ) и U0126 (ингибитор ERK; 5 мкМ). Выполняется в течение 2 ч. Затем клетки совместно обрабатывали конечными концентрациями IL-1β 2 нг/мл и IL-17A 4 нг/мл в течение 25–30 минут и немедленно собирали в буфере для лизиса для анализа радиоиммунопрепарации. Белки в клеточных лизатах разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и электротранспортировали на нитроцеллюлозные мембранны. Сигнальные молекулы были направлены на специфические антитела (таблица S2) и были разработаны с использованием субстрата максимальной чувствительности SuperSignal West Femto (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) использовали для захвата изображений без корректировок. Фосфорилирование и общее формирование каждой молекулы количественно определяли на одной и той же мембране, которую удаляли с помощью буфера для удаления (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Программное обеспечение TotalLab TL120 v2009 (TotalLab Ltd., Нью-касл-апон-Тайн, Великобритания) использовалось для измерения плотности целевых полос.

4.11. Проточный цитометрический анализ

Клетки SW1353 с 80% слиянием в 24-луночных планшетах предварительно обрабатывали 50 нг/мл TNF-α в течение 2 часов, а затем совместно обрабатывали экстрактом КР до 48 часов. Клетки обрабатывали трипсином и окрашивали с использованием набора для окрашивания Annexin-V-FLUOS (Roche Applied Science, Индианаполис, Индиана, США) в соответствии с инструкцией производителя. Апoptотические клетки подсчитывали с использованием проточного цитометра BD FACSCanto II (BD Biosciences Systems, Сан-Хосе, Калифорния, США). Позитивный контроль гибели клеток готовили в 2,5% ДМСО.

4.12. Статистический анализ

Данные выражали как среднее значение ± стандартная ошибка среднего или стандартное отклонение двух или трех независимых экспериментов, которые проводились в двух или трех повторности x . Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа с последующим априорным тестом множественных сравнений Тьюки или тестом Фишера. Значения $p < 0,05$ считались показательными для статистической значимости. Для статистического анализа использовалась версия SPSS 22.0.

Дополнительные материалы Следующие материалы доступны Ингернете, Таблица S1: Последовательности праймеров человека, используемые для ОТ-ПЦР в реальном времени, Таблица S2: Комерческие антитела, используемые для вестернблоттинга, Рисунок S1: В ЭЖХ -хромограммы экстракта КР, Рисунок S2: Влияние экстракта КП на изменение массы тела крысы Рисунок S3: Влияние экстракта КР на клеточный цикл в TNF-α-индуцированных клетках SW1353 в течение 48 ч. Рисунок S4: Влияние экстракта КР на выявление ЛДГ в IL-1β и IL-17А-индуцированье клетки SW1353 в течение 24 ч, рисунок S5: Влияние экстракта КР на жизнеспособность клеток SW1353, рисунок S6: полноразмерные blot-изображения ИКК, ИкБ, p65 и β-актина, рисунок S7: Полноразмерные blot-изображения JNK, ERK, p38 и β-актина, рисунок S8: Химическая структура стандартных соединений.

Вклад авторов: Концептуализация, SO и PK; методология, SO, PK, NC и ST; ресурсы SO и NC; курирование данных, SO и PK; написание – подготовка первоначального проекта, SO и PK; написание – рецензирование и редактирование, SO PK и NB; визуализация, PK; надзор, SO администрация проекта, SO; приобретение финансирования, SO Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование: это исследование финансировалось Исследовательским фондом медицинского факультета Университета Чiangmai, Таиланд (номер гранта 142/2561), и частично поддерживалось Университетом Чiangmai, Таиланд, Центром исследований и разработок натуральных продуктов для здоровья, Университет Чiangmai, Таиланд (номер гранта 14/2564).

Заявление Институционального наблюдательного совета: исследование было одобрено Комитетом по этике животных медицинского факультета Чiangmai университета, Таиланд (код протокола 13/2561).

Заявление о доступности данных: данные, представленные в этом исследовании, доступны по запросу от соответствующего автора.

Благодарности: Мы выражаем нашу благодарность Prachya Kongtawelert, Таиландский передовой центр тканевой инженерии и стволовых клеток, кафедра биохимии, медицинский факультет, Чiangmai университет, Таиланд, за общую поддержку. Мы также хотели бы поблагодарить Benjaporn Chaiwun, доктора медицинских наук, отделение патологии, медицинский факультет Университета Чiangmai, Таиланд, за ее руководство в гистопатологической оценке синовита крыс.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Спонсоры не участвовали в разработке исследования; при сборе, анализе или интерпретации данных, в написании рукописи или в решении опубликовать результаты.

Доступность образцов: образцы соединений не доступны авторов.

Использованная литература

1. Вутцель, Д.; Хубер, Р.; Купфер, П.; Полерс, Д.; Пфафф, М.; Дриш, Д.; Хойг, Т.; Коэн, Д.; Стиль, П.; Гутке, Р.; и другие. Идентификация пациентов с ревматоидным артритом и остеоартритом путем создания набора правил на основе транскриптома. Артрит рев. тер. 2014, 16, Р84.
[Перекрестная ссылка]
2. Лаев С.С.; Салахутдинов Н.Ф. Противоартитные средства: достижения и перспективы. Биоорганическая мед. х им. 2015, 23, 3059-3080. [Перекрестная ссылка]
3. Робинсон, У.Х.; Лепус, см.; Ван, Кью; Рагху, У.Х.; Мюх, Р.; Линдстрем, ТМ Соколов, Дж. В. логику в воспаление как ключ к механизму остеоартрита. Наци. Преподобный Ревматол. 2016, 12, 580-592. [Перекрестная ссылка]
4. Вайдасевич, П.; Пояловский, Л.А.; Щукевич, Д. Роль в воспалительных и противовоспалительных цитокинов в патогенезе остеоартрита. Медиат. Воспаление. 2014, 2014, 1-19. [Перекрестная ссылка] [В таблице]
5. Алунино, А.; Карубби, Ф.; Джакомелли, Р.; Герли, Р. Цитокины в патогенезе ревматоидного артрита: новые игроки и терапевтические мишени. БМК Ревматол. 2017, 1, 1-13. [Перекрестная ссылка] [В таблице]
6. Ким, Дж.-Х.; Чон, Дж.; Шин, М.; Вон, Ю. Ли, М.; Квак, Дж.-С.; Ли, Г.; Ри, Дж.; Рю, Дж.-Х.; Чун, К.-Х.; и другие. Регуляция катаболического каскада при остеоартрите с помощью оси цинк-ZIP8-MTF1. Cell 2014, 156, 730-743. [Перекрестная ссылка] [В таблице]
7. Шарлье, Э.; Реликвия, Б.; Дерайер, К.; Малез, О.; Невиль, С.; Калле, Дж.; Недомогание, MG; Де Сени, Д. Взгляд на молекулярые механизмы анизомигации хондроцитов при остеоартрите. Междунар. Дж. Мол. науч. 2016, 17, 2146. [Перекрестная ссылка] [В таблице]

8. Бенедетти, Г.; Бона венгера, П.; Лавокат, Ф.; Miossec, P. IL-17A и TNF- α увеличивают экспрессию антиапоптотической адгезии Молекула амиго-2 в синовиоцитах артрита. Передний. Иммунол. 2016, 7, 254. [Перекрестная ссылка]
9. Дель Гросси Мура, М; Круз Лопес, Л.; Сильва, Мнганга; Барберато-Фильо, С.; Мотта, RHL; Bergamaschi, CC Использование стероидных и нестероидных противовоспалительных средств при лечении ревматоидного артрита: протокол систематического обзора. Медицина 2018, 97, e12658. [Перекрестная ссылка]
10. Kobayashi, H.; Sudaiki, R.; Sato, K.; Ogami, T.; Tomizawa, H.; Cebata, M.; Ichinose, K.; Aburada, M.; Onishi, B.; и другие. Влияние экстракта Kaempferia parviflora на остеоартрит коленного сустава. Дж Нат. Мед. 2017, 72, 136–144. [Перекрестная ссылка]
11. Ву, Л.; Лю, Х.; Ли, Л.; Лю, Х.; Ян, К.; Лю, З.; Huang, H. 5,7,30,40-Тетраметоксифлавоновый аналог в лекарствах с антипротеиназной активностью, действующими на передачу сигналов бета-катенина in vivo и in vitro. Биофиз. Рез. комм. 2014, 452, 682–688. [Перекрестная ссылка]
12. Юнь, Х.; Ли, Л.; Ши, В.; Лю, Х.; Хуанг, Х.; Лю, З.; Wu, L. TMF защищает хондроциты от апоптоза, вызванного стрессом ER, подавляя GSK-3beta. Биомед. Фармацевт. 2017, 89, 1262–1268. [Перекрестная ссылка]
13. Конгданг, П.; Джейтам, Р.; Тонгой, С.; Куэнсаен, К.; Прадит, В.; Онгчай, С. Спиртовой экстракт Kaempferia parviflora прерывает связанные с механическими аномалиями ревматоидный артрит в модели культуры SW982 через пути p38/STAT1 и STAT3. Фитомедицина 2019, 59, 152755. [CrossRef]
14. Гюнтер, Г.В.; Дицкрафт, Л.С.; Рейнхольц, Ф.П.; Холмунд, АВ; Лием RS; де Бонг, Л.Г. Синовиальная инфильтрация в артроскопии получена при исследовании коленного сустава: обзор литературы и предложенная система гистологической классификации. Ж. Ортопедии и травматологии 1998, 56, 1281–1286; обсуждение 1287. [CrossRef]
15. Саюев, С.; Вилаират, П.; Рактанякан, П.; Дильторисакул, П.; Диптайом, Т.; Конгкаев, К.; Сруасири, Р.; Чутапутти, А.; Чайка Кунарук, Н. Клинические эффекты Krachaidum (Kaempferia parviflora): систематический обзор. Дж Эвид. На основе интегр. Мед. 2016, 22, 413–428. [Перекрестная ссылка]
16. Ченд.; Ли, Х.; Ли, В.; Фэн, С.; Денг, Д. Kaempferia parviflora и ее метоксифлавоны X и миа и биологическая активность. Евид. Дополнение на основе. Альтерн Мед. 2018, 2018, 4057456. [Перекрестная ссылка]
17. Мекья рускул, С.; Джей, М; Шипанидкульчай, Б. Фармакокинетика, биодоступность, распределение в тканях, эксcreция и метаболитная идентификация метоксифлавонов в экстракте Kaempferia parviflora у крыс. Препарат Метаб. Утилизация 2012, 40, 2342–2353. [Перекрестная ссылка]
18. Чивапат, С.; Чавалитумронг, П.; Аттавишча, Р.; Рунгсипат, А. Исследование хронической токсичности Kaempferia parviflora Wall ex. извлекать. Тайский. Дж Вет. Мед. 2010, 40, 377–383.
19. Мессиат, К.; Ларсон, Д.; Прати, К.; Пощко, Т.; Демурко, К.; Мэри, С. Связь между оценкой артрита в начальном заболевании и долгосрочными осложнениями. Активность при адьюванционной индукции артрита у крыс. Артрит рез. тер. 2015, 17, 1–12. [Перекрестная ссылка]
20. Чудди, Н.; Бхатт, Л.К.; Прабх авалкар, К.С. Экспериментальные модели ревматоидного артрита на животных. Иммунотерапия. Иммунотаксикол. 2018, 40, 193–200. [Перекрестная ссылка]
21. Хушманд, Г.; Мансури, Мнганга; Нагизаде, Б.; Хеммати, А.А.; Хашемитабар, М. Потенцирование индометацининдуцированного противовоспалительного ответа пиоглитазоном при каррагинининдуцированном остеоартрите у крыс: роль рецепторов PPARgamma. Междунар. Иммунотерапия. 2016, 38, 434–442. [Перекрестная ссылка] [В паблике]
22. Махди, Х.Дж.; Ханна, А.; Асмави, МЗ., Б.; Махмуд, Р.; Викнесваран, А.; Мургайя, Л. Противоартритное и антиинфильтративное действие этанольного экстракта листьев *Moringa oleifera* in vivo на артрит, индуцированный полным адьювантом Фрейнда (CFA), у крыс. Интегр Мед. Рез. 2018, 7, 85–94. [Перекрестная ссылка] [В паблике]
23. Хан прасертонг, Н.; Тикачунг, Атеанг, С.; Чайвонгса, Р.; Онгчай, С.; Кунчусонг, П.; Сангди, К.; Пангонг, А.; Бунгсанг, С.; Натасаен, Н.; Реутракул, В. Анальгетическая, противовоспалительная и хондропротекторная активность экстракта *Cryptolepis buchananii*: исследования in vitro и in vivo. Биомед. Рез. Междунар. 2014, 978582. [Перекрестная ссылка]
24. Шабо, М.; Любертис, Э.; Джустан, Л.; Берг, WWD; Miossec, P. IL-17, полученный из синовиальных клеток и синовиальной оболочки, способствует деградации суставов при ревматоидном артите. Артрит рез. 2001, 3, 168–177. [Перекрестная ссылка] [В паблике]
25. ВанФ.; Ву, Л.; Ли, Л.; Чен, С. Многородиновая защитная деградации против индуцированного ИЛ-1бета апоптоза и катаболических реакций на хондроциты остеоартрита. Междунар. Иммунотерапия. 2014, 23, 575–580. [Перекрестная ссылка]
26. Гебауэр, М; Саас, Дж; Соллер, Ф.; Хаг, Дж; Содер, С.; Липпер, М; Бартник, Э; Бенинга, Дж; Циммер, Р.; Эйтнер, Т. Сравнение клеточной линии хондроцитов из комплекса SW1353 с первичными суставами и хондроцитами взрослого человека в отношении профилактики экспрессии их генов и реaktivности к IL-1beta. Остеоартроз. Картил. 2005, 13, 697–708. [Перекрестная ссылка] [В паблике]
27. Ли, С.Г.; Ли, Э.Дж.; Парк, Западная Дания; Ким, Дж.Б.; Ким, Э.О.; Чой, С.В. Противовоспалительное и противоостеоартритное действие ферментированного японского Накаи. Дж Этнотерапия. 2012, 142, 634–641. [Перекрестная ссылка]
28. Парк, ЮЮ; Ким, С.; Чой, С.; Сео, С.; Сын, Дж.К.; Канг, ВУ; Ким, ЮР. Хондропротекторное и противовоспалительное действие нового комплексного препарата ChondroT. Дополнение БМК. Альтерн Мед. 2016, 16, 213. [Перекрестная ссылка]
29. Руангсурия, Дж.; Будпром, П.; Виряихасем, Н.; Конгданг, П.; Чокчайтависук, К.; Сирикаев, Н.; Чомдей, С.; Онгчай, С.; Нганонгпанит, К. Подавление деградации хряща с помощью зингерона с участием сигнального пути p38 и JNK MAPK. Планкт. Мед. 2016, 83, 268–276. [Перекрестная ссылка]
30. Явни, Ю; Кертис, молодший; Инс, А.; Бараф, Х.; Меламет, Р.Л.; Тенг, Л.Л.; Кавано, А. Эффективность тоцилизумаба у пациентов с активным ревматоидным артритом от умеренной до язвенной степени и предшествующим неадекватным ответом на противовоспалительные препараты модифицирующие заболевания: исследование ROSE. Анна. Ревм. Дис. 2011, 71, 198–205. [Перекрестная ссылка]
31. Беррадж, П.С.; Микс, К.С.; Brinckerhoff, СЕ Матриксные металлопротеиназы роль в артrite. Передний. Биоуч. 2006, 11, 529–543. [Перекрестная ссылка]
32. Морфи, Г.; Кнаупер, В.; Аткинсон, С.; Батлер, Г.; Английский, В.; Хаттон, М.; Штраше, Дж.; Кларк, И. Матриксные металлопротеиназы артритного заболевания. Артрит рез. 2002, 4, C39–C49. [Перекрестная ссылка] [В паблике]

33. Четвериков И.; Ломандер, Л.С.; Верзейл, Н.; Хейзинга, TWJ; Текоппеле, Дж М; Ханемайер Р.; DeGroot, J. Белок MMP и уровни активности в синовиальной жидкости у пациентов с травмами суставов, воспалительным артритом и остеоартритом. Анна. Ревматол. 2005, 64, 694–698. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[В паблике\]](#)
34. Рэй, К. Остеоартрит: цинк свя занес остеоартритом. Нац. Преподобный Ревматол. 2014, 10, 196. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[В паблике\]](#)
35. Ли, Х.; Ван Д.; Юнь, Ю; Мин Дж. Новое понимание регуляции торной сети MMP-13 в патогенезе раннего остеоартрита. Артрит рев. 2017, 19, 1-12. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
36. Песня, Дж; Ким, Д.; Ли, СН; Ли, MS; Чунь К.-Х.; Джин, Э.-Дж. МикроИК-488 регулирует транспортер цинка SLC39A8/ZIP8 вовремя патогенеза остеоартроза. Дж Биомед. науч. 2013, 20, 31. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[В паблике\]](#)
37. Малемуд, С.Дж Внутриклеточные сигнальные пути при ревматоидном артите. Дж Клин. Клетка. Иммунол. 2013, 4, 160. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[В паблике\]](#)
38. Рен ЮМ; Чжоу, Х.; Ян Т.; Дуань, ЮХ; Солнце, ЮБ; Чжоу, WJ; Tian, MQ Изучение ключевых генов и путей развития остеоартрита в хрящах коленного сустава на крысиных моделях с использованием профилирования экспрессии генов. Йонсей Мед. Дж 2018, 59, 760–768. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
39. Саклатвала Дж Передача сигналов воспаления в хрящах: пути MAPK и NF-kappaB в хондроцитах и использование ингибиторов для изучения патогенеза и терапии остеоартроза. Курс. Цели по наркотикам 2007 г., 8, 305–313. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
40. Ли, Х.; Ван А. Апоптоз фибробластов оподобных синовиоцитов ревматоидного артрита: возможная роль оксида азота и тирофлоксина 1. Медиат. Воспаление. 2013, 953462. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[В паблике\]](#)
41. ЮС; Кох, Дж Х.; Ленг, Л.; Ким, В.-У.; Букала, Р. Обзор: Отух оподобный фенотип ревматоидного синовиума: молекулярыкий профилирование и перспективы прецизионной медицины Артрит Ревматолог. 2018, 70, 637–652. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
42. Малемуд, С.Дж Фармакологические вещества для предотвращения апоптоза хондроцитов при ревматоидном артите и остеоартрите. Препарат Дисков. Рынок концепций 2018, 45, 77.
43. Лю, ЮЛ.; Линь Х.М; Цзюй, Р.; Ву, Дж К.; Хань Р.; Раймонд, Л.Н.; Рид, ПФ; Цинь, З.Х. Подавление полной болезни Фрейнда адьювангноиндуцированный адьювангний артрит кобротоксином. Акта Фарм. Грех . 2009, 30, 219–227. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
44. Бранд Д.Д.; Латам, К.А.; Ролонец, Е.Ф. Коллагениндуцированный артрит. Нац. протокол 2007, 2, 1269–1275. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[В паблике\]](#)
45. Megraw, RE Реакция восстановленного никотинамидаденидинуклеотида с 2,4-динитрофенилгидразином в сыворотке лактата дегидро-геназные анализы Являются. Дж Клин. Патол. 1971, 56, 225–226. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[В паблике\]](#)
46. Фарнейл, RW; Баттл, ди-Джей; Барретт, А.Дж Улучшение качественного определения и распознавания сульфатированных гликозаминогликанов с помощью диметилметиленовый синий. Биохим. Эт. Биофиз. Acta (Bba) Gen. Subj. 1986, 883, 173–177. [\[Перекрестная ссылка\]](#)