

BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS IN THE BLOOD OF MICE CAUSED BY LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED ENDOTOXEMIA

Natalia Kurhaluk, D.Sc., Professor, Institute of Biology and Earth Sciences, Pomeranian University in Słupsk, Poland

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4669-1092>

Halina Tkaczenko, D.Sc., Professor, Institute of Biology and Earth Sciences, Pomeranian University in Słupsk, Poland

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3951-9005>

Various animal models have been developed to mimic systemic inflammation in humans (Seemann et al., 2017). These models can be classified into three major types: exogenous administration of endotoxin, i.e. lipopolysaccharide (LPS) treatment, exogenous administration of viable pathogens (inoculation with *Escherichia coli*), and disruption of the endogenous protective barrier, i.e. cecal ligation and puncture model (Stortz et al., 2017; Seemann et al., 2017). Lipopolysaccharide (LPS), a major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria, plays a key role in host-pathogen interaction with the innate immune system (Park and Lee, 2013; Maldonado et al., 2016). In total, the existing data suggest that shortly after LPS administration, high levels of pro-inflammatory cytokines are released (Remick et al., 2000). This leads to the rapid development of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and subsequent dose-dependent mortality (Stortz et al., 2017). Thus, LPS can be used to study the pathophysiological processes of endotoxemia or SIRS and as a model of endotoxic shock, but not of sepsis in general (Deitch, 1998; Seemann et al., 2017).

Animal models of sepsis can provide significant insights into the complex pathophysiology of sepsis-induced multiple organ dysfunction. Such models include intravascular infusion of endotoxin or live bacteria, bacterial peritonitis, cecal ligation and perforation, soft tissue infection, pneumonia, or meningitis models using different animal species including rats, mice, rabbits, dogs, pigs, sheep, and nonhuman primates (Poli-de-Figueiredo et al., 2008). The most popular preclinical sepsis model involves mice. Various mice models with different patterns have been generated, among which endotoxin, bacterial infusion, cecal ligation and puncture, and colon ascendance stent peritonitis models are the most commonly used (Hwang et al., 2019).

LPS stimulates the synthesis and release of several metabolites from mammalian phagocytes, i.e. reactive oxygen species (ROS) that are considered to play a crucial role in the pathogenesis of endotoxic shock via oxidative stress generation (Skibska et al., 2006; Torres-Rodríguez et al., 2016). ROS may cause cellular damage by reacting with lipids, proteins, and DNA. Oxidative modification of lipids and carbonyl derivatives of proteins mediated by ROS is called lipid peroxidation and protein oxidation (Kehrer, 1993; Mehlhase and Grun, 2002). In the current study, the blood lipid peroxidation and protein damage were evaluated in LPS-induced endotoxemia in mice. Lipid peroxidation was measured as blood 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels, while protein damage was assessed as the levels of aldehydic and ketonic derivatives of oxidatively modified proteins in the blood.

Healthy male white Balb/c mice (*Mus musculus*), weighing about 20–30 grams and aged about 2–3 months, were used in the experiments. The data were collected from 12 adult animals divided into two groups, i.e. untreated control (6 animals) and LPS-induced systemic inflammatory response syndrome (6 animals). The experiments were performed by the Guidelines of the European Union Council and the current laws and were approved by the Ethical Commission (2612/2016).

Lipopolysaccharide [*Escherichia coli* LPS 026:B6; Sigma-Aldrich Sp. z.o.o, Poznan, Poland; lyophilized powder chromatographically purified by gel filtration (protein content < 1%) was used for modeling systemic inflammatory response syndrome in mice. Shortly before use, LPS was

dissolved in sterile normal saline (0.9% NaCl). Injections of LPS were administered once, intraperitoneally, at a dose of 150 µg per mouse, as described by Blanqué and co-workers (1999) and Yang and co-workers (2013). Negative control mice were injected with 0.9% NaCl. Samples were collected 24 h after the last drug administration. Blood samples were taken from the caudal vein using syringes in less than 1 min and transferred to tubes with K2-EDTA.

TBARS were measured using the method described by Kamyshnikov (2004). TBARS level was expressed in nmol of malonic dialdehyde (MDA) per mL of blood. The carbonyl derivatives of oxidatively modified proteins (OMP) rate was estimated using the reaction of the resultant carbonyl derivatives of amino acids with 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNFH), as described by Levine and co-workers (1990) and modified by Dubinina and co-workers (1995). Levels of carbonyl groups were determined spectrophotometrically at 370 nm (aldehydic derivatives, AD) and 430 nm (ketonic derivatives, KD), and expressed in nmol per mL of blood.

Results were expressed as mean ± S.D. All variables were tested for normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov and Lilliefors tests ($p > 0.05$) and homogeneity of variance was checked by using Levene's test. The significance of differences in parameters between untreated control and treated groups was examined using a one-way analysis of variance (ANOVA). We also used Bonferonni's post-test (Zar, 1999). Statistical analysis was carried out in one way, i.e. the LPS-induced systemic inflammatory response syndrome was compared with those of the untreated control group. Differences were considered significant at $p < 0.05$. All statistical calculations were performed on separate data from each group with STATISTICA 8.0 software (StatSoft Inc., Poland).

TBARS are end products of the terminal stages of lipid peroxidation (Gyurászová et al., 2018). The TBARS concentration was significantly increased in the LPS-exposed mice compared to the untreated control group (23.14 ± 3.44 nmol•mL⁻¹ vs 16.23 ± 2.11 nmol•mL⁻¹, increase by 42.6%, $p = 0.000$). Intensification of free radical oxidation causes changes in proteins and their structure. Such changes are presented as carbonyl derivatives consisting of aldehydic and ketonic derivatives of OMP (Bargnoux et al., 2009; Hauck and Bernlohr, 2016). The concentration of aldehydic derivatives of OMP was higher in the LPS-exposed group compared to the untreated control mice (12.51 ± 1.16 nmol•mL⁻¹ vs 4.22 ± 0.56 nmol•mL⁻¹, increase by 196.5%, $p = 0.000$). LPS-induced systemic inflammatory response syndrome statistically significant increased the concentration of ketonic derivatives of OMP, i.e. (11.25 ± 1.13 nmol•mL⁻¹ vs 3.98 ± 0.22 nmol•mL⁻¹, increase by 182.7%, $p = 0.000$) compared to the untreated controls. Oxidative stress has also been known to contribute to the pathophysiology of LPS-induced systemic inflammatory response syndrome (Skibska et al., 2006; Pavlakou et al., 2017; Kurhaluk et al., 2017, 2018, 2020; Kim et al., 2020). In this study, mice treated with LPS displayed increased blood levels of the lipid peroxidation markers, TBARS, compared to saline-treated control mice. On the other hand, the levels of oxidatively modified proteins were more increased (1.96 and 1.83-fold increased, $p = 0.000$) compared to saline-treated control mice.

These results are concordant with the acknowledged prooxidant properties of LPS (Skibska et al., 2006; Torres-Rodríguez et al., 2016). These findings are in good agreement with recent studies showing that the systemic administration of LPS generally leads to the fulminant release of ROS, which is produced during the leukocyte respiratory induced oxygen burst induced by the LPS (Goode and Webster, 1993; Skibska et al., 2006; Kurhaluk et al., 2017, 2018, 2020). Macrophages activated by LPS lead to the overproduction of ROS (Lee et al., 2012; Zhang et al., 2019). On the other hand, the excess production of ROS is revealed to play a key role in potentiating macrophage activation, which eventually leads to excessive inflammation, resulting in various inflammatory diseases (Xu et al., 2015; Sheu et al., 2018; Zhang et al., 2019). Pedruzzi and co-workers (2012) and Ren and co-workers (2019) revealed that the nucleus translocation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is an important regulator in regulating the expression of antioxidant and anti-inflammatory factors in cell life activities. Moreover, Nrf2 is essential for suppressing ROS-induced inflammatory response (Zhao et al., 2014).

It is clear that while LPS induces oxidative stress, the combination of both oxidations of lipids and proteins is more highly toxic to the organism. As a consequence, protein damage and lipid peroxidation in the blood is highly expanded.

This research has been supported by The Visegrad Fund (Bratislava, Slovak Republic), and it is cordially appreciated by authors.

УДК: 636.1.09:616.72-002-036

РОЛЬ СПЕЦИФІЧНОЇ РОЗЧИСТКИ ТА АКТИВНОГО МОЦІОНУ У КОРЕКЦІЇ СТАНУ КОНЯ З ВРОДЖЕНОЮ КОНТРАКТУРОЮ ЗГИНАЧІВ ПАЛЬЦІВ. КЛІНІЧНИЙ ВИПАДОК

Агаркова К.І., аспірант, Державний біотехнологічний університет, м. Харків, Україна.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-9988-6021>

Контрактура (лат. contracture – стягання, звуження) є обмеженням рухливості в суглобі, що спричинюють зміни у м'яких тканинах, оточуючих суглоб. Контрактура може бути вродженою та набутою (R. M. Embertson, 1994).

Постнатальна контрактура згиначів пальців у коней зазвичай виявляється у віці 5-6 місяців, коли лоша починає активно рости та набирати вагу. Найефективнішим методом лікування вважається десмотомія до 6 місяців, одразу після діагностики даної патології. Проте навіть за виконання оперативного втручання прогноз щодо повного відновлення функціонального стану кінцівок є сумнівним (J. R. Rooney, 1985; A. Tnibar, 2010).

Об'єктом дослідження був кінь породи українська верхова, 2016 року народження, що належить приватному власнику та утримується у м. Харків.

В досліджуваному випадку оперативне втручання не дало позитивного результату та через рік-півтора тварина мала виражене випадіння путового суглоба вперед на правій грудній кінцівці, помірне випадіння на всіх інших кінцівках, та торцеві копита.

У віці двох років кінь мав активний щоденний моціон, оскільки випасався разом з табуном у полі увесь теплий сезон року. Під час холодного періоду тварину вигулювали у леваді та двічі на тиждень працювали на корді. Разом з тим проводилася розчистка з регулярністю у 2 місяці. Оскільки копита мали торцеву форму, дана маніпуляція була спрямована на значну обрізку п'яtkової частини копита, таким чином, щоб переносити вагу тіла тварини назад та вирівнювати кут путового суглоба. Після близько 2 років активного моціону та коректної розчистки вдалося вирівняти кут путового суглоба до майже вертикального, що значно полегшує рух тварини.

На момент проведення представленого дослідження тварині було 6 років.

Мета досліджень: дати експериментальне підтвердження ефективності специфічної розчистки та активного моціону у корекції стану коня з вродженою контрактурою згиначів пальців.

Методика досліджень. Для досягнення мети були вибрані наступні заходи – проведення рентгенографії та лабораторної діагностики сироватки крові. Рентгенографія була проведена у боковій проекції путового, вінцевого та копитного суглобів, та дорсолатеральній проекції зап'ясткового суглоба грудної правої кінцівки із застосуванням рентген-апарату «ARMAN-2». Під час лабораторної діагностики досліджували наступні показники: фракції глікозаміногліканів (ГАГ), хондроїтинсульфати, сіалові кислоти, серомукоїди та глікопротеїни. Дані показники були обрані для оцінки стану хрящової тканини у суглобах. Лабораторна діагностика виконувалась на базі клініко-діагностичної лабораторії «Алвіс-клас» (м. Харків).

Результати досліджень та їх інтерпретація. Результати рентгенодіагностики путового, вінцевого та копитного суглоба правої грудної кінцівки дають можливість