

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Шодиев Дмитрий Рахимович

**Изучение метаболизма костно-хрящевой ткани при метаболическом
фенотипе остеоартроза и возможности его коррекции**

1.5.4. Биохимия

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Звягина Валентина Ивановна

Рязань – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Состояние проблемы остеоартроза и современные подходы к клиническому фенотипированию	16
1.2. Особенности метаболизма тканей сустава и возможности его контроля при остеоартрозе.....	23
1.3. Современные подходы к лечению пациентов с остеоартрозом.....	31
1.4. Потенциал применения мелатонина и его роль в окислительном стрессе	34
1.5. Энергетический метаболизм хрящевой ткани при остеоартрозе	40
1.6. Сукцинат-рецепторная ось в патогенезе остеоартроза	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	47
2.1. Общая характеристика исследования	47
2.1.1. Характеристика клинической части исследования	47
2.1.2. Общая характеристика пациентов.....	48
2.1.3. Экспериментальные клинические модели и схемы введения препаратов.....	50
2.2. Клинические методы исследования и шкалы	51
2.3. Получение биологического материала	55
2.4. Определение показателей костно-хрящевого метаболизма в сыворотке крови	56
2.5. Оценка показателей оксидативного стресса сыворотки крови	58
2.6. Определение липидного спектра сыворотки крови.....	59
2.7. Определение метаболитов в гомогенатах костно-хрящевой ткани	60
2.7.1. Определение количества белка в пробах гомогенатов.....	61
2.8. Характеристика экспериментальной части исследования <i>in vitro</i>	61
2.8.1. Условия культивирования клеток хондроцитов	62

2.8.2. Экспериментальные клеточные модели и схемы использования препаратов <i>in vitro</i>	63
2.8.3. Определение метаболитов в клетках линии хондроцитов.....	64
2.8.4. Определение количества белка в пробах <i>in vitro</i>	64
2.9. Статистическая обработка данных.....	64
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	66
3.1. Определение показателей костно-хрящевого метаболизма у пациентов с метаболическим фенотипом остеоартроза	66
3.2. Окислительная модификация белков у пациентов с метаболическим фенотипом остеоартроза.....	71
3.3. Особенности распределения сукцинат-рецепторной системы в костно-хрящевой ткани при метаболическом фенотипе остеоартроза	76
3.4. Оценка влияния мелатонина на клинико-биохимические показатели пациентов с метаболическим фенотипом остеоартроза.....	82
3.4.1. Уровень ночной секреции мелатонина в сыворотке крови и нарушения сна у пациентов с метаболическим фенотипом остеоартроза.....	82
3.4.2. Влияние мелатонина на клинико-биохимические показатели пациентов с метаболическим фенотипом остеоартроза.....	84
3.5. Особенности сукцинат-рецепторной системы хондроцитов метаболического фенотипа остеоартроза в условиях окислительного стресса <i>in vitro</i>	89
3.6. Локализация сукцинатного рецептора в хондроцитах метаболического фенотипа остеоартроза	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
ВЫВОДЫ	100
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	106

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Остеоартроз (ОА) – основная причина боли и временной нетрудоспособности у взрослого дееспособного населения и пожилых людей [199]. Распространенность клинически выявленного ОА с преимущественным вовлечением в процесс коленных и тазобедренных суставов на территории Российской Федерации составляет 13% [11].

В нозологической структуре ОА, по мнению некоторых авторов, лидирующие позиции занимает поражение коленного сустава, а затем тазобедренного сустава как самых нагружаемых [81, 116, 122]. В свою очередь, рост заболеваемости ОА ставит проблему своевременной диагностики и лечения заболевания актуальной. С ростом числа пациентов с запущенными формами ОА прогнозируется рост тотальной артропластики тазобедренного и коленного суставов [188]. Возрастает экономическое бремя на систему здравоохранения [211, 234], что подчеркивает необходимость управления факторами риска, изучения механизмов развития и прогрессирования заболевания и разработки новых эффективных методов лечения ОА.

Известно, что распространенность ОА зависит от половозрастных характеристик, страны, а вместе с ними – особенностей и уровня жизни [187]. Выделяют: системные (пол, раса, генетические причины), локальные (травмы, дисплазия суставов) и внешние (ожирение, спортивная нагрузка, профессиональные особенности) факторы риска. Так, по данным экспертов ВОЗ, на 2016 г. 39% взрослых старше 18 лет имели избыточную массу тела, 13% – страдали ожирением [253], а распространенность ожирения в России в возрасте 25-64 лет линейно увеличилась среди мужчин с 14,3% до 36,3% и с 10,7% до 52,3% среди женщин [6].

Важным аспектом ОА является вариабельность клинических и структурных

проявлений, которая может быть одним из основных факторов, связанных с трудностями определения универсальных терапевтических стратегий [70]. Ввиду этого на основе факторов риска выделяют характерные фенотипы заболевания. Аналогичным образом, сочетание нарушений, составляющих метаболический синдром, позволяет выделить метаболический фенотип ОА [176]. Ожирение, являясь основным компонентом метаболического синдрома, активирует множество каскадов патофизиологических и воспалительных изменений в суставе [145]. Например, интерлейкин -1 β , -6 (IL-1 β , IL-6) и фактор некроза опухоли (TNF- α), вырабатываемые клетками жировой ткани, стимулируют распад внеклеточного матрикса хряща у пациентов с ОА [251]. Эти цитокины увеличивают генерацию внутриклеточных активных форм кислорода (АФК), что ведет к ингибированию хондрогенеза [197]. Кроме того, провоспалительные цитокины усиливают экспрессию генов, кодирующих матриксные металлопротеиназы (MMPs), и вызывают постепенную потерю протеогликанов с последующей деградацией коллагена II типа [68].

Наряду с уже известными механизмами возникновения и прогрессирования ОА все больше интереса возникает в изучении потенциально новых путей патогенеза ОА. В настоящее время в научной литературе имеются данные, которые подтверждают потенциальную взаимосвязь между промежуточными продуктами цикла трикарбоновых кислот и прогрессированием ОА, однако результаты таких исследований требуют более глубокого изучения [207]. Уровень сукцината регулируется метаболическими потребностями клетки, что может способствовать его увеличению в матриксе митохондрий и выходу избыточного количества метаболита во внеклеточную среду, активируя специфический рецептор SUCNR1 и тем самым влияя на различные клеточные функции [222]. Сукцинат-рецепторное взаимодействие является физиологическим сенсором внеклеточных концентраций сукцината, а циркулирующие уровни сукцината являются предметом внимания исследователей при различных патологиях [102]. Имеющаяся ограниченная информация о наличии SUCNR1 в

хондроцитах человека [106] во многом обусловлена недостаточными сведениями о профиле экспрессии неспецифических генов хондроцитов. Однако известно о возможности экспрессии рецептора на поверхности клеток, участвующих в формировании синовиального сустава [88].

Связь между ожирением и патологией суставов довольно сложна и многогранна, в результате чего возникает необходимость в изучении факторов, регулирующих обмен жировой, хрящевой и костной тканей [12]. Такой перспективной молекулой является гормон шишковидной железы – мелатонин. Так, в многонациональном когортном исследовании было обнаружено, что у пациентов с ожирением уровень мелатонина был на 16,9% ниже, чем у пациентов с нормальным весом [37], а нарастающие знания о роли мелатонина в регулировании костно-хрящевого метаболизма позволяют предположить о дефиците гормона как о факторе, который способствует прогрессированию дегенеративных процессов костно-хрящевой ткани [203]. В свою очередь, перспективы клинического применения мелатонина становятся все более обоснованными [3, 7, 13].

Таким образом, современные подходы к клиническому фенотипированию ОА позволили выделить метаболический фенотип заболевания и поставить проблему изучения его клинико-биохимических особенностей актуальной.

Степень разработанности проблемы

Данные об особенностях костно-хрящевого метаболизма при метаболическом фенотипе остеоартрита в литературе ограничены.

Метаболические эффекты сукцинат-рецепторной системы при большинстве патологий остаются не изученными, однако имеющиеся данные позволяют рассматривать рецептор как часть сигнального пути в патогенезе ОА, объясняющего воспаление и нарушения энергетического метаболизма [129, 227]. Особенности распределения сукцинат-рецепторной системы костно-хрящевой

ткани при метаболическом фенотипе остеоартрита до настоящего времени не освещались, следовательно, возникает необходимость в изучении сукцинат-рецепторной системы при данной патологии.

Рядом исследований нарушения в суточной секреции мелатонина у пациентов с избыточным весом рассматриваются как ведущая причина гормонально-метаболических нарушений [37, 203], что потенциально может сопровождаться изменением метаболизма костно-хрящевой ткани.

Мелатонин, индуцируя экспрессию антиоксидантных ферментов и сигнальных белков, проявляет защитные эффекты при развитии патологических состояний, протекающих на фоне ОС [8, 107, 108], однако влияние мелатонина на клиничко-биохимические показатели при метаболическом фенотипе ОА и сукцинат-рецепторную систему хондроцитов метаболического фенотипа ОА в условиях окислительного стресса *in vitro* не освещалось. Вследствие чего, изучение и понимание механизмов ОС и их связи с повреждением тканей суставов необходимо для разработки новых терапевтических подходов к профилактике и лечению метаболического фенотипа ОА.

Цель исследования

Целью данного исследования является изучение метаболизма костно-хрящевой ткани при метаболическом фенотипе остеоартроза *in vivo* и *in vitro*, а также оценка возможности его коррекции мелатонином.

Задачи исследования

1. Исследовать изменения показателей маркеров метаболизма костно-хрящевой ткани у пациентов с метаболическим фенотипом остеоартроза в сыворотке крови.

2. Проанализировать изменения показателей окислительного стресса в

сыворотке крови и костно-хрящевой ткани у пациентов с метаболическим фенотипом остеоартроза.

3. Изучить особенности локализации сукцинат-рецепторной системы в костно-хрящевой ткани различных зон сустава при метаболическом фенотипе остеоартроза.

4. Оценить влияние мелатонина на клинико-биохимические показатели пациентов с метаболическим фенотипом остеоартроза.

5. Изучить влияние мелатонина на уровень SUCNR1 и его лиганда сукцината в хондроцитах метаболического фенотипа остеоартроза в условиях окислительного стресса *in vitro*.

Научная новизна

В ходе выполнения работы показано, что у пациентов метаболического фенотипа ОА с выраженными показателями клинических проявлений ОА наблюдались более активные процессы костного ремоделирования, которые характеризуются повышением уровня костного изофермента щелочной фосфатазы (КЩФ), повышением активности кислой фосфатазы (КФ) и снижением уровня кальция (Ca^{2+}) сыворотки крови, сопровождающиеся усилением окислительного стресса и увеличением количества карбонилированных производных аминокислотных остатков в белках сыворотки крови и костно-хрящевой ткани.

Исходные показатели ОМБ пациентов с метаболическим фенотипом ОА характеризовались повышением уровня первичных маркеров фрагментации и, следовательно, соответствовали начальной степени развития окислительного стресса, сопровождались снижением активности ферментативного звена антиоксидантной защиты и несколько сниженной активности СОД сыворотки крови.

Выявлено, что у пациентов с метаболическим фенотипом ОА наблюдается

высокий уровень SUCNR1 в тканях сустава с преимущественным увеличением количества SUCNR1 в субхондральной зоне кости. Впервые у пациентов с метаболическим фенотипом ОА обнаружены более высокие уровни сукцината в субхондральных отделах кости, нагружаемых и не нагружаемых зонах хряща суставов.

Добавление в схему лечения метаболического фенотипа ОА препарата мелатонин было связано с уменьшением уровня маркеров костного ремоделирования - снижением уровня КЩФ, активности КФ и повышением уровня Ca^{2+} в сыворотке крови, в сравнении с исходными показателями. На фоне лечения пациентами отмечалось улучшение качества сна по шкалам субъективной оценки качества и количества сна и положительная динамика клинического течения ОА.

На первичных культурах хондроцитов впервые представлено, что добавление мелатонина в питательную среду хондроцитов с последующей инкубацией в течение 24 ч. не приводило к статистически значимым изменениям уровня SUCNR. Сходное ограничение прямой регуляции мелатонином сукцинат-рецепторной оси отмечалось и на уровне сукцината как лиганда SUCNR1 при используемых дозировках 100 мкМ и 500 мкМ. Показано, что окислительный стресс, моделируемый путем добавления в клеточную среду хондроцитов метаболического фенотипа ОА человека H_2O_2 в конечной концентрации 200 мкМ, приводил к увеличению уровня SUCNR1 и его лиганда сукцината.

Выявлено, что предварительная инкубация клеток хондроцитов метаболического фенотипа ОА человека с мелатонином в дозировках в 100 и 500 мкМ ограничивала индуцированное H_2O_2 накопление сукцината и снижала уровни SUCNR1 в клетках.

Теоретическая и практическая значимость работы

Диссертационное исследование носит практический и фундаментальный

характер. Представленные клинические и экспериментальные данные характеризуют метаболический фенотип ОА как заболевание, сопровождающееся активными процессами ремоделирования костно-хрящевой ткани, сопряженными с окислительным стрессом и коррелирующими со специфическим клиническим профилем.

Влияние мелатонина как компонента консервативного лечения метаболического фенотипа ОА на процессы костного ремоделирования и показатели метаболического синдрома демонстрируют остеогенную и метаболическую активность препарата.

Сходство в повышении уровня компонентов сукцинат-рецепторной системы в гомогенатах костно-хрящевой ткани метаболического фенотипа ОА в целом и в хондроцитах метаболического фенотипа ОА в условиях окислительного стресса, в частности, даёт основания предполагать, что нарушение регуляции сукцинат-рецепторной системы при метаболическом фенотипе ОА опосредовано действием окислительного стресса и имеет важное значение в понимании процессов повреждения тканей.

Полученные в ходе диссертационного исследования экспериментальные данные указывают на то, что сукцинат-рецепторная система при метаболическом фенотипе ОА демонстрирует перспективность в изучении возможностей применения мелатонина и других антиоксидантов как компонентов в лечении метаболического фенотипа ОА.

Методология и методы исследования

Субъектом исследования явились пациенты с метаболическим фенотипом остеоартрита, пациенты с переломом шейки бедренной кости без признаков остеоартрита и первичная клеточная линия хондроцитов метаболического фенотипа остеоартрита человека. Контрольную группу составили здоровые добровольцы без клинических признаков остеоартрита.

Материалом исследования служила сыворотка крови, гомогенаты костно-хрящевой ткани и лизаты клеток хондроцитов.

Работа выполнена на базе кафедры биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, лаборатории клеточных технологий ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, ортопедического отделения ГБУ РО ГКБСМП, г. Рязань, ортопедического отделения ГБУ РО ОКБ, г. Рязань.

Хрящевой олиgomатриксный пептид (COMP) в сыворотке крови измеряли методом ИФА с помощью набора COMP EIA (Immunodiagnostic systems (IDS), Maryland, U.S.A). КЩФ определяли методом ИФА с помощью набора Ostase VAP EIA (Immunodiagnostic systems (IDS), Maryland, U.S.A). Активность КФ в образцах сыворотки крови измеряли унифицированным методом по конечной точке с использованием набора реагентов (Витал Диагностикс, Россия). Уровень сывороточного кальция (Ca^{2+}) измеряли спектрофотометрическим методом с использованием набора реагентов для определения кальция в биологических жидкостях с о-крезолфталеин комплексом (Агат, Россия). Концентрацию общего холестерина (ОХ), холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и триглицеридов (ТГ) сыворотки крови определяли с использованием коммерческих наборов (Ольвекс диагностикум, Россия). Уровень SUCNR1 в гомогенатах костно-хрящевой ткани и лизатах хондроцитов измеряли методом ИФА с помощью набора SUCNR1 EIA (BlueGene, China). Для оценки локализации SUCNR1 в клетках выполняли иммуноцитохимическое исследование с использованием поликлональных антител к SUCNR1 (DF6478 Polyclonal NR1I2 Antibody, «Cloud-Clone Corp», КНР).

Активность СОД сыворотки крови измеряли по торможению реакции окисления кверцетина. Активность СДГ в гомогенатах костно-хрящевой ткани определяли спектрофотометрическим методом. Сукцинат в гомогенатах костно-хрящевой ткани и лизатах хондроцитов определяли колориметрическим методом с помощью набора Succinate Assay Kit (Abcam, United Kingdom). Определение

окислительной модификации белков в сыворотке крови и в гомогенатах костно-хрящевой ткани проводили по методу R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой. Для оценки устойчивости системы к окислительному воздействию проводили анализ резервно-адаптационного потенциала. Измерение концентрации белка в гомогенатах костно-хрящевой ткани осуществлялось биуретовым методом с использованием коммерческих наборов производства фирмы «Агат» (Россия). Измерение концентрации белка в клеточных лизатах проводили методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus («Bradford») Assay Kit, «ThermoFisher», США).

Положения, выносимые на защиту

1. У пациентов метаболического фенотипа остеоартроза наблюдаются более активные процессы костного ремоделирования и развитие системного окислительного стресса.

2. При метаболическом фенотипе остеоартроза фиксируется высокий уровень SUCNR1 и его лиганда сукцината в костно-хрящевых тканях сустава с преимущественным увеличением в субхондральных отделах кости.

3. Добавление в схему консервативного лечения метаболического фенотипа остеоартроза препарата мелатонин приводит к уменьшению процессов костного ремоделирования и вызывает улучшение клинического течения заболевания.

4. Экспериментальный окислительный стресс, моделируемый пероксидом водорода в конечной концентрации 200 мкМ, ассоциирован с повышением содержания сукцината и его специфического рецептора в хондроцитах метаболического фенотипа остеоартроза. Мелатонин *in vitro* препятствует повышению уровня SUCNR1 и дозозависимо ингибирует накопление сукцината в клетках хондроцитов метаболического фенотипа остеоартроза.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием адекватных и современных методов исследования с последующей систематизацией и статистической обработкой. Основные положения диссертации представлены, обсуждены и опубликованы в материалах конференций: Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2022); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные подходы в лечении травм и заболеваний опорно-двигательного аппарата» (Рязань, 2022); XXIX Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2023», Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2023); IV Конгрессе Ортобиология 2023 «Patient cases – от теории к практике» (Москва, 2023); «Зубаировские чтения: новое в коагулологии», Российской научно-практической конференции «Медицинская биохимия: достижения и перспективы», Казанский государственный медицинский университет (Казань, 2023); «Вреденовские игры 2024», Всероссийская конференция молодых ученых, НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена (Санкт-Петербург, 2024); XV Российская (итоговая) научно-практическая конкурс-конференция с международным участием студентов и молодых ученых «АВИЦЕННА – 2024» (Новосибирск, 2024).

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты диссертационной работы успешно внедрены и используются в учебном процессе студентов и клинических ординаторов на

кафедрах биологической химии; общей хирургии, травматологии и ортопедии; в деятельности центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, ортопедического отделения Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областная клиническая больница».

Личный вклад автора

Автор самостоятельно подготовил обзор литературы по направлению темы диссертационной работы, провел клиническую и экспериментальную части экспериментов *in vitro*, выполнил биохимические исследования, обработал и интерпретировал полученные результаты, подготовил печатные работы по изучаемой проблематике. Личный вклад автора в исследование превышает 90%.

Сведения о публикациях по теме диссертации

По результатам диссертационного исследования опубликовано 6 научных трудов, из которых 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации результатов диссертационных исследований, и индексируемых в международной цитатно-аналитической базе данных Scopus.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений, список литературы. Диссертация изложена на 135 страницах, иллюстрирована 23 рисунками и 13 таблицами. Список литературы представлен 255 источниками, из них 29 отечественных и 226 зарубежных авторов.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность доценту кафедры биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, д.м.н., доценту Звягиной В.И., доценту кафедры общей хирургии, травматологии и ортопедии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, к.м.н., доценту Рябовой М.Н. и ассистенту кафедры биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России Марсяновой Ю.А. за всестороннюю помощь на всех этапах исследования, при подготовке и публикации печатных работ; ректору ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, д.м.н., профессору Калинину Р.Е.; проректору по научной работе и инновационному развитию ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, д.м.н., профессору Сучкову И.А.; заведующему кафедрой биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, к.м.н., доценту Матвеевой И.В.; заведующему кафедрой фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, д.м.н., профессору Якушевой Е.Н.; профессору кафедры фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, д.м.н., доценту Щулькину А.В.; заведующему ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России к.м.н., доценту Никифорову А.А.; заместителю главного врача по хирургической помощи и организационной работе ГБУ РО ГКБСМП Филимонову С.К.; заведующему ортопедическим отделением ГБУ РО ОКБ Муранчику Ю.И.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Состояние проблемы остеоартроза и современные подходы к клиническому фенотипированию

Результаты исследований заболеваемости ОА показали, что разные подходы к определению заболевания на основе множества использующихся критериев диагностики ОА (клинические, рентгенологические или симптоматические) затрудняют сравнение между ними [25, 41]. В настоящее время наиболее часто используются симптоматические и рентгенологические критерии [25, 207].

Среди рентгенологических критериев нашли практическое применение: шкала Келлгрена-Лоуренса (Kellgren-Lawrence) [140], шкала Косинской Н.С. [14], метод измерения ширины суставной щели, индекс Крофта [83], критерии Американского колледжа ревматологии [44] и т.д. Шкала Келлгрена-Лоуренса является наиболее распространенной, где 0 - изменения отсутствуют; I – сомнительные рентгенологические признаки; II – минимальные изменения (небольшое сужение суставной щели, единичные остеофиты); III – умеренные проявления (умеренное сужение суставной щели, множественные остеофиты); IV – выраженные изменения (суставная щель почти не прослеживается, выявляются грубые остеофиты) [140].

По данным Каталонского регистра первичной медико-социальной помощи, показатели клинически выявленной заболеваемости ОА коленного сустава составили 6,5 / 1000 человеко-лет в целом, 8,3 для женщин и 4,6 для мужчин. Аналогичным образом заболеваемость ОА тазобедренного сустава и суставов кисти составляли: 2,1 и 2,4 (2,4 и 3,5 для женщин и 1,7 и 1,3 среди мужчин) [122]. В целом по Европе распространенность рентгенологически и симптоматически верифицированного ОА коленного сустава у лиц старше 55 лет среди женщин сопоставимо и равняется 29 и 23% соответственно; у мужчин 16 и 8% [116].

Распространенность рентгенологически и симптоматически верифицированного ОА тазобедренного сустава несколько ниже, 16 и 8% у женщин, 14 и 7 % у мужчин. Согласно Шведскому популяционному исследованию [81], к 2032 году доля населения в возрасте 45 лет и старше с любым критерием диагностированного ОА, увеличится с 26,6 до 29,5% для любой локации, с 13,8% до 15,7% для коленного сустава и от 5,8 до 6,9% для тазобедренного сустава. Таким образом, ОА представляет собой довольно распространенную социально значимую проблему, которую, несмотря на различные подходы к диагностике, объединяют сходные патогенетические механизмы, сопровождающиеся болью и потерей функции суставов.

ОА возникает в результате нарушения сложной системы биомеханической, биохимической и молекулярной обратной связи в структурах сустава. Это гетерогенная болезнь с широким спектром путей, которые приводят к аналогичным результатам совместного разрушения [33,86,90]. Некоторые причины ОА поддерживают обоснование определения фенотипов ОА [214]. С эпидемиологической точки зрения важно четко понимать факторы, которые способствуют развитию различных подтипов ОА, а с терапевтической точки зрения – идентификация фенотипов ОА позволит проводить целенаправленное лечение для конкретных подгрупп и, в результате, выявить более эффективные методы лечения.

В настоящее время ОА считается заболеванием с несколькими различимыми фенотипами, в разделении которых есть несколько подходов. Согласно одному из них, идентифицирован набор переменных, позволяющий различать фенотипы ОА как основу, определяющую течение, исходы заболевания и направление медикаментозной терапии [120]: 1) фенотип хронической боли с центральной сенсibilизацией; 2) воспалительный фенотип; 3) метаболический фенотип; 4) фенотип костно-хрящевого метаболизма; 5) механический фенотип; 6) фенотип минимального заболевания суставов.

В дополнение к таким фенотипам были предложены структурные фенотипы

ОА на основе метода магнитно-резонансной томографии (МРТ): воспалительный фенотип; фенотип субхондральной кости, характеризующийся выраженными изменениями субхондральной кости; менисковый или хряще-менисковый фенотип, который приводит к изменению биомеханики и последующей потере хряща; а также гипертрофический и атрофический фенотипы, характеризующиеся наличием крупных остеофитов или отсутствием их образования [54]. Однако последняя концепция имеет некоторые ограничения, поскольку структурные изменения перекрываются, и у человека может присутствовать более одного фенотипа.

Другая группа исследователей определила существование пяти потенциальных фенотипов, включая механический, гормональный, метаболический, аутовоспалительный и генетический, как дальнейшую стратегию группового деления пациентов с ОА в клинических исследованиях [179]. Еще один путь решения задачи фенотипирования ОА в этой области предложен на основе секвенирования РНК и анализа экспрессии определенных генов на уровне клетки, что коррелирует с клиническими исходами [209]. Было предположено, что прогрессирование ОА следует рассматривать с позиции отдельных локализаций: кость, хрящ и синовиальная оболочка – где эти ключевые ткани могут представлять разные подгруппы заболеваний как преобладающие, а тканеспецифичные изменения выявляются на определенной стадии [146].

Следует отметить, что выделенные фенотипы не обязательно соответствуют предлагаемому всеобъемлющему определению фенотипов ОА, и каждая из предложенных стратификаций может быть актуальна в контексте целей и задач исследования.

Оптимальной тактикой можно считать способность выявлять и воздействовать на каждую из этих стадий или подгрупп заболеваний. Таким образом, фенотип ОА можно представить как набор наблюдаемых признаков (этиологических факторов, факторов риска), которые могут идентифицировать и охарактеризовать подгруппу в определенной популяции.

Фенотипы характеризуются специфическими клиническими особенностями [183], биохимическими маркерами [170] и критериями визуализации [136], а патофизиологическая связь между фенотипами может заключаться в хроническом системном воспалении, инициируемом высвобождением медиаторов воспаления и окислительным стрессом [49].

Ожирение, особенно висцеральное, вероятно, основная причина метаболического синдрома (МС), который включает в себя сахарный диабет 2 типа, артериальную гипертензию, синдром обструктивного апноэ сна, связанную с метаболической дисфункцией стеатозную болезнь печени, инсулинорезистентность и дислипидемию [88,112,192]. В недавнем 5-летнем многоцентровом проспективном исследовании изучались предикторы радиологического прогрессирования ОА [40], где анализ результатов показал, что боль в коленях, синовит, отек костного мозга большеберцовой кости по данным МРТ и избыточная масса тела могут рассматриваться как основные компоненты этого заболевания.

Согласно определению Международной федерации диабета (IDF) [39,88], человек считается больным МС, если у него имеется центральное ожирение (окружность талии ≥ 90 см для мужчин и ≥ 80 см для женщин, индекс массы тела (ИМТ) >30 кг/м), плюс любые два из следующих четырех факторов: повышенный уровень триглицеридов (≥ 150 мг/дл); снижение уровня холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) (<40 мг/дл у мужчин, <50 мг/дл у женщин); повышенное артериальное давление (АД $\geq 130/85$ мм рт. ст.); повышенный уровень глюкозы в плазме натощак (≥ 100 мг/дл) или ранее диагностированный сахарный диабет (СД).

Адиipoциты и макрофаги рассматриваются как основные источники активной секреции адипокинов и провоспалительных цитокинов при ОА ассоциированным с метаболическим синдромом [109].

Многочисленными исследованиями, направленными на изучение адипокинов в биологических жидкостях с целью определения потенциальной

роли в патогенезе ОА, установлены их более высокие уровни у пациентов с ОА и метаболическим синдромом, чем у пациентов без него [87]. Например, лептин является универсальным гормоном, участвующим в контроле не только таких физиологических процессов, как обмен липидов, секреция инсулина, ангиогенез, но и одним из игроков в патогенезе ОА, регулируя синтез матрикса хряща [50]. Происходит это либо напрямую посредством активации ядерного фактора-каппа В (NF-κB), протеинкиназы С (PKC) и сигнальных путей митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), либо через внеклеточные сигнально-регулируемые пути (ERK) и янус-киназы (JNK) в хондроцитах человека [145].

Наблюдается и связь между уровнями адипонектина в сыворотке крови, биомаркерами ОА и местным синовиальным воспалением. В хрящевой ткани и первичных клетках хондроцитах ОА адипонектин приводил к увеличению продукции оксида азота (NO), IL-6, интерлейкина-8 (IL-8), васкулярной молекулы клеточной адгезии-1 (VCAM-1) [36], тканевого ингибитора металлопротеиназ-1 (TIMP-1) и матриксных металлопротеиназ-1,-3 и -13 (MMP-1,-3, -13) [33].

Параллельно с вышеуказанными молекулами у пациентов с ожирением инсулинорезистентные адипоциты выделяют избыток насыщенных свободных жирных кислот, активирующие макрофаги через сигнальный путь Toll-подобного рецептора 4 (TLR-4) [200].

В ответ эти клетки секретируют TNF-α, который через рецептор-1 фактора некроза опухоли альфа (R1 TNF-α) на адипоцитах активирует путь NF-κB.

В свою очередь это вызывает воспалительную реакцию и высвобождает еще больше свободных жирных кислот и провоспалительных цитокинов, замыкая порочный круг [96] (Рисунок 1).

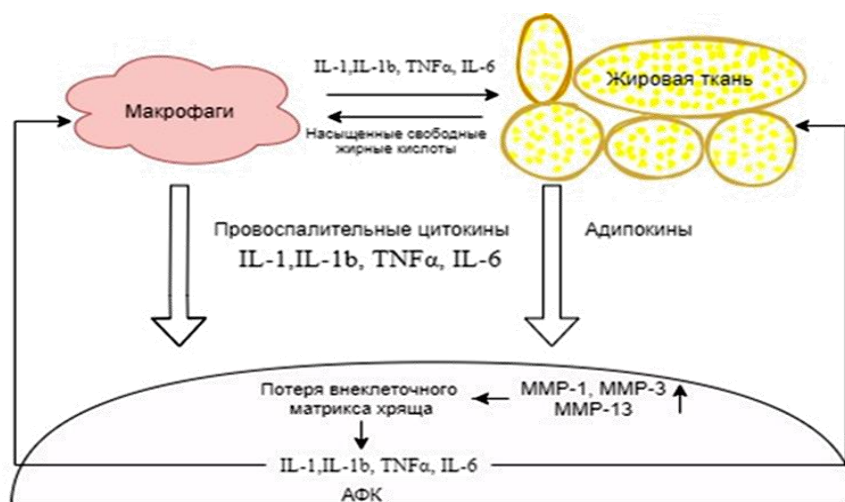


Рисунок 1 – Схема регуляции деструкции хрящевой ткани при метаболическом фенотипе ОА (адаптировано по Mobasher A. (2017) [242])

Как элемент метаболического синдрома интересен вопрос дислипидемии в роли потенциального фактора риска при ОА [89,115]. Дислипидемия представляет собой нарушение нормального соотношения липидных фракций крови с различными ее формами, которые классифицируют в зависимости от того, уровень каких именно липидов и липопротеинов выходит за пределы нормы [60].

Основной причиной дислипидемии при метаболическом синдроме является прогрессирующая инсулинорезистентность, которая приводит к липолизу и липотоксичности [174]. В последние годы форма дислипидемии, возникающая в результате согласованного действия инсулинорезистентности и ожирения, признана «метаболической дислипидемией», характеризующейся снижением концентрации холестерина ЛПВП, нормальным или незначительно повышенным уровнем холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), повышением концентрации триглицеридов (ТГ).

Крупный мета-анализ 48 исследований, целью которого являлось изучить распространенность дислипидемии у пациентов с ОА и выяснить, связаны ли ОА и дислипидемия, показал: средняя распространенность заболевания составила $30,2\% \pm 0,6\%$ среди 14 843 пациентов с ОА и $8,0\% \pm 0,1\%$ среди 196 168 пациентов без ОА. Риск дислипидемии был выше при ОА, чем без него, в целом

(отношение шансов (ОШ) 1,98, при 95% доверительном интервале (ДИ) от 1,43 до 2,75, $p \leq 0,0001$) и при ОА коленного сустава (ОА ОШ 2,27, при ДИ от 1,33 до 3,89, $p \leq 0,003$) и ОА кисти (ОШ 2,12, при ДИ от 1,46 до 3,07), $p \leq 0,0001$) [53].

Таким образом, липидные нарушения являются фактором риска ОА, а немеханическую концепцию развития ОА подтверждает включение в исследование пациентов с ОА кисти, где механическая осевая нагрузка исключена.

В ряде других работ, окисленные ЛПНП и рецепторы к ним рассматриваются одним из основных механизмов возникновения и прогрессирования метаболического фенотипа ОА [135,124]. Транспорт и обмен холестерина регулируется несколькими рецепторами. Например, мембранный белок-кластер дифференцировки 36 (CD 36) был признан связывающим фактором окисленных липопротеинов низкой плотности (оx-ЛПНП) и широкого спектра лигандов, таких как длинноцепочечные жирные кислоты, апоптотические клетки, анионные фосфолипиды и другие измененные липопротеины [64].

Позднее был обнаружен и более специфичный рецептор – окисленный рецептор 1 липопротеина низкой плотности (OLR1), который возможно участвует в патогенезе дегенерации хряща [144, 225] путем связывания оx-ЛПНП с OLR1 на поверхности хондроцитов, что в итоге приводит к высвобождению активных форм кислорода (АФК) [152]. Например, нокаутные по гену OLR1 мыши продемонстрировали, что разрушение хряща значительно подавлялось, а распространенность тяжелого ОА была ниже у таких мышей в возрасте 12 и 18 месяцев, и, наоборот, уровень экспрессии OLR1 и количество оx-ЛПНП увеличивалась с течением времени в хондроцитах мышей дикого типа [144]. Эти данные наглядно показывают, что система оx-ЛПНП-OLR1 может участвовать в старении хондроцитов *in vivo*, а дефицит OLR1 подавляет возрастную дегенерацию хряща.

Еще одним компонентом метаболического синдрома является гипергликемия, формирующая инсулинорезистентное состояние тканей

организма. Крупный мета-анализ факторов риска показал, что в свете патогенеза ОА гипергликемия приводит к повышению вероятности развития патологии на 13% [165]. В частности, длительная гипергликемия инициирует образование и накопление конечных продуктов гликирования (AGE) с последующим повреждением белков. AGE связываются со специфическим рецептором (RAGE) на мембране хондроцитов и инициируют внутриклеточную передачу сигналов со сверхэкспрессией провоспалительных и катаболических медиаторов [233], а на тканевом и клеточном уровне этот процесс характеризуется повышением жесткости матрицы хряща с уменьшением сопротивления силам сжатия и сдвига [93].

Таким образом, накопленные знания о механизмах развития ОА позволяют предположить, что МС может способствовать формированию метаболического фенотипа ОА. Следовательно, нарушения обменных процессов являются одними из ключевых факторов риска прогрессирования ОА, подчеркивая важность лечения метаболического синдрома как профилактической и интервенционной меры при метаболическом фенотипе ОА, что послужило предпосылкой для дальнейшего изучения и выполнения данной работы.

Особенности метаболизма тканей сустава и возможности его контроля при остеоартрозе

В патологический процесс ОА вовлечены все окружающие ткани суставов: синовиальная оболочка, хрящ, субхондральная кость и, наконец, капсула, связки и окружающая мускулатура [190]. Тот факт, что люди, страдающие ожирением, имеют значительный риск развития ОА в суставах, не несущих нагрузки, таких как кисти и запястья, позволяет предположить, что факторы, экспрессируемые жировой тканью, могут быть вовлечены в прогрессирование ОА [164].

Повышенный процент жира в организме и дисфункция жировой ткани тесно связаны с хроническим воспалительным процессом низкой интенсивности,

который является системной особенностью как ожирения, так и ОА. Хондроциты, синовиоциты, остеобласты, остеокласты и другие типы клеток в совокупности способствуют поддержанию патологических изменений в тканях сустава [225], а синовиальная оболочка одной из первых вовлекается в патологический процесс ОА, где обильная васкуляризация в полной мере способствует системным воздействиям, таким как воспаление и липотоксичность [86].

Помимо питания и смазки подвижных компонентов сустава, основной функцией синовиальной ткани является предотвращение слипания капсулы сустава с хрящом. Синовиальная оболочка у людей с ожирением демонстрирует выраженный фиброз, повышенную инфильтрацию макрофагами и экспрессию гена TLR4 [16], а тучные клетки являются важным источником цитокинов. Обнаружено, что количество тучных клеток в синовиальной ткани выше при ОА, чем при ревматоидном артрите (РА), даже несмотря на более низкую выраженность синовита [226]. Выявленные корреляции между рентгенологической тяжестью ОА и количеством тучных клеток [226] говорят о механической нагрузке как факторе, способствующем дегрануляции последних [156]. Следовательно, синовиальное микроокружение одним из первых вовлечено в прогрессирование ОА, а формирование высоковаскуляризованной инфильтрирующей соединительной ткани происходит не только при РА, но и при ОА.

Считается, что влияние синовиальной оболочки на функции хондроцитов играет ключевую роль в патофизиологии ОА [225]. В основном это вызвано высвобождением цитокинов и факторов роста, продуцируемых клетками синовиальной мембраны и диффундирующих в хрящ через синовиальную жидкость, что, среди других механизмов, приводит к усилению апоптоза хондроцитов [100]. Так, индуцируя экспериментальный ОА у мышей с нокаутом гена MMP-3, Blom и его коллеги [79] продемонстрировали активацию синовиальных макрофагов с последующим повреждением хряща, тем самым, указывая на значение синовиальной оболочки в развитии ОА.

Поскольку повреждение окружающих тканей сустава отмечается уже на начальных стадиях ОА, то возникает необходимость в поиске надежных маркеров диагностики и контроля эффективности лечения заболевания [121]. В настоящее время известен целый спектр метаболитов, позволяющих контролировать состояние хряща и других суставных тканей в различных целях [196].

Хрящевой олиgomатриксный пептид (СОМР) представляет собой неколлагеновый гликопротеин внеклеточного матрикса, принадлежащий к семейству тромбоспондинов и участвующий в сборке коллагена и контроле стабильности всего внеклеточного матрикса хряща [66]. Структурно СОМР является секреторным пентамерным белком, где каждое мономерное плечо состоит из N-концевого спирального домена, четырех повторов, подобных эпидермальному фактору роста 2 типа, семи кальций – связывающих повторов типа 3 и C-концевого глобулярного домена, который собирается в пентамер через его концевые домены [232].

Функционально СОМР способен взаимодействовать со многими другими компонентами внеклеточного матрикса [72] и благодаря своему строению связывать факторы роста и гидрофобные соединения, такие как витамин Д [232], что делает его связывающей молекулой, регулирующей клеточную структуру, фенотипы тканей и такие функции клеток хряща, как пролиферация, дифференцировка и прикрепление [38]. Кроме того, взаимодействие между СОМР и другими белками требует определенных условий. Например, слабокислая среда (рН: 6,75) способствует связыванию СОМР с TGF- β 1 [97], что позволяет говорить об изменениях хрящевого матрикса при ОА и предполагает важную функцию этого белка в модификации клеточной сигнализации и поддержании гомеостаза хряща. В хондроцитах и синовиальных клетках экспрессия СОМР может быть изменена провоспалительными цитокинами [162] и механическими сигналами, действующими на хрящ, впоследствии высвобождаясь в суставную жидкость и далее в кровь, где и может обнаруживаться [236].

На поздних стадиях ОА хрящ повреждается с заметной потерей как

внеклеточного матрикса, так и клеточного компонента. Изменяется микроокружение хондроцитов и клеточный ответ на механический стресс. Предполагается, что без защиты внеклеточным компонентом хряща от чрезмерной нагрузки, на поздних стадиях клетки подвергаются более сильному механическому стрессу, чем на ранних стадиях. При ОА экспрессия СОМР повышается в хондроцитах, прилегающих к измененному хрящу [67], что, возможно, связано с восстановлением повреждения и репарацией матрикса [196], а также с привлечением хондроцитов для замещения дефекта [76]. Однако, на ранних стадиях ОА содержание СОМР может снижаться, вероятно, из-за расщепления молекулы матриксной металлопротеиназой-13 (ММР-13) [127] и подавления синтеза СОМР в хондроцитах интерлейкином-1 β (IL-1 β) [201], что указывает на регуляцию СОМР провоспалительными сигналами [166]. Недавнее исследование показало, что и сам по себе СОМР может модулировать сборку коллагена/протеогликана, поддерживая фенотипы хондроцитов и, облегчая их миграцию и прикрепление, не оказывая независимого влияния на пролиферацию клеток [76]. Наряду с этим СОМР вместе с другими компонентами внеклеточного матрикса индуцирует фосфорилирование Erk1/2 и ингибирует гипертрофию суставных хондроцитов [74]. Таким образом, понимание значения СОМР как потенциального биомаркера и связанных с ним сигнальных путей важно для выявления взаимодействия хондроцитов и внеклеточного матрикса при ОА.

Воспалительное микроокружение при ОА, характеризующееся поляризацией Т-клеток [185] и высвобождением ими цитокинов, вместе с повреждением хрящевого матрикса индуцирует остеокластогенез в кости [185]. Путем дифференцировки макрофагов синовиального происхождения в функциональные остеокласты, воспалительный процесс способствует ремоделированию субхондральной кости [245]. Механизм миграции этих клеток из синовиальной оболочки в субхондральную кость остается неясным, однако, воспалительная остеопения может объяснить начальное субхондральное истончение или образование кист на более поздней стадии ОА.

В процессы ремоделирования субхондральной кости включаются не менее сложные механизмы, сопровождающиеся инфильтрацией воспалительными клетками, активацией остеобластов и образованием остеокластов. Следовательно, нарушение ремоделирования и изменение минеральной плотности кости характерно не только для остеопороза [19], но и для ОА.

Ремоделирование кости – это упорядоченный процесс, при котором за резорбцией следует образование костной ткани [180]. Остеокласты, остеобласты и третий тип клеток, остеоциты подают друг другу сигналы [184], способствующие этому упорядоченному процессу, а выделяемые ими продукты, именуемые как маркеры костного обмена, широко используются как в научных исследованиях, так и в клинической практике [85, 15].

В настоящее время накоплен достаточный опыт в измерении и интерпретации продуктов метаболизма костной ткани, которые включают широко используемые маркеры костеобразования (костная щелочная фосфатаза (КЩФ), остеокальцин (ОК) и проколлаген I N-пропептид) и резорбции (сывороточные С-телопептиды коллагена I типа, N-телопептиды коллагена I типа и кислая фосфатаза) [171], отражающие работу, как остеобластов, так и остеокластов. Продукция белков костного матрикса остеобластами, которые образуют органический каркас кости, отражается в выработке КЩФ, ОК и N-терминального фрагмента проколлагена I типа (P1NP). Удаление костного органического матрикса кости после ферментативного расщепления отражается в синтезе фрагментов деградации коллагена I типа (N- и С-телопептиды коллагена I типа), высвобождении фермента кислой фосфатазы и растворении гидроксиапатитов с высвобождением кальция в кровотоки [15].

Щелочные фосфатазы представляют собой мембраносвязанные гликопротеины, которые гидролизуют моноэфиры фосфатов при щелочном pH. У человека обнаружены 4 изофермента: плацентарный, зародышевый, кишечный и тканеспецифичный (печень, кости и почки) [249]. Все тканеспецифичные изоформы имеют одинаковую аминокислотную последовательность, но

различаются посттрансляционной модификацией. КЩФ богата остатками сиаловой кислоты и представляет собой гомодимер, прикрепленный к мембране матриксных везикул и остеобластов. КЩФ отщепляется от мембраны фосфолипазой, а затем циркулирует в виде растворимого гомодимера в крови, где и определяется как маркер костеобразования [186].

Основными субстратами КЩФ являются пиридоксаль-5'-фосфат и пирофосфат, являющийся ингибитором минерализации. Прикрепленная к мембране фосфатаза гидролизует пирофосфат до фосфата, который является субстратом для образования кристаллов гидроксиапатита, следовательно, КЩФ отражает фазу минерализации костеобразования. Хотя функция фермента в минерализации тканей широко признана, важно отметить, что КЩФ играет дополнительную роль во время развития опорно-двигательного аппарата [244]. Кроме того, экспрессия КЩФ в костном мозге снижается с возрастом, а дефицит этого фермента опосредует деградацию костной ткани [42].

Недавние результаты, полученные на клетках-предшественниках, показали, как КЩФ экспрессируется и модулирует функцию митохондрий и уровни АТФ в костных и мышечных клетках [172], что демонстрирует новое понимание механизмов, с помощью которых КЩФ может функционировать в клетках-предшественниках, влияя на здоровье опорно-двигательной системы. Наряду с этим, полученные данные могут иметь отношение к метаболическим нарушениям, учитывая, что митохондриальная дисфункция и КЩФ связаны с ожирением, резистентностью к инсулину и метаболическим синдромом [205, 241]. Так, A. Corrado и его коллеги установили, что за счет локальной продукции адипокинов клетки субхондральной кости вовлечены в процессы ремоделирования субхондральных отделов путем образования остеофитов и склероза, оказывая проостеогенное воздействие [182].

Сопутствующая повышенная активность остеобластов приводит к пространственной реминерализации, остеосклерозу и усиленной кальцификации глубокой зоны хряща. На более поздней стадии ОА кальцинированный хрящевой

слой исчезает, а костная пластинка значительно утолщается. Поскольку субхондральная кость действует как амортизатор для прилегающего суставного хряща, новообразование кости и субхондральный склероз увеличивают не только ее жесткость, но и снижают сопротивление упругим силам, вызывая дисбаланс в распределении механических напряжений, чрезмерной нагрузке на суставной хрящ, что, в свою очередь, вызывает его износ.

Для моделирования подобных процессов Jianxi Zhu и соавт. создавалась супрафизиологическая нагрузка в коленном суставе путем повреждения передней крестообразной связки [131]. Было выдвинуто предположение, что вышеописанные изменения субхондральной зоны кости опосредованы через мишень комплекса рапамицина 1 (mTOR1), которая активируется в преостеобластах и функционирует через сигнальные комплексы 1 и 2 (TORC1, TORC2), тем самым регулируя клеточный рост и выживание. Однако, как активируется механизм, с помощью которого ее повышенный метаболизм способствует дегенерации хряща при ОА, остается не до конца ясным. Но можно предположить, что в условиях коморбидной патологии при ОА возникающие метаболические нарушения могут привести к изменению механизмов функционирования клеток субхондральной кости и их способности к пролиферации на разных стадиях заболевания.

В исследовании на овариэктомированных мышах с ОА изменение фенотипа остеобластов субхондральной кости в условиях дефицита эстрогенов проявлялось в их иной способности к пролиферации, дифференцировке и минерализации [129]. Увеличение экспрессии остеогенных генов (ЩФ, коллагена I типа и транскрипционного фактора Runx-2) и снижение минерализации костной ткани в этих условиях предполагает, что остеобласты при недостатке эстрогенов развиваются только до определенной точки и не могут полностью дифференцироваться в зрелые формы, продуцирующие минерализованный матрикс [137]. На это указывает стабильный уровень матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), ОК и повышенные уровни маркеров образования и резорбции

кости, что говорит о высоком обмене костной ткани и избыточном образовании остеоида, как о еще одном важном патологическом изменении при ОА. Сходные нарушения в процессах созревания и минерализации, но при повреждении тканей губчатой кости обнаруживаются при дефиците мелатонина на моделях пинеалэктомированных животных [82], где посредством иммуноокрашивания отмечено снижение экспрессии белков Runx-2, остеопонтин (ОП), ОК и фермента ЩФ на разных стадиях созревания остеобластов [82].

Параллельно модификации остеобластов в процесс ремоделирования субхондральной кости активно вовлекаются остеокласты, где основным ферментом их деятельности считается кислая фосфатаза (КФ). КФ представлена группой ферментов, которые гидролизуют широкий спектр небольших органических фосфомоноэфиров в кислых условиях [47].

Макрофагическая или тартрат-резистентная КФ представляет собой фосфопротеинфосфатазу разрушающую остеопонтин - белок, который связывается с интегринами на поверхности остеокластов и инициирует их адгезию. Разрушая межмолекулярные связи остеокластов с образованием активных форм кислорода, КФ способствует миграции клеток [135]. Например, повышенная плотность остеокластов в средней трети медиального плато большеберцовой кости была связана с клиническими симптомами ОА коленного сустава, а концентрация кислой фосфатазы в сыворотке, коррелировала с количеством субхондральных остеокластов и была статистически значимо связана с болью при ОА [175].

Таким образом, накопленные знания о патогенезе ОА показывают, что все структурные элементы сустава вовлечены в возникновении ОА, а изучение особенностей костно-хрящевого метаболизма при метаболическом фенотипе ОА может служить потенциальной точкой приложения в терапии данного заболевания.

Современные подходы к лечению пациентов с остеоартрозом

Лечение ОА представляет собой сложную и междисциплинарную проблему, с поэтапным подходом и учетом индивидуальных особенностей каждого пациента. Традиционно варианты коррекции классифицируются на фармакологические, нефармакологические, хирургические, дополнительные и/или альтернативные методы, которые чаще используются в комбинации для достижения оптимальных результатов [41].

Зачастую пациенты обращаются за лечением или на поздних стадиях ОА, в случае, когда проведенный комплекс консервативных мероприятий не показывает ощутимого результата и нарушенная функция конечности или конечностей значительно ограничивает привычный образ жизни. Тогда выработанная хирургами-ортопедами тактика приведет к оперативному лечению [211]. Наиболее частым методом является имплантация протеза, являющаяся значительным травмирующим фактором для костных структур и окружающих тканей, что, как известно, приводит к осложнениям [32], и, как следствие, к неудовлетворительным функциональным результатам, поскольку в большинстве случаев эти пациенты имеют ряд серьезных сопутствующих заболеваний [238].

Вместе с тем, даже при отсутствии осложнений пациент может быть не удовлетворен исходами эндопротезирования в связи с сохраняющимся болевым синдромом, нарушением функции конечности, завышенными ожиданиями от результатов лечения [2] и т.д., а нарастающая психоэмоциональная напряженность коморбидных больных усугубляет положение.

Однако и консервативные методы лечения не лишены недостатков, поскольку отсутствует устойчивая система консервативного подхода к терапии дегенеративно-дистрофических заболеваний суставов с учетом фенотипа, а стратегия фармакологического лечения в основном направлена на облегчение боли, функциональное улучшение и повышение качества жизни пациентов.

Широко применяемые нестероидные противовоспалительные препараты

(НПВП), имея хороший эффект в отношении боли и функционального результата короткими фиксированными дозами, несколько ограничивают свой потенциал применения ввиду имеющихся негативных влияний на сердечно-сосудистую систему и желудочно-кишечный тракт [1], а также обладают лишь кратковременным и симптоматическим эффектом.

Дополнение к НПВП составляют симптоматические препараты замедленного действия (Symptomatic Slow Acting Drugs for Osteoarthritis (SYSADOA)), которые назначаются в инъекционной или пероральной форме, что зависит от клинической ситуации, пожеланий пациента и решения врача на основе собранного анамнеза. По результатам международных исследований, симптоматический эффект SYSADOA при приеме пероральных средств проявляется на 4–12 неделе, т. е. эффективны в краткосрочной перспективе [75]. Однако в настоящее время есть противоречивые данные о терапевтических результатах симптоматического и противовоспалительного действия этих препаратов и их способности замедлять прогрессирование ОА как при коротком [85], так и при длительном применении [110].

В здоровом суставе гиалуроновая кислота (ГК), присутствующая в синовиальной жидкости, имеет уникальные физико-химические свойства [154]. Она обладает вязкоупругими свойствами, которые позволяют ей действовать как смазка при низких скоростях сдвига при медленных движениях, а также как эластичное твердое вещество при высоких скоростях сдвига, обеспечивая амортизацию при быстрых движениях. ГК оказывает хондропротекторное и противовоспалительное действие, а также способствует синтезу и построению протеогликанов [235].

При ОА баланс между синтезом и деградацией ГК нарушается, что приводит к снижению концентрации ГК в суставе и впоследствии вязкости суставной жидкости. Поэтому внутрисуставные инъекции ГК рассматриваются как альтернатива в комплексном подходе к лечению ОА и проводятся с целью восстановления концентрации ГК и, следовательно, вязкоэластичных свойств

синовиальной жидкости.

Поскольку препараты ГК различаются структурой, методом получения и молекулярной массой, то в итоге имеется широкий разброс в реологических свойствах и профиле эффективности у разных препаратов [252].

Исследования в области клеточных технологий позволили применить внутрисуставные инъекции мультипотентных стволовых клеток (МСК), которые приводили к уменьшению боли и функциональному улучшению в ряде клинических и доклинических испытаний [22]. Обогащенная тромбоцитами плазма (PRP) включает модуляцию внутрисуставной среды путем введения аутологичных продуктов крови в сустав, что может привести к уменьшению воспалительного процесса и способствовать хондрогенезу [243]. Многочисленные исследования показали, что антиноцицептивные и клеточно-пролиферативные свойства PRP являются эффективными ингибиторами процесса ОА [50]. Но, несмотря на достижения в определенных областях, сохраняется значительное разнообразие в отношении используемых схем лечения, продолжительности периода наблюдения, отбора пациентов и оценки клинически значимых результатов [128].

Генно-инженерные препараты получили широкое распространение в лечении больных РА, однако все чаще рассматриваются и в терапии ОА. Например, танезумаб является высокоселективным иммуноглобулином, антителом против фактора роста нервов (NGF), который модулирует сигналы, контролируемые экспрессию периферических и центральных болеутоляющих веществ и сенсibiliзирующие соседние ноцицептивные нейроны в ответ на стимуляцию. Некоторые исследования показали, что у пациентов с умеренно тяжелым ОА коленного сустава танезумаб приводит к уменьшению боли в коленях и увеличению функции по сравнению с плацебо, однако отмечались побочные эффекты, в том числе и неврологические нарушения [228].

В разрезе побочных эффектов препараты на основе мелатонина лишены подобных недостатков, подбор дозы имеет большой спектр, а анализ научных

данных о потенциальных положительных эффектах мелатонина при ОА открывает широкие горизонты его клинического применения.

Потенциал применения мелатонина и его роль в окислительном стрессе

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) представляет собой эндогенно продуцируемую молекулу, впервые обнаруженную в 1958 г. [133] (Рисунок 2).

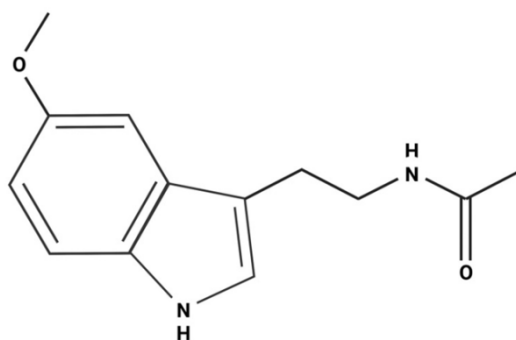


Рисунок 2 – Структура молекулы мелатонина (цит. по: Lerner A.B., 1958) [133]

Его синтез был выявлен в шишковидной железе, однако мелатонин также найден в многочисленных экстра-шишковидных органах, включая кожу, сетчатку, почки, яичники и т.д. [65,163], что говорит о важной роли мелатонина в регуляции процессов на разных уровнях биологической организации [3,7].

Первоначально было признано, что мелатонин регулирует циркадные и сезонные ритмы, но фактически высказано предположение о защите организма от окислительного стресса (ОС) как основной функции мелатонина в живых системах [231].

ОС представляет собой сложный биохимический процесс дисбаланса в производстве и потреблении оксидантов, сопровождающий многие патологические процессы [22, 29] в том числе ОА [191] и ожирение [26]. Свободные радикалы занимают особое место в патогенезе ОС, где они обладают высокой реакционной способностью и обычно запускают цепные реакции, приводящие к распространению молекулярных повреждений.

Наиболее широко используемая классификация свободных радикалов происходит от определенного типа атома, который содержит радикальный центр. Соответственно, они классифицируются на АФК [254], активные формы азота (АФА) и активные формы серы (АФС) [240].

В целом неспецифическое устранение свободных радикалов с использованием антиоксидантных соединений не всегда помогало противодействовать возникновению и прогрессированию заболевания в клинических испытаниях. Однако контроль определенных сигнальных путей, опосредованных АФК за счет избирательного нацеливания, открывает перспективу для более совершенной терапии.

Известно, что клеточные оксиданты имеют не только патологические эффекты, но и участвуют в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза и нормальной физиологической функции, являясь частью метаболических путей, обозначенных как окислительный эустресс [193]. Например, один из основных механизмов, с помощью которого пероксид водорода (H_2O_2) приобретает специфичность для передачи биологических сигналов, заключается в окислении серы (тиолатных групп) в целевых белках, посредством обратимого окисления метионина [139], через селенопротеины [64] или через окисление металлических центров белков [229].

Физиологические мишени окислителей служат в качестве молекулярных окислительно-восстановительных переключателей при передаче сигналов, действующих на различных уровнях клеточной регуляции в ответ на стрессы или другие внешние агенты. Например, белок p53, регулирующий клеточный цикл в клетках организма, в том числе хондроцитах, находится под окислительным контролем H_2O_2 , посредством чего изменяет селективную активацию генов-мишеней [98] – косвенно через модуляцию сигнальных сетей [58] и, возможно, напрямую путем окисления аминокислотных остатков цистеина. В свою очередь, p53 поддерживает клеточный окислительно-восстановительный баланс, регулируя экспрессию генов антиоксидантных ферментов [149]. Подобным образом

функционирует система Nrf-2 – кельч-ассоциированный протеин 1 (KEAP1). KEAP1, который действует как ингибитор Nrf-2, содержит несколько остатков цистеина, подверженных окислению. Это окисление приводит к конформационному изменению KEAP1, что предотвращает убиквитинирование Nrf-2, тем самым увеличивая стабильность и возможность его последующего перемещения в ядро, где он служит фактором транскрипции для экспрессии ряда белков антиоксидантной защиты [10,173].

Однако супрафизиологические внутриклеточные (выше 100 нМ) и внеклеточные концентрации H_2O_2 приводят к стрессовым реакциям и адаптациям с неспецифическим повреждением молекул. Структурные модификации разнообразны и часто зависят от типа биомолекулы, которая повреждена, а при их накоплении, как на примере белка p53, происходит апоптоз и гибель клетки.

Среди молекулярных модификаций липиды [213] и белки [17] являются наиболее подверженными повреждению окислителями в целом и свободными радикалами в частности. Можно предположить, что изменение редокс-равновесия у пациентов с метаболическим фенотипом ОА неизбежно приводит к нарушению привычных сигнальных взаимодействий и увеличению окислительного повреждения билипидной мембраны клеток и их ДНК [23]. В частности, ведет к нарушению функции остеобластов, а повышенная дифференцировка остеокластов, путем индукции лиганда рецептора, активируемого NF-κB (RANKL) увеличивает резорбцию кости [55].

Со свободными радикалами мелатонин может активно выступать в реакцию как непосредственно [107, 108], где основными продуктами реакции гормона с окислителями являются 3-гидроксимелатонин, N1-ацетил-N2-формил-5-метоксикинурамин, N1-ацетил-5-метоксикинурамин, 6-гидроксимелатонин [177], так и через активацию антиоксидантных [8] и инактивацию прооксидантных ферментов [157]. На основании этих механизмов объясняются некоторые клинические эффекты применения мелатонина как в клинике внутренних болезней, так и в клинике заболеваний опорно-двигательного аппарата.

В двойном слепом рандомизированном контролируемом исследовании изучали влияние ночной терапии мелатонином в дозе 1 мг (N = 20), 3 мг (N = 20) или плацебо (N = 41) на минеральную плотность костной ткани (МПК) [45]. В начале эксперимента и после 1 года лечения измеряли МПК с помощью двойной рентгеновской абсорбциометрии, количественной компьютерной томографии (КТ) и периферической КТ с высоким разрешением, кальцитропные гормоны и маркеры резорбции кости. Основным результатом исследования явилось дозозависимое увеличение МПК в группе препарата по сравнению с плацебо. Кроме того, отмечено повышение МПК в поясничном отделе позвоночника в группе высоких доз мелатонина, а также увеличение толщины трабекул в дистальном отделе большеберцовой кости и снижение уровня кальция в моче у группы комбинированного приема мелатонина по сравнению с плацебо.

В контексте коррекции ожирения и дислипидемии, как факторов риска возникновения и прогрессирования ОА, прием мелатонина в дозе 3–5 мг в течение 12 месяцев приводит к снижению процентного содержания жира в организме и увеличению доли сухой массы тела, определяемые посредством абсорбционной рентгенографии [194]. Подобные изменения коррелировали с измеренным уровнем адипонектина и лептина, а продемонстрированное снижение процентного содержания жира, в свою очередь, и веса в целом потенциально приводит к замедлению повреждения хряща и положительному изменению биомаркеров хряща и кости. В этом исследовании оценили липидный спектр и гликемический профиль, однако никаких корреляций с группой мелатонина или плацебо обнаружено не было [194]. Но стоит отметить, исследуемые пациенты имели нормальный индекс массы тела, а липидный и глюкозный профиль был в пределах нормального диапазона, что, видимо, и не привело к ожидаемым изменениям.

Наряду с независимым действием в качестве акцептора свободных радикалов и ограничения ОС, мелатонин оказывает разнообразное регулирующее влияние благодаря связыванию со специфическими рецепторами (MT1, MT2) и

внутриклеточными мишенями [169]. Цитопротекторные эффекты мелатонина включают множество рецептор – опосредованных путей, стимуляцию сигнальных путей и молекул – посредников, из которых роль передачи сигналов в ядро клетки через NF-κB является наиболее изученной [212, 43].

Показано, что мелатонин регулирует физиологию хряща посредством прямой или косвенной модуляции экспрессии основных генов циркадных часов, таких как ядерный транслокатор-подобный белок (Bmal), семейство генов криптохромных циркадных регуляторов (Cry1, 2) и семейства генов циркадного ритма 1–3 (Per1–3) [9]. Эта клеточно-автономная сеть генов циркадных ритмов ингибируется в хондроцитах ОА и является наиболее сильно нарушенным сигнальным молекулярным путем при ОА.

В модели ОА реализуемой посредством дестабилизации медиального мениска было значительно более серьезное повреждение хряща, субхондральные костные изменения и синовиальное воспаление у мышей нокаутных по гену Cry2, чем по гену Cry1. Эти результаты показывают, что Cry2 имеет хондропротекторные эффекты, а нацеливание на него может исправить паттерны аномальной экспрессии генов и снизить тяжесть ОА [224].

Последнее время уделяется внимание изучению механизмов регуляции экспрессии генов в развитии ОА. Наиболее интересно нацеливание на семейство мРНК, семейство сиртуиновых белков (SIRTs) и факторы индуцируемые гипоксией (HIFs). Среди семейства мРНК интересна мРНК-140-5p (miR-140-5p), которая специфически экспрессируется в хряще и считается ключевым фактором дифференцировки хондроцитов и индуцированной деградации внеклеточного матрикса при ОА. Усиление активности miR-140-5p мелатонином ингибирует экспрессию спектра ферментов, разрушающих матрикс, что является потенциальной точкой приложения терапии ОА [162] наряду с семейством SIRTs, где точечное воздействие мелатонина определяет регуляцию жизненно важных клеточных процессов и метаболических путей хрящевой ткани.

На примере первичных хондроцитов замыкательной пластинки

межпозвоночного диска это влияние может способствовать аутофагии, которая впоследствии ингибирует апоптоз и экспрессию белков и генов, связанных с кальцификацией, через сигнальный путь SIRT6 в условиях ОА [255]. Через этот же механизм мелатонин ингибирует MMP-3 и MMP-13 индуцированные IL-1 β , который является ключевым провоспалительным цитокином при ОА [160].

Другим важным регулятором метаболизма хрящевой ткани и тканей сустава в целом посредством модуляции транскрипционной активности является семейство белков HIFs, представляющие собой гетеродимеры с субъединицей α и β и двумя основными изоформами HIF-1 и HIF-2.

В целом суставной хрящ – это бессосудистая ткань, где питание и снабжение кислородом идет путем диффузии из синовиальной жидкости и субхондральной кости, следовательно, процессы в суставном хряще на протяжении всей его жизни поддерживаются в условиях низкого парциального давления кислорода в пределах 1–6% [208]. HIF осуществляет адаптацию к этой бессосудистой среде посредством стабилизации субъединицы α в гипоксических условиях и гетеродимеризации с субъединицей β [204], что приводит к его ядерной транслокации, за которой следует связывание гетеродимера HIF с элементами специфических генов-мишеней [250].

В настоящее время имеются ограниченные данные о регуляции мелатонином HIF в костно-хрящевой ткани. На примере клеток проксимальных канальцев почки мелатонин снижает содержание субъединицы HIF-1 α , повышая уровень его ацетилирования [161]. Что является результатом ослабленной экспрессии SIRT1, фермента, деацетилирующего HIF-1 α . Однако в хрящевой ткани HIF-1 α выполняет анаболическую функцию [118] и способствует адаптации энергетического метаболизма хондроцитов при ОА, а HIF-2 α через посредников модулирует синтез хрящевого матрикса, но напрямую может оказывать катаболический эффект [119, 247].

В связи с вышеизложенными особенностями метаболической активности мелатонина, изучение его влияния на костно-хрящевую ткань является

перспективным направлением исследований, что позволит взглянуть на новые пути развития патогенеза ОА.

Энергетический метаболизм хрящевой ткани при остеоартрозе

Суставной хрящ представляет собой гипоцеллюлярную, аваскулярную и анервальную структуру [62], состоящую из хондроцитов, окруженных внеклеточным матриксом, который отличается метаболически активной средой со сниженным доступом к кислороду и глюкозе по сравнению с синовиальной жидкостью и плазмой [34]. Следовательно, восстановление внеклеточного матрикса в зрелом скелетном хряще крайне медленное. Например, восстановление протеогликанов (таких как агрекан) может занять до 25 лет, а период полураспада коллагена типа II, основного фибриллярного коллагена в хрящевой ткани составляет от 100 до 400 лет [103]. Таким образом, здоровый хрящ с оптимальной функцией внеклеточного матрикса требует поддержания хрупкого баланса между анаболической и катаболической активностью, что имеет решающее значение для долговременной целостности и способности ткани восстанавливаться [153].

Глюкоза является важным метаболическим субстратом, который жизненно необходим для хондроцитов в целом и синтеза внеклеточного матрикса в частности. Когда глюкоза транспортируется в хондроциты, она метаболизируется посредством гликолиза и цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) или используется в качестве структурного компонента для синтеза гликопротеинов. Поэтому оптимальная функция митохондрий важна для поддержания энергетического метаболизма в здоровых хондроцитах, а митохондриальная дисфункция лежит в основе патогенеза ОА [167].

В патофизиологических ситуациях, таких как ОА, равновесие клеточного обмена веществ нарушается с увеличением катаболических и воспалительных факторов. Новые данные свидетельствуют о том, что в хондроцитах пациентов с

ОА провоспалительные пути зависят от энергии, генерируемой метаболическим переключением с окислительного фосфорилирования (ОФ) на гликолиз [167]. В здоровом суставном хряще хондроциты обладают метаболической гибкостью, позволяющей генерировать энергию и способствовать выживанию клеток в периоды острого питательного стресса, путем активации митохондриального дыхания и снижении скорости производства АФК и АФА.

Метаболическая адаптация суставного хряща при ОА к новым условиям окружающей среды зависит от стадии заболевания, где срыв адаптационных механизмов на поздних стадиях наиболее выражен. Обменные потребности полностью дифференцированных и покоящихся хондроцитов сильно отличаются от потребностей хондроцитов в воспалительном микроокружении. Хондроциты такого типа представляют собой клетки с высоким уровнем гликолиза, которые, как и раковые клетки, проявляют «эффект Варбурга» [198].

Адаптация хондроцитов к воспалительному микроокружению оказывает прямое влияние на состав мембранных белков клеток [101]. Метаболическое переключение в пораженном хряще означает, что хондроциты получают АТФ в результате гликолиза, снижая активность ОФ и тем самым обеспечивая синтез АТФ в периоды низкой доступности кислорода. Для этого хондроциты экспрессируют транспортеры глюкозы 1–3 (GLUT 1–3), тем самым увеличивая их способность поглощать глюкозу в условиях низкого содержания кислорода [117]. Уровни глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы также повышаются в образцах хряща, подвергшихся окислительному повреждению, что указывает на повышенную гликолитическую активность [181]. Следовательно, измененный метаболический профиль клеток хрящевой ткани создает дополнительные условия для прогрессирования заболевания, а изучение метаболизма хрящевой ткани в условиях метаболического фенотипа ОА является актуальным направлением исследований.

Сукцинат-рецепторная ось в патогенезе остеоартроза

Сукцинат представляет собой метаболит ЦТК (Рисунок 3), который образуется из сукцинил-КоА и окисляется сукцинатдегидрогеназой (СДГ) с образованием фумарата [155], а его уровень регулируется метаболическими потребностями клетки [220].

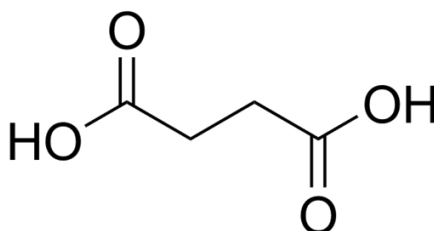


Рисунок 3 – Структура молекулы сукцината (цит.по Gilissen J et. al., 2016) [155]

Когда клетки подвергаются стрессу, нарушение ЦТК может привести к повышению уровня сукцината в матриксе и утечке избыточного количества метаболита в цитоплазму, где он действует как сигнальная молекула, влияя на различные клеточные функции [27]. Так, недавние исследования в области патогенеза ОА позволили выявить характерный метаболический профиль синовиального микроокружения и его связь с синовиальным воспалением [227], где несколько промежуточных метаболитов, включая сукцинат, потенциально могут выступать в качестве патогенетических звеньев и биомаркеров для диагностики ОА [129].

В этом аспекте основное внимание направлено на изучение сукцинат-рецепторного взаимодействия, которое является физиологическим ауто- или паракринным сенсором высоких внеклеточных концентраций сукцината, вызванных метаболическим стрессом.

Сукцинат, как сигнал внеклеточного метаболического ответа, воспринимается главным образом сукцинатным рецептором (SUCNR1/GPR91) опосредованным с G-белками, как наиболее представительным классом белков-посредников клеточного ответа (Рисунок 4).

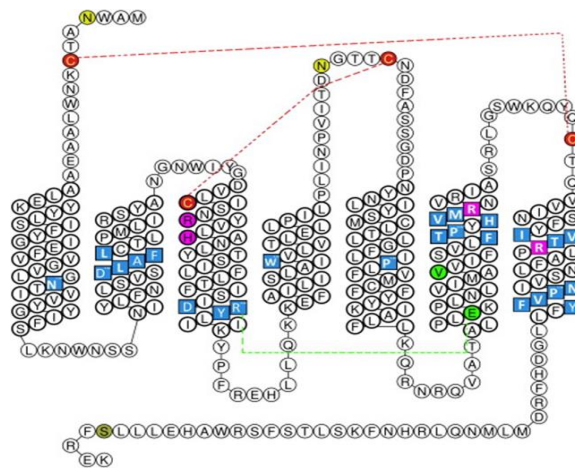


Рисунок 4 – Структура SUCNR1/GPR1(цит. по Gilissen J et. al., 2016) [130]

SUCNR1 был обнаружен в 2004 году как рецептор метаболита сукцината путем скрининга экстрактов почек свиньи [73]. С тех пор было показано, что SUCNR1 экспрессируется во многих других тканях, включая печень [218], жировую ткань [195], сердце и ряд различных иммунных клеток.

В большинстве исследований по изучению механизмов активации SUCNR1 сообщается о передаче сигналов через G- α i субъединицу и ингибировании цАМФ в качестве основного сигнального пути, который первоначально был описан на эмбриональных почках человека [73]. Однако демонстрируется и G-q [105] связанный сигнальный путь, как ответственный за SUCNR1-опосредованную активацию некоторых транскрипционных регуляций на линии нейрональных клеток ганглиев сетчатки [126]. Таким образом, специфичность посредников может определяться типом исследуемых клеток.

Согласно вышеописанным механизмам, внутриклеточный сукцинат поддерживает провоспалительный фенотип макрофагов, активация которых повышает выработку IL-4, связывая воспаление с фиброзом и ангиогенезом [223] посредством VEGF-зависимых путей на моделях ревматоидного артрита [217].

Увеличение синовиального ангиогенеза не только поставляет больше кислорода и питательных веществ в воспаленный сустав, но также облегчает миграцию воспалительных клеток, а ангиогенез в бессосудистой среде хряща

усугубляет его разрушение и коррелирует с уровнем боли [48].

Высвобождаемый макрофагами синовиальной оболочки сукцинат усиливал не только экспрессию SUCNR1 на M1-макрофагах, но и NIF-1 α [219] с последующей экспрессией IL-1 β , что также приводило к прогрессированию артрита [111]. Выявлено, что эти клетки демонстрируют изменения в структуре митохондрий, приводя к их разрушению и фрагментации [147] с последующим выбросом провоспалительных цитокинов [148].

Обнаружено, что SUCNR1 действует как датчик хемотаксического градиента, который направляет дендритные клетки в лимфатические узлы, управляя популяцией Т-хелперов (Th17) и развитием экспериментального антиген-индуцированного артрита с увеличением гипералгезии, нейтрофильной инфильтрации и воспалительных цитокинов в суставе [221].

В свою очередь, ингибирование сукцинатной активации SUCNR1 может быть эффективным методом уменьшения воспаления в целом [57]. Согласно большинству рассмотренных исследований, функции SUCNR1 были связаны с адаптацией к метаболическому стрессу, возникающему, в частности, при ишемии и гипоксии. В этих условиях резко возрастает продукция митохондриальных АФК, а сукцинатдегидрогеназа (СДГ) функционирует в реверсном режиме, переводя фумарат обратно в сукцинат, поддерживая его высокие уровни [132].

СДГ, локализованная во внутренней митохондриальной мембране, выполняет уникальную задачу, играя двойную роль в основных процессах выработки энергии в клетке. Во-первых, она участвует в окислении сукцината до фумарата в цикле лимонной кислоты, во-вторых, в восстановлении убихинона (коэнзима Q) в аэробной цепи переноса электронов, способствуя образованию АТФ путем окислительного фосфорилирования. Структурно СДГ представляет собой гетероолигомер, состоящий из 4 субъединичных белков (SDHA, SDHB, SDHC и SDHD) [80] (Рисунок 5).

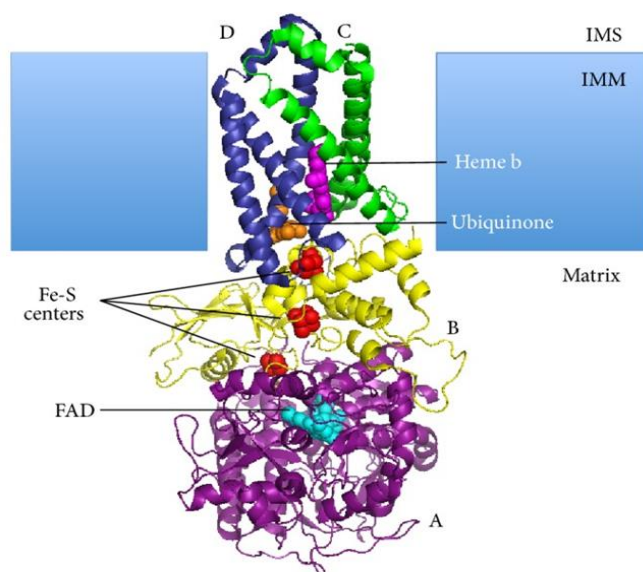


Рисунок 5 – Структура СДГ (цит. по Her YF et. al., 2015) [114]

SDHA характеризуется как флавопротеин, а SDHB железно-серный белок; вместе они образуют основной каталитический домен, контролирующий окисление сукцината до фумарата. Субъединицы SDHC и SDHD закорены в мембране митохондрии и вовлечены в передачу электронов через электрон-транспортную цепь.

Все четыре субъединицы (SDHA, SDHB, SDHC и SDHD), кодируемые ядерными генами, высоко консервативны и в ходе синтеза собираются и функционируют на внутренней мембране митохондрии. Субъединицы SDHA и SDHB образуют каталитический компонент, тогда как C и D формируют гидрофобное ядро комплекса. Для катализа реакций СДГ необходимо участие всех четырех субъединиц, а точечные мутации в любой из них неизменно приводят к дестабилизации всего ферментного комплекса и изменению активности СДГ [168].

Рядом исследований продемонстрировано уменьшение уровня ферментов мембраны митохондрий, в том числе СДГ, в различных зонах сустава при ОА, впрочем, номинальные уровни фермента разнятся от исследования к исследованию, а объектом изучения служили клеточные линии, что имеет некоторые ограничения в интерпретации результатов, поскольку клетки

культивировали в стандартных кислородных условиях [91].

Таким образом, метаболические эффекты сукцинат-рецепторной системы при большинстве патологий остаются неисследованными, однако имеющиеся данные позволяют рассматривать ее как потенциальный маркер в диагностике ОА, являющийся частью сигнального пути и объясняющий воспаление и нарушения энергетического метаболизма.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая характеристика исследования

Диссертационная работа выполнена на базе кафедры биологической химии (зав. кафедрой к.м.н., доц. И.В. Матвеева), лаборатории клеточных технологий ЦНИЛ (зав. ЦНИЛ к.м.н., доц. А.А. Никифоров) ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России и одобрена локальным этическим комитетом (протокол № 4 от 09.11.2021).

Клиническая и экспериментальная части исследования выполнялись в рамках научного плана ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. По дизайну клиническая часть исследования организована как одноцентровое экспериментальное проспективное открытое контролируемое исследование с использованием простой случайной выборки.

Клиническое исследование включало 95 участников – 50 пациентов с метаболическим фенотипом ОА, 30 практически здоровых добровольцев без костно-суставной патологии и 15 пациентов без рентгенологических и морфологических признаков ОА с переломом шейки бедренной кости служат группой сравнения. Все пациенты проходили обследование и лечение в стационарах и поликлиниках г. Рязани.

Экспериментальная часть исследования проводилась *in vitro* на первичных клеточных культурах хондроцитов метаболического фенотипа ОА человека, которая была предоставлена УНУ Коллекцией клеточных культур Института биологии развития им. Н.К. Кольцова, РАН, г. Москва.

2.1.1. Характеристика клинической части исследования

Всем участникам исследования для подтверждения диагноза выполнялся тщательный сбор анамнеза заболевания, физикальное обследование, измерение

окружности конечности на разных уровнях, общеклинические и специальные методы исследования.

Критериями исключения в исследование служили: заболевания, влияющие на исследуемый сустав, такие как системные воспалительные заболевания суставов, предшествующий сепсис, остеонекроз, хроническое или недавнее употребление пероральных кортикостероидов, нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), глюкозамина или хондроитина; недавние (<3 месяцев) внутрисуставные инъекции кортикостероидов, гиалуроновой кислоты или других протезов синовиальной жидкости. Серьезные соматические заболевания в стадии декомпенсации (например, неконтролируемый диабет, ВИЧ-инфекция или артериальная гипертензия), являющиеся противопоказаниями к участию.

2.1.2. Общая характеристика пациентов

В исследовании приняло участие 95 пациентов, среди них 78 женщин и 17 мужчин. Участники были разделены на 4 группы по разным клиническим и исследовательским задачам (Рисунок 6, Таблица 1):

1 группа – здоровые пациенты без суставной патологии и нормальным индексом массы тела;

2 группа – пациенты с метаболическим фенотипом ОА 3-4 стадии по Kegglen-Lourence, которые проходили консервативное лечение;

3 группа – пациенты с метаболическим фенотипом ОА 3-4 стадии по Kegglen-Lourence, которые проходили оперативное лечение в объеме первичного тотального эндопротезирования коленного сустава;

4 группа – пациенты без рентгенологических и макроскопических признаков ОА, проходивших наблюдение и оперативное лечение по поводу перелома шейки бедренной кости в объеме первичного тотального эндопротезирования тазобедренного сустава.

В группах 1 и 2 определяли показатели костно-хрящевого метаболизма (уровень СОМР, КЩФ, Ca^{2+} , активность КФ) и оксидативного стресса (ОМБ, активность СОД) в сыворотке крови, в группе 3 и 4 показатели костно-хрящевого метаболизма в гомогенатах костно-хрящевой ткани (SUCNR1, сукцинат, СДГ).

Пациенты 2 группы были разделены на две подгруппы (М и Б) по схемам консервативного лечения: Б (n=12) и М (n=13).

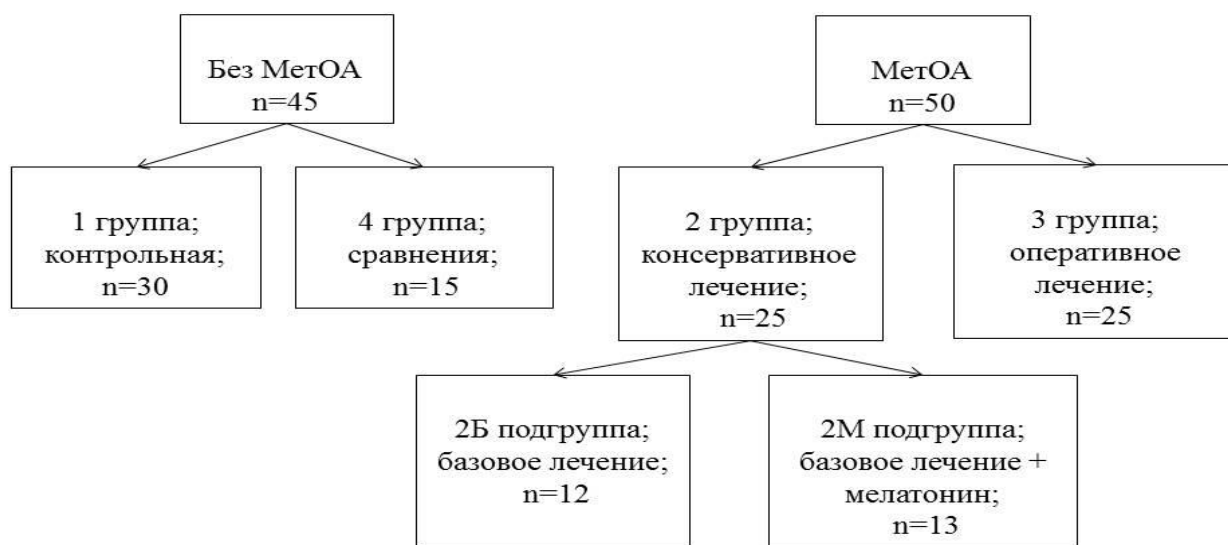


Рисунок 6 – Дизайн исследования

Диагноз «ОА коленного сустава» в группах 2 и 3 устанавливался согласно критериям европейской коллегии ревматологов (EULAR) 2010 г. [42].

Наличие критериев метаболического синдрома (МС) в группах 2 и 3 устанавливался согласно критериям Российского кардиологического общества [20] (окружность талии (ОТ) > 80 см у женщин и > 94 см у мужчин, ИМТ > 30) и двух из пяти критериев: 1) артериальная гипертензия (артериальное давление \geq 140/90 мм рт. ст.); 2) повышение уровня триглицеридов (ТГ) \geq 1,7 ммоль/л; 3) снижение уровня липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) < 1,0 ммоль/л у мужчин и < 1,2 ммоль/л у женщин; 4) повышение уровня липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) > 3,0 ммоль/л; 5) гипергликемия натощак (уровень сахара в крови \geq 6,1 ммоль/л) или нарушение толерантности к глюкозе (показатель в плазме крови через 2 ч после нагрузки глюкозой \geq 7,8, но \leq 11,1 ммоль/л)).

Сомнологические нарушения выявляли по критериям клинических шкал оценки качества и количества сна. Критерии включения для здоровых пациентов: ИМТ ≤ 25 ; отсутствие суставной патологии по критериям европейской коллегии ревматологов (EULAR) 2010 г.; отсутствие критериев метаболического синдрома (МС); отсутствие серьезных сомнологических нарушений по критериям клинических шкал оценки качества и количества сна.

Таблица 1 – Характеристика групп пациентов (M \pm s)

	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Количество пациентов	n=30	n=25	n=25	n=15
Средний возраст пациентов, лет	59,3 \pm 6,49	61,8 \pm 6,69	62,2 \pm 7,84	62,3 \pm 6,37
Пол	М=7; Ж=23	М=3; Ж=22	М=5; Ж=20	М=3; Ж=12
Средний рост, см	168,4 \pm 4,83	164 \pm 6	162,2 \pm 6,4	164,2 \pm 4,4
Средний вес, кг	68,2 \pm 8,2	98,82 \pm 15	91,65 \pm 10,39	64,5 \pm 6
ИМТ	23,13 \pm 2,4	36,84 \pm 6,27	34,85 \pm 3,84	24,32 \pm 2,52
Окружность талии	88,1 \pm 5,4	114,43 \pm 13,52	111,03 \pm 13,15	82,84 \pm 2,7
% жира в организме	32,16 \pm 3,63	46,9 \pm 3,7	42,38 \pm 5,62	33,64 \pm 3,15
Сахарный диабет	0	10	5	0
Гипертоническая болезнь	0	16	18	0

2.1.3. Экспериментальные клинические модели и схемы введения препаратов

Пациенты подгруппы 2Б (n=12) получали базовое консервативное лечение, которое включало в себя медикаментозную терапию (витамины группы В не более 10 дней), нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) по потребности, пентоксифиллин (4 недели), мидокалм (не более 10 дней), физиотерапевтические процедуры, массаж нижних конечностей, лечебная гимнастика по методике ОА. Пациентам подгруппы 2М (n=13) в схему

консервативного лечения включали препарат мелатонин (Мелаксен®) в дозировке 3 мг 30 дней.

2.2. Клинические методы исследования и шкалы

Клиническое обследование имело своей целью определить степень поражения исследуемого сустава. При осмотре обращали внимание на походку больного, наличие активных и пассивных движений, выраженность контрактур, наклон таза, атрофию мышц бедра, изменения в области поясничного отдела позвоночника. При пальпации пораженных суставов выявляли болезненные точки, окружающих сустав мышц, изменения мышечного тонуса, патологическую подвижность и крепитацию костных отломков у пациентов с переломами шейки бедренной кости. Атрофию мышц, виды укорочения конечностей измеряли сантиметровой лентой. Объем движений в суставах определяли угломером.

Рост измерялся использованием медицинского ростомера, вес с использованием медицинских весов, рассчитывался индекс массы тела (ИМТ). Толщина кожной складки измерялась с использованием медицинского механического калипера по трем точкам в районе талии, ниже лопатки, средней части трицепса с выведением показателя процента жира в организме, окружность талии измерялась в соответствии с рекомендациями ВОЗ в средней точке между нижним краем последнего прощупываемого ребра и верхней части гребня подвздошной кости. Процентное содержание жира в организме рассчитывали по формуле [112].

Клинические шкалы

Пациентам было предложено ответить на вопросы клинических шкал по оценке функционального состояния суставов, качества сна и качества жизни.

Шкала KOOS. Шкала KOOS (The Knee Injury and Osteoarthritis Outcome

Score) позволяет оценить анатомофункциональные особенности состояния суставов до и после лечения с учетом в повседневной и повышенной активности. Шкала KOOS состоит из пяти разделов, которые в сумме составляют 42 вопроса.

Разделы данной шкалы:

1. Болевая шкала (P).
2. Оценка выраженности симптомов (S).
3. Оценка сложности выполнения ежедневных бытовых действий пациентом (A).
4. Спорт и активность на отдыхе (SP).
5. Оценка качества жизни (SF).

По каждому вопросу шкалы KOOS оценку производили в диапазоне от 0 до 4 баллов. Каждый раздел KOOS рассчитывали по формулам. Чем ниже оценка по каждой из шкал опросника (от 0 до 100), тем выше выраженность клинического течения ОА.

Альгофункциональный индекс Лекена. Альгофункциональный индекс Лекена является интегральной характеристикой оценки функции суставов при ОА, который включает в себя оценку боли, дистанцию ходьбы без боли, функциональную активность [125]. Суммарное значение индекса Лекена по разделам позволяет оценить тяжесть ОА в бальном выражении (1-4 балла – слабая; 5-7 баллов – средняя; 8-10 – выраженная; 11-12 – значительно выраженная; более 12 – резко выраженная тяжесть).

Визуально-аналоговая шкала боли. Визуально-аналоговая шкала боли (ВАШ) представляет собой отрезок прямой линии длиной 10 см с отметками от 0 до 10, где нулевой отметке соответствует отсутствие боли, а 10 представляет нестерпимую боль. Методика использования визуально-аналоговой шкалы заключается в следующем: пациенту предлагают наметить точку на шкале, которая соответствует его интенсивности боли. С помощью линейки измеряется расстояние (мм) между нулевой отметкой и указанной больным точкой, соответствующей интенсивности ощущений пациента. На основании

распределения баллов выводится следующая классификация: отсутствие боли (0–4 мм), слабая боль (5–44 мм), умеренная боль (45–74 мм), сильная боль (75–100 мм).

Питсбургский индекс качества сна. Питсбургский индекс качества сна (PSQI) содержит 19 вопросов для самостоятельной оценки и 5 вопросов, оцениваемых партнером по комнате (если таковой имеется) [239]. 19 вопросов объединяются в семь комплексных баллов, где каждый имеет диапазон от 0 до 3. Оценка «0» указывает на отсутствие затруднений, а оценка «3» – на серьезную трудность. Затем баллы по компонентам суммируются в общий балл с диапазоном от 0 до 21, где 0 указывает на отсутствие трудностей, а 21 указывает на трудности во всех аспектах сна.

Шкала сна Левина Я.И. Анкета балльной оценки субъективных характеристик сна, предложенная Я.И. Левиным (1995)[30] включает следующие характеристики, оцениваемые по 5-балльной системе:

время засыпания (от «мгновенно» – 5 баллов – до «очень долго» – 1 балл);

продолжительность сна (от «очень долгий» – 5 баллов – до «очень короткий» – 1 балл);

количество ночных пробуждений (от «нет» – 5 баллов – до «очень часто» – 1 балл);

качество сна (от «отлично» – 5 баллов – до «очень плохо» – 1 балл);

количество сновидений (от «нет» – 5 баллов – до «множественные и тревожные» – 1 балл);

качество утреннего пробуждения (от «отлично» – 5 баллов – до «очень плохо» – 1 балл).

Максимальная оценка составляет 30 баллов. Нормой является сумма в > 22 балла, при значениях 19-21 балл результат оценивается как пограничный, а показатель < 19 баллов свидетельствует о наличии инсомнии.

Шкала сонливости Эпворт. Шкала сонливости Эпворт представляет собой анкету для самостоятельного заполнения, состоящую из 8 вопросов [138].

Пациенту предлагается оценить по 4-балльной шкале от 0 до 3 свои обычные шансы заснуть или задремать во время восьми повседневных занятий. Оценка шкалы (сумма баллов по 8 пунктам, от 0 до 3) может варьироваться от 0 до 24. Чем выше оценка шкалы, тем выше средняя склонность человека ко сну в повседневной жизни или его «дневная сонливость»:

0-5 Нижняя норма дневной сонливости

6-10 Выше нормальной дневной сонливости

11-12 Легкая чрезмерная дневная сонливость

13-15 Умеренная чрезмерная дневная сонливость

16-24 Сильная чрезмерная дневная сонливость

Опросник качества жизни SF-36. Для субъективной оценки удовлетворенности качеством жизни использовали опросник качества жизни SF-36. Шкала позволяет количественно оценить показатели, соответствующие определенной шкале:

1) GeneralHealth (GH) – общее состояние здоровья – оценка испытуемым своего состояния здоровья в настоящий момент.

2) PhysicalFunctioning (PF) – физическое функционирование, отражающее степень, в которой здоровье лимитирует выполнение 29 физических нагрузок (самообслуживание, ходьба, подъем по лестнице, переноска тяжестей и т.п.).

3) Role-Physical (RP) – влияние физического состояния на ролевое функционирование (работу, выполнение будничной деятельности).

4) Role-Emotional (RE) – влияние эмоционального состояния на ролевое функционирование, предполагает оценку степени, в которой эмоциональное состояние мешает выполнению работы или другой повседневной деятельности (включая увеличение затрат времени, уменьшение объема выполненной работы, снижение качества ее выполнения и т.п.).

5) SocialFunctioning (SF) – социальное функционирование, определяется степенью, в которой физическое или эмоциональное состояние ограничивает социальную активность (общение).

6) BodilyPain (BP) – интенсивность боли и ее влияние на способность заниматься повседневной деятельностью, включая работу по дому и вне дома.

7) Vitality (VT) – жизнеспособность (подразумевает ощущение себя полным сил и энергии или, напротив, обессиленным).

8) MentalHealth (MH) – самооценка психического здоровья, характеризует настроение (наличие депрессии, тревоги, общий показатель положительных эмоций).

Все шкалы опросника объединены в 2 суммарных измерения: физический компонент здоровья (PH) (1-4 шкалы) и психологический (MH) (5-8 шкалы). В каждой шкале имеется от 2 до 10 вопросов (суммарно 36). Ответы, полученные при анкетировании, ранжировались и обрабатывались с помощью калькулятора. Чем выше была оценка по каждой из шкал опросника (от 0 до 100), тем выше качество жизни.

2.3. Получение биологического материала

Забор и подготовка проб крови. Забор крови осуществлялся из вен передней локтевой области в количестве 10 мл в пробирку без антикоагулянта. Образцы крови были собраны после ночного голодания, далее выдерживались в течение 40 минут при комнатной температуре, затем для получения сыворотки образцы венозной крови были центрифугированы при 3000 g в течение 15 минут. После отбора пробы хранили замороженными при -20°C до лабораторного исследования.

Получение гомогенатов костно-хрящевой ткани. Гомогенаты костно-хрящевой ткани 3 и 4 групп получали из интраоперационных хирургических опилов. Хрящевая ткань разделялась на нагружаемую зону из задненижнего угла мышелка бедренной кости или из апикального участка головки бедренной кости и ненагружаемую зону анатомических областей сустава.

Хирургические опиловы костно-хрящевой ткани помещались в стерильные

центрифужные пробирки в операционной с раствором фосфатно-солевого буфера (PBS) и транспортировались при 2-8°C. Выделенные кусочки костной и хрящевой ткани отдельно отмывали холодным PBS, измельчали кусочками и скальпелем, затем помещали в ступку с жидким азотом до получения однородной порошкообразной массы. Далее образцы гомогенизировали в течение 2 минут при 1500 об/мин в гомогенизаторе PotterS в растворе холодного PBS в соотношении 1:9. Описанные процедуры проводили на льду при температуре не выше 4°C [142].

Полученные гомогенаты костной и хрящевой ткани центрифугировали 15 мин при 3000 g для осаждения не полностью разрушенных клеток и ядер. Часть надосадочной жидкости затем центрифугировали 15 мин при 14000 g для осаждения митохондрий. Осадок, представляющий собой фракцию митохондрий, ресуспендировали в PBS и использовали для определения активности СДГ, а к остальной части добавляли Тритон X-100 в конечной концентрации 0,1% для разрушения мембраны митохондрий и использовали для анализа содержания остальных метаболитов. После отбора пробы хранили замороженными при – 20°C до испытания.

2.4. Определение показателей костно-хрящевого метаболизма в сыворотке крови

В начале исследования и по прошествии 1 месяца консервативной терапии в группах 1 и 2 определяли маркеры костно-хрящевого метаболизма в сыворотке крови.

Определение хрящевого олиgomатриксного пептида (COMP). Хрящевой олиgomатриксный пептид (COMP) измеряли методом ИФА с помощью набора COMP EIA (Immunodiagnostic systems (IDS), Maryland, U.S.A). Анализ представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ. Образцы, содержащие COMP, реагируют со специфическим моноклональным антителом на

лунках микропланшета. После образования комплекса антиген/антитело микропланшет промывали для удаления несвязанных антигенов, а затем инкубировали с ферментным субстратом. Величину субстрата определяли колориметрически, измеряя поглощение остановленной реакции при длине волны 450 нм на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 2100 (microplate reader) (Awareness technology Inc. Palm City, FL 34990, USA). Поглощение прямо пропорционально концентрации СОМР в исследуемом образце.

Определение костного изофермента щелочной фосфатазы (КЩФ). Костный изофермент щелочной фосфатазы (КЩФ) определяли методом ИФА с помощью набора Ostase ВАР EIA (Immunodiagnostic systems (IDS), Maryland, U.S.A). Анализ представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ с использованием моноклональных антител. Образцы, содержащие КЩФ, реагируют со специфическим моноклональным антителом на лунках микропланшета. После образования комплекса антиген/антитело микропланшет промывают для удаления несвязанных антигенов, а затем инкубируют с ферментным субстратом. Величину субстрата определяли колориметрически, измеряя поглощение остановленной реакции при длине волны 450 нм на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 2100 (microplate reader) (Awareness technology Inc. Palm City, FL 34990, USA). Поглощение прямо пропорционально концентрации КЩФ в исследуемом образце.

Определение активности кислой фосфатазы. Активность кислой фосфатазы (КФ) в образцах измеряли унифицированным методом по «конечной точке», основанном на количественном определении продукта ферментативного расщепления п-нитрофенилфосфата – п-нитрофенола (коммерческий набор «Витал Диагностикакс»).

Определение кальция. Кальций измеряли спектрофотометрическим методом с использованием набора реагентов для определения кальция в биологических жидкостях с о-крезолфталеин комплексом (Агат, Россия).

Определение мелатонина в сыворотке крови. В сыворотке крови

определяли уровень мелатонина методом ИФА с помощью набора Melatonin ELISA (Cloud Clone, China). Анализ представляет собой конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ. Образцы инкубируют с антителом в присутствии мелатонина, конъюгированного с биотином. Мелатонин в образце конкурирует с биотинилированным мелатонином за ограниченное количество сайтов связывания антител. После достижения равновесия добавляется стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена, который количественно связывается с биотином. Заключительные стадии включают реакцию субстрата с ферментом, присоединенным к стрептавидину, с получением окрашенного продукта, который количественно определяется спектрофотометрически при длине волны 450 нм. Интенсивность окраски реакционной среды обратно пропорциональна содержанию мелатонина в сыворотке крови.

2.5. Оценка показателей оксидативного стресса сыворотки крови

Активность супероксиддисмутазы. Активность СОД измеряли по торможению реакции окисления кверцетина. Метод основан на торможении реакции аутоокисления кверцетина в присутствии СОД, которая нейтрализует супероксиданионы образующиеся в аэробных условиях при рН=10 и присутствии ТЕМЕД, что сопровождается замедлением снижения оптической плотности при $\lambda=406$ нм [4]. Измерения проводили на КФК 3-01-«ЗОМЗ» (ОАО «Загорский оптико-механический завод», Россия).

Оценка уровня спонтанной окислительной модификации белка. Окислительная модификация белка (ОМБ) в сыворотке крови определялась методом R. Levine в модификации Е.Е. Дубининой [21]. Метод основан на взаимодействии окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием динитрофенилгидразонов, обладающих специфическим спектром поглощения в видимой и ультрафиолетовой областях спектра.

Оценка уровня металл-катализируемой окислительной модификации белка. Регистрация карбонильных производных белков металл-катализируемой ОМБ, образовавшихся под действием реактива Фентона, осуществляется спектрофотометрически при длинах волн, аналогичных при регистрации спонтанно образовавшихся ОМБ [21].

Оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразонов измеряли на спектрофотометре «СФ-26». Содержание ДНФГ-производных в сыворотке крови выражали в единицах оптической плотности.

Оценка резервно-адаптационного потенциала. Резервно-адаптационный потенциал (РАП) – это разница между спонтанной ОМБ и металл-катализируемой; при этом уровень индуцированной принимается за 100% (является расчетным показателем). Чем выше разница между спонтанной и индуцированной по реакции Фентона ОМБ, тем выше адаптация к окислительному стрессу [21].

2.6. Определение липидного спектра сыворотки крови

Общий холестерин. Концентрацию общего холестерина определяли с использованием коммерческих наборов (Ольвекс диагностикум, Россия). Принцип метода определения ОХ основан на его высвобождении из состава эфиров под действием фермента холестеролэстеразы. Затем при участии фермента холестеролоксидазы холестерин окисляется до 4-холестен-3-она, а образующийся пероксид водорода при участии фермента пероксидазы способствует окислительному азосочетанию 4-аминоантипирина (4-ААП) и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминный краситель) [104]. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию холестерина в исследуемом материале и определяется фотометрически при длине волны 500 (490-520) нм.

Триацилглицериды. Концентрацию триацилглицеридов определяли с

использованием коммерческих наборов (Ольвекс диагностикум, Россия). Определение концентрации ТГ основано на проведении ряда сопряжённых ферментативных реакций, катализируемых липазой, глицерокиназой (ГК) в присутствии АТФ, глицерол-3-фосфатоксидазой (ГФО) и пероксидазой (ПО). Образующаяся в ходе данных реакций перекись водорода (H_2O_2) способствует окислительному азосочетанию 4-ААП и фенола с образованием окрашенного соединения (хинонимин) [246]. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию триглицеридов в исследуемом материале и измеряется фотометрически при длине волны 500 (490-540) нм.

ЛПВП. Концентрацию ЛПВП определяли с использованием коммерческого набора (Ольвекс диагностикум, Россия). Принцип метода основан на осаждении хиломикрон, липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и ЛПНП при добавлении к образцу фосфорновольфрамовой кислоты и Mg^{2+} [51]. После центрифугирования оставшиеся в супернатанте ЛПВП, определяли так же, как концентрация общего холестерина.

2.7. Определение метаболитов в гомогенатах костно-хрящевой ткани

Сукцинатный рецептор. SUCNR1 измеряли методом ИФА с помощью набора SUCNR1 EIA (BlueGene, China). Метод основан на конкурентном методе ИФА, использующем поликлональное тело к SUCNR1 и конъюгат SUCNR1 с пероксидазой хрена. Образцы инкубируются с ферментным конъюгатом с последующей отмывкой несвязавшихся компонентов. Далее добавляют субстрат с образованием специфического окрашивания. Величину субстрата определяют колориметрически, измеряя поглощение остановленной реакции при длине волны 450 нм на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 2100 (microplate reader) (Awareness technology Inc. Palm City, FL 34990, USA). Поглощение обратно пропорционально количеству сукцинатного рецептора в исследуемом образце.

Сукцинат. Сукцинат определяли колориметрическим методом с помощью

набора Succinate Assay Kit (Abcam, United Kingdom). Величину субстрата определяют колориметрически, измеряя поглощение при длине волны 450 нм на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 2100 (microplate reader) (Awareness technology Inc. Palm City, FL 34990, USA), которое пропорционально концентрации сукцината в исследуемом образце.

Сукцинатдегидрогеназа. СДГ определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 450 нм. Принцип метода основан на восстановлении красной кровяной соли ($K_3[Fe(CN)_6]$) в ферроцианид калия ($K_4[Fe(CN)_6]$), что сопровождалось пропорциональным снижением оптической плотности раствора при $\lambda=420$ [18]. Активность фермента пропорциональна количеству восстановленного ферроцианида. Измерения проводили с использованием КФК З-01-«ЗОМЗ» (ОАО «Загорский оптико-механический завод», Россия).

2.7.1. Определение количества белка в пробах гомогенатов

Содержание белка во фракциях гомогенатов определяли методом Лоури с помощью набора реагентов (НПЦ «Эко-сервис», Россия) [151]. Метод основан на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот с реактивом Фолина-Чокальтеу в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи. Экстинкция пропорциональна концентрации белка в исследуемой пробе. Концентрацию белка рассчитывали по калибровочному графику.

2.8. Характеристика экспериментальной части исследования *in vitro*

Экспериментальное исследование *in vitro* проводилось на паспортизованной первичной клеточной линии хондроцитов метаболического фенотипа ОА предоставленной ККК УНУ ИБР РАН им.Н.К.Кольцова.

В исследовании *in vitro* были сформированы следующие экспериментальные серии:

первая серия – контрольная, стандартные условия культивирования;

вторая серия – изучение влияния мелатонина в конечной концентрации 100 мкМ на абсолютное количество SUCNR1 и уровень сукцината хондроцитов;

третья серия – изучение влияния мелатонина в конечной концентрации 500 мкМ на абсолютное количество SUCNR1 и уровень сукцината хондроцитов;

четвертая серия – изучение влияния окислительного стресса (H_2O_2 200 мкМ в конечной концентрации) на абсолютное количество SUCNR1 и уровень сукцината хондроцитов, предварительно обработанных мелатонином (100 мкМ в конечной концентрации);

пятая серия – изучение влияния окислительного стресса (H_2O_2 200 мкМ в конечной концентрации) на абсолютное количество SUCNR1 и уровень сукцината хондроцитов, предварительно обработанных мелатонином (500 мкМ в конечной концентрации);

шестая серия – изучение влияния окислительного стресса (H_2O_2 200 мкМ в конечной концентрации) на абсолютное количество SUCNR1 и уровень сукцината хондроцитов.

2.8.1. Условия культивирования клеток хондроцитов

Клетки культивировали на 25, затем на 75 фласке в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с добавлением L-глутамина в конечной концентрации 1 % («ПанЭко», РФ), пирувата в конечной концентрации 1 % («ПанЭко», РФ), инсулин-трансферрин-серина (ITS) в конечной концентрации 2% («ПанЭко», РФ), эмбриональной бычьей сыворотки в конечной концентрации 10% («Sigma-Aldrich», США) и пенициллина 100 ЕД/мл («ПанЭко», РФ).

Клетки инкубировали при 37°C и 5% уровне CO_2 . При достижении монослоя 70-90% конфлюэнтности, клетки снимали в количестве 5×10^6 добавлением раствора трипсин-ЭДТА (0,25% трипсин и 0,2% ЭДТА) («ПанЭко», РФ) и высевали на 6-луночных планшетах.

2.8.2. Экспериментальные клеточные модели и схемы использования препаратов *in vitro*

К хондроцитам экспериментальных серий 2, 3, 4 и 5 добавляли мелатонин до получения конечных концентраций 100 или 500 мкМ и пероксид водорода (H_2O_2) в серии 4, 5 и 6 до получения конечной концентраций 200 мкМ. В качестве препарата использовалась субстанция мелатонина 99,9% (Melatonin, JM, Индия). Длительность воздействия составляла 24 часа для мелатонина и 12 часов для H_2O_2 . Исходные концентрации веществ и время инкубации клеток были выбраны по результатам анализа публикаций сходных по дизайну исследований [72, 92, 134]. В контрольную лунку в эквивалентном объеме добавляли воду для инъекций (растворитель H_2O_2) или этанол не более 0,1 % (растворитель мелатонина). На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения.

После окончания культивирования клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА, трехкратно промывали фосфатным буфером (PBS) pH=7,4 (ПанЭко, Российская Федерация) и лизировали согласно инструкции к наборам.

Определение локализации сукцинатного рецептора

Для оценки локализации SUCNR1 выполняли иммуноцитохимическое исследование. Для этого клетки культивировали в 96-луночных планшетах. После чего клетки фиксировали охлажденным до $-200C$ метанолом (15 мин), пермеабелизировали мембрану 0,1% раствором Тритона X-100 (15 мин), блокировали раствором BSA-DPBST (1 г 99% бычьего сывороточного альбумина («CDH», Индия), 100 мл раствора фосфатного буфера («Bio-Rad», США), 100 мкл Tween-20 («Sigma-Aldrich», Германия)) в течение 30 минут при комнатной температуре. Далее инкубировали с первичными поликлональными антителами к SUCNR1 (AF5316 GPR91 Antibody, «Affinity Biosciences», КНР) в течение ночи при $+40C$. Визуализацию первичных антител осуществляли с помощью

вторичных антител против белка кролика (S0018 Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG 49 (H+L) Fluor488-conjugated, «Affinity Biosciences», КНР), которые инкубировали с клетками в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре. Визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus СКХ-53 («Olympus», Япония) при увеличении в 400 раз.

2.8.3. Определение метаболитов в клетках линии хондроцитов

После снятия клеток с 6-луночных планшетов, клетки трехкратно промывались в PBS, затем проводили цикл замораживания/оттаивания 3 раза при -20°C . Далее клетки центрифугировали в течение 15 мин 1000 g при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$ для осаждения фрагментов клеток. Супернатант использовали для выполнения биохимических анализов в соответствии с наборами для определения уровня сукцината и SUCNR1.

2.8.4. Определение количества белка в пробах *in vitro*

Анализ проводили методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus («Bradford») Assay Kit, «ThermoFisher», США). Метод основан на связывании красителя Coomassie brilliant Blue G250 с остатками основных и ароматических аминокислот, с последующим развитием синей окраски. Количество белка оценивалось спектрофотометрическим методом по интенсивности окраски на микропланшетном анализаторе Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США) при длине волны 595 нм [63]. Полученные результаты рассчитывали с помощью калибровочного графика и выражали в мг/мл белка.

2.9. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы

Statistica 12.0. (Statsoft, США). Построение графических рисунков с помощью программы GraphPad Prism 12 (GraphPad Software, США). Соответствие выборок нормальному распределению проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка с построением нормального вероятностного графика ($p < 0,05$). При распределении величин, отличного от нормального, для определения статистической значимости в независимых группах использовали критерий множественного сравнения Краскела Уоллиса и попарное сравнение с помощью критерия Манна-Уитни, а в зависимых группах критерий Уилкоксона и тест Фридмана. Количественные данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха Me [25; 75 перцентиль]. При нормально распределенных величинах для оценки статистической значимости различий между двумя группами использовали t-критерий Стьюдента, при сравнении более чем двух групп применяли дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Тьюки. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Данные на графиках представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента Спирмена. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Определение показателей костно-хрящевого метаболизма у пациентов с метаболическим фенотипом остеоартроза

Поскольку дислипидемия является компонентом метаболического синдрома, то для ее установления нами был определен липидный спектр у пациентов метаболического фенотипа ОА. Выявлено, что у пациентов метаболического фенотипа ОА (2 и 3 группы) отмечалось статистически значимое повышение уровня ОХ ($p < 0,001$), фракций ЛПНП ($p < 0,001$), коэффициента атерогенности (КА) ($p < 0,001$) и снижение фракции ЛПВП ($p < 0,001$) в сравнении с группами без метаболического фенотипа ОА (Таблица 2).

Таблица 2 – Липидный спектр сыворотки крови у пациентов исследуемых групп

Группа	ОХ	ЛПВП	ТГ	ЛПНП	КА
Без МетОА	3,7 [3,24; 4,43]	1,32 [1,06; 1,46]	1,06 [0,76; 1,49]	2,19 [1,7; 2,65]	1,9 [1,35; 2,82]
МетОА	6,31 [5,8; 6,67]*	0,89 [0,69; 1,15]*	0,74 [0,67; 0,9]	4,83 [4,05; 5,38]*	5,36 [4,04; 7,29]*
Примечание – * – статистически значимые различия между значениями, $p < 0,05$.					

В настоящее время исследования биомаркеров сосредоточены на их использовании в качестве инструментов для идентификации молекулярных эндотипов и клинических фенотипов, а также для облегчения скрининга и мониторинга пациентов в исследованиях [189]. Определяемый спектр костно-хрящевых метаболитов у пациентов с метаболическим фенотипом ОА позволил выявить разнонаправленную динамику исследуемых показателей. У пациентов с метаболическим фенотипом ОА в сравнении с группой здоровых пациентов наблюдалось статистически значимое повышение активности КФ, уровня КЩФ и снижение уровня Ca^{2+} сыворотки крови (Таблица 3).

Таблица 3 – Активность ферментов и уровень метаболитов костно-хрящевого обмена в сыворотке крови у пациентов исследуемых групп

№	СОМР, нг/мл	КФ, нмоль/(с*л)	КЩФ, ммоль/л	Са ²⁺ , ммоль/л
Здоровые пациенты (группа 1)	1065,88 [695,30;1347,81]	333,58 [291,54; 398,37]	16,18 [14,42; 20,96]	2,08 [2,00; 2,27]
Пациенты с МетОА (группа 2)	1056 [883,33;1278,88]	607,89 [512,78;664,41]*↑ p ₁₋₂ =0,001	24,81 [23,51;26,36]*↑ p ₁₋₂ =0,0005	1,49 [1,29; 1,60]*↓ p ₁₋₂ =0,002
Примечание – * – статистически значимые различия между значениями, p<0,05.				

Некоторыми исследованиями рассматривается возможность использования СОМР в качестве маркера тяжести ОА, поскольку по результатам мета-анализа его уровень был связан как со структурными повреждениями сустава, так и с симптомами [113]. СОМР представляет собой белок внеклеточного матрикса с пятью идентичными субъединицами гликопротеина, который связывается с коллагенами и, как считается, является надежным маркером обновления хряща [206, 248]. Однако по нашим данным уровень СОМР у пациентов с метаболическим фенотипом ОА не различался между группами (p>0,05), что коррелирует с результатами других похожих по выборке исследований [61,71,78].

Примечательным является то, что выявленное нами повышение маркеров костной резорбции у пациентов с метаболическим фенотипом ОА, согласуется с недавно опубликованными данными по гистопатологическим особенностям субхондральной кости у пациентов с ОА, где повышенная плотность субхондральных остеокластов ассоциировалась с болью [56].

В целом повышение активности КЩФ, ЩФ и снижение уровня Са²⁺ отражают активные процессы ремоделирования, происходящие в костной ткани. Воздействие жировой ткани на скелет опосредовано как механическими, так и в большей мере биохимическими факторами, а протекающие в клетках и тканях процессы основаны на механизмах обратной связи [215]. Нами предполагается,

что интенсификация костной резорбции и увеличение активности фермента КФ у пациентов с метаболическим фенотипом ОА приводит к усилению процессов образования костной ткани, что и обуславливает повышение КЩФ сыворотки крови [94].

Ранее считалось, что избыточный вес является защитным фактором для костной ткани, формируя патогенетическую концепцию – «парадокс ожирения» [237], при котором повышенный ИМТ коррелирует с более высокой минеральной плотностью костей и благоприятным профилем микроархитектуры кости у этих пациентов, обусловленный механическим воздействием веса тела на костную ткань. Однако эта взаимосвязь не столь очевидна [52] и не приводит к снижению риска переломов, поскольку ожирение влияет на костный метаболизм посредством механических, гормональных и воспалительных факторов, тесно связанных с системой остеопротегерин (OPG)/RANKL/RANK. В свою очередь, регуляция функции костных клеток происходит путем непосредственной экспрессии жировой тканью RANKL с последующей дифференцировкой остеокластов [143].

В костной ткани лептин напрямую воздействует на лептиновые рецепторы на поверхности остеобластов, ингибируя выработку OPG, что приводит к увеличению концентрации RANKL и, как следствие, к усилению резорбции кости [99]. Наряду с этим, по принципу обратной связи могут усиливаться процессы костеобразования, что сопровождается повышением показателей костных маркеров, таких как щелочная фосфатаза и остеокальцин, наблюдаемых в остеобластах [150].

Следующим этапом анализа популяции метаболического фенотипа ОА было выявление корреляционных связей между исходными биохимическими показателями и результатами клинических шкал. Обнаружено, что уровень КЩФ прямо коррелировал с тяжестью ОА по альгофункциональной шкале Лекена ($r=0,55$; $p<0,01$), а активность фермента КФ прямо коррелировала с тяжестью ОА по альгофункциональной шкале Лекена ($r=0,62$; $p<0,04$) и неудовлетворительным

качеством сна по шкале Эпворт ($r=0,55$; $p<0,04$).

Корреляционный анализ между показателями липидного спектра и клиническими показателями позволил выявить статистически значимую ($p<0,05$) умеренную положительную корреляционную связь между уровнем ОХ ($r=0,42$) и шкалой ВАШ у пациентов с метаболическим фенотипом ОА (Рисунок 7).

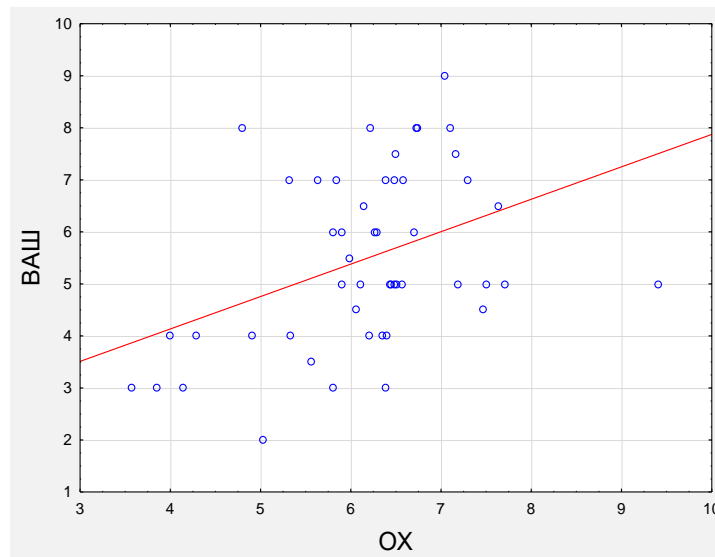


Рисунок 7 – Корреляционный анализ между баллами визуально-аналоговой шкалы боли (ВАШ) и уровнем общего холестерина (ОХ) у пациентов с метаболическим фенотипом ОА

Кроме того, умеренная положительная корреляционная связь наблюдалась между уровнем холестерина ЛПНП ($r=0,41$, $p<0,05$) и шкалой ВАШ у пациентов с метаболическим фенотипом ОА (Рисунок 8).

Также статистически значимая ($p<0,05$) умеренная положительная корреляционная связь ($r=0,48$) определялась между уровнем КА и шкалой субъективной оценки функционального состояния коленных суставов Лекена (Рисунок 9).

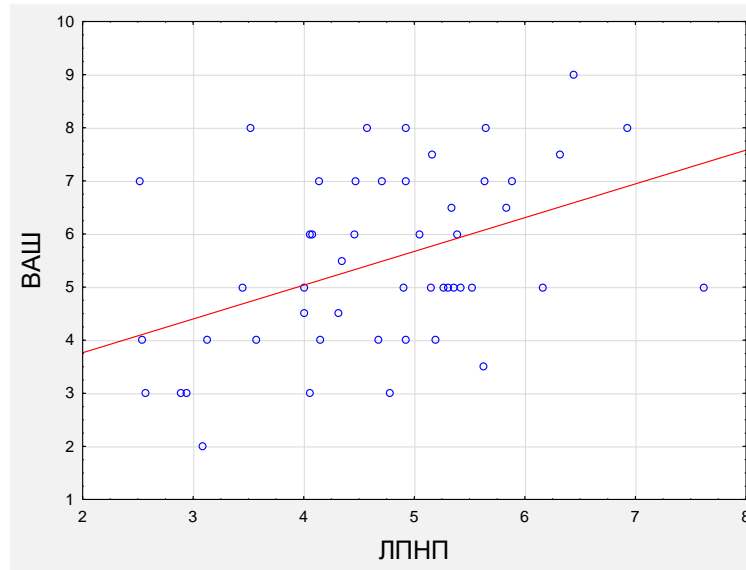


Рисунок 8 – Корреляционный анализ между баллами визуально-аналоговой шкалы боли (ВАШ) и уровнем ЛПНП у пациентов с метаболическим фенотипом ОА

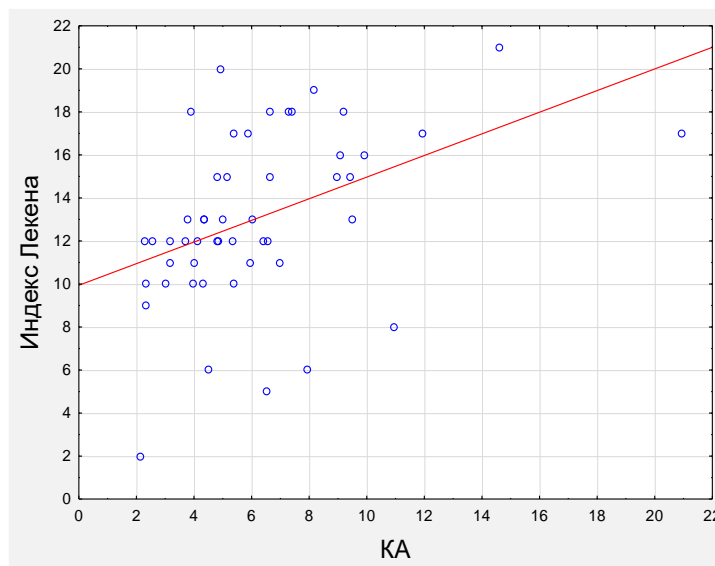


Рисунок 9 – Корреляционный анализ между индексом Лекена и коэффициентом атерогенности (КА) у пациентов с метаболическим фенотипом ОА

Таким образом, у пациентов с метаболическим фенотипом ОА наблюдается повышение активности КФ, уровня КЩФ и снижение содержания Ca^{2+} в сыворотке крови. Обнаружены прямые корреляционные взаимосвязи между активностью КФ, уровнем КЩФ и тяжестью ОА по клинической шкале Лекена и качеством сна по шкале Эпворт, а также прямые корреляционные связи между

компонентами липидного спектра сыворотки крови и клиническими симптомами ОА по шкалам боли ВАШ и Лекена.

3.2. Окислительная модификация белков у пациентов с метаболическим фенотипом остеоартроза

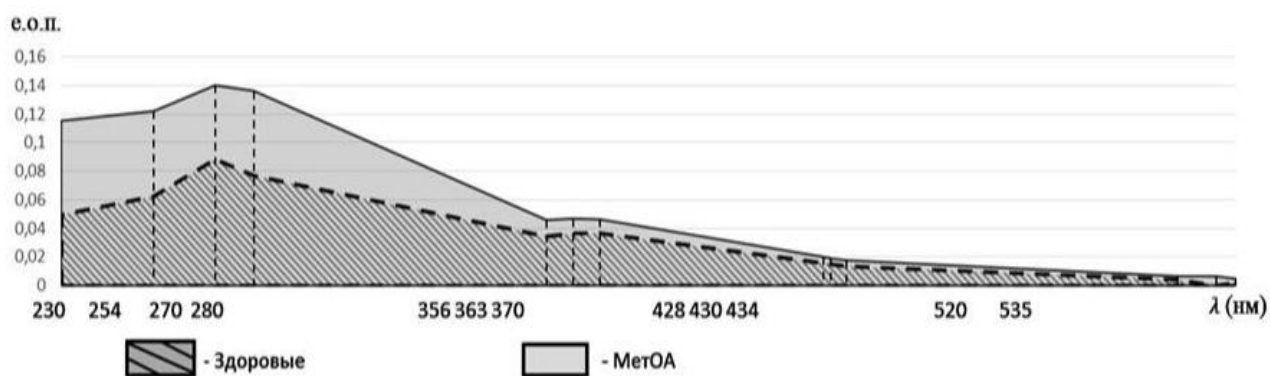
Жировая ткань является не только депонирующим органом, но и источником биологически активных веществ, поступающих в системный кровоток и индуцирующих выработку АФК и активных форм азота (АФА), выступая фактором формирования системного ОС [29]. Следовательно, при метаболическом синдроме более наглядным представляется выявление продуктов ОМБ в сыворотке крови как последствий ОС системного характера.

Основными мишенями для свободнорадикальных процессов ввиду высокой чувствительности к ним и распространенности в биологических материалах являются белки. Кроме того, они ответственны за большинство функциональных процессов, вследствие чего изучение их окислительной модификации является актуальной проблемой [84].

Определяемый нами уровень ОМБ сыворотки крови показал различия в уровнях спонтанной ОМБ между здоровыми пациентами (группа 1) и пациентами метаболического фенотипа ОА. Общая площадь под кривой спонтанной ОМБ была статистически значимо выше в основном за счет нейтральной фракции альдегид-динитрофенилгидразонов (АДНФГ), что продемонстрировано на Рисунке 10.

Результатом окислительной деструкции белков является нарушение их исходной структуры. Под действием активных форм кислорода (АФК) могут происходить два процесса: фрагментация белков, маркерами которой являются АДНФГ; и агрегация белков, маркерами которой являются кетон-динитрофенилгидразоны (КДНФГ). Данный методологический подход позволяет оценить общий уровень ОМБ, количество АДНФГ и КДНФГ основного и

нейтрального характера, а также выявить путь нарушения нативной конформации белков [31].



Группа	САДНФГ н.	СКДНФГ н.	САДНФГ о.	СКДНФГ о.	S общ.
Здоровые	9,78 [3,7; 16,3]	1,81 [1,36; 2,14]	0,93 [0,53; 1,15]	0,11 [0,04; 0,16]	12,9 [5,4; 19,4]
МетОА	15,28 [9,17; 24,12]*↑ p=0,007	2,3 [1,78; 4]	1,15 [0,7; 2,9]	0,15 [0,08; 0,51]	25,2 [13,5; 32,3]*↑ p=0,001

Рисунок 10 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов и их компонентов спонтанной ОМБ сыворотки крови у пациентов с метаболическим фенотипом ОА

Примечание – * – статистически значимые различия между значениями, $p < 0,05$.

Необходимость изучения спонтанной и индуцируемой ионами металлов окислительной модификации белков, обусловлена возможностью произвести косвенную оценку антиоксидантных способностей белков с помощью резервно-адаптационного потенциала (РАП). При изучении РАП нами было отмечено его снижение у пациентов с метаболическим фенотипом ОА. Из представленного Рисунка 11 следует, что статистически значимые различия между резервно-адаптационным потенциалом исследуемых групп наблюдались для АДНФГ нейтрального и для КДНФГ основного характера.

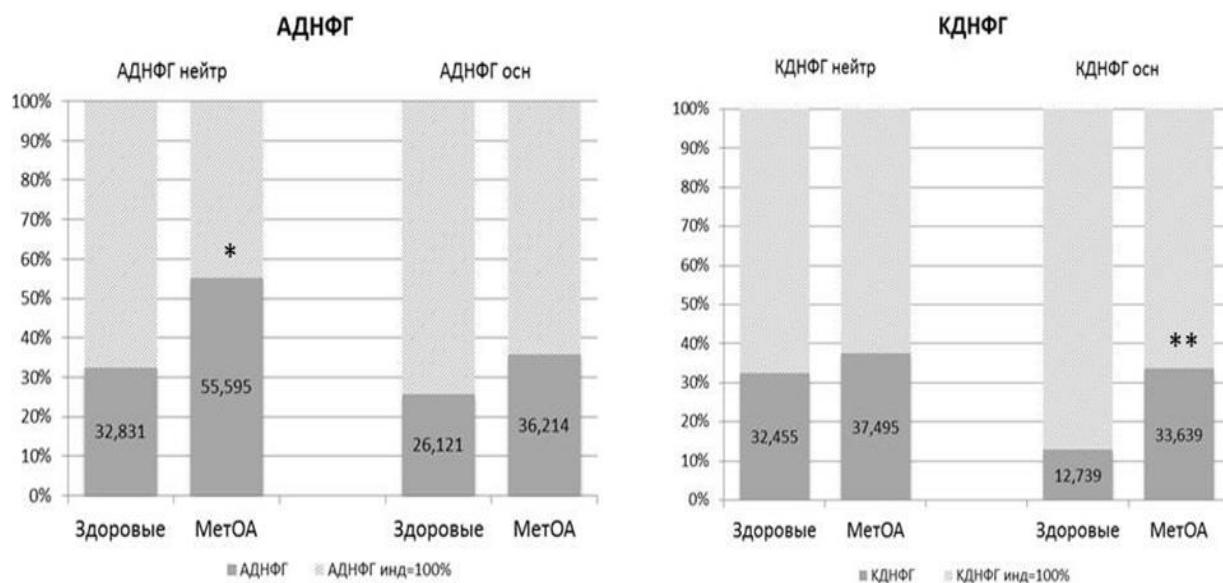


Рисунок 11 – Отношение площади под кривой альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов, полученных при спонтанном окислении, к площади, полученной при индуцированном окислении белков крови у пациентов с метаболическим фенотипом ОА

Примечание – * – статистически значимые различия между значениями, $p=0,0001$;

– ** – статистически значимые различия между значениями, $p=0,027$.

Полученные результаты истощения РАП могут свидетельствовать о недостаточной активности антиоксидантных систем, снижении возможности обновления белков и накопления поврежденных протеинов со слабой функциональной активностью при метаболическом фенотипе ОА

Показатели ОМБ в группах метаболического фенотипа ОА характеризуются повышением в большей степени первичных маркеров фрагментации и, следовательно, инициальных стадий развития окислительного стресса, что, с одной стороны, может рассматриваться как компенсаторная реакция организма, направленная на повышение общего резерва системы антиоксидантной защиты. Но, с другой стороны, ОМБ может стать одной из причин ингибирования активности ферментативного звена антиоксидантной защиты и усугубить течение ОС, что в наших результатах отразилось в снижении активности СОД у пациентов с ОА (Таблица 4).

Таблица 4 – Активность СОД в сыворотке крови у пациентов с метаболическим фенотипом ОА

	Здоровые	МетОА
СОД, у.е.а.	7,4 [5,3; 8,4]	3,5 [2,5; 4,3]*↓ p<0,001
Примечание – * – статистически значимые различия между значениями, p<0,05.		

Поскольку биохимические изменения под влиянием ОС носят системный характер, то наиболее наглядными представляются корреляции между исходными маркерами ОМБ и клиническими показателями пациентов с метаболическим фенотипом ОА (Таблица 5).

Таблица 5 – Корреляционный анализ между биохимическими и клиническими показателями пациентов групп метаболического фенотипа ОА

	Шкала Лекена	KOOS NormP
Собщ металл	r=0,57; p<0,007	r= -0,54; p<0,008
САДФГ(нейтр) металл	r=0,55; p<0,009	r= -0,52; p<0,012
Примечание – r – коэффициент корреляции.		

Выявлена обратная корреляция металл-зависимого звена ОМБ с уровнем боли (NormP) шкалы KOOS, где более низкие показатели NormP демонстрируют выраженный болевой компонент, и прямая корреляционная связь показателя со шкалой Лекена, где высокий балл отражает сильный болевой синдром, что говорит о высоких уровнях развития ОС у пациентов с более выраженными клиническими симптомами ОА.

Также отмечена прямая корреляционная связь между общей площадью спонтанной ОМБ и ИМТ (r=0,43, p=0,045), что дополнительно подтверждает интенсификацию процессов окисления белков у пациентов с избыточной жировой массой (Рисунок 12).

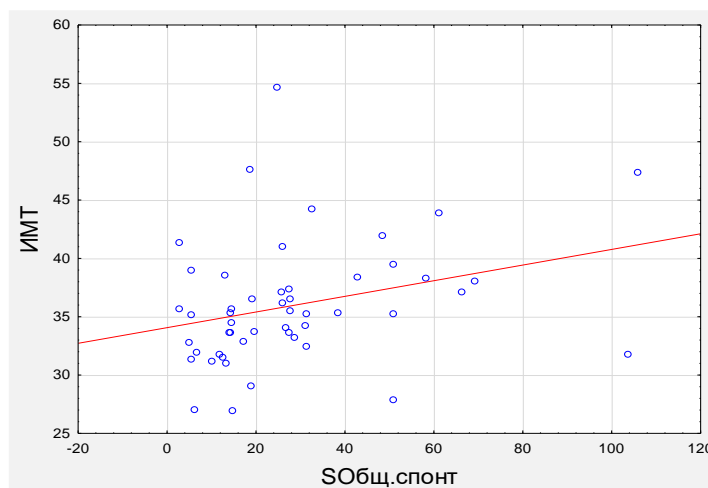


Рисунок 12 – Корреляционный анализ между индексом массы тела (ИМТ) и уровнем спонтанной ОМБ у больных с метаболическим фенотипом ОА

Поскольку нами обнаружено увеличение количества карбонилированных производных аминокислотных остатков в белках сыворотки крови с сопутствующим истощением РАП ОМБ, то следующим этапом исследования явилось изучение ОМБ в исследуемых зонах костно-хрящевой ткани (Таблица 6).

Таблица 6 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной ОМБ костно-хрящевой ткани

	3 группа	4 группа	p3-4
Субхондральная зона кости (к)	55 [34; 95]*↑ $P_{к-хнн}=0,004$	27,91 [18,69; 40,1] $p_{к-хн}>0,05$	*↑ $p=0,03$
Нагружаемая зона хряща (хн)	38,42 [26,75; 38] $P_{хн-хнн}>0,05$	21,68 [9,36; 29] $P_{хн-хнн}>0,05$	*↑ $p=0,04$
Ненагружаемая зона хряща (хнн)	18,52 [12,67; 37,33]	28,48 [12;39,52] $p_{хнн-к}>0,05$	$p>0,05$
Примечание – * – статистически значимые различия между значениями, $p<0,05$.			

В группе 3 нами выявлено увеличение общей площади под кривой спонтанной ОМБ в субхондральных отделах кости и нагружаемой зоне хряща в сравнении с группой 4. В группе 3 выявлены более высокие уровни спонтанной

ОМБ в субхондральной зоне хряща в сравнении с ненагружаемой зоной.

При изучении РАП исследуемых зон сустава статистически значимых изменений между группами нами отмечено не было.

Таким образом, метаболический фенотип ОА сопровождается усилением ОС, выражающегося в увеличении количества карбонилированных производных аминокислотных остатков в белках сыворотки крови и костно-хрящевой ткани. При этом на фоне усиления ОМБ наблюдается нарушение системы антиоксидантной защиты, о чем свидетельствует снижение активности СОД с сопутствующим истощением РАП ОМБ сыворотки крови. Выявлена корреляция общей площади спонтанной ОМБ, площади АДНФГ металл-катализируемой ОМБ сыворотки крови с уровнем боли, определяемой по шкале KOOS и Лекена.

3.3. Особенности распределения сукцинат-рецепторной системы в костно-хрящевой ткани при метаболическом фенотипе остеоартроза

Повышение ОМБ в сыворотке крови и костно-хрящевой ткани свидетельствует о развитии системного окислительного стресса, активатором которого могут выступать АФК, где основное место их образования – дыхательная цепь митохондрий. Комплекс II может играть роль как самостоятельного генератора свободных радикалов, так и донора электронов для комплексов I и III, поэтому вносит прямой и косвенный вклад в производство АФК.

В последнее время сукцинат рассматривается исследователями как потенциальный биомаркер в диагностике ОА и возможным сигнальным фактором, объясняющим воспаление и деструкцию тканей [16]. Помимо своей традиционной функции метаболита в цикле трикарбоновых кислот, сукцинат способен выполнять гормоноподобную роль, запуская сигнальные пути через SUCNR1 при различных патологических состояниях, указывая на локальный стресс и изменяя при этом клеточный метаболизм [111, 220].

При изучении гомогенатов хирургических опилов различных зон сустава пациентов с метаболическим фенотипом ОА (3-я группа) и гомогенатов пациентов без рентгенологических и макроскопических признаков ОА с переломом шейки бедренной кости (4-я группа) наблюдались статистически значимые межгрупповые различия по уровню SUCNR1.

В 3 группе выявлено увеличение количества SUCNR1 во всех исследуемых зонах сустава в сравнении с группой 4 (Рисунок 13).

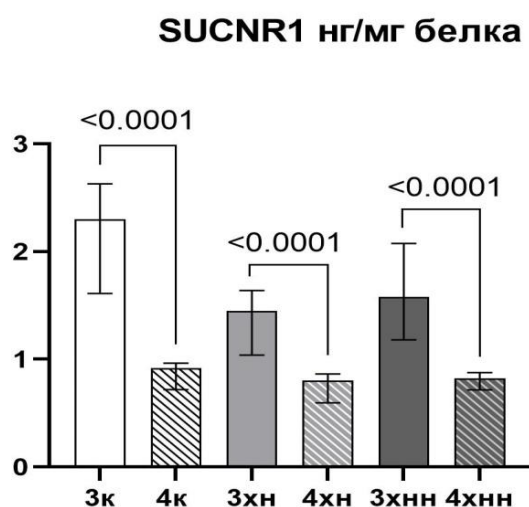


Рисунок 13 – Количество SUCNR1 в гомогенатах костно-хрящевой ткани у пациентов 3 и 4 группы, нг/мл

Примечание – к – субхондральная кость; – хн – хрящ нагружаемой зоны; – хнн – хрящ не нагружаемой зоны.

Последующий внутригрупповой анализ гомогенатов костно-хрящевой ткани пациентов с метаболическим фенотипом ОА выявил неравномерное распределение SUCNR1 в них, где более высокий его уровень наблюдался в области субхондральной кости по сравнению с хрящевыми зонами сустава.

На Рисунке 14 продемонстрированы отличия по количеству рецептора между субхондральной костью, нагружаемой и не нагружаемой зонами сустава.

В 4 группе исследуемые зоны сустава не отличались по количеству SUCNR1 между собой, имея неспецифический характер распределения (Рисунок 13).

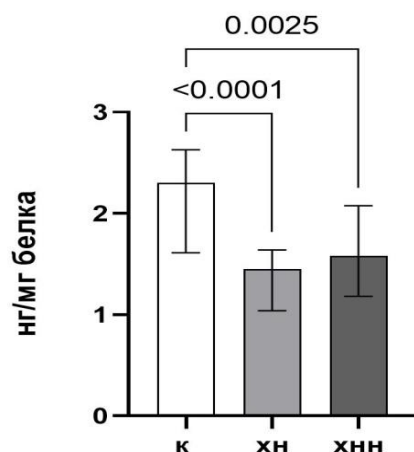


Рисунок 14 – Количество сукцинатного рецептора SUCNR1 в гомогенатах костно-хрящевой ткани у пациентов метаболическим фенотипом ОА (группа 3)

Примечание – к – субхондральная кость; – хн – хрящ нагружаемой зоны; – хнн – хрящ ненагружаемой зоны.

Измерение содержания сукцината митохондрий в гомогенатах костно-хрящевой ткани 3 и 4 группы показало различия во всех исследуемых зонах сустава между группами.

У пациентов с метаболическим фенотипом ОА обнаружено увеличение метаболита как в субхондральной костной ткани, так и в различных зонах хряща по сравнению с 4 группой (Рисунок 15).

Сукцинат мкмоль/мг белка

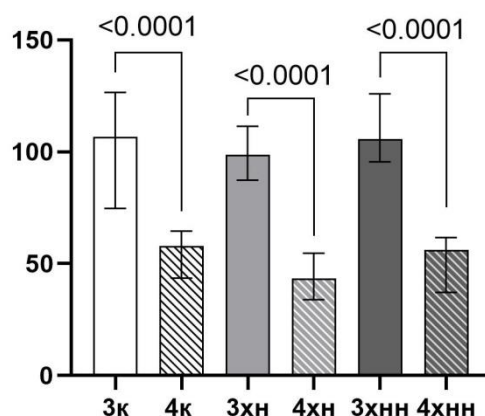


Рисунок 15 – Содержание сукцината в гомогенатах костно-хрящевой ткани у пациентов метаболическим фенотипом ОА (группа 3)

Примечание – к – субхондральная кость; – хн – хрящ нагружаемой зоны; – хнн – хрящ ненагружаемой зоны.

В большинстве исследований изучение роли сукцинат-рецепторной системы было связано с адаптацией к метаболическому стрессу, развивающемуся в ответ на патологические условия [28]. У пациентов с метаболическим фенотипом ОА отмечено увеличение содержания сукцината и повышение уровня его рецептора в костно-хрящевой ткани, которая носит тканеспецифичный характер.

Как промежуточное звено в цикле лимонной кислоты, сукцинат оказывает свое действие как внеклеточно, так и внутриклеточно [230]. Так, нарушение ЦТК может приводить к повышению уровня сукцината в матриксе митохондрий и утечке избыточного количества сукцината в цитоплазму, где он действует как сигнальная молекула, влияя на клеточные функции, например, посредством ингибирования пролилгидроксилазы HIF1 α [160].

Цитозольный сукцинат секретируется во внеклеточное пространство и диффундирует в циркулирующую кровь, где действует как системный метаболит, регулируя, как физиологические функции, так и патологические процессы. Следовательно, повышение уровня сукцината в митохондриях костно-хрящевой ткани пациентов с метаболическим фенотипом ОА следует рассматривать как сигнал, являющийся результатом изменения функционирования митохондрий в условиях ОС.

Рядом исследований показано, что, накапливаясь, внутриклеточный сукцинат способствует транскрипции воспалительных факторов путем стабилизации HIF-1 α . В то же время внеклеточная активация SUCNR1 приводит к высвобождению кальция и активации протеинкиназы C, что в итоге высвобождает оксид азота (II) и простагландин E2 [216], а индуцирование секреции IL-1 β происходит не только посредством ингибирования пролилгидроксилазы HIF-1 α , но и через активацию SUCNR1 [111].

Важным показателем состояния сукцинат-рецепторной системы является фермент внутренней мембраны митохондрий – СДГ, активность которого отражает характер энергетического метаболизма клетки.

В литературе указывают на повышение экспрессии СДГ в клетках крови при ОА, которая связана с неблагоприятным болевым профилем в послеоперационный период [5]. Нами не обнаружены изменения в активности СДГ митохондрий в большинстве зон сустава обеих исследуемых групп (Таблица 7).

Таблица 7 – Активность СДГ в митохондриях костно-хрящевой ткани у пациентов 3 и 4 групп (нмоль сукцината/мин на мг белка)

	3 группа	4 группа	p ₃₋₄
Субхондральная зона кости (к)	3,26 [2,02; 5,06]	0,29 [0,15; 0,5]	*↑p<0,01
Нагружаемая зона хряща (хн)	0,19 [0,12; 0,37] p _{хн-к} <0,01*↓	0,37 [0,13; 0,58] p _{хн-к} >0,05	p>0,05
Не нагружаемая зона хряща (хнн)	0,26 [0,18; 0,76] p _{хнн-к} <0,01*↓	0,31 [0,28; 0,69] p _{хнн-к} >0,05	p>0,05
Примечание – * – статистически значимые различия между значениями, p<0,05.			

Однако некоторое увеличение активности фермента СДГ митохондрий субхондральной кости относительно других исследуемых зон сустава выявлено в группе метаболического фенотипа ОА.

Активность фермента СДГ митохондрий гомогенатов костно-хрящевой ткани группы сравнения (группа 4) не различалась между исследуемыми зонами сустава.

Поскольку избыточный вес является фактором риска ОА, обуславливающий последующие метаболические изменения и деструкцию тканей сустава, то возникает интерес в поиске потенциальных связей между антропометрическими факторами риска ОА и исследуемыми биохимическими маркерами.

Выявлена сильная прямая корреляционная связь между показателями окислительного стресса сыворотки крови пациентов группы 3 и уровнем сукцината в нагружаемой зоне хряща (Таблица 8).

Таблица 8 – Корреляционный анализ между сывороточными маркерами карбонильного стресса и сукцинатом нагружаемой зоны хряща пациентов группы 3

	SOбщ.спонт	САДНФГн
Сукцинат хн	$r=0,80; p<0,01$	$r=0,76; p<0,01$
Примечание – r – коэффициент корреляции.		

Проанализировав клинико-биохимические характеристики пациентов 3 группы, нами получена сильная прямая корреляционная связь между уровнем SUCNR1 субхондральной кости и процентного содержания жира в организме, что отражено на Рисунке 16.

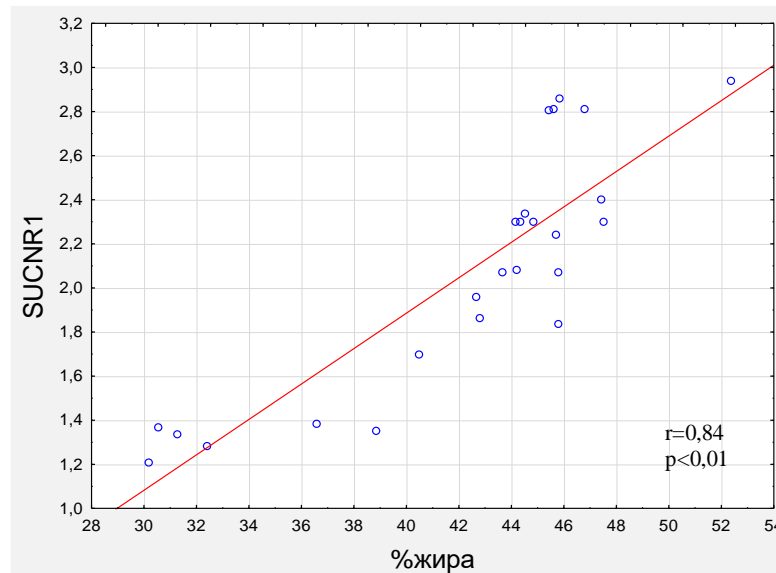


Рисунок 16 – Корреляционный анализ уровня SUCNR1 субхондральной кости и процента жира в организме у пациентов с метаболическим фенотипом ОА (группа 3)

Стоит отметить, что в анаэробных условиях как внутриклеточная, так и, что важно, внеклеточная концентрация сукцината резко возрастают за счет реверсного восстановления фумарата сукцинатдегидрогеназой [132]. Полученные нами показатели активности СДГ хрящевых зон и субхондральной кости исследуемых групп не показали различия между собой, однако отмечалась более

высокая активность фермента в субхондральной зоне кости пациентов 3 группы.

Ввиду своего строения, особенностей васкуляризации и количества клеток на единицу ткани, метаболическая активность костной ткани выше, чем в хрящевой, что может объяснять более высокую активность СДГ и всей сукцинат-рецепторной системы в исследуемой зоне в целом. Нами предполагается, что при метаболическом фенотипе ОА в митохондриях накапливается избыточное количество АФК, снижающих работу ЭТЦ с повышением активности СДГ, накоплением и последующим выходом сукцината в цитоплазму и межклеточное пространство с активацией SUCNR1.

Таким образом, мы предполагаем, что повышение содержания сукцината, увеличение экспрессии его рецептора в пораженных зонах суставах и относительное повышение активности СДГ в субхондральных отделах кости при метаболическом фенотипе ОА носит адаптационный характер с целью ограничения развития ОС.

3.4. Оценка влияния мелатонина на клинико-биохимические показатели пациентов с метаболическим фенотипом остеоартроза

3.4.1. Уровень ночной секреции мелатонина в сыворотке крови и нарушения сна у пациентов с метаболическим фенотипом остеоартроза

ОА является основной причиной боли и инвалидности [199]. Ранее обнаружено, что более высокие баллы по опроснику Индекса остеоартрита Университетов Западного Онтарио и Макмастера (WOMAC), который отражает высокую инвалидность, связанную с ОА, считаются предиктором плохого качества сна, подчеркивая взаимосвязь расстройства сна с функциональностью [210].

Известно, что мелатонин синтезируется, а затем секретруется с разной скоростью в течение дня и ночи, с увеличением концентрации между 21:00 и

22:00 часами вечера. Максимальная концентрация в плазме крови достигается между 2:00 и 3:00 часами ночи и снижается утром между 7:00 и 9:00 часами, имея низкую или неопределяемую концентрацию в течение дня. Поэтому в нашем исследовании время забора биологического материала проводилось между 2:00 и 3:00 ч., что обосновано экспериментальными данными о ритме секреции гормона [141].

По результатам обследования было выявлено, что у пациентов с метаболическим фенотипом ОА наблюдается снижение ночной секреции гормона шишковидной железы мелатонина в сравнении с пациентами группы 1 (Рисунок 17).

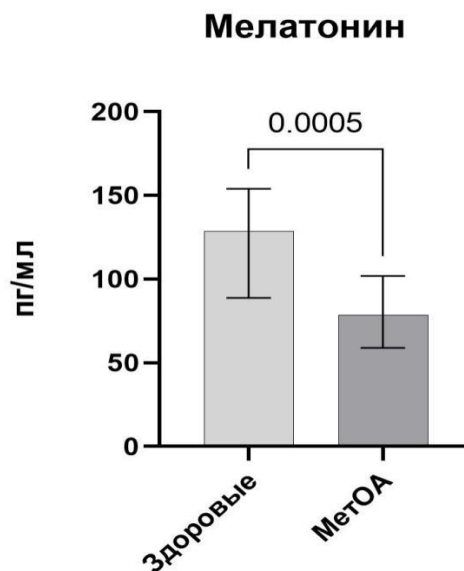


Рисунок 17 – Уровень ночной секреции мелатонина в сыворотке крови здоровых пациентов и пациентов метаболического фенотипа ОА (пг/мл)

Тесты на выявление сомнологических нарушений у пациентов с метаболическим фенотипом ОА показали статистически значимые нарушения сна в сравнении с группой здоровых пациентов по всем субъективным шкалам оценки качества и количества сна (Таблица 9).

Таблица 9 – Инсомнологические показатели шкал субъективной оценки количества и качества сна (баллы) у пациентов с метаболическим фенотипом ОА

Группа	Шкала PSQI	Шкала Левина	Шкала Эпворта
Здоровые	4 [3; 6,75]	26 [22; 30]	4 [2; 6,75]
МетОА	8,5 [6; 11]*↑ p<0,001	17 [15; 19]*↓ p<0,001	10 [8; 11]*↑ p<0,001
Примечание – * – статистически значимые различия между значениями, p<0,05.			

Пациенты демонстрировали склонность к дневной сонливости, неудовлетворенность продолжительностью сна и частые ночные пробуждения, которые могут быть обусловлены болевым синдромом и симптомами ОА.

Косвенно это подтверждается выявленной умеренной прямой корреляционной связью между уровнем ночной секреции мелатонина в сыворотке крови и уровнем выраженности симптомов (NormS) по шкале KOOS у пациентов 2 группы. Коэффициент корреляции составил $r=0,31$, $p=0,02$, что говорит о потенциальной связи между нарушением сна и сниженной функциональной активностью пациентов с метаболическим фенотипом ОА.

Следовательно, полученные результаты свидетельствуют о том, что снижение ночной секреции мелатонина служит предпосылкой для неблагоприятного клинического течения метаболического фенотипа ОА.

3.4.2. Влияние мелатонина на клинко-биохимические показатели пациентов с метаболическим фенотипом остеоартроза

По прошествии 1 месяца в подгруппе 2М, получавшей в качестве дополнения к базовому лечению препарат мелатонин в дозе 3 мг сут., отмечено статистически значимое снижение уровня ОХ ($p=0,006$), снижение ЛПНП ($p=0,002$), повышение фракции ЛПВП ($p=0,004$) и снижение КА ($p=0,002$) (Таблица 10).

Таблица 10 – Липидные фракции сыворотки крови у пациентов подгрупп 2М и 2Б до и после лечения

№	ОХ		ЛПВП		ЛПНП		КА	
	до	после	до	после	до	после	до	после
2М	5,31 [4,1; 6,26]	4,62 [3,71; 5,29]*↓	0,99 [0,85; 1,13]	1,49 [1,17; 1,72]*↑	3,75 [2,92; 1,72]	2,65 [1,90; 4,98]*↓	4,42 [4,04; 4,81]	2,07 [1,81; 2,34]*↑
2Б	6,38 [6,28; 6,48]	6,36 [5,41; 6,48]	1,42 [1,1; 1,8]	1,32 [1,13; 1,74]	4,84 [3,71; 5,02]	4,51 [3,44; 4,78]	3,35 [2,38; 4,81]	3,52 [2,3; 4,6]

Примечание – * – статистически значимые различия между значениями, $p < 0,05$.

В подгруппе 2Б существенной динамики в показателях липидного обмена отмечено не было. Также не выявлено изменение уровня ТГ в обеих исследуемых подгруппах. Так, в подгруппе 2М уровень ТГ был 0,75 [1,17; 1,72] ммоль/л до лечения и 0,73 [0,62; 0,78] ммоль/л после лечения. В подгруппе 2Б уровень ТГ до лечения составил 0,72 [0,71; 0,74] ммоль/л и 0,98 [0,83; 1,12] ммоль/л после лечения.

Существенной динамики антропометрических показателей (ИМТ, % содержания жира в организме и окружности талии) в обеих подгруппах метаболического фенотипа ОА не отмечалось, поскольку пациенты не были ограничены какой-либо гипокалорийной диетой и питались в привычном для них режиме.

При исследовании костно-хрящевых метаболитов сыворотки крови у пациентов подгруппы 2М после лечения, отмечены определенные изменения уровня маркеров, отражающих процессы костного ремоделирования. Выявлено повышение уровня Ca^{2+} ($p < 0,0001$) в сравнении с исходными показателями, снижение активности КЩФ ($p = 0,01$) и снижение уровня активности КФ ($p < 0,0001$).

Показатель хрящевой деструкции СОМР по окончании лечения у подгруппы 2М не изменился.

У пациентов подгруппы 2Б показатели костного метаболизма (КЩФ, КФ, Ca^{2+}) после проведенного курса лечения не изменялись. Однако обнаружено статистически значимое увеличение уровня маркера хрящевой деструкции СОМР сыворотки крови (Рисунок 18).

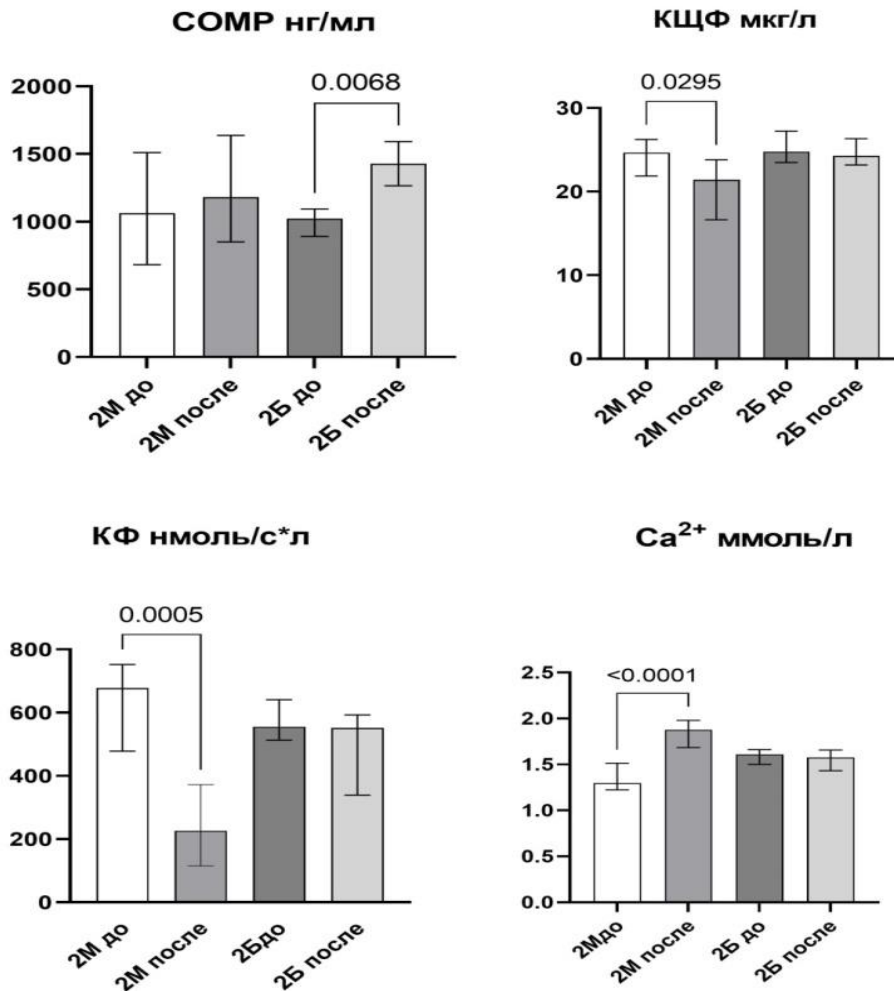


Рисунок 18 – Динамика уровня костно-хрящевых метаболитов у пациентов подгрупп 2М и 2Б

Выявленная динамика маркеров костного метаболизма в подгруппе 2М после лечения, возможно, указывает на некоторый остеогенный эффект мелатонина. Снижение показателей резорбции (КФ) и костеобразования (КЩФ) свидетельствуют об изменении интенсивности процессов ремоделирования костной ткани, а повышение уровня кальция - как следствие увеличения его реабсорбции, что соотносится с результатами других исследований [159, 178].

По результатам консервативного лечения статистически значимый

профицит объема движений относительно исходных показателей показал сходную динамику в обеих исследуемых подгруппах (Таблица 11).

Таблица 11 – Динамика дефицита объема движений коленных суставов до и после лечения (градусы)

№	Дефицит объема сгибательных движений		Дефицит объема разгибательных движений	
	До	После	До	После
2М	37,5 [25,75; 62,5]	25 [23; 35]↓*	19 [10; 20]	10 [10; 15]↓*
	p<0,0007		p<0,005	
2Б	38 [23,75; 54,75]	20 [14,75; 40,00]↓*	18 [10; 20]	16,5 [10; 19,25]↓*
	p<0,00001		p<0,03	
Примечание – * – статистически значимые различия между значениями, p<0,05.				

Показатели шкалы субъективной оценки функционального состояния коленных суставов Лекена в подгруппе 2М снизились после лечения с 12 [12; 13] до 10 [8,75; 10,25] баллов (p<0,03), а среди пациентов подгруппы 2Б оставались без существенной динамики (10,5 [10; 11,75] и 10 [10; 19,25] баллов до и после лечения соответственно). В свою очередь, это говорит о положительном функциональном эффекте лечения в подгруппе 2М.

Положительная динамика результатов шкалы ВАШ наблюдалась в обеих подгруппах, однако в подгруппе 2М снижение болевого синдрома (p=0,005) было эффективнее с 4,5 [3,75; 5] до 2,5 [2; 3,25] мм против 4,5 [4; 5] и 3,5 [3; 4] мм в подгруппе 2Б (p=0,01).

Анализ критериев регионально адаптированной шкалы KOOS у пациентов 2М подгруппы, принимавшей препарат мелатонин, показал снижение тяжести клинического течения ОА (повышение баллов по критериям шкалы). Выявлено уменьшение боли (P) и симптомов (S) с увеличением уровня повседневной активности (A) и суммарного показателя качества жизни (Sum) после лечения. В 2Б подгруппе, чья схема консервативного лечения не включала препарат

мелатонин, только симптомы (S) шкалы KOOS показали умеренное снижение, тогда как изменения остальных показателей, в том числе суммарного (NormSum), не были статистически значимыми (Таблица 12).

Таблица 12 – Нормализованные показатели регионально адаптированной шкалы KOOS после лечения (баллы)

№	NormP		NormS		NormA		NormSum	
	до	после	до	после	до	после	до	после
2Б	66,66 [61,11; 66,66]	66,66 [63,88; 69,44]	58,92 [42,85; 57,14]	67,85 [57,14; 67,85]*↑	44,11 [35,29; 44,11]	46,32 [41,17; 55,51]	45,83 [42,85; 46,42]	51,19 [46,42; 55,05]
			p=0,04					
2М	47,22 [41,66; 61,11]	55,55 [50,0; 75,0]*↑	46,42 [32,14; 50,0]	53,57 [35,71; 60,71]*↑	48,52 [42,64; 51,47]	52,94 [47,05; 64,7]*↑	41,66 [35,11; 46,42]	50 [45,83; 56,54]*↑
	p=0,01		p=0,005		p=0,004		p=0,001	
Примечание – * – статистически значимые различия между значениями, p<0,05.								

При анализе шкалы субъективной оценки качества жизни SF-36 в 2М подгруппе общий показатель физического компонента здоровья (PH) после лечения увеличился (p=0,02) с 31,38 [25,87; 37,56] до 42,85 [40,48; 45,55] балла, а уровень ментального компонента (MH) не претерпел изменений. В 2Б подгруппе отмечалось увеличение (p=0,009) показателя ментального здоровья (MH) с 37,72 [35,13; 52,62] до 51,02 [41,22; 53,57] балла, тогда как показатель физического компонента здоровья не изменился.

Мелатонин применяется в клинике различных коморбидных состояний с целью нормализации сомнологических нарушений как усугубляющего фактора клинического течения [13]. Сомнологические нарушения по результатам лечения нормализовались в 2М подгруппе, принимавшей препарат мелатонин. Изменения показателей качества и количества сна по шкале Эпворта, Левина и PSQI выявлены как внутри группы, так и в сравнении с группой 2Б с уменьшением периодов дневной сонливости, ночных пробуждений и увеличением продолжительности сна. В 2Б подгруппе проблемы с качеством и количеством

сна оставалась на прежнем уровне по всем трем шкалам (Таблица 13).

Таблица 13 – Инсомнологические показатели шкал субъективной оценки количества и качества сна 2 группы после лечения (баллы)

№	Шкала PSQI		Шкала Левина		Шкала Эпворта	
	До	После	До	После	До	После
2Б	9 [7,25; 10,25]	9 [8;10]	18 [17;18,5]	18 [17; 19]	8 [7,75;9]	8 [6,25;9]
2М	10 [9; 10]	7 [6; 8] * $p_{2М-2Б}=0,029$	17 [17; 20]	20 [19; 21] * $p_{2М-2Б}=0,027$	9 [7; 10]	6 [3; 6]
	p=0,003		p=0,006		p=0,003	
Примечание – * – статистически значимые различия между значениями, $p < 0,05$.						

Следовательно, добавление в схему консервативного лечения препарата мелатонин в дозе 3 мг было связано с нормализацией показателей липидного спектра сыворотки крови, уменьшением активности КФ, уровня КЩФ и повышением уровня Ca^{2+} в сыворотке крови у пациентов с метаболическим фенотипом ОА.

Более выраженное уменьшение болевой чувствительности и симптомов ОА в 2М подгруппе после лечения позволяет говорить о положительном эффекте мелатонина, который связан с улучшением качества и количества сна, выявленным по шкалам субъективной оценки.

3.5. Особенности сукцинат-рецепторной системы хондроцитов метаболического фенотипа остеоартроза в условиях окислительного стресса *in vitro*

В исследовании *in vivo* в гомогенатах нагружаемой и не нагружаемой зон хрящевой ткани у пациентов с метаболическим фенотипом ОА было обнаружено повышение концентрации сукцината и уровня его рецептора. В качестве одной из возможных причин выявленных изменений рассматриваются последствия

активных свободнорадикальных процессов. А с учетом антиоксидантных свойств мелатонина выяснение его протективных механизмов на сукцинат-рецепторную систему является актуальным направлением исследований, позволяющим определить новые пути адаптации и лечения ОА.

Известно, что окислительный стресс, инициируемый *in vitro* путем добавления H_2O_2 в инкубационную среду клеток, приводит к повреждению структурных элементов клетки и активирует каскад зависимых сигнальных путей [10].

На первом этапе эксперимента было выявлено, что инкубация клеток с H_2O_2 в дозе 200 мкМ приводила к кратному увеличению уровня сукцината и SUCNR1 в клетках хондроцитов (Рисунок 19).

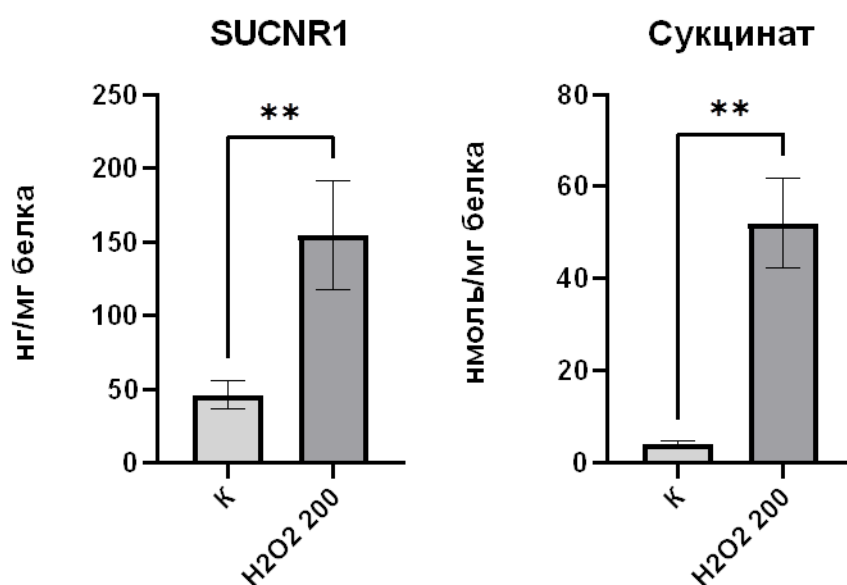


Рисунок 19 – Количество SUCNR1 и сукцината в клетках линии хондроцитов после воздействия H_2O_2 200 мкМ в течение 12 часов

Примечание – ** – статистически значимые различия между значениями, $p < 0,01$.

Добавление раствора мелатонина в питательную среду хондроцитов не приводило к статистически значимым изменениям уровня SUCNR1 на уровне белка. Причем данный результат не имел дозозависимого эффекта при используемых нами дозировках в 100 мкМ и 500 мкМ (Рисунок 20).

Сходное ограничение в прямой регуляции мелатонином сукцинат-рецепторной оси отмечалось и на уровне сукцината как лиганда SUCNR1 в исследуемых дозах (Рисунок 20).

Предварительная инкубация с мелатонином клеток хондроцитов в концентрации 100 мкМ и 500 мкМ с последующим моделированием окислительного стресса H_2O_2 200 мкМ препятствовала повышению уровня компонентов сукцинат-рецепторной системы.

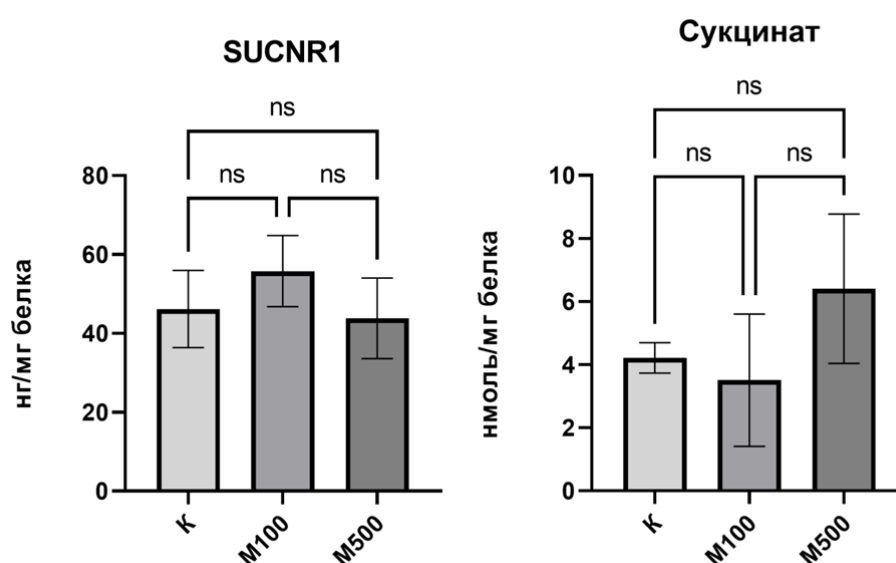


Рисунок 20 – Количество SUCNR1 и сукцината в клетках линии хондроцитов после воздействия мелатонина в концентрациях 100 и 500 мкМ в течение 24 часов
Примечание – ns – статистически не значимые различия между значениями, $p \geq 0,05$.

Отмечалось статистически значимое уменьшение уровня SUCNR1 определяемого методом ИФА в сравнении с контрольными показателями клеток в условиях окислительного стресса без предварительной обработки мелатонином. Однако эти изменения SUCNR1 не носили дозозависимого характера в концентрации мелатонина 100 мкМ и 500 мкМ (Рисунок 21).

Статистически значимый эффект уменьшения уровня сукцината отмечался при дозировке мелатонина 200 мкМ и 500 мкМ в сравнении с контрольными показателями клеток в условиях окислительного стресса без предварительной

обработки мелатонином (Рисунок 21), однако при дозировке 500 мкМ действие было более выраженным.

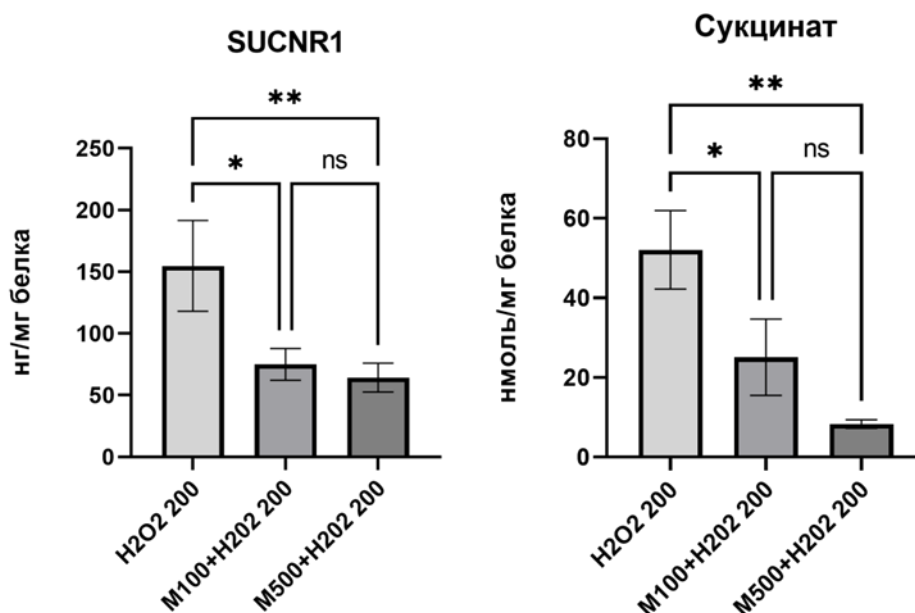


Рисунок 21 – Количество SUCNR1 и сукцината в клетках линии хондроцитов после воздействия H₂O₂ 200 мкМ на предварительно обработанные мелатонином клетки относительно H₂O₂ 200 мкМ

Примечание – * – статистически значимые различия между значениями, $p < 0,01$; – ns – статистически не значимые различия между значениями, $p \geq 0,01$.

Сравнение полученных данных с исходными показателями уровня SUCNR1 и сукцината на предварительной инкубации в присутствии мелатонина 100 и 500 мкМ не выявило статистически значимых отличий в содержании сукцинатного рецептора, однако уровень сукцината дозозависимо снижался, достигая контрольных значений, только при добавлении мелатонина в концентрации 500 мкМ (Рисунок 22).

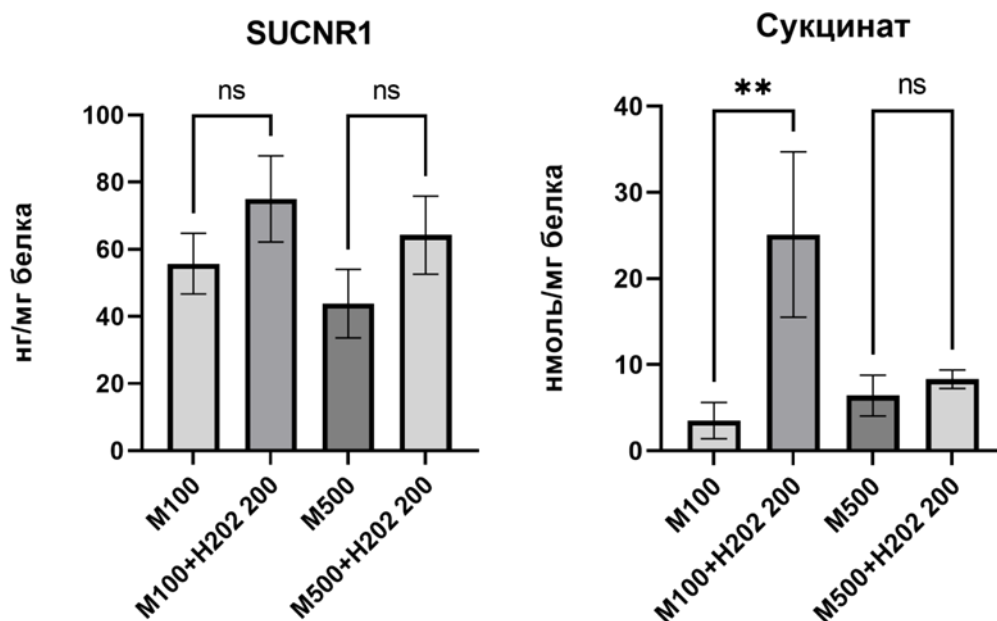


Рисунок 22 – Количество SUCNR1 и сукцината в клетках линии хондроцитов после воздействия H_2O_2 200 мкМ на предварительно обработанные мелатонином клетки относительно мелатонина

Примечание – ** – статистически значимые различия между значениями, $p < 0,01$; – ns – статистически не значимые различия между значениями, $p \geq 0,01$.

Как отмечалось ранее, активация сукцинат-рецепторной системы связана с адаптацией к метаболическому стрессу, в частности, к ишемии и гипоксии [124]. В этих условиях резко возрастает как внутриклеточная, так и внеклеточная концентрация сукцината. Таким образом, SUCNR1 является физиологическим сенсором высоких внеклеточных концентраций промежуточного продукта ЦТК сукцината, вызванных метаболическим стрессом при некоторых заболеваниях, сопровождающихся ОС [123].

Полученные нами результаты демонстрируют, что при развитии ОС под действием H_2O_2 200 мкМ на клетки линии хондроцитов метаболического фенотипа остеоартрита человека происходит увеличение уровня метаболита цикла трикарбоновых кислот сукцината и, вероятно, повышается уровень SUCNR1, который был определен методом ИФА. В свою очередь, SUCNR1

играет важную роль в развитии ОС вследствие рецептор-опосредованного поддержания воспаления как источника АФК [95]. Важно, что и гликолиз, и окислительное ОФ осуществляются в хондроцитах, однако большая часть энергетических потребностей хондроцитов при ОА удовлетворяется посредством гликолиза, а ОФ обеспечивает лишь часть общего количества АТФ в хондроцитах [90]. Отчасти переключение метаболических путей получения энергии объясняется возрастающим уровнем гипоксии и ОС, но, поскольку энергетический эффект ОФ значительно превышает гликолиз, митохондриальная дисфункция может нарушить баланс между гликолизом и ОФ, существенно снижая выработку АТФ.

Рецепторы сукцината SUCNR1 и мелатонина MTNR1A обладают сходными эффектами, так как оба типа рецепторов связаны с ингибирующими G-белками (Gi) [202]. Инактивация цАМФ-сигнального пути, который следует за стимуляцией Gi сукцинатом или мелатонином, может способствовать переключению энергетического метаболизма клетки с анаэробного на аэробный тип.

В нашем исследовании не получено убедительных данных об участии мелатонина в прямой регуляции сукцинат-рецепторной оси, поскольку не отмечалось статистически значимых изменений уровня SUCNR1 и его лиганда сукцината при используемых нами дозировках в 100 мкМ и 500 мкМ в сравнении с контрольными показателями. Нами обнаружено, что предварительная инкубация в присутствии мелатонина клеток хондроцитов в концентрации 100 мкМ и 500 мкМ с последующим моделированием окислительного стресса H_2O_2 200 мкМ приводит к снижению уровня компонентов сукцинат-рецепторной системы дозозависимым образом. Известно, что мелатонин стимулирует синтез ферментов, улавливающих H_2O_2 , что и может объяснять его цитопротективное действие в условиях ОС [158].

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали, что воздействие мелатонина дозах 100 мкМ и 500 мкМ создает условия для снижения

повреждающих эффектов H₂O₂ и препятствует развитию ОС.

3.6. Локализация сукцинатного рецептора в хондроцитах метаболического фенотипа остеоартроза

В настоящее время имеется ограниченная информация об экспрессии SUCNR1 в хондроцитах человека [106]. Известно о локализации рецептора на поверхности клеток предшественников хондроцитов – фибробластов, а также других клеток, участвующих в формировании синовиального сустава (фибробластоподобных синовиоцитов) [88].

Нами было проведено иммуноцитохимическое исследование для оценки локализации SUCNR1 в хондроцитах метаболического фенотипа ОА. В качестве положительного контроля использовали клетки мышинных миобластов C2C12, экспрессирующие SUCNR1 [35, 59]. При оценке локализации SUCNR1 были получены следующие результаты (Рисунок 23).

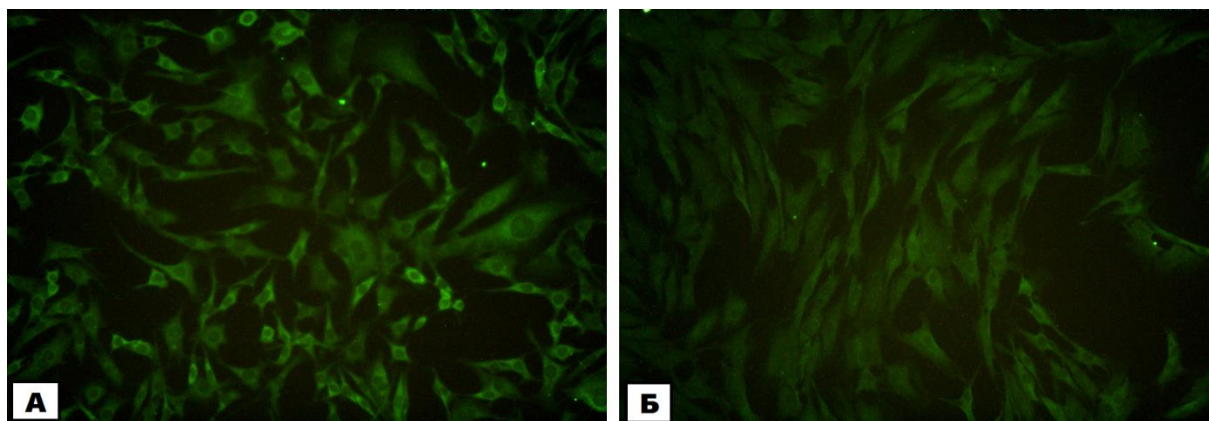


Рисунок 23 – Иммуноцитохимическое окрашивание клеток линии C2C12 (А) и хондроцитов метаболического фенотипа ОА (Б) с использованием антител к SUCNR1, вторичных антител S0018 Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Fluor488-conjugated, Affinity Biosciences, КНР, увеличение × 400 раз

Выявлена выраженная иммунопозитивная реакция с мембранами и цитоплазмой клеток C2C12, что подтверждает наличие в них SUCNR1. В

хондроцитах метаболического фенотипа ОА отмечалась слабая иммунопозитивная реакция с мембранами клеток. Полученные результаты, свидетельствуют о наличии данных рецепторов в изучаемых клетках, однако их роль и функционирование требуют дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ОА возникает в результате нарушения сложной системы, биомеханической, биохимической и молекулярной обратной связи в хряще, окружающих тканях и субхондральной кости. Это гетерогенная болезнь с широким спектром патобиохимических путей, которые в результате приводят к разрушению сустава.

Несмотря на всю сложность и многогранность патофизиологии ОА, в настоящее время возникает необходимость воздействовать на эти пути одновременно. Поскольку не разработано эффективных медицинских методов лечения для предотвращения разрушения хряща и сопутствующих костных изменений сустава при ОА, необходимо дальнейшее изучение механизмов, лежащих в основе ОА и защитных эффектов применяемой терапии. В том числе более глубокое изучение клинических фенотипов ОА.

На первом этапе нашего исследования было сформировано 2 группы пациентов: первую группу составили здоровые пациенты без суставной патологии и нормальным индексом массы тела, а во вторую группу вошли пациенты с метаболическим фенотипом ОА 3-4 стадии по Kegglen-Lourence.

В ходе работы у пациентов с метаболическим фенотипом ОА выявлены изменения маркеров костно-хрящевого метаболизма в сыворотке крови. Выяснилось, что данный фенотип характеризуется активными процессами костного ремоделирования, проявляющимися повышением уровня КЩФ, КФ и снижением уровня Ca^{2+} . Кроме того, показатели субъективных шкал клинического прогрессирования ОА коррелировали с уровнем КФ сыворотки крови и показателями липидного спектра, свидетельствующими о более тяжелом клиническом течении ОА и неудовлетворительном качестве сна.

У пациентов исследуемого фенотипа ОА также обнаружено снижение уровня ночной порции гормона шишковидной железы, что объясняет неудовлетворенность качеством и количеством сна и в целом худший клинический профиль заболевания. Исходя из этого, нами была поставлена задача

оценить влияние мелатонина на клинико-биохимические показатели пациентов с метаболическим фенотипом ОА путем добавления в схему консервативного лечения части пациентов 2 группы препарата мелатонин в дозировке 3 мг в течение 4 недель. Это способствовало уменьшению процессов костной резорбции, нормализации показателей липидного спектра сыворотки крови, улучшению качества сна и клинического течения ОА. Выявленный системный ОС у пациентов метаболического фенотипа ОА, являющийся фактором последующей деструкции тканей, проявлялся повышением продуктов ОМБ не только в сыворотке крови, но и в костно-хрящевой ткани. Вследствие чего, сукцинат-рецепторная система рассматривалась в качестве потенциального посредника между исследуемыми процессами.

С целью выявления особенностей распределения компонентов сукцинат-рецепторной системы в гомогенатах костно-хрящевой ткани при метаболическом фенотипе ОА, были сформированы третья и четвертая группы пациентов. Третью группу составили пациенты с метаболическим фенотипом ОА 3-4 стадии по Kegglen-Lourence, которые проходили оперативное лечение в объеме первичного тотального эндопротезирования коленного сустава. В четвертую группу вошли пациенты без рентгенологических и макроскопических признаков ОА, проходивших наблюдение и оперативное лечение по поводу перелома шейки бедренной кости в объеме первичного тотального эндопротезирования тазобедренного сустава.

Выявлено, что у пациентов с метаболическим фенотипом ОА наблюдалась высокая экспрессия SUCNR1 в тканях сустава, которая носила тканеспецифичный характер с преимущественным увеличением количества SUCNR1 в субхондральной кости.

Обнаружены более высокие уровни сукцината в субхондральных отделах кости и разных по нагрузке зонах хряща суставов у пациентов с метаболическим фенотипом ОА, что следует рассматривать как сигнал, который носит адаптационный характер с целью ограничения развития ОС. В настоящее время

происходит активное накопление данных о месте и роли сукцинат-рецепторной системы в клеточных и системных изменениях, а также ведутся исследования механизмов защиты от повышения в клетке продуктов окислительного повреждения белков.

Наиболее перспективными направлениями в этой области на данный момент считаются выявление и конкретизация представлений о механизмах действия мелатонина в исследуемых процессах. Выявление положительных клинических эффектов мелатонина побудило к исследованию его потенциального протективного воздействия на изучаемые нами процессы при экспериментальном окислительном стрессе. Исходя из этого, на экспериментальном этапе осуществлялось моделирование ситуаций, наблюдаемых нами *in vivo*, на клеточных линиях хондроцитов метаболического фенотипа ОА, сопряженных с окислительным стрессом и его возможной коррекцией применением мелатонина.

Выяснилось, что окислительный стресс, моделируемый путем добавления в клеточную среду хондроцитов метаболического фенотипа ОА человека H_2O_2 200 мкМ, приводит к увеличению уровня SUCNR1 и повышению количества сукцината.

Продемонстрировано, что предварительная инкубация клеток хондроцитов метаболического фенотипа ОА человека с мелатонином ограничивала перекисно-индуцированное накопление сукцината и снижала уровень SUCNR1 в клетках.

Таким образом, комплекс *in vivo* и *in vitro* исследований позволил обнаружить взаимосвязь между окислительным стрессом и уровнем компонентов сукцинат-рецепторной оси и продемонстрировать вовлеченность мелатонина в выявленные изменения. Кроме того, полученные результаты дают основание предполагать, что метаболический фенотип ОА имеет специфический клинко-биохимический профиль, а добавление мелатонина в схему консервативного лечения ОА демонстрирует его роль как перспективной молекулы, обладающей остеогенным, анальгизирующим и адаптогенным эффектом при метаболическом фенотипе ОА.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с метаболическим фенотипом остеоартроза наблюдаются более активные процессы костного ремоделирования, о чем свидетельствует повышение активности кислой фосфатазы, увеличение уровня костного изофермента щелочной фосфатазы и снижение содержания кальция в сыворотке крови. Обнаружены прямые корреляционные взаимодействия между активностью кислой фосфатазы, уровнем костного изофермента щелочной фосфатазы и выраженностью клинических проявлений остеоартроза по клиническим шкалам.

2. При метаболическом фенотипе остеоартроза наблюдается активация процессов окислительного стресса, выражающегося в увеличении количества карбонилированных производных аминокислотных остатков в белках сыворотки крови и костно-хрящевой ткани с нарушением антиоксидантного звена, о чем свидетельствует снижение активности супероксиддисмутазы с сопутствующим истощением резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков сыворотки крови.

3. У пациентов с метаболическим фенотипом остеоартроза отмечается увеличение уровня сукцинатного рецептора в костно-хрящевой ткани, которое носит тканеспецифичный характер с преимущественным увеличением количества рецептора в субхондральных отделах кости. При этом повышенное содержание сукцината фиксируется в субхондральных отделах кости и в нагружаемой зоне хряща сустава.

4. Добавление в схему консервативного лечения метаболического фенотипа остеоартроза препарата мелатонин уменьшает активность процессов костной резорбции, снижает степень выраженности нарушений липидного обмена, улучшает качество сна и клиническое течение остеоартроза.

5. Окислительный стресс, моделируемый добавлением в клеточную среду хондроцитов метаболического фенотипа остеоартроза человека 200 мкМ пероксида водорода, приводит к повышению уровня внутриклеточного сукцината

и увеличению количества сукцинатного рецептора.

6. Предварительная инкубация клеток линии хондроцитов метаболического фенотипа остеоартрита человека с мелатонином ограничивает индуцированное пероксидом водорода накопление сукцината и снижает уровень сукцинатного рецептора.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение метаболитов костно-хрящевой ткани в сыворотки крови (СОМР, КФ, КЩФ, Ca^{2+}) рекомендуется для оценки клинического течения и эффективности лечения остеоартроза.

2. Применение препарата мелатонин в дозе 3 мг в сутки курсом 30 дней следует рассматривать в схеме консервативного лечения метаболического фенотипа остеоартроза у пациентов с сопутствующей инсомнией и нарушением ночной секреции гормона мелатонина с целью улучшения клинического течения заболевания и модуляции процессов костного ремоделирования.

3. Изучение показателей карбонильного стресса в сыворотке крови может использоваться для оценки неблагоприятного клинического течения остеоартроза.

4. С учетом роли сукцинат-рецепторной системы в исследованиях патогенеза остеоартроза рекомендуется выделение и изучение клеток интраоперационного патологического микроокружения сустава для повышения научной информативности о значении сукцинат-рецепторной системы в прогрессировании заболевания.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2,4-ДНФГ – 2,4-динитрофенилгидразин

САДНФГ – площадь под кривой спектра поглощения альдегиддинитрофенилгидразонов

СКДНФГ – площадь под кривой спектра поглощения кетондинитрофенилгидразонов

SOMB – суммарная площадь под кривой спектра поглощения окислительной модификации белков

ox-ЛПНП – окисленные липопротеины низкой плотности

АФА – активные формы азота

АФК – активные формы кислорода

АФС – активные формы серы

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГК – гиалуроновая кислота

ИМТ – индекс массы тела

КТ – компьютерная томография

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

МПК – минеральная плотность кости

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

МРТ – магнитно-резонансная терапия

MT 1,2 – рецептор мелатонина 1,2

НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты

ОА – остеоартроз

ОК – остеокальцин

ОП – остеопонтин

ОС – окислительный стресс

ОФ – окислительное фосфорилирование

- РАП ОМБ – резервно-адаптационный потенциал окислительной модификации белков
- СДГ – сукцинатдегидрогеназа
- СОД – супероксиддисмутаза
- ТГ – триглицериды
- ЦТК – цикл трикарбоновых кислот
- ЩФ – щелочная фосфатаза
- AGE – advanced glycation end-products, конечные продукты гликирования
- CD 36 – cluster of differentiation 36, кластер дифференцировки 36
- ERK extracellular signal-regulated kinase, внеклеточные сигнально-регулируемые пути
- HIFs – hypoxia-inducible factors, факторы индуцируемые гипоксией
- IL-1b – interleukin 1 beta, интерлейкин 1b,
- IL-6 – interleukin 6, интерлейкин 6
- IL-8 – interleukin 8, интерлейкин 8
- JNK – janus kinase, янус-киназа
- KEAP1 – kelch-like ECH-associated protein 1, кельч-ассоциированный протеин 1
- KL– Kellgren and Lawrence scale, шкала Келлгрена-Лоуренса
- МАРК – mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа
- miR-140-5p – микро-РНК-140-5p
- MMP-1,-3,-13 – matrix metalloproteinase-1,-3,-13, матриксная металлопротеиназа - 1,-3, -13
- mTOR1 – mammalian target of rapamycin complex 1, мишень комплекса рапамицина 1
- NF-κB – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, ядерный фактор-каппа
- NGF – nerve growth factor, фактор роста нервов
- NO – nitric oxygen, оксид азота
- OLR1 – oxidized low density lipoprotein receptor 1, окисленный рецептор 1

липопротеина низкой плотности

PKC – protein kinase C, протеинкиназа C

PRP – platelet rich plasma, обогащенная тромбоцитами плазма

RAGE – receptor for advanced glycation end-products, рецептор конечных продуктов гликирования

RANK – receptor activator of nuclear factor kappa-B, рецептор-активатор ядерного фактора каппа-B

RANKL – receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, рецептор-активатор ядерного фактора каппа-B-лиганд

Runx-2 – runt-related transcription factor 2, транскрипционный фактор 2

SIRT6 – sirtuin signaling pathway, семейство сиртуиновых белков

SUCNR1 – succinate receptor 1, сукцинатный рецептор

SYSADOA – symptomatic slow acting drugs for osteoarthritis, симптоматические препараты замедленного действия

TGF- β – transforming growth factor beta, фактор роста бета

Th-1,-2,-17 – T-helper cell type -1,-2,-17, Т-хелперы 1,2,17

TIMP-1 – tissue inhibitor of metalloproteinase-1, тканевой ингибитор металлопротеиназ-1

TLR-4 – toll-like receptor 4, Toll-подобный рецептор-4

TNFR1 – tumor necrosis factor receptor-1, рецептор фактора некроза опухоли 1

TNF α – tumor necrosis factor alpha, фактор некроза опухоли α

TORC-1,-2 – the target of rapamycin complex -1,-2 сигнальный комплекс 1,2
рапамицина 1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдурахимов А.Г. Нестероидные противовоспалительные препараты у пациентов с деформирующим остеоартрозом и артериальной гипертензией: анализ влияния целекоксиба и мелоксикама на антигипертензивные средства. Оптимизация лечения / А.Г. Абдурахимов, Ф.И. Халметова. – Текст: непосредственный // Атеросклероз. – 2023. – Т.19, №3. – С.186-187.
2. Анализ биохимических показателей сыворотки крови у больных с ревизионным эндопротезированием тазобедренного сустава и нарушением углеводного обмена / А.В. Каминский, Е.Л. Матвеева, А.Г. Гасанова [и др]. – Текст: непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2023. – Т.11, №1. – С. 5–14.
3. Анализ содержания мелатонина и его взаимосвязь с дисфункцией яичников у пациенток репродуктивного возраста с ожирением (обзор литературы) / Р.К. Михеев, Е.Н. Андреева, Е.В Шереметьева [и др.]. – Текст: непосредственный // Проблемы эндокринологии. – 2021. – Т.67, №1. – С.69-75
4. Арутюнян, А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: методические рекомендации / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина. – СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000. – С. 90-92. – Текст : непосредственный
5. Ассоциация высокой скорости гликолиза и активности разобщения окисления и фосфорилирования в клетках крови больных на поздней стадии остеоартрита коленного сустава с развитием послеоперационной боли / Е.В. Четина, Г.А. Маркова, К.Е. Глемба Посохов [и др.] – Текст: непосредственный // Современная ревматология. – 2024. – Т.18, №1. – С.21-27.
6. Баланова, Ю.А. Ожирение в российской популяции - распространенность и ассоциации с факторами риска хронических неинфекционных заболеваний / Ю.А. Баланова, С.А Шальнова, А.Д. Деев – Текст: непосредственный / Российский кардиологический журнал. – 2018. – Т.64, №6. –

C.123-130.

7. Виртуальный и экспериментальный скрининг новых биоизостеров мелатонина для лечения глаукомы / Д.А. Бабков, А.С. Таран, А.А. Шевченко [и др.]. – Текст: непосредственный // Acta Biomedica Scientifica. – 2024. – Т.9, №1. – С.116-128.

8. Влияние мелатонина на процессы гемокоагуляции, липопероксидации и нарушения мочеобразовательной функции почек при хронической интоксикации соединениями / В.Б. Брин, Э.М. Гаглоева, Н.В.Соколовский. – Текст: непосредственный // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2023. – Т.18, №3. – С.287-292.

9. Влияние мелатонина на экспрессию белков Bcl-2 b Bad в клетках желтых тел яичников после воздействия экспериментальной гипертермии / С.В. Мичурина, С.И. Колесников, И.В. Ищенко [и др.] – Текст: непосредственный // Acta Biomedica Scientifica. – 2024. – Т.9, №1. – С.203-213.

10. Внутриклеточная локализация и функция ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro* / Ю.В. Абаленихина, П.Д. Ерохина, А.А. Сеидкулиева [и др.]. – Текст: непосредственный // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2022. – № 3. – С.295-304.

11. Галушко, Е.А. Распространенность ревматических заболеваний в России / Е.А.Галушко, Е.Л.Насонов. – Текст: непосредственный // Альманах клинической медицины. – 2018. – Т.46, №1. – С. 75-80.

12. Значение мелатонина в регуляции метаболизма, пищевого поведения, сна и перспективы его применения при экзогенно-конституциональном ожирении / Е.С. Цветкова, Т.И. Романцова, М.Г. Полуэктов. – Текст: непосредственный // Ожирение и метаболизм. – 2021. – Т.18, №2. – С.112-124.

13. Клиническая апробация мелатонина у пациентов с бронхиальной астмой / И. С. Разикова, Н. Д. Дустбабаева, Н. П. Айдарова [и др.]. – Текст: непосредственный // Scientific progress. – 2023. – № 2. – С.102-106.

14. Косинская, Н.С. Рабочая классификация и общая характеристика поражений костносуставного аппарата / Н. С. Косинская, Д. Г. Рохлин; ред. П. А. Маккавейский. - Л.: Медгиз, 1961. - 56 с.

15. Костное ремоделирование при менопаузе в сочетании с сахарным диабетом у крыс Wistar / Н.В. Тимкина, А.В. Симаненкова, А.А. Байрамов [и др.] – Текст: непосредственный // Ожирение и метаболизм. – 2023. – Т. 20, №3. – С.189-200.

16. Лазарев, В. В. Влияние сукцинатов на воспалительную реакцию: обзор литературы / В. В. Лазарев, П. Е. Анчутин. – Текст: непосредственный // Вестник интенсивной терапии им. А.И.Салтанова. – 2023. – Т.3. – С.155-165.

17. Марсянова, Ю.А. Анализ окислительной модификации белков митохондрий эпидидимиса крыс при нормобарической -хронической гипоксии и модуляции синтеза оксида азота (II) / Ю.А. Марсянова, В.И. Звягина, А.В. Петров. – Текст: непосредственный // Казанский медицинский журнал. – 2022. – Т. 103, № 6. – С.976-985.

18. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / под ред. М.И. Прохоровой. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. – 327 с. – Текст: непосредственный.

19. Минеральная плотность и показатели обмена костной ткани у взрослого населения, проживающего в йододефицитном районе / Камилов Ф. Х., Юнусов Р. Р., Ганеев Т. И. [и др.] – Текст: непосредственный // Медицинский вестник Башкортостана. – 2020. – Т. 15, №1.– С. 26-30.

20. Мычка В.Б. Консенсус экспертов по междисциплинарному подходу к ведению, диагностике и лечению больных с метаболическим синдромом / В.Б., Мычка, А.Л., Верткин, Л.И. Вардаев [и др.]. – Текст: непосредственный // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2013. – Т. 12, № 6. – С. 41-82.

21. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов, И.Г. Порогов. – Текст: непосредственный // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т. 41, №1. –

С. 24-26.

22. Оценка действия мезенхимальных стромальных клеток из различных источников на пролиферацию хондроцитов человека / А.Д. Белова, Ю.Б. Басок, А.М. Григорьев [и др.]. – Текст: непосредственный // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т.25, № 4. – С.121-129.

23. Параметры карбонильного стресса и окислительная модификация ДНК при возрастной менопаузе у женщин русской и бурятской этнических групп / Н.В. Семенова, А.С. Бричагина, О.А. Никитина [и др.]. – Текст: непосредственный // Экология человека. – 2022. – № 6. – С.413-421.

24. Протективные эффекты L аргинина на митохондрии эпидидимиса крыс при гипергомоцистеинемии, вызванной длительной метиониновой нагрузкой / В.И. Звягина, К.Б. Шумаев, Э.С. Бельских [и др.]. – Текст: непосредственный // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2022. – Т.30, №4. – С.457–470.

25. Ранний остеоартрит коленных суставов / Л.И. Алексеева, Е.А. Таскина, К.А. Тельшев [и др.] – Текст: непосредственный // Остеопороз и остеопатии. – 2020. – Т.23, №1. – С.28.

26. Роль полиморфизма редокс-чувствительных генов в механизмах окислительного стресса при ожирении и метаболических заболеваниях / М.А. Шкурат, Е.В. Машкина, Н.П. Милютин [и др.]. – Текст: непосредственный // Экологическая генетика. – 2023. – Т.21, № 3. – С. 261–287.

27. Сукцинат и сукцинатдегидрогеназа как «точка опоры» в цикле Кребса при критических состояниях / Ю.П. Орлов, А.В. Бутров, С.В. Свиридов [и др.]. – Текст: непосредственный // Антибиотики и Химиотерапия. – 2023. – Т. 68, №1. – С.57-68.

28. Сукцинат и сукцинатдегидрогеназа моно-ядерных лейкоцитов крови как маркеры адаптации митохондрий к гипоксии у больных при обострении хронической обструктивной болезни легких / Э.С. Бельских, О.М. Урясьев, В.И. Звягина [и др.]. – Текст: непосредственный // Российский медико-биологический

вестник им. академика И.П. Павлова. – 2020. – Т. 28, №1. – С.13-20.

29. Фалетрова, С. В. Изучение влияния жировой ткани на уровень маркеров карбонильного стресса у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких при неинфекционном обострении / С.В. Фалетрова, О. М. Урясьев, Э. С.Бельских. – Текст: непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2024. – Т. 12, № 1. – С.45-54.

30. Фармакотерапия инсомний: роль Имована / Я.И. Левин, Т.С. Елигулашвили, С.И. Посохов [и др.] – Текст: непосредственный // Расстройства сна / под ред. Ю.А. Александровского, А.М. Вейна. СПб.: Медицинское информационное агенство, 1995. – С. 56-61.

31. Фомина, М.А. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях: методические рекомендации / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина. – М.; Рязань, 2014. – 61 с. – Текст: непосредственный.

32. Эндопротезирование тазобедренного и коленного суставов: показания к операции / А.А. Вороков, П.И. Бортулев, В.М. Хайдаров [и др]. – Текст: непосредственный // Ортопедия, травматология и восстановительная хирургия детского возраста. – 2020. – Т. 8, №3. – С. 355–364.

33. A new player in cartilage homeostasis: adiponectin induces nitric oxide synthase type II and pro-inflammatory cytokines in chondrocytes / R. Lago, R. Gomez, M. Otero [et al.]. – Text: visual // Osteoarthritis Cartilage. – 2008. – Vol.16, №9. – P.1101-1109.

34. A novel two-step method for the formation of tissueengineered cartilage by mature bovine chondrocytes: the alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method / K. Masuda, R.L. Sah, M.J. Hejna [et al.]. – Text: visual // Journal of Orthopaedic Research. – 2003. – Vol.21. – P.139–148.

35. Abalenikhina Y.V. Mechanism of stimulation of myogenesis under the action of succinic acid through the succinate receptor SUCNR1. Y.V. Abalenikhina, M.O. Isayeva, P.Y. Mylnikov [et al.]. – Text: visual // Biochemistry (Mosc). – 2024. –

Vol. 89. – №7. – P.1325-1335.

36. Adiponectin and leptin induce VCAM-1 expression in human and murine chondrocytes / J. Conde, M. Scotece, V. López [et al.]. – Text: visual // PLoS One. – 2012. – Vol.7, №12. – P.e:52533.

37. Adiposity, weight change, and urinary melatonin levels among men in the multiethnic cohort / I.M. Chowdhury-Paulino, J.B. Vasselkiv, I. Cheng [et al.]. – Text: visual // Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. – 2024. – Vol.33. – P.136-142.

38. Aggrecan and COMP improve periosteal chondrogenesis by delaying chondrocyte hypertrophic maturation / M.M.J. Caron, M.P.F. Janssen, L. Peeters [et al.]. – Text: visual // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2020. – Vol.8. – P.1036.

39. Alberti, K.G. Metabolic syndrome-a new world-wide definition. A Consensus statement from the international diabetes federation / K.G. Alberti, P. Zimmet, J. Shaw. – Text: visual // Diabetic Medicine. – 2006. – Vol.23, №5. – P.469-480.

40. Alekseeva L. Risk factors predicting radiological progression of knee osteoarthritis / L. Alekseeva, S. Anikin. – Text: visual // Annals of the Rheumatic Diseases. – 2018. – Vol.77. – №2.

41. Allen, K.D. Epidemiology of osteoarthritis / K.D. Allen, L.M. Thoma, Y.M. Golightly. – Text: visual // Osteoarthritis Cartilage. – 2022. – Vol.30, №2. – P.184-195.

42. Alpl prevents bone ageing sensitivity by specifically regulating senescence and differentiation in mesenchymal stem cells / W. Liu, L. Zhang, K. Xuan [et al.]. – Text: visual // Bone Research. – 2018. – Vol.6. – P.27.

43. Ameliorative effects of the melatonin on some cytokine levels, NF- κ B immunoreactivity, and apoptosis in rats with cerulein-induced acute pancreatitis / D. Uluişik, E. Keskin, T. Özaydın [et al.]. – Text: visual // Iranian Journal of Basic Medical Sciences. – 2024. – Vol.27, №3. – P.279-285.

44. American college of rheumatology/arthritis foundation guideline for the management of osteoarthritis of the hand, hip, and knee / S.L. Kolasinski, T. Neogi, M.C. Hochberg [et al.]. – Text: visual // Arthritis Care & Research. – 2020. – Vol.72, №2. – P.149-162.
45. Amstrup, A.K. Melatonin improves bone mineral density at the femoral neck in postmenopausal women with osteopenia: a randomized controlled trial / A.K. Amstrup, T. Sikjaer. – Text: visual // Journal of Pineal Research. – 2015. – Vol.59, №2. – P.221–229.
46. An updated algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis from the European society for clinical and economic aspects of osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases (ESCEO) / O. Bruyère, G. Honvo, N. Veronese [et al.]. – Text: visual // Seminars in Arthritis and Rheumatism. – 2019. – Vol.49, №3. – P.337-350.
47. Anand, A. A molecular description of acid phosphatase / A. Anand, P.K. Srivastava. – Text: visual // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2012. – Vol.167, №8. – P.2174-2197.
48. Angiogenesis stimulated by elevated PDGF-BB in subchondral bone contributes to osteoarthritis development / W. Su, G. Liu, X. Liu [et al.]. – Text: visual // JCI insight. – 2020. – Vol.5, №8. – P.e:135446.
49. Ansari, M.Y. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: role of polyphenols / M.Y. Ansari, N. Ahmad, T.M. Haqqi [et al.]. – Text: visual // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2020. – Vol.129. – P.110452.
50. Articular cartilage regeneration via Induced chondrocyte autophagy by sustained release of leptin inhibitor from thermo-sensitive hydrogel through STAT3/REDD1/mTORC1 cascade / Z. Huang, C. Liu, G. Zheng [et al.]. – Text: visual // Advanced Healthcare Materials. – 2023. – Vol.12, №30. – P. e2302181.
51. Assmann, G. Lipiddiagnostik heute [Current diagnosis of hyperlipidemias] / G. Assmann. – Text: visual // Internist (Berl). – 1979. – Vol.20, №11. – P.559-564.
52. Association between body fat and bone mineral density in Korean adults: a

cohort study / H. Yoon, E. Sung, J.H. Kang [et al.]. – Text: visual // *Scientific Reports*. – 2023. – P.e:17462.

53. Association between osteoarthritis and dyslipidemia: a systematic literature review and meta-analysis / P. Baudart, K. Louati, C. Marcelli [et al.]. – Text: visual // *RMD Open*. – 2017. – Vol.3, №2. –P.e:000442

54. Association of knee OA structural phenotypes to risk for progression: a secondary analysis from the Foundation for National Institutes of Health Osteoarthritis Biomarkers study (FNIH) / F.W. Roemer, J.E. Collins, T. Neogi [et al.]. – Text: visual // *Osteoarthritis Cartilage*. – 2020. – Vol.28, №9. – P.1220-1228.

55. Association of oxidative stress with postmenopausal osteoporosis and the effects of hydrogen peroxide on osteoclast formation in human bone marrow cell cultures / K.H. Baek, K.W. Oh, W.Y. Lee [et al.]. – Text: visual // *Calcified Tissue International*. – 2010. – Vol.87, №1. – P.226–235

56. Associations of symptomatic knee osteoarthritis with histopathologic features in subchondral Bone / K. Aso, S.M. Shahtaheri, R. Hill [et al.]. – Text: visual // *Arthritis & Rheumatology*. – 2019. – Vol.71, №6. – P.916-924.

57. Baihu Jia Guizhi Decoction Improves Rheumatoid Arthritis Inflammation by Regulating Succinate/SUCNR1 Metabolic Signaling Pathway / H. Chen, T. Pan, P. Liu, [et al.]. – Text: visual // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2019. – P.e: 3258572.

58. Barata, A.G. A role for peroxiredoxins in H₂O₂- and MEKK-dependent activation of the p38 signaling pathway / A.G. Barata, T.P. Dick. – Text: visual // *Redox Biology*. – 2020. – Vol.28. – P.e:101340.

59. Barbosa-Morais N.L. The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species // N.L. Barbosa-Morais, M. Irimia, Q. Pan [et al.]. – Text: visual // *Science*. – 2012. – Vol. 338, №6114. – P.1587-1593.

60. Berberich, A.J. A modern approach to dyslipidemia / A.J. Berberich, R.A. Hegele. – Text: visual // *Endocrine Reviews*. – 2022. – Vol.43, №4. – P.611-653.

61. Bi, X. Correlation of serum cartilage oligomeric matrix protein with knee

osteoarthritis diagnosis: a meta-analysis / X. Bi. – Text: visual // Journal of Orthopaedic Surgery and Research. – 2018. – Vol.13, №1. – P.262.

62. Bora, F. W. Joint physiology, cartilage metabolism, and the etiology of osteoarthritis / F. W. Bora, G. Miller. – Text: visual // Hand clinics. – 1987. – Vol.3, №1. – P.325-336.

63. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford. – Text: visual // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol.72. – P.248-254.

64. Brigelius-Flohé, R. Selenium and redox signaling / R. Brigelius-Flohé, L. Flohé. – Text: visual // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2017. – Vol.617. – P.48-59

65. Bubenik, G.A. Gastrointestinal melatonin: Localization, function, and clinical relevance / G.A. Bubenik. – Text: visual // Digestive Diseases and Sciences. – 2002. – Vol.47. – P.2336–2348.

66. Cartilage oligomeric matrix protein and its binding partners in the cartilage extracellular matrix: interaction, regulation and role in chondrogenesis / C. Acharya, J.H. Yik, A. Kishore [et al.]. – Text: visual // Matrix Biology. – 2014. – Vol.37, №3. – P.102-111.

67. Cartilage oligomeric matrix protein is involved in human limb development and in the pathogenesis of osteoarthritis / S. Koelling, T.S. Clauditz, M. Kaste [et al.]. – Text: visual // Arthritis Research & Therapy. – 2006. – Vol.8, №3. – P.56.

68. Catabolic and proinflammatory effects of leptin in chondrocytes are regulated by suppressor of cytokine signaling-3 / A. Koskinen-Kolasa, K. Vuolteenaho, R. Korhonen [et al.]. – Text: visual // Arthritis Research & Therapy. – 2016. – Vol.18. – P.215.

69. CD36 binds oxidized low density lipoprotein (LDL) in a mechanism dependent upon fatty acid binding / A.G. Jay, A.N. Chen, M.A. Paz [et al.]. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 2015. – Vol.290, №8. – P.4590-4603

70. Challenges in osteoarthritis treatment / A. Emami, H. Namdari, F.

Parvizpour [et al.]. – Text: visual // *Tissue and Cell*. – 2023. – Vol.80, №2. – P.e:101992.

71. Change in serum COMP concentration due to ambulatory load is not related to knee OA status / A. Mündermann, K.B. King, R.L. Smith [et al.]. – Text: visual // *Journal of Orthopaedic Research*. – 2009. – Vol.27, №11. – P.1408-1413.

72. Circadian rhythm modulates endochondral bone formation via MTR1/AMPK β 1/BMAL1 signaling axis / S. Yu, Q. Tang, G. Chen [et al.]. – Text: visual // *Cell Death & Differentiation*. – 2022. – Vol.29, №4. – P.874-887.

73. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors / W. He, F.J. Miao, D.C. Lin [et al.]. – Text: visual // *Nature*. – 2004. – Vol.429, №6988. – P.188-193.

74. Collagen type II suppresses articular chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis progression by promoting integrin β 1-SMAD1 interaction / C. Lian, X. Wang, X. Qiu [et al.]. – Text: visual // *Bone Research*. – 2019. – Vol.7. – P.8.

75. Combined treatment with chondroitin sulfate and glucosamine sulfate shows no superiority over placebo for reduction of joint pain and functional impairment in patients with knee osteoarthritis: a six-month multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial / J.A. Roman-Blas, S. Castañeda, O. Sánchez-Pernaute [et al.]. – Text: visual // *Arthritis & Rheumatology*. – 2017. – Vol.69, №1. – P.77-85.

76. COMP and TSP-4: Functional Roles in Articular Cartilage and Relevance in Osteoarthritis / K. Maly, E. Andres Sastre, E. Farrell [et al.]. – Text: visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol.22, №35. – P.2242.

77. COMP-assisted collagen secretion--a novel intracellular function required for fibrosis / J.N. Schulz, J. Nüchel, A. Niehoff [et al.]. – Text: visual // *Journal of Cell Science*. – 2016. – Vol.129, №4. – P.706-716.

78. Correlation of serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and interleukin-16 (IL-16) levels with disease severity in primary knee osteoarthritis: A pilot study in a Malaysian population / E. Das Gupta, W.R. Ng, S.F. Wong [et al.]. – Text: visual // *PLoS One*. – 2017. – Vol.12, №9. – P.e:0184802.

79. Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3 / A.B. Blom, P.L. van Lent, S. Libregts [et al.]. – Text: visual // *Arthritis & Rheumatology*. – 2007. – Vol.56, №1. – P.147-157.
80. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II / F. Su, X. Huo, Y. Zhai [et al.]. – Text: visual // *Cell*. – 2005. – Vol.121, №7. – P. 1043-1057.
81. Current and future impact of osteoarthritis on health care: a population-based study with projections to year 2032 / A. Turkiewicz, I.F. Petersson, J. Bjork [et al.]. – Text: visual // *Osteoarthritis Cartilage*. – 2014. – Vol. 22. – P. 1826-1832.
82. Daily melatonin administration improves osseointegration in pinealectomized rats / L.P. Palin, T.O.B. Polo, F.R.S. Batista [et al.]. – Text: visual // *Journal of Applied Oral Science*. – 2018. – Vol.26. – P.e:20170470.
83. Defining osteoarthritis of the hip for epidemiologic studies / P. Croft, C. Cooper, C. Wickham [et al.]. – Text: visual // *Am J Epidemiol*. – 1990. – Vol.132, №3 – P.514-522.
84. Demasi M. Oxidative modification of proteins: from damage to catalysis, signaling, and beyond / M. Demasi, O. Augusto, E.J.H. Bechara [et al.]. – Text: visual // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2021. – Vol.35, №12. – P.1016-1080.
85. Di Medio L. Advances in bone turnover markers / L. Di Medio, M.L, Brandi. – Text: visual // *Advances in Clinical Chemistry*. – 2021. – Vol.105. – P.101-140.
86. Dietary fat-associated osteoarthritic chondrocytes gain resistance to lipotoxicity through PKCK2/STAMP2/FSP27 / S.W. Lee, J.H. Rho, S.Y. Lee J [et al.]. – Text: visual // *Bone Research*. – 2018. – Vol.6, №20. – P.20.
87. Differential expression of adipokines in knee osteoarthritis patients with and without metabolic syndrome / N. Dong, Y.H. Gao, B. Liu [et al.]. – Text: visual // *International Orthopaedics*. – 2018. – Vol.42. – P.1283-1289.
88. Dobrowolski P. Metabolic syndrome - a new definition and management

guidelines: a joint position paper by the Polish society of hypertension, Polish society for the treatment of obesity, polish lipid association, polish association for study of liver, polish society of family medicine, polish society of lifestyle medicine, division of prevention and epidemiology polish cardiac society, "Club 30" Polish cardiac society, and division of metabolic and bariatric surgery society of Polish surgeons // P. Dobrowolski, A. Prejbisz, A. Kuryłowicz [et al.]. – Text: visual // Archives of Medical Science. – 2022. – Vol.18. – №5. – P.1133-1156.

89. Dyslipidemia might be associated with an increased risk of osteoarthritis / J. Xiong, J. Long, J. Chen [et al.]. – Text: visual // BioMed Research International. – 2020. – Vol.2020, №2. – P.e:3105248.

90. Dysregulated energy metabolism impairs chondrocyte function in osteoarthritis / X. Wu, C. Liyanage, M. Plan [et al.]. – Text: visual // Osteoarthritis and Cartilage. – 2023. – Vol.31, №5. – P.613-626.

91. Effect of chondrocyte mitochondrial dysfunction on cartilage degeneration: A possible pathway for osteoarthritis pathology at the subcellular level / H. Liu, Z. Li, Y. Cao [et al.]. – Text: visual // Molecular medicine reports. – 2019. – Vol.20, №4. – P.3308-3316.

92. Effects of Hesperidin on H₂O₂-Treated Chondrocytes and Cartilage in a Rat Osteoarthritis Model / G. Gao, H. Ding, C. Zhuang [et al.]. – Text: visual // Medical Science Monitor. – 2018. – Vol.24. – P.9177-9186.

93. Effects of non-enzymatic glycation on the micro- and nano-mechanics of articular cartilage / P.R. Moshtagh, N.M. Korthagen, M.H.P. van Rijen [et al.]. – Text: visual // Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. – 2018. – Vol.77. – P.551-556.

94. Elevated marrow inflammatory cells and osteoclasts in subchondral osteosclerosis in human knee osteoarthritis / J. Geurts, A. Patel, M.T. Hirschmann [et al.]. – Text: visual // Journal of Orthopaedic Research. – 2016. – Vol.34. – P.262-269.

95. Elevated plasma succinate levels are linked to higher cardiovascular disease risk factors in young adults / F.J. Osuna-Prieto, B. Martinez-Tellez, L. Ortiz-

Alvarez [et al.]. – Text: visual // Cardiovascular Diabetology. – 2021. – Vol.20, №1. – P.151.

96. Engin, A.B. Adipocyte-macrophage cross-talk in obesity / A.B. Engin. – Text: visual // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2017. – Vol.960. – P.327-343.

97. Enhanced activity of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) bound to cartilage oligomeric matrix protein / D.R. Haudenschild, E. Hong, J.H. Yik [et al.]. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 2011. – Vol.286, №50. – P.43250-43258.

98. Epigenetic regulation of chondrocyte hypertrophy and apoptosis through Sirt1/P53/P21 pathway in surgery-induced osteoarthritis / M. Xu, M. Feng, H. Peng [et al.] – Text: visual // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2020. – Vol.528, №1. – P.179-185

99. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis / H. Dumond, N. Presle, B. Terlain [et al.]. – Text: visual // Arthritis & Rheumatology. – 2003. – Vol.48, №11. – P.3118-3129.

100. Exploration and breakthrough in the mode of chondrocyte death - A potential new mechanism for osteoarthritis / B. Chen, L. Wang, D. Xie [et al.]. – Text: visual // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2024. – Vol.170. – P.e:115990.

101. Expression and function of the insulin receptor in normal and osteoarthritic human chondrocytes: modulation of anabolic gene expression, glucose transport and GLUT-1 content by insulin / S.C. Rosa, A.T. Rufino, F. Judas [et al.]. – Text: visual // Osteoarthritis Cartilage. – 2011. – Vol.19, №6. – P.719-727.

102. Extracellular succinate derived from ectopic milieu drives adhesion and implantation growth of ectopic endometrial stromal cells via the SUCNR1 signal in endometriosis / Q. Tian, J. Ruan, Y. Wang [et al.]. – Text: visual // Journal of Cell Communication and Signaling. – 2024. – Vol.22, №1. – P.82.

103. Eyre, D. R. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? / D. R. Eyre, M.A. Weis, J. J. Wu. – Text: visual // European Cells & Materials Journal. –

2006. – Vol.12. – P.57-63.

104. Fishbach, F. A manual of laboratory diagnostic tests. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins. – 2004. – P.1291.

105. Forskolin-free cAMP assay for Gi-coupled receptors / J. Gilissen, P. Geubelle, N. Dupuis [et al.]. – Text: visual // Biochemical Pharmacology. – 2015. – Vol.9, №3. – P.381-391.

106. Funari V.A. Cartilage-selective genes identified in genome-scale analysis of non-cartilage and cartilage gene expression / A. Day, D. Krakow [et al.]. – Text: visual // BMC Genomics. – 2007. – №8. – P.165.

107. Galano, A. On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals / A. Galano. – Text: visual // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2011. – Vol.13. – P.7178-7188.

108. Galano, A. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK / A. Galano, D.X. Tan, R.J. Reiter. – Text: visual // Journal of Pineal Research. – 2013. – Vol.54. – P.245–257.

109. Giralt, M. Adipokines and the endocrine role of adipose tissues / M. Giralt, R. Cereijo, F. Villarroya. – Text: visual // Handbook of Experimental Pharmacology. – 2016. – Vol.233. – P.265-282.

110. Glucosamine and chondroitin for knee osteoarthritis: a double-blind randomised placebo-controlled clinical trial evaluating single and combination regimens / M. Fransen, M. Agaliotis, L. Nairn [et al.]. – Text: visual // Annals of the Rheumatic Diseases. – 2015. – Vol.74, №5. – P.851-858.

111. GPR91 senses extracellular succinate released from inflammatory macrophages and exacerbates rheumatoid arthritis / A. Littlewood-Evans, S. Sarret, V. Apfel [et al.]. – Text: visual // Journal of Experimental Medicine. – 2016. – Vol.213. – P.1655-1662.

112. Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index / D. Gallagher, S.B. Heymsfield, M. Heo [et al.]. – Text: visual // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2000. – Vol.72, №3. – P.694-

701.

113. Henrotin, Y. Osteoarthritis in year 2021: biochemical markers / Y. Henrotin. – Text: visual // Osteoarthritis and Cartilage. – 2022. – Vol.30, №2. – P.237-248.

114. Her, Y.F. Succinate Dehydrogenase Loss in Familial Paraganglioma: Biochemistry, Genetics, and Epigenetics / Y.F. Her, L.J. Maher 3rd. – Text: visual // International Journal of Endocrinology. – 2015. – Vol.2015, №2. – P.e:296167.

115. High LDL levels lead to increased synovial inflammation and accelerated ectopic bone formation during experimental osteoarthritis / W.de Munter, M.H. van den Bosch [et al.]. – Text: visual // Osteoarthritis and Cartilage. – 2016. – Vol.24, №5. – P.844-855.

116. Hunter, D.J. Osteoarthritis / D.J. Hunter, S. Bierma-Zeinstra. – Text: visual // Lancet. – 2019. – Vol. 27. – P.1745-1759.

117. Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3: putative molecular components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocytes / A. Mobasheri, S. Richardson, R. Mobasheri [et al.]. – Text: visual // Histology & Histopathology. – 2005. – Vol.20, №4. – P.1327-1338.

118. Hypoxia promotes the production and inhibits the destruction of human articular cartilage / B.L. Thoms, K.A. Dudek, J.E. Lafont [et al.]. – Text: visual // Arthritis & Rheumatology. – 2013. – Vol.65. – P.1302–1312.

119. Hypoxia-inducible factor-2alpha is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction / S. Yang, J. Kim, J.H. Ryu [et al.]. – Text: visual // Nature Medicine. – 2010. – Vol.16. – P.687-693.

120. Identification of clinical phenotypes in knee osteoarthritis: a systematic review of the literature / A. Dell'Isola, R. Allan, S.L. Smith [et al.]. – Text: visual // BMC Musculoskeletal Disorders. – 2016. – Vol.17, №1. – P.425.

121. Imaging Biomarkers of Osteoarthritis / F.W. Roemer, W. Wirth, S. Demehri [et al.]. – Text: visual // Seminars in Musculoskeletal Radiology. – 2024. – Vol

28, №1. – P.14-25.

122. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints / D. Prieto-Alhambra, A. Judge, M.K. Javaid [et al.] – Text: visual // *Annals of the Rheumatic Diseases*. – 2014. – Vol. 73.– P.1659-1664.

123. Incidence rate and risk factors for radiographic hip osteoarthritis in Japanese men and women: a 10-year follow-up of the ROAD study / T. Iidaka, S. Muraki, H. Oka [et al.]. – Text: visual // *Osteoarthritis and Cartilage*. – 2020. – Vol.28, №2. – P.182-188.

124. Increased Succinate Accumulation Induces ROS Generation in In Vivo Ischemia/Reperfusion-Affected Rat Kidney Mitochondria / J. Kamarauskaite, R. Baniene, D. Trumbeckas [et al.]. – Text: visual // *BioMed Research International*. – 2020. – Vol.2020. – P.e:8855585.

125. Indexes of severity for osteoarthritis of the hip and knee: validation–value in comparison with other assessment tests / M.G. Lequesne, C. Mery, M. Samson [et al.]. – Text: visual // *Scandinavian Journal of Rheumatology*. – 1987. – Vol.16. – P.85-89.

126. Inhibition of high glucose-induced VEGF release in retinal ganglion cells by RNA interference targeting G protein-coupled receptor 91 / J. Hu, Q. Wu, T. Li [et al.]. – Text: visual // *Experimental Eye Research*. – 2013. – Vol.109, №3. – P.31-39.

127. Inhibition of interleukin-1alpha-induced cartilage oligomeric matrix protein degradation in bovine articular cartilage by matrix metalloproteinase inhibitors: potential role for matrix metalloproteinases in the generation of cartilage oligomeric matrix protein fragments in arthritic synovial fluid / V. Ganu, R. Goldberg, J. Peppard [et al.]. – Text: visual // *Arthritis & Rheumatology*. – 1998. – Vol.41, №12. – P.2143-2151.

128. Injective mesenchymal stem cell-based treatments for knee osteoarthritis: from mechanisms of action to current clinical evidences / S. Lopa, A. Colombini, M. Moretti [et al.]. – Text: visual // *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. –

2019. – Vol.27. – P.2003–2020.

129. Insight into osteoarthritis through integrative analysis of metabolomics and transcriptomics / Z. Huang, Z. He, Y. Kong, Z. Liu, L. Gong. – Text: visual // *Clinica Chimica Acta*. – 2020. – Vol.510. – P.323-329.

130. Insight into SUCNR1 (GPR91) structure and function / J. Gilissen, F. Jouret, B. Pirotte [et al.]. – Text: visual // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2016. – Vol.159. – P.56-65.

131. Instability and excessive mechanical loading mediate subchondral bone changes to induce osteoarthritis / J. Zhu, Y. Zhu, W. Xiao [et al.]. – Text: visual // *Annals of Translational Medicine*. – 2020. – Vol.8, №6. – P.350.

132. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS / E.T. Chouchani, V.R. Pell, E. Gaude [et al.]. – Text: visual // *Nature*. – 2014. – Vol. 515, №3. – P.431-435.

133. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes / A.B. Lerner, J.D. Case, Y. Takahashi [et al.]. – Text: visual // *Journal of the American Chemical Society*. – 1958. – Vol.80, №10. – P.2587.

134. Isoorientin ameliorates H₂O₂-induced apoptosis and oxidative stress in chondrocytes by regulating MAPK and PI3K/Akt pathways / T. Cui, Y. Lan, Y. Lu [et al.]. – Text: visual // *Aging (Albany NY)*. – 2023. – Vol.15, №11. – P.4861-4874.

135. Janckila, A.J. Biology and clinical significance of tartrate-resistant acid phosphatases: new perspectives on an old enzyme / A.J. Janckila, L.T. Yam. – Text: visual // *Calcified Tissue International*. – 2009. – Vol.85, №6. – P.465-483.

136. Jarraya, M. Osteoarthritis year in review 2023: Imaging. osteoarthritis cartilage / M. Jarraya, A. Guermazi, F.W. Roemer. – Text: visual // *Osteoarthritis and Cartilage*. – 2024. – Vol.32, №1. – P.18-27.

137. Jiang, A. Phenotype changes of subchondral plate osteoblasts based on a rat model of ovariectomy-induced osteoarthritis / A. Jiang, S. Gao. – Text: visual // *Annals of Translational Medicine*. – 2020. – Vol.8, №6. – P.476.

138. Johns, M.W. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth

sleepiness scale / M.W. Johns. – Text: visual // *Sleep*. – 1991. – Vol.14, №6. – P.540-545.

139. Kaya, A. Regulation of protein function by reversible methionine oxidation and the role of selenoprotein MsrB1 / A. Kaya, B.C. Lee, V.N. Gladyshev. – Text: visual // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2015. – Vol.23. – P.814–822.

140. Kellgren, J.H. Radiological assessment of osteoarthritis / J.H. Kellgren, J.S. Lawrence. – Text: visual // *Annals of the Rheumatic Diseases*. – 1957. – Vol.16. – P.494–502.

141. Kennaway, D.J. Measuring melatonin by immunoassay / D.J. Kennaway. – Text: visual // *Journal of Pineal Research*. – 2020. – Vol.69, №1. – P.e:12657.

142. Korotkyi, O. H. Cytokines profile in knee cartilage of rats during monoiodoacetateinduced osteoarthritis and administration of probiotic / O. H. Korotkyi, A. A. Vovk, T. I. Halenova [et al.]. – Text: visual // *Biopolymers and Cell*. – 2020. – Vol. 36, №1. – P. 23-35.

143. Kovács, B. Regulatory effects and interactions of the Wnt and OPG-RANKL-RANK signaling at the bone-cartilage interface in osteoarthritis / B. Kovács, E. Vajda, E.E. Nagy. – Text: visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol.20, №18. – P.4653.

144. Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1-deficient mice show resistance to instability-induced osteoarthritis / K. Hashimoto, S. Mori, Y. Oda [et al.]. – Text: visual // *Scandinavian Journal of Rheumatology*. – 2016. – Vol.45. – P.412–422

145. Leptin enhances MMP-1, MMP-3 and MMP-13 production in human osteoarthritic cartilage and correlates with MMP-1 and MMP-3 in synovial fluid from OA patients / A. Koskinen, K. Vuolteenaho, R. Nieminen [et al.]. – Text: visual // *Clinical and Experimental Rheumatology*. – 2011. – Vol.29. – P.57-64

146. Li, Z. Cell interplay in osteoarthritis / Z. Li, Z. Huang, L. Bai. – Text: visual // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Vol.9. – P.e:720477.

147. Lipopolysaccharide promotes Drp1-dependent mitochondrial fission and associated inflammatory responses in macrophages / R. Kapetanovic, S.F. Afroz, D.

Ramnath [et al.]. – Text: visual // *Immunology & Cell Biology*. – 2020. – Vol.98. – P.528-539.

148. Lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial morphology induces a metabolic shift in microglia modulating the inflammatory response *in vitro* and *in vivo* / S. Nail, S., K.S. Sobotka, P. Joshi [et al.]. – Text: visual // *Glia*. – 2019. – Vol.67. – P.1047-1061.

149. Liu, B. ROS and p53: a versatile partnership / B. Liu, Y. Chen, D.K. Clair. – Text: visual // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2008. – Vol.44. – P.1529-1535.

150. Local leptin production in osteoarthritis subchondral osteoblasts may be responsible for their abnormal phenotypic expression / M.S. Mutabaruka, M. Aoulad Aissa, A. Delalandre [et al.]. – Text: visual // *Arthritis Research & Therapy*. – 2010. – Vol.12, №1. – P.20.

151. Lowry O.H. Protein measurement with Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr [et al.]. – Text: visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 1951. – Vol.193, №1. – P. 265-275.

152. LOX-1 deficient mice show resistance to zymosan-induced arthritis / K. Hashimoto, Y. Oda, K. Nakagawa [et al.]. – Text: visual // *European Journal of Histochemistry*. – 2018. – Vol.62. – P.2847.

153. Martin, J.A. Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis / J.A. Martin, J. A. Buckwalter. – Text: visual // *Biogerontology*. – 2002. – Vol.3. – P.257–264.

154. Martin-Alarcon, L. Rheological effects of macromolecular interactions in synovial fluid / L. Martin-Alarcon, T.A. Schmidt. – Text: visual // *Biorheology*. – 2016. – Vol.53, №2. – P.49-67

155. Martínez-Reyes, I. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease / I. Martínez-Reyes, N.S. Chandel. – Text: visual // *Nature Communications*. – 2020. – Vol.11, №1. – P.102.

156. Mechanical loading promotes mast cell degranulation via RGD-integrin dependent pathways / V. Fowlkes, C.G. Wilson, W. Carver [et al.]. – Text: visual //

Journal of Biomechanics. – 2013. – Vol.46. – P.788–95.

157. Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin / T.W. Fischer, K. Kleszczyński, L.H. Hardkop [et al.]. – Text: visual // Journal of Pineal Research. – 2013. – Vol.54. – P.303-312.

158. Melatonin enhances the occurrence of autophagy induced by oxidative stress in Arabidopsis seedlings / P. Wang, X. Sun, N. Wang [et al.]. – Text: visual // Journal of Pineal Research. – 2015. – Vol.58, №4. – P.479-489.

159. Melatonin induces mitochondrial apoptosis in osteoblasts by regulating the STIM1/cytosolic calcium elevation/ERK pathway / S. Qiu, Z.B. Tao, L. Tao [et al.]. – Text: visual // Life Sciences. – 2020. – Vol.248, №2. – P.e:117455.

160. Melatonin inhibits Sirt1-dependent NAMPT and NFAT5 signaling in chondrocytes to attenuate osteoarthritis / J.Y. Guo, F. Li, Y.B. Wen [et al.]. – Text: visual // Oncotarget. – 2017. – Vol.8, №34. – P.55967-55983.

161. Melatonin Lowers HIF-1 α Content in Human Proximal Tubular Cells (HK-2) Due to Preventing Its Deacetylation by Sirtuin 1 / A. Owczarek, K.B. Gieczewska, M. Polanska [et al.]. – Text: visual // Frontiers in Physiology. – 2021. – Vol.11. – P.e: 572911.

162. Melatonin Prevents Osteoarthritis-Induced Cartilage Degradation via Targeting MicroRNA-140 / Y. Zhang, J. Lin, X. Zhou [et al.]. – Text: visual // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2019. – Vol.2019. – P.e: 9705929.

163. Melatonin: Buffering the immune system / A. Carrillo-Vico, P.J. Lardone, N. Alvarez-Sánchez [et al.]. – Text: visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2013. – Vol.14. – P.e: 8638.

164. Metabolic syndrome and osteoarthritis distribution in the hand joints: a propensity score matching analysis from the osteoarthritis initiative / B. Mohajer, R.M. Kwee, A. Guerhazi [et al.]. – Text: visual // The Journal of Rheumatology. – 2021. – Vol.48, №10. – P.1608-1615.

165. Metabolic syndrome increases osteoarthritis risk: findings from the UK Biobank prospective cohort study / S. Zhang, D. Wang, J. Zhao [et al.]. – Text: visual // BMC Public Health. – 2024. – Vol.24, №1. – P.333.

166. MicroRNA-193b-3p regulates chondrogenesis and chondrocyte metabolism by targeting HDAC3 / F. Meng, Z. Li, Z. Zhang [et al.]. – Text: visual // Theranostics. – 2018. – Vol.8, №10. – P.2862-2883.

167. Mitochondrial respiration and redox coupling in articular chondrocyte / R.S. Lane, Y. Fu, S. Matsuzaki [et al.]. – Text: visual // Arthritis Research & Therapy. – 2015. – Vol.17, №1. – P.54.

168. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes / E. Maneiro, M.A. Martín, M.C. de Andres [et al.]. – Text: visual // Arthritis and Rheumatism. – 2003. – Vol.48, №3. – P.700-708.

169. Molecular mechanisms of the melatonin receptor pathway linking circadian rhythm to type 2 diabetes mellitus / A.Y. Xia, H. Zhu, Z.J. Zhao [et al.]. – Text: visual // Nutrients. – 2023. – Vol.15, №6. – P.1406.

170. Molecular taxonomy of osteoarthritis for patient stratification, disease management and drug development: biochemical markers associated with emerging clinical phenotypes and molecular endotypes / A. Mobasheri, W.E. van Spil., E. Budd [et al.]. – Text: visual // Current Opinion in Rheumatology. – 2019. – Vol.31, №1. – P.80-89.

171. Mukaiyama, K. Elevation of serum alkaline phosphatase (ALP) level in postmenopausal women is caused by high bone turnover / K. Mukaiyama, M. Kamimura. – Text: visual // Aging Clinical and Experimental Research. – 2015. – Vol.27. – №4. – P.413-418.

172. Multiple functions of MSCA-1/TNAP in adult mesenchymal progenitor/stromal cells / D. Estève, J. Galitzky, A. Bouloumié [et al.]. – Text: visual // Stem Cells International. – 2016. – Vol.2016, №3. – P.1815982.

173. Natural ingredients-derived antioxidants attenuate H₂O₂-induced oxidative stress and have chondroprotective effects on human osteoarthritic chondrocytes via

Keap1/Nrf2 pathway / J. Yang, X. Song, Y. Feng [et al.]. – Text: visual // Free Radical Biology and Medicine. – 2020. – Vol.152. – P.854-864.

174. Novel insights and mechanisms of lipotoxicity-driven insulin resistance / B. Lair, C. Laurens, B. Van Den Bosch [et al.]. – Text: visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol.21, №17. – P.e:6358.

175. Nwosu, N. Pain prediction by serum biomarkers of bone turnover in people with knee osteoarthritis: an observational study of TRAcP5b and cathepsin K in OA / N. Nwosu, M. Allen. – Text: visual // Osteoarthritis and Cartilage. – 2017. – Vol.25. – P.858-865

176. Obesity, Metabolic Syndrome, and Osteoarthritis-An Updated Review / S.J.P. Sampath, V. Venkatesan, S. Ghosh [et al.]. – Text: visual // Current Obesity Reports. – 2023. – Vol.12, №3. – P.308-331.

177. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species / D.X. Tan, L.C. Manchester, M.P. Terron [et al.]. – Text: visual // Journal of Pineal Research. – 2007. – Vol.42. – P.28-42.

178. Oral administration of melatonin increases plasma calcium and magnesium and improves bone metabolism in aged male mice / J. Igarashi-Migitaka, Y. Maruyama, A. Seki [et al.]. – Text: visual // Melatonin Research. – 2021. – Vol.4, №2. – P.581-591.

179. Osteoarthritis - a case for personalized health care? / M.A. Karsdal, C. Christiansen, C. Ladel [et al.]. – Text: visual // Osteoarthritis and Cartilage. – 2014. – Vol.22, №1. – P.7-16.

180. Owen, R. *In vitro* models of bone remodelling and associated disorders / R. Owen, G.C. Reilly. – Text: visual // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2018. – Vol.6. – P.134.

181. Oxidant conditioning protects cartilage from mechanically induced damage / P. Ramakrishnan, B.A. Hecht, D.R. Pedersen [et al.]. – Text: visual // Journal of Orthopaedic Research. – 2010. – Vol.28, №7. – P.914-920.

182. Pattern of adipokine expression in osteoblasts from osteoporotic and osteoarthritic bone / A. Corrado, E.R. Sanpaolo, C. Rotondo [et al.]. – Text: visual //

Translational Research in Gerontology and Geriatrics. – 2019. – Vol.67. – №4.

183. Phenotypes of osteoarthritis-related knee pain and their transition over time: data from the osteoarthritis initiative / J. Ye, D. Xie, X. Li [et al.]. – Text: visual // BMC Musculoskeletal Disorders. – 2024. – Vol.25, №1. – P.173.

184. Ponzetti, M. Osteoblast differentiation and signaling: established concepts and emerging topics / M. Ponzetti, N. Rucci. – Text: visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol.22, №13. – P.6651.

185. Preferential accumulation of activated Th1 cells not only in rheumatoid arthritis but also in osteoarthritis joints / H. Yamada, Y. Nakashima, K. Okazaki [et al.]. – Text: visual // The Journal of Rheumatology. – 2011. – Vol.38, №8. – P.1569-1575.

186. Prevalence of abnormal bone-specific alkaline phosphatase in orthopaedic trauma patients: a cross-sectional study from a tertiary trauma centre / D. Rastogi, N. Gautam, Z. Ara [et al.]. – Text: visual // Cureus. – 2022. – Vol.14, №4. – P.e:24264.

187. Prevalence trends of site-specific osteoarthritis from 1990 to 2019: findings from the global burden of disease study 2019 / H. Long, Q. Liu, H. Yin [et al.]. – Text: visual // Arthritis & Rheumatology. – 2022. – Vol.74, №7. – P.1172-1183.

188. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030 / S. Kurtz, K. Ong, E. Lau [et al.] – Text: visual // The Journal of Bone and Joint Surgery. – 2007. – Vol. 89. – P. 780-785.

189. Răduț, R. Bone markers in arthropathies / R. Răduț, A.M. Crăciun, C.N. Silaghi. – Text: visual // Acta Clinica Croatica. – 2019. – Vol.58, №4. – P.716-725.

190. Rainbow, R. Inflammation and joint tissue Interactions in OA: implications for potential therapeutic approaches / R. Rainbow, W. Ren, L. Zeng. – Text: visual // Arthritis. – 2012. – Vol.2012, №2. – P.741582.

191. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis / S. Drevet, G. Gavazzi, L. Grange [et al.]. – Text: visual // Experimental Gerontology. – 2018. – Vol.111. – P.107–117

192. Reaven G.M. Role of insulin resistance in human disease / G.M Reaven. – Text: visual // Diabetes. – 1988. – Vol.37. – P.1595–1607.

193. Redox homeostasis: the golden mean of healthy living / F. Ursini, M. Maiorino, H.J. Forman. – Text: visual // *Redox Biology*. – 2016. – Vol.8. – P.205–215.
194. Reduced fat mass and increased lean mass in response to 1 year of melatonin treatment in postmenopausal women: A randomized placebo-controlled trial / A.K. Amstrup., T. Sikjaer, S.B. Pedersen [et al.]. – Text: visual // *Clinical Endocrinology*. – 2016. – Vol.84, №3. – P.342-347.
195. Regard, J.B. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression / J.B. Regard, I.T. Sato, S.R. Coughlin. – Text: visual // *Cell*. – 2008. – Vol.135, №3. – P. 561-571.
196. Relationship between different serum cartilage biomarkers in the acute response to running and jumping in healthy male individuals / M. Dreiner, T. Munk, F. Zaucke [et al.]. – Text: visual // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol.12, №1. – P.6721.
197. Rescue of proinflammatory cytokine-inhibited chondrogenesis by the antiarthritic effect of melatonin in synovium mesenchymal stem cells via suppression of reactive oxygen species and matrix metalloproteinases / X. Liu, Y. Xu, S. Chen [et al.]. – Text: visual // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2014. – Vol.68. – P. 234-246.
198. Research progress in glucose metabolism of chondrocytes / J.Y. Wei, D.M. Zhang, J. Xie [et al.]. – Text: visual // *Journal of Sichuan University (Medical Science Edition)*. – 2021. – Vol.52, №6. – P.923-928.
199. Risk of sick leave and disability pension in working-age women and men with knee osteoarthritis / J. Hubertsson, I.F. Petersson, C.A. Thorstenson [et al.] – Text: visual // *Annals of the Rheumatic Diseases*. – 2013. – Vol. 3. – P. 401-405.
200. Rogero, M.M. Obesity, inflammation, toll-like receptor 4 and fatty acids / M.M. Rogero, P.C. Calder. – Text: visual // *Nutrients*. – 2018. – Vol.10, №4. – P.432.
201. Role of norepinephrine in IL-1 β -induced chondrocyte dedifferentiation under physioxia / S. Speicher, N. Molotkov, K. El Bagdadi [et al.]. – Text: visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol.20, №5. – P.1212.
202. Sakai, K. Vertebrates originally possess four functional subtypes of G protein-coupled melatonin receptor / K. Sakai, Y. Yamamoto, T. Ikeuchi. – Text: visual

// Scientific Reports. – 2019. – Vol.9, №1. – P.e:9465.

203. Salutory effects of melatonin combined with treadmill exercise on cartilage damage / Y. Hong, H. Kim, Y. Lee [et al.]. – Text: visual // Journal of Pineal Research. – 2014. – Vol.57. – P. 53-66.

204. Schofield, C.J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases / C.J. Schofield, P.J. Ratcliffe. – Text: visual // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2004. – Vol.5. – P.343–354.

205. Serum alkaline phosphatase level is positively associated with metabolic syndrome: a nationwide population-based study / J.H. Kim, H.S. Lee, H.M. Park [et al.]. – Text: visual // Clinica Chimica Acta. – 2020. – Vol.500. – P.189-194

206. Serum cartilage oligomeric matrix protein in late-stage osteoarthritis: association with clinical features, renal function, and cardiovascular biomarkers // J. Riegger, M. Rehm, G. Büchele [et al.]. – Text: visual // Journal of Clinical Medicine. – 2020. – Vol.9, №1. – P.268.

207. Serum metabolome analysis identified amino-acid metabolism associated with pain in people with symptomatic knee osteoarthritis - a cross-sectional study / O. Mehta, A. Vijay, S.A. Gohir [et al.]. – Text: visual // The Journal of Pain. – 2023. – Vol.24, №7. – P.1251-1261.

208. Silver, I.A. Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites / I.A. Silver. – Text: visual // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. – 1975. – Vol.271. – P.261–272.

209. Single-cell RNA-seq analysis reveals the progression of human osteoarthritis / Q. Ji, Y. Zheng, G. Zhang [et al.]. – Text: visual // Annals of the Rheumatic Diseases. – 2019. – Vol.78, №1. – P.100-110.

210. Sleep disturbance and its association with pain severity and multisite pain: a prospective 10.7-year study / F. Pan, J. Tian, F. Cicuttini, Jones G [et al.]. – Text: visual // Pain and Therapy. – 2020. – Vol.9, №2. – P.751-763.

211. Socioeconomic burden of total joint arthroplasty for symptomatic hip and knee osteoarthritis in the Italian population: a 5-year analysis based on hospitalization

records / P. Piscitelli, G. Iolascon, G. Di Tanna [et al.]. – Text: visual // *Arthritis care & Research*. – 2012. – Vol.64. – P.1320-1327.

212. Song, Y. Melatonin synergistically enhances docetaxel induced endoplasmic reticulum stress to promote apoptosis by suppressing NF- κ B activation in cervical cancer / Y. Song, S. Wang. – Text: visual // *Medical Oncology*. – 2023. – Vol.40, №8. – P.219.

213. Sousa, B.C., Chemistry and analysis of HNE and other prominent carbonyl-containing lipid oxidation compounds / B.C. Sousa, A.R. Pitt, C.M. Spickett. [et al.]. – Text: visual // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2017. – Vol.111. – P.294-308.

214. Specific-cytokine associations with outcomes in knee osteoarthritis subgroups: breaking down disease heterogeneity with phenotyping / J. Calvet, A. Berenguer-Llgero, C. Orellana [et al.]. – Text: visual // *Arthritis Research & Therapy*. – 2024. – Vol.26, №1. – P.19.

215. Starup-Linde, J. Biochemical bone turnover markers in diabetes mellitus — A systematic review / J. Starup-Linde, P. Vestergaard. – Text: visual // *Bone*. – 2016. – Vol.82, №2. – P.69-78.

216. Succinate and its G-protein-coupled receptor stimulates osteoclastogenesis / Y. Guo, C. Xie, X. Li [et al.]. – Text: visual // *Nature Communications*. – 2017. – Vol.8, №3. – P.15621.

217. Succinate induces synovial angiogenesis in rheumatoid arthritis through metabolic remodeling and HIF-1 α /VEGF axis / Y. Li, Y. Liu, C. Wang [et al.]. – Text: visual // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2018. – Vol.126. – P.1-14.

218. Succinate is a paracrine signal for liver damage / P.R. Correa, E.A. Kruglov, M. Thompson [et al.]. – Text: visual // *Journal of Hepatology*. – 2007. – Vol.47, №2. – P.262–269.

219. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α / G.M. Tannahill, A.M. Curtis, J. Adamik [et al.]. – Text: visual // *Nature*. – 2013. – Vol.496, №7444. – P.238–242.

220. Succinate metabolism in the retinal pigment epithelium uncouples respiration from ATP synthesis / D.T. Hass, C.M. Bisbach, B.M. Robbins [et al.]. – Text: visual // Cell Reports. – 2022. – Vol.39, №10. – P.e:110917.

221. Succinate receptor deficiency attenuates arthritis by reducing dendritic cell traffic and expansion of Th17 cells in the lymph nodes / A.L. Saraiva, F.P. Veras, R.S. Pere [et al.]. – Text: visual // The FASEB Journal. – 2018.

222. Succinate-SUCNR1 induces renal tubular cell apoptosis / M. Pu, J. Zhang, Y. Zeng [et al.]. – Text: visual // American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2023. – Vol.324, №2. – P.467-476.

223. SUCNR1 controls an anti-inflammatory program in macrophages to regulate the metabolic response to obesity / N. Keiran, V. Ceperuelo-Mallafre, E. Calvo [et al.]. – Text: visual // Nature Immunology. – 2019. – Vol.20, №5. – P.581-592

224. Suppression of Circadian Clock Protein Cryptochrome 2 Promotes Osteoarthritis / H. Bekki, T. Duffy, N. Okubo [et al.]. – Text: visual // Osteoarthritis and Cartilage. – 2020. – Vol.28, №7. – P.966-976.

225. Synovial cell cross-talk with cartilage plays a major role in the pathogenesis of osteoarthritis / C.H. Chou, V. Jain J. Gibson [et al.]. – Text: visual // Scientific Reports. – 2020. – Vol.10, №1. – P.e:10868.

226. Synovial mast cells from knee and hip osteoarthritis: histological study and clinical correlations / L. Farinelli, A. Aquili, M. Mattioli-Belmonte [et al.]. – Text: visual // Journal of Experimental Orthopaedics. – 2022. – Vol.9, №1. – P.13.

227. Synovial tissue metabolomic profiling reveal biomarkers of synovial inflammation in patients with osteoarthritis / J.D. Murillo-Saich, R. Coras, R. Meyer [et al.]. – Text: visual // Osteoarthritis and Cartilage Open. – 2022. – Vol.4, №3. – P.e: 100295.

228. Tanezumab reduces osteoarthritic hip pain: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial / T. Brown Mark, T. Murphy Frederick, M. Radin David [et al.]. – Text: visual // Arthritis & Rheumatology. – 2013. – Vol.65. – №7. – P. 1795–1803.

229. Targeted redox inhibition of protein phosphatase 1 by Nox4 regulates eIF2 α -mediated stress signaling / C.X. SantosSantos, A.D. Hafstad, M. Beretta [et al.]. – Text: visual // The EMBO Journal. – 2016. – Vol.35. – P.319-334

230. Targeting the succinate receptor effectively inhibits periodontitis / Y. Guo, F. Xu, S.C. Thomas [et al.]. – Text: visual // Cell reports. – 2022. – Vol.40, №12. – P.e:111389.

231. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness / D.X. Tan, R. Hardeland, L.C. Manchester [et al.]. – Text: visual // Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society. – 2010. – Vol.85. – P. 607-623

232. The crystal structure of the signature domain of cartilage oligomeric matrix protein: implications for collagen, glycosaminoglycan and integrin binding / K. Tan, M. Duquette, A. Joachimiak [et al.]. – Text: visual // The FASEB Journal. – 2009. – Vol.23, №8. – P.2490-2501

233. The function of PPAR γ /AMPK/SIRT-1 pathway in inflammatory response of human articular chondrocytes stimulated by advanced glycation end products / H. Huang, Z.J. Wang, H.B. Zhang [et al.]. – Text: visual // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2019. – Vol.42, №8. – P.1303-1309.

234. The global economic cost of osteoarthritis: how the UK compares / A. Chen, C. Gupte, K. Akhtar [et al.]. – Text: visual // Arthritis. – 2012. – Vol.2012. – P. 698-709.

235. The mechanism of action for hyaluronic acid treatment in the osteoarthritic knee: a systematic review / R.D. Altman, A. Manjoo, A. Fierlinger [et al.]. – Text: visual // BMC Musculoskeletal Disorders. – 2015. – Vol.16. – P.321.

236. The mechanosensitivity of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) / P. Giannoni, M. Siegrist, E.B. Hunziker [et al.]. – Text: visual // Biorheology. – 2003. – Vol.40, №1. – P.101-109.

237. The obesity paradox and osteoporosis / A. Fassio, L. Idolazzi, M. Rossini [et al.]. – Text: visual // Eating and Weight Disorders. – 2018. – Vol.23, №3. – P.293-

302.

238. The outcomes of total knee arthroplasty in morbidly obese patients: a systematic review of the literature / L. Boyce, A. Prasad, M. Barrett [et al.]. – Text: visual // Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery. – 2019. – Vol.139. – P. 553–560

239. The Pittsburgh sleep quality index: A new instrument for psychiatric practice and research / D.J. Buysse, C.F. Reynolds 3rd, T.H. Monk [et al.]. – Text: visual // Psychiatry Research. – 1989. – Vol.28, №2. – P.193-213.

240. The Reactive Sulfur Species Concept: 15 Years On / G.I. Giles, M.J. Nasim, W. Ali [et al.]. – Text: visual // Antioxidants. – 2017. – Vol.6. – P.38.

241. The relationship between glucose metabolism, metabolic syndrome, and bone-specific alkaline phosphatase: a structural equation modeling approach / C.L. Cheung, K.C. Tan, K.S. [et al.]. – Text: visual // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2013. – Vol.98, №9. – P.3856-3863.

242. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis / A. Mobasheri, M.P. Rayman, O. GualilloNat [et al.] – Text: visual // Nature Reviews Rheumatology. – 2017 – Vol. 13, №5. – P. 302-311.

243. The role of WNT and IL-1 signaling in osteoarthritis: therapeutic implications for platelet-rich plasma therapy / A. Tonutti, V. Granata, V. Marrella [et al.]. – Text: visual // Frontiers in Aging. – 2023. – Vol.4. – P.1201019.

244. Tissue nonspecific alkaline phosphatase function in bone and muscle progenitor cells: control of mitochondrial respiration and ATP production / Z. Zhang, H.K. Nam, S. Crouch [et al.]. – Text: visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol.22, №3. – P.1140.

245. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand / J. Lam, S. Takeshita, J.E. Barker [et al.]. – Text: visual // Journal of Clinical Investigation. – 2000. – Vol.106, №12. – P.1481-1488.

246. Trinder, P. Enzymatic calorimetric determination of triglycerides by GOP-PAP method / P. Trinder. – Text: visual // Annals of Clinical Biochemistry. – 1969. –

Vol.6. – P.24-27.

247. Up-regulated HIF-2 α contributes to the Osteoarthritis development through mediating the primary cilia loss / Q. Yang, Y. Zhou, P. Cai [et al.]. – Text: visual // International Immunopharmacology. – 2019. – Vol.75. – P.e: 105762.

248. Verma, P. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in knee osteoarthritis: a novel diagnostic and prognostic biomarker / P. Verma, K. Dalal. – Text: visual // Journal of Orthopaedic Research. – 2013. – Vol.31, №7. – P.999-1006.

249. Vimalraj, S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization / S. Vimalraj. – Text: visual // Gene. – 2020. – Vol.754. – P.e: 144855.

250. Wang, G.L. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia / G.L. Wang, G.L. Semenza. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 1993. – Vol.268, №29. – P.21513–21518.

251. Wang, T. Pro-inflammatory cytokines: the link between obesity and osteoarthritis / T. Wang, C. He. – Text: visual // Cytokine & Growth Factor Reviews. – 2018. – Vol.44. – P.57-64.

252. Webner, D. Intraarticular hyaluronic acid preparations for knee osteoarthritis: are some better than others? / D. Webner, Y. Huang, C.D. Hummer. – Text: visual // Cartilage. – 2021. – Vol.13, №1. – P. 1619S-1636S.

253. World Health Organization. Obesity and Overweight. Factsheet. WHO Media Centre.

254. Yang, S. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply / S. Yang, G. Lian. – Text: visual // Molecular and Cellular Biochemistry. – 2020. – Vol.467. – P.1-12.

255. Zhang, Z. Melatonin protects vertebral endplate chondrocytes against apoptosis and calcification via the Sirt1-autophagy pathway / Z.Zhang, J.Lin [et al.]. – Text: visual // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2019. – Vol.23. – P.177-193.