

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Южный федеральный университет»

На правах рукописи



ПАНИНА СВЕТЛАНА БОРИСОВНА

**Роль антиоксидантной системы и провоспалительных цитокинов в
механизмах развития гонартроза**

03.01.04 – биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент Н. П. Милютина

Ростов-на-Дону

2016

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Молекулярно-клеточные механизмы окислительного стресса.....	11
1.2 Молекулярно-клеточные механизмы патогенеза гонартроза.....	26
1.3 Полиморфные варианты генов и предрасположенность к развитию артроза.....	36
Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	45
2.1 Клинические наблюдения и клинические группы.....	45
2.2 Получение биологического материала.....	46
2.3 Биохимические методы исследования.....	47
2.3.1 Определение содержания продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой.....	47
2.3.2 Определение активности супероксиддисмутазы/супероксидустраняющей активности.....	48
2.3.3 Определение активности каталазы/скорости утилизации гидропероксида.....	49
2.3.4 Определение активности глутатионпероксидазы.....	50
2.3.5 Определение активности глутатион-S-трансферазы.....	51
2.3.6 Определение активности глутатионредуктазы.....	52
2.3.7 Определение содержания восстановленного глутатиона.....	52
2.3.8 Определение активности ксантиноксидоредуктазы.....	53
2.3.9 Определение активности ксантиноксидазы.....	54
2.3.10 Определение содержания мочевой кислоты.....	55
2.3.11 Определение общего белка.....	55
2.3.12 Иммуноферментный анализ.....	56
2.4 Генетические методы исследования.....	57
2.4.1 Выделение геномной ДНК.....	57
2.4.2 Проведение полимеразной цепной реакции.....	57
2.4.3 Детекция продуктов амплификации.....	59
2.5 Статистическая обработка результатов.....	60
Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ	62
3.1 Активность антиоксидантных ферментов в крови и синовиальной	

	жидкости пациентов с первичным и посттравматическим гонартрозом....	62
3.2	Активность ксантиноксидоредуктазы, ксантиноксидазы и содержание мочесвой кислоты в крови и синовиальной жидкости пациентов с первичным и посттравматическим гонартрозом.....	79
3.3	Уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови при гонартрозе....	84
3.4	Содержание провоспалительных цитокинов в крови и синовиальной жидкости пациентов с первичным/посттравматическим гонартрозом. Стратификация пациентов с ПТГА и здоровых лиц по генотипу полиморфных локусов <i>T-31C IL-1β, G-308A TNFα</i>	86
3.5	Анализ ассоциации полиморфных локусов генов интерлейкинов, матриксных металлопротеиназ, NO-синтаз и антиоксидантных ферментов с посттравматическим гонартрозом.....	92
3.5.1	Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов провоспалительных цитокинов <i>IL-1β, TNFα</i> у пациентов с ПТГА и здоровых лиц. Анализ ассоциации содержания <i>IL-1β/TNFα</i> с генотипом <i>T-31C IL-1β/ G-308A</i> гена <i>TNFα</i>	92
3.5.2	Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов матриксных металлопротеиназ <i>MMP-1</i> и <i>MMP-12</i> и тканевого ингибитора металлопротеиназ <i>TIMP-1</i> у пациентов с ПТГА и здоровых лиц.....	97
3.5.3	Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов NO-синтаз (<i>nNOS, eNOS3</i>) у пациентов с ПТГА и здоровых лиц. Анализ ассоциации уровня маркеров нитрозильного стресса и полиморфных локусов генов NO-синтаз.....	103
3.5.4	Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов антиоксидантных ферментов <i>SOD1, SOD2, CAT, GSTP1</i> у пациентов с ПТГА и здоровых лиц. Анализ ассоциации активности ферментов супероксиддисмутазы, каталазы, глутатион-S-трансферазы и полиморфных локусов генов <i>SOD1, SOD2, CAT, GSTP1</i>	106
3.5.5	Моделирование межгенных взаимодействий методом редукции многофакторной размерности (MDR).....	111
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
	ВЫВОДЫ	123
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	125

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКМ – активированные кислородные метаболиты
 АФК – активные формы кислорода
 АФА – активные формы азота
 ГА - гонартроз
 ГПО – глутатионпероксидаза
 КО – ксантиноксидаза
 КОР - ксантиноксидоредуктаза
 МДА – малоновый диальдегид
 МЕ – международная единица (мкмоль/мин)
 МК – мочевая кислота
 МПО – миелопероксидаза
 ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты
 ПОЛ – перекисное окисление липидов
 ПТГА – посттравматический гонартроз
 СЖ – синовиальная жидкость
 СОД, *SOD* – супероксиддисмутаза
 СРО – свободнорадикальное окисление
 СУА – супероксидустранивающая активность
 ТБК - 2-тиобарбитуровая кислота
 ХДНБ - 1-хлор-2,4-динитробензол
 ЭКМ – экстраклеточный матрикс
 ЭР – эндоплазматический ретикулум
 ARE – антиоксидант-респонсивный элемент, antioxidant responsive element
 BMI – индекс массы тела, bone mass index
 CAT–каталаза
 CI – доверительный интервал, confidence interval
 GMDR – Generalized MDR
 GR – глутатионредуктаза
 GSH – восстановленный глутатион
 GST – глутатион-S-трансфераза, *GSTP* - глутатион-S-трансфераза класса P
 GWAS – полногеномный анализ ассоциаций (genome-wide association scanning)
 Hb–гемоглобин
 IL - интерлейкин
 K/L – стадия артроза по шкале Kellgren/Lawrence
 MDR – редукция многофакторной размерности, multidimensional reduction
 MMP – матриксная металлопротеиназа, matrix metalloproteinase
 NOS – NO-синтаза
 NO_x⁻ – метаболиты радикала оксида азота, нитрит- и нитрат-ионы NO₂⁻ и NO₃⁻
 OR – отношение шансов, odds ratio
 SNP – однонуклеотидный полиморфизм, single nucleotide polymorphism
 TIMP – тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ, tissue inhibitor of MMP
 TNF – фактор некроза опухоли, tumor necrosis factor
 V_{H2O2} - скорость утилизации гидропероксида

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Гонартроз (ГА) – артроз коленного сустава, от которого в мире страдают более 251 млн человек; частота рентгенологических и/или клинических свидетельств развития ГА увеличивается каждые 10 лет жизни: от 33% у 60-70-летних до 43,7% у 80-летних (Anderson A.S., Loeser R.F., 2010). В отчете ВОЗ указано, что гонартроз занимает четвертое место по инвалидности среди женщин и восьмое – среди мужчин (Rogers R. et al., 2004). У лиц с диагнозом гонартроз примерно в два раза увеличивается вероятность продолжительности временной нетрудоспособности и примерно на 40-50% выше риск стойкой нетрудоспособности по сравнению с населением в целом (Галушко Е.А. и др., 2009). Около 2% всех дней нетрудоспособности связаны с гонартрозом (Hubertsson J. et al., 2013).

В основе развития артроза лежат такие патологические процессы, как потеря функциональности тканей, воспаление и стресс, системный ответ организма на которые включает в себя активацию свободнорадикального окисления и развитие окислительного стресса. Артроз является системным полиморбидным заболеванием, которое рассматривается не только с позиции локальной суставной патологии, но и с позиции нарушения многих факторов обмена веществ (Насонова В.А., 2009). Артроз – главная причина мышечно-скелетной боли, которая приводит к инвалидизации пациента; терапия на настоящий момент включает широкий ряд нефармакологических, фармакологических и хирургических подходов, которые нацелены на ослабление болевого синдрома, поддержание функции и предотвращение структурных изменений тканей сустава (Pendleton A. et al., 2000). При артрозе все ткани и клетки сустава вовлечены в патологический воспалительный процесс, при этом окислительный стресс, дисбаланс процессов репарации и деградации матрикса хряща, митохондриальная дисфункция и апоптоз хондроцитов являются патогенетическими факторами развития дегенеративно-дистрофического процесса в суставе (Clouet J. et al., 2009; Kim J. et al., 2010; Трилис Я.Г. и др., 2012). Повреждения и травмы хряща инициируют развитие воспаления и болевого синдрома в совокупности со структурными изменениями сустава, что может приводить к прогрессирующей дегенерации хряща и развитию посттравматического артроза (Anderson D.D. et al., 2011; Edd S.N. et al., 2015). При травмах сустава большое значение имеет вазоконстрикторная реакция, вызывающая ишемию, при развитии которой создаются все условия для интенсификации процессов перекисного окисления липидов (Матвеева Е.Л. и др., 2013).

В патогенезе артроза важное место занимает дисбаланс антиоксидантной системы, который может являться, в том числе, следствием влияния провоспалительных цитокинов, например, IL-1 β , в меньшей степени – IL-6 (Mathy-Hartert M. et al., 2008). Известно, что цитокины регулируют функции хондроцитов, остеобластов и остеокластов, ответственных за ремоделирование костной ткани; провоспалительные цитокины отвечают за повышенный синтез и экспрессию матриксных металлопротеиназ (ММП) в суставных тканях. Хондроциты, синовиоциты и другие клетки сустава способны изменять метаболизм в ответ на действие цитокинов (TNF α , IL-1, -6, -2, -7, -15) и хемокинов, содержание которых можно оценить в синовиальной жидкости пациентов с артрозом (Дмитриева Л.А., 2007; Miller R.E. et al., 2014). Современная концепция патогенеза артроза предполагает существенную роль хронического синовиального воспаления, которое приводит к прогрессированию деструкции хряща и имеет значение для развития болевого синдрома. Данные литературы свидетельствуют, что IL-1 β и, возможно, TNF α , - главные медиаторы деструкции суставных тканей при артрозе (Koopman M. et al., 2011).

Известна роль однонуклеотидного полиморфизма различных генов в предрасположенности к артрозу, например, rs143383 гена ростового фактора *GDF5*, гена *FTO*, в том числе, к посттравматическому гонартрозу (ПТГА) (Valdes A.M. et al., 2013; Gonzalez A., 2013). Полиморфные локусы генов, продукты которых вовлечены в развитие хрящевой ткани и/или ремоделирование кости, могут способствовать формированию предрасположенности к развитию артроза.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось исследование роли антиоксидантной системы и провоспалительных цитокинов в механизмах развития гонартроза, выявление взаимосвязи активности антиоксидантных ферментов и содержания цитокинов с различными генотипами полиморфных локусов соответствующих им генов при посттравматическом гонартрозе, а также поиск полиморфных локусов генов, предопределяющих предрасположенность к развитию посттравматического гонартроза.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. исследовать содержание малонового диальдегида как маркера перекисного окисления липидов в крови и синовиальной жидкости (СЖ) пациентов с первичным ГА и ПТГА;
2. исследовать активность антиоксидантных ферментов - супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, глутатионредуктазы и содержание восстановленного

глутатиона - в крови и синовиальной жидкости пациентов с первичным ГА и ПТГА;

3. исследовать активность ферментов ксантиноксидоредуктазы, ксантиноксидазы и уровень мочевой кислоты в крови и синовиальной жидкости пациентов с первичным ГА и ПТГА;
4. исследовать уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови при первичном и посттравматическом ГА;
5. исследовать содержание провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α в крови и синовиальной жидкости пациентов с первичным ГА и ПТГА;
6. исследовать влияние генотипа полиморфных локусов *G7958A SOD1*, *Ile58Thr SOD2*, *C-262T CAT*, *Ile105Val GSTP1*, *T-786C NOS3*, *G-84A NOS1*, *T-31C IL-1 β* , *G-308A TNF α* на активность ферментов супероксиддисмутазы, каталазы, глутатион-S-трансферазы, содержание нитритов/нитратов, IL-1 β , TNF α ;
7. провести поиск SNP-маркеров предрасположенности к развитию ПТГА среди генов антиоксидантных ферментов (*SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GSTP1*); провоспалительных цитокинов (*IL-1 β* , *TNF α*); матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов (*MMP1*, *MMP12*, *TIMP1*); NO-синтаз (*NOS1*, *NOS3*);
8. проанализировать межгенные взаимодействия всех SNP-типированных локусов (мультилокусное MDR-, GMDR-моделирование).

Научная новизна. Изучены особенности состояния антиоксидантной системы при первичном и посттравматическом гонартрозе с последующим корреляционным анализом показателей. Впервые показано, что для первичного и посттравматического гонартроза характерно нарушение баланса функционирования супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах, а также значительная инактивация глутатионпероксидазы. Показано, что активация глутатионпероксидазы в мононуклеарных клетках и сопряженное снижение уровня восстановленного глутатиона в синовиальной жидкости более характерно для ПТГА, а повышение активности глутатион-S-трансферазы в клетках крови и СЖ - для первичного ГА, особенно поздних стадий. Впервые установлено, что ряд редокс-параметров плазмы, клеток крови и синовиальной жидкости коррелируют с рентгенологической стадией гонартроза по шкале Kellgren/Lawrence. Впервые установлено, что уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови при гонартрозе любой этиологии значительно интенсифицирован. С использованием методов множественной регрессии при ПТГА были установлены взаимосвязи между: активностью

каталазы в эритроцитах, мононуклеарах и генотипом полиморфного локуса *C-262T CAT*; активностью глутатион-S-трансферазы в эритроцитах крови и генотипом локуса *Ile105Val GSTP1*; содержанием нитритов/нитратов в синовиальной жидкости и генотипом *T-786C eNOS*; содержанием TNF α в плазме и СЖ и генотипом *G-308A TNFa*. Впервые показано, что частоты генотипов и аллелей полиморфных локусов *A-82G MMP-12*, *G-84A nNOS* в общих выборках, а также *-1607 1G/2G MMP-1* у женщин различаются между пациентами с посттравматическим гонартрозом и здоровых лиц. Впервые путем моделирования межгенных взаимодействий получены статистически достоверные сочетания генотипов высокого и низкого риска развития гонартроза.

Практическая значимость. В работе найдены редокс-показатели плазмы и клеток крови, а также синовиальной жидкости, сопряженные с рентгенологической стадией гонартроза по шкале Kellgren/Lawrence. На основании полученных результатов разработан инновационный способ дифференциальной диагностики стадии гонартроза (патентная заявка №2014153253), учитывающий показатели плазмы и мононуклеарной фракции крови. В работе показано, что полиморфные локусы *A-82G MMP-12*, *G-84A nNOS*, а также *-1607 1G/2G MMP-1* у женщин могут быть использованы в качестве прогностических биомаркеров для оценки степени относительного риска развития посттравматического гонартроза в спортивных, медицинских, валеологических центрах. Данные факты отражены в патентной заявке «Способ прогнозирования предрасположенности к развитию посттравматического остеоартроза коленного сустава», №2014153254. Высокодостоверная MDR-модель, включающая гены-кандидаты NO-синтаз (*NOS1*, *NOS3*), каталазы (*CAT*), матриксной металлопротеиназы-12 (*MMP-12*) и интерлейкина-1 β (*IL-1b*), также может быть применена для прогноза предрасположенности к посттравматическому гонартрозу. Представленные в диссертации материалы составили основу инновационного стартап-проекта «Артротест К – тест-система для оценки состояния коленного сустава и выявления генетической предрасположенности к развитию артроза», неоднократно отмеченного на различных конкурсах, в т.ч. всероссийского уровня.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на X, XII, XIII, XIV межвузовских конференциях с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении» (Ростов-на-Дону, 2011, 2013, 2014, 2015 гг.); на IV, V, VI международных конференциях «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2011, 2013, 2015 гг.); на Всероссийской молодежной конференции «Актуальные вопросы биомедицинской инженерии» (Ростов-на-Дону, 2012 г.); на III Межвузовской научно-практической конференции студентов и молодых ученых (Самара, 2013 г.); на XX заочной научной конференции в Research Journal of International Studies (Екатеринбург,

2013 г.); на 8-й национальной научно-практической конференции с международным участием "Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека" (Смоленск, 2014 г.); на II Всероссийской XIII Межрегиональной с международным участием научной сессии «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Н. Новгород, 2015 г.), на V Съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015), а также на конкурсах инновационных стартап-проектов: УМНИК от Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, Russian Startup Tour 2015 (Ростов-на-Дону, 3-4 февраля 2015 г.; Инновационный центр Сколково, Startup Village, 2-3 июня 2015 г., полуфинал), GenerationS (онлайн- и офлайн-Предакселератор трека «BiotechMed», 25-29 августа 2015 г., Корпоративный Акселератор, Томск, 25 октября – 8 ноября 2015 г., полуфинал, финал GenerationS, совмещенный с III Московским корпоративным венчурным саммитом, 15 декабря 2015 г., Москва).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 30 работ, в том числе в изданиях, рекомендованных ВАК – 11 статей (из них в БД Scopus – 3 статьи, в БД Web of science - 3). Оформлены 2 патентные заявки - «Способ дифференциальной диагностики стадий гонартроза», №2014153253 от 25.12.2014 и «Способ прогнозирования предрасположенности к развитию посттравматического остеоартроза коленного сустава», №2014153254 от 25.12.2014.

На защиту выносятся следующие положения:

1. В эритроцитах пациентов с первичным и посттравматическим гонартрозом отмечено нарушение баланса активности сопряженных антиоксидантных ферментов, способствующее повышению интенсивности ПОЛ. Для мононуклеарных клеток крови пациентов с первичным и посттравматическим гонартрозом характерны изменения редокс-статуса, связанные с активацией ксантиноксидоредуктазы, ксантиноксидазы, с одной стороны, и антиоксидантных ферментов глутатион-S-трансферазы, глутатионредуктазы, с другой стороны. Апоптоз лимфоцитов периферической крови при гонартрозе интенсифицирован.
2. Активность ксантиноксидоредуктазы (КОР) в синовиальной жидкости, плазме и мононуклеарной фракции крови пациентов коррелируют с рентгенологической стадией гонартроза по шкале K/L и является биохимическим маркером стадии первичного и посттравматического гонартроза, а уровень МК в плазме крови – маркером стадии посттравматического ГА.
3. Содержание провоспалительного цитокина IL-1 β в плазме крови и синовиальной жидкости увеличено при гонартрозе по сравнению с нормальным значением в плазме крови, при этом содержание цитокина TNF α не отличается от нормы.

4. Генотипы полиморфных локусов *C-262T CAT*, *Ile105Val GSTP1*, *-786T>C eNOS*, *G-308A TNFa* достоверно ассоциированы, соответственно, с повышенной активностью каталазы в клетках крови (аллель *T*); пониженной активностью глутатион-S-трансферазы в эритроцитах (аллель *Val*); со сниженной концентрацией нитритов/нитратов в синовиальной жидкости (генотип *CC*); снижением содержания $TNF\alpha$ в плазме и СЖ (аллель *A*).
5. Модель *CAT C-262T* × *MMP-12 A-82G* × *NOS1 G-84A* × *IL1b T-31C* × *NOS3 T-786C*, а также локусы *A-82G MMP-12* и *G-84A nNOS* в общих выборках; *-16071G/2G MMP-1* у женщин являются достоверными предикторами для оценки риска развития посттравматического гонартроза в исследованной популяции.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 149 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов (5 глав), заключения, выводов, списка литературы (303 источника). Иллюстративный материал включает 19 таблиц и 20 рисунков.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Молекулярно-клеточные механизмы окислительного стресса

Свободнорадикальные процессы – нормальная и необходимая составляющая многих процессов жизнедеятельности, обязательный атрибут нормальной аэробной жизни. Исследования последних 20 лет продемонстрировали роль активированных кислородных метаболитов (АКМ) в качестве медиаторов внутриклеточного сигналинга, регулирующих множество физиологических и биологических процессов (т.н. редокс-биология), таких, как функционирование ростовых факторов, передача сигнала гипоксии, аутофагия, иммунный ответ, пролиферация и дифференциация стволовых клеток (Reczek S.R., Chandel N.S., 2015). Известны защитные функции АКМ, например, связанные с активацией нейтрофилов, способных к фагоцитозу мелких инородных частиц, включая бактерии. Однако при различных заболеваниях, воспалении и естественном старении наблюдается повышенная интенсивность свободнорадикальных процессов, приводящая к патологическим изменениям. Большинство заболеваний рассматриваются как «редокс-патологии» (Sies H., 2015).

Термин *окислительный стресс* был предложен Н. Sies в 1991 году как нарушение баланса про- и антиоксидантов в сторону усиления свободнорадикального окисления. Данная концепция подчеркивает, что нарушение этого равновесия может быть вызвано изменениями обеих его сторон – ненормально высокой генерацией АКМ или недостаточным функционированием антиоксидантной системы. Позже данное определение было расширено: в него было включено нарушение редокс-сигналинга, редокс-контроля и/или повреждение на молекулярном уровне. Термин «окислительный стресс» включает адаптацию, поскольку, в целом, стресс ассоциируется также с адаптивным ответом на него. В данном контексте особенно интересны открытия, связанные с молекулярным сигналингом за счет фосфорилирования/дефосфорилирования, а также динамической ролью цистеинов в белках. Открытие «редокс-переключателей» является начальным этапом в области изучения редокс-протеома, включающего такие важнейшие системы, как NF- κ B и Nrf2/Keap1. Кроме того, к настоящему времени уже установлено, что между окислительным стрессом и другими формами клеточного стресса (например, стрессом эндоплазматического ретикулума) существуют тесные взаимодействия. Следствием этих успехов в области редокс-биологии являются попытки медицинских и фармакологических вмешательств в эти адаптивные системы (Sies H., 2015; Burton G.J., Jauniaux E., 2011).

В настоящее время окислительный стресс практически всегда рассматривается в связи с воспалением и иммунным ответом. Так, сложно организованный ответ на сигналы опасности, связанные с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP) включает участие АКМ. Вирусные и бактериальные инфекции часто ассоциируются с недостатком необходимого микроэлемента селена, редокс-активной химической группы селенопротеинов – мощных антиоксидантов (Sies H., 2015).

Окислительный стресс проявляется в накоплении поврежденных оснований ДНК, продуктов окисления белков и перекисидации липидов, а также в снижении уровня антиоксидантов и связанной с этим повышенной восприимчивостью липидов мембран и липопротеинов к действию прооксидантов, включая ионы Fe^{2+} или H_2O_2 . Так, распространенной модификацией геномной, митохондриальной и теломерной ДНК и РНК является одноэлектронное окисление гуанина с образованием 8-оксогуанина (Radak Z., Boldogh I., 2010).

Свободный радикал – высокореактивная частица (молекула или атом), имеющая один или несколько неспаренных электронов на внешней орбитали (Владимиров Ю.А. и др., 1991). Причины образования свободных радикалов различны: внешние факторы (ионизирующее и ультрафиолетовое излучение, химические воздействия, ксенобиотики), внутренние факторы (активированные оксидазы – цитохром P450, NADPH-оксидаза, липопероксидазы; сбои в протекании окислительно-восстановительных реакций в клетке). Значительное количество свободных радикалов кислорода образуют «энергетические станции клеток» - митохондрии, а точнее, митохондриальная цепь электронного транспорта (Тодоров И.Н., 2007). Известно, что между АКМ и функционированием митохондрий и эндоплазматического ретикулума существуют тесные взаимосвязи, опосредованные токами ионов Ca^{2+} и представляющие собой сложную систему обратных связей. Так, недостаточная активность шаперонов приводит к накоплению белков с аномальной конформацией, что приводит, во-первых, к дальнейшей генерации АКМ, во-вторых, к запуску особого ответа на такое накопление (unfolded protein response, UPR) – высоко-консервативным сигнальным путем, направленным на восстановление гомеостаза, в противном случае – на запуск апоптоза (Burton G.J., Jauniaux E., 2011). Известно, что митохондрии, испытывающие окислительный стресс, играют критическую роль в качестве триггера и медиатора апоптоза: процессы перекисидации липидов митохондриальных мембран способствуют их деструкции и разбуханию, выходу в цитозоль проапоптотных факторов (цитохром c, AIF и др.), последующей фрагментации ядерной ДНК и апоптозу. Мутации митохондриальной ДНК могут приводить к сборке

энергетически неполноценных митохондрий, и как следствие возможен недостаток АТФ (Тодоров И.Н., 2007).

Согласно предложенной Владимировым Ю.А. классификации, большинство радикалов, образующихся в организме человека, можно разделить на природные и чужеродные. Среди экзогенных источников АКМ можно назвать загрязнители, табачный дым, ксенобиотики и лекарства; важнейшими сайтами образования внутриклеточных АКМ являются митохондриальная цепь переноса электронов, эндоплазматический ретикулум и NADPH-оксидазный комплекс. В связи с этим большое количество патологий ассоциировано с дисфункциями митохондрий или эндоплазматического ретикулума (Ye Z.-W. et al., 2015).

Природные радикалы, по Ю.А. Владимирову, можно разделить на первичные (природные), вторичные (повреждающие) и третичные (радикалы антиоксидантов). Образование первичных радикалов осуществляется при участии определенных ферментных систем. Эти радикалы выполняют полезные для организма функции. Из первичного радикала - супероксида, а также в результате других реакций в организме могут образоваться весьма активные молекулярные соединения: перекись водорода, гипохлорит и гидроперекиси липидов. Под действием ионов металлов переменной валентности, в первую очередь ионов Fe^{2+} , из этих веществ образуются вторичные свободные радикалы, такие, как радикал гидроксила и радикалы липидов, которые оказывают разрушительное действие на клеточные структуры (Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., 2009; рис. 1)

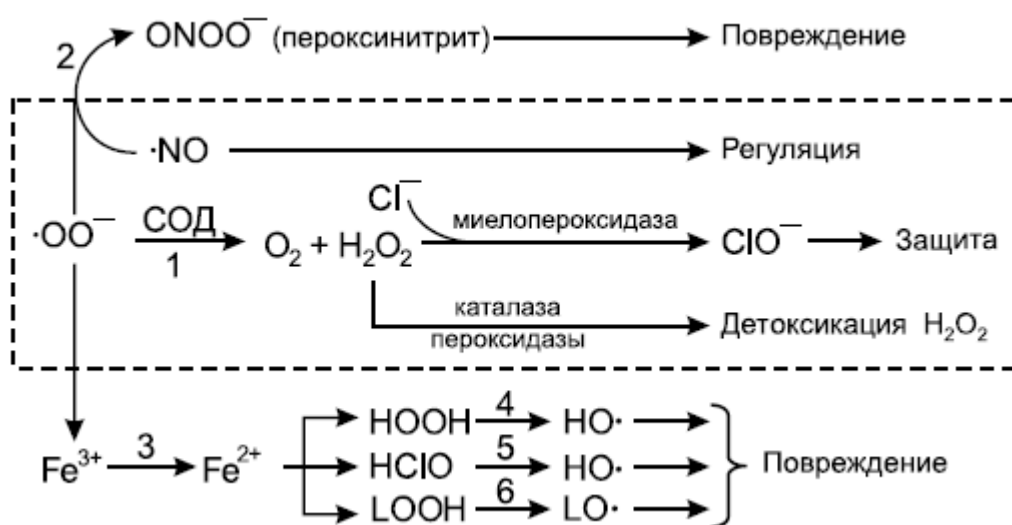


Рис. 1 Метаболизм первичных радикалов (объяснения в тексте). По (Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., 2009)

Фермент супероксиддисмутаза (СОД) превращает супероксид-анион радикал в пероксид водорода H_2O_2 (реакция 1). NO в присутствии $\text{O}_2^{\bullet -}$ реагирует с ним с образованием токсичного иона пероксинитрита ONOO^- (реакция 2). Супероксид обладает способностью восстанавливать трехвалентное железо, хранимое в ферритине или входящее в состав железо-серных комплексов цепей переноса электронов, до двухвалентного (реакция 3), что и происходит в неблагоприятных для клетки условиях. Двухвалентное железо охотно реагирует с H_2O_2 или гипохлоритом с образованием чрезвычайно активного гидроксильного радикала OH^\bullet (реакции 4–5), а также способно разветвлять цепи перекисного окисления липидов, реагируя с липогидропероксидами (реакция 6). Гидроксильный радикал может запускать процесс перекисного окисления липидов с образованием липидных радикалов.

В результате всех этих реакций в клетках образуется совокупность весьма агрессивных соединений ($\text{O}_2^{\bullet -}$, H_2O_2 , OH^\bullet и другие), которые были названы *активными формами кислорода* (АФК). Кроме них, к числу активированных кислородных метаболитов относят также *активные формы хлора* (гипохлорит ClO^-) и *активные формы азота*, связанные с превращением NO^\bullet , высшие окислы азота и пероксинитрит. *Активированные кислородные метаболиты* (АКМ) – это продукты неполного восстановления кислорода или обращения спина одного из его электронов, находящихся на внешних орбиталях, а также продукты ферментативной активации кислорода. *Антиоксидантами* можно назвать вещества различной химической природы, ингибирующие свободнорадикальное окисление (СРО) на различных стадиях цепного процесса.

Супероксидный анион-радикал ($\text{O}_2^{\bullet -}$) – это продукт одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода. Супероксид – очень реакционно-активное соединение, может вызывать патологические эффекты за счет окисления различных субстратов, непосредственно запускать процессы ПОЛ, восстанавливать трехвалентное железо Fe^{3+} с образованием высокоактивных гидроксильных радикалов OH^\bullet . Кроме перечисленного, известны и другие эффекты супероксида: регуляция тонуса сосудов, внутриклеточная регуляция, а также продукция биоцидного супероксида фагоцитами и участие в редокс-сигналинге. Так, супероксид может легко окислять ион железа внутриклеточных сенсоров Fe_2S_2 -содержащих белков (например, аконитаз), что приводит к изменению конформации белка и активации транскрипции ряда генов, в т.ч. гена супероксиддисмутазы (Белоусов В.В. и др., 2013).

Супероксидный анион-радикал $O_2^{\bullet-}$ как первичный радикал может участвовать в образовании других вторичных АКМ (перекиси водорода, гидроксильного радикала). Супероксидный анион-радикал продуцируется также с участием ксантиноксидоредуктазы, которая в нормальных условиях существует преимущественно в форме ксантиндегидрогеназы; а также с участием системы митохондриального окисления, NAD-дегидрогеназ и металлопротеинов. Большое количество супероксида продуцируется митохондриями клеток, а именно митохондриальной электрон-транспортной цепью (комплексы I и III) вследствие «утечки» электронов (Valko M. et al., 2007). Подсчитано, что приблизительно 1-2% электронов «утекает» через электрон-транспортную цепь митохондрий (Ye Z.-W. et al., 2015).

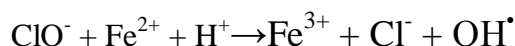
Перекись водорода (H_2O_2), гидропероксид – продукт двухэлектронного восстановления молекулярного кислорода. Перекись водорода достаточно стабильна и в отличие от других АФК, не является радикалом, способна легко проникать через биомембраны, т.к. не обладает зарядом. Негативное биологическое действие гидропероксида связано с тем, что он может являться предшественником других АФК, в частности, гидроксильных радикалов в результате протекания реакции Фентона ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$) и Габера-Вейсса ($O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\bullet} + OH^-$) (Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., 2009; Valko M. et al., 2007). Собственно гидропероксид является цитотоксичным соединением. Однако малые количества H_2O_2 не только не вызывают заметных повреждений клетки, но и оказывают митогенный эффект, стимулируют миграцию клеток, активируют/ингибируют некоторые факторы транскрипции (Ткачук В.А. и др., 2012). Наиболее изученными мишенями действия гидропероксида являются тирозиновые фосфатазы, цистеиновые остатки в активных центрах которых напрямую модифицирует пероксид водорода с образованием цистеинсульфенатов (Белоусов В.В. и др., 2013). В большинстве такие модификации являются обратимыми и АТР-зависимыми, и, следовательно, связанными с энергетическим статусом клетки.

Механизмы генерации H_2O_2 : дисмутация $O_2^{\bullet-}$ супероксиддисмутазой, функционирование ксантиноксидоредуктазы, оксидаз L-аминокислот, электрон-транспортная цепь митохондрий. Интересно, что в некоторых работах отмечается способность пероксида водорода, образуемого внутри митохондрий, участвовать в передаче апоптозного сигнала от одной клетки к другой (Плетюшкина О.Ю. и др., 2006). При нарастающей продукции H_2O_2 любой органеллой клетки задолго до окисления ДНК гидропероксид способен локально окислить все физиологические мишени вокруг органеллы, а именно, регуляторные и каталитические тиолаты белков. Это вызовет

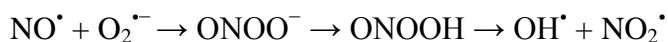
ошибочную активацию/ингибирование сигнальных каскадов, ассоциированных с данным компартментом, что индуцирует изменение транскрипционного паттерна и, вероятно, включение апоптоза (Белоусов В.В. и др., 2013).

Гидроксильный радикал OH^\bullet является продуктом трехэлектронного восстановления молекулярного кислорода или образуется в результате реакции гидропероксида с ионами металлов переменной валентности, является наиболее активной формой АФК *in vivo*. OH^\bullet достаточно быстро реагирует с биомолекулами всех классов, включая нуклеиновые кислоты, свободные нуклеотиды, белки, липиды и углеводы (Bartosz G., 2009). Действуя на SH-группы, гистидиновые и другие аминокислотные остатки, OH^\bullet вызывает денатурацию белков и инактивирует ферменты. Ведущая роль в повреждении ДНК отводится радикалам OH^\bullet , которые эффективно взаимодействуют с дезоксирибозой, пуриновыми и пиримидиновыми основаниями (Radak Z., Boldogh I., 2010).

Внедряясь в липидный слой клеточных мембран, радикал гидроксила запускает (инициирует) реакции цепного окисления липидов (ПОЛ), что приводит к повреждению мембран, нарушению их функций и гибели клеток (Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., 2009). Гидроксильный радикал образуется не только в реакции Фентона. А.Н. Осипов показал, что радикалы гидроксила образуются также при взаимодействии ионов железа (Fe^{2+}) с гипохлоритом. При этом радикал гидроксила выделяется даже с более высоким выходом, чем в реакции Фентона:



Еще одним важным источником OH^\bullet является взаимодействие оксида азота и супероксидного анион-радикала, что приводит к образованию пероксинитрита (ONOO^-) и далее пероксинитритной кислоты (ONOOH), которая, распадаясь, производит OH^\bullet и NO_2^\bullet .



Положительная роль OH^\bullet – создание микробицидного потенциала макрофагов и нейтрофилов. Реакции образования гидроксильного радикала могут происходить, по всей вероятности, при определенных патологических условиях в биологических жидкостях (плазма крови, синовиальная жидкость и др.).

Радикал оксида азота NO^\bullet . Структурная формула окиси азота - $\cdot\text{N}=\text{O}$. NO^\bullet образуется клетками стенок кровеносных сосудов (эндотелия), фагоцитами, нервными и многими другими клетками под действием гемсодержащих ферментов NO-синтаз. NO^\bullet играет ключевую роль во многих физиологических процессах: регуляции тонуса сосудов и кровяного давления, проведении нервного импульса, иммунном ответе и агрегации тромбоцитов (Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., 2009). NO^\bullet выделяется клетками-

фагоцитами и вместе с супероксидными радикалами используется для борьбы с чужеродными микроорганизмами. Являясь достаточно лабильной молекулой, NO^\bullet быстро превращается в нитрат, нитрит и другие продукты метаболизма в присутствии кислорода (Sher J.U. et al., 2007). Реакция между оксидом азота и супероксидным анион-радикалом приводит к образованию пероксинитрита, мощного окисляющего и нитрующего агента *in vivo*: $\text{N}=\text{O} + \text{}^\bullet\text{O}-\text{O}^- \rightarrow \text{O}=\text{N}-\text{O}-\text{O}^-$ (Carballal S. et al., 2014).

Пероксинитрит ONOO^- , образующийся в этой реакции, может разлагаться с образованием гидроксильного радикала $\text{}^\bullet\text{OH}$, который тоже вносит существенный вклад в цитотоксическое действие пероксинитрита: $\text{ONOOH} \rightarrow \text{O}=\text{N}-\text{O}^\bullet + \text{OH}^\bullet$ (Зенков Н.К. и др., 1999). Образование пероксинитрита приводит к серьезному повреждению клеток: он может инициировать процессы ПОЛ в мембранах, обладает прямым цитотоксическим и ДНК-расщепляющим эффектами (образует однонитевые разрывы в ДНК), может нарушать транспорт электронов в митохондриях, разобщая процессы окислительного фосфорилирования и истощая запасы АТФ, участвует в мутагенезе и апоптозе, окисляет NH- и SH-группы белков, что приводит к инактивации ряда ферментов (Зенков Н.К. и др., 1999; Sher J.U. et al., 2007).

NO^\bullet способен подавлять активность дыхательных ферментов (например, NADH-убихиноноксидоредуктазу, сукцинатубихиноноксидоредуктазу) (Зенков Н.К. и др., 1999), блокировать цепь переноса электронов в митохондриях. NO^\bullet может непосредственно активировать открытие гигантских пор в мембране митохондрий, что ведет к набуханию митохондриального матрикса, разрыву наружной мембраны, выходу цитохрома *c* и запуску каспазного каскада, т.е. апоптозу клетки. С другой стороны, NO^\bullet легко диффундирует между клетками и участвует в клеточном сигналинге, активируя свою мишень гуанилатциклазу, которая генерирует вторичный мессенджер cGMP из GTP. Молекула cGMP затем специфично связывается с белками-мишенями, включая cGMP-зависимые протеинкиназы, фосфодиэстеразы, и опосредует множество биологических эффектов (Abramson S.B., 2008). Другим примером сигнальных функций NO^\bullet считается его способность к ингибированию митохондриальной цитохром *c* оксидазы, что может оказывать значительное влияние на клеточное дыхание и метаболизм. «Неклассическим» механизмом NO^\bullet -сигналинга являются посттрансляционные модификации белков (S-нитрозилирование, S-глутатионилирование, нитрование тирозина), нитрование жирных кислот (олеиновой, линоленовой, арахидоновой и др.) (Martinez-Ruiz A. et al., 2011).

NO-синтазы. Реакция образования оксида азота NO^\bullet из L-аргинина, NADPH и кислорода катализируется тремя изоформами ферментов NO-синтаз (NOS),

кодирующихся разными генами: конститутивными нейрональной (nNOS, NOS1), эндотелиальной NOS (eNOS, NOS3) и индуцибельной NOS (iNOS, NOS2). Конститутивные изоформы являются Ca^{2+} /кальмодулин-зависимыми и постоянно продуцируют небольшие количества NO^{\bullet} в ответ на стимуляцию рецепторов. В отличие от конститутивных изоформ, Ca^{2+} -независимая iNOS экспрессируется только после клеточной стимуляции и производит большие количества окиси азота (Sher J.U. et al., 2007; Guix F.X. et al., 2005). Открыта также, так называемая, митохондриальная NO-синтаза (mtNOS), ассоциированная с внутренней митохондриальной мембраной (Guix F.X. et al., 2005; Haynes V. et al., 2003). Согласно результатам группы (Haynes V. et al., 2003), mtNOS была идентифицирована как альфа-изоформа nNOS, имеющая две посттрансляционные модификации – ацилирование миристиновой кислотой и фосфорилирование С-конца. С другой стороны, некоторые исследования не подтвердили факт наличия nNOS либо iNOS в митохондриях печени крыс (Lacza Z. et al., 2003). В целом, mtNOS регулирует митохондриальное дыхание; ее аминокислотную последовательность еще предстоит определить.

NADPH-оксидаза. NADPH-оксидаза является одним из важнейших ферментных комплексов профессиональных фагоцитов - нейтрофилов и моноцитов, - участвующих в защите от патогенов (Jones R.D. et al., 2000). NADPH-оксидаза – мембрано-ассоциированный мультиферментный электрон-транспортный комплекс. Две субъединицы $p22^{\text{phox}}$ и NOX-2/ $p91^{\text{phox}}$ формируют мембраносвязанный гетеродимерный флавопротеин - цитохром b (Bylund J. et al., 2010). В неактивном состоянии цитозольные субъединицы комплекса, а именно $p40^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$, не ассоциированы с цитохромом b. После активации клетки цитозольные субъединицы транслоцируются к мембране и формируют функциональную NADPH-оксидазу. Этот фермент использует NADPH в качестве субстрата и катализирует одноэлектронное восстановление кислорода в супероксид $\text{O}_2^{\bullet-}$, который далее может дисмутировать в H_2O_2 .

Миелопероксидаза (МПО). МПО представляет собой гемсодержащий белок с четвертичной структурой типа $\alpha_2\beta_2$ и состоит из двух протомеров $\alpha\beta$, включающих большую и малую субъединицы (Янковский О.Ю., 2000). МПО локализуется в азурофильных гранулах нейтрофилов. МПО способна окислять ионы галогенов (J, Br, в первую очередь Cl) и использовать продукты окисления (OCI) для поражения патогенов, в этом и заключается биоцидное действие этого фермента.

Ксантиноксидоредуктаза (КОР). Этот фермент катализирует превращение гипоксантина в ксантин и далее в мочевую кислоту на заключительном этапе пуринового метаболизма, а также окисление ряда птерицинов, альдегидов и имидазолов (Сумбаев

В.В., Розанов А.Я., 2001). У млекопитающих фермент в нормальных условиях находится преимущественно в ксантиндегидрогеназной форме (ксантин: NAD^+ -оксидоредуктаза, КД) и может обратимо или необратимо переходить в ксантиноксидазу (ксантин:кислород-оксидоредуктаза, КО), в результате соответственно образования дисульфидных связей цистеиновых остатков Cys535 и Cys992 или ограниченного протеолиза с вовлечением кальций-зависимых протеаз. При ишемии органов наблюдается быстрая трансформация ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу, и в этот процесс могут вовлекаться АКМ (Меньщикова Е.Б. и др., 2006). Основная физиологическая функция фермента – участие в катаболизме пуринов; при этом ксантиндегидрогеназная форма в качестве акцептора электронов использует главным образом NAD^+ , оксидазная – молекулярный кислород.

Структурно фермент представляет собой гомодимер; каждая субъединица имеет молекулярную массу около 150 кДа и содержит 3 домена, связанных со специфическими кофакторами. Молекулярная масса фермента составляет 283 кДа, причем при разделении его на мономеры обнаруживается, что каждый из них в отдельности обладает каталитической активностью. N-концевой домен содержит 2 субдомена, в каждый из которых входит по 1 железосерному центру, координационно связанному с 4 остатками цистеина; промежуточный домен содержит связывающий карман для FAD; C-концевой домен связан с молибденовым фактором (органическое производное птерина).

В оксидазной форме в результате работы фермента наблюдается образование $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 , при этом чем выше парциальное давление кислорода, тем больше образуется $\text{O}_2^{\cdot-}$ и меньше - H_2O_2 .

Экспрессия ксантиноксидоредуктазы существенно усиливается под действием цитокинов (интерферон γ , TNF- α), гормонов (кортизол), гипоксии (Меньщикова Е.Б. и др., 2006). Массированная трансформация ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу имеет место в гипоксических условиях, преимущественно на эндотелии (Radi R. et al., 1991). В результате гипоксии подавляется продукция АТФ, в соответствии с этим АМФ деградирует до аденозина. Последний диффундирует в экстраклеточное пространство, где через образование инозина превращается в гипоксантин, который является субстратом ксантиноксидоредуктазы. Гипоксантин накапливается в ишемизированной ткани для продукции $\text{O}_2^{\cdot-}$ в условиях реоксигенации. Параллельно с этим, ксантиндегидрогеназа конвертируется в КО. Пусковым механизмом этого процесса является Ca^{2+} -зависимый протеолиз. В условиях дефицита АТФ в клетках возрастает уровень Ca^{2+} , что ведет к активации кальмодулин-регулируемых внутриклеточных протеиназ. В результате реализации обоих параллельных процессов при реоксигенации осуществляется продукция $\text{O}_2^{\cdot-}$.

При снижении рН, а также избытке никотинамидных коферментов ксантиноксидаза также функционирует как NAD-зависимая ксантиндегидрогеназа (Hunt J. et al., 1993). Индуктором активности ксантиноксидазы являются молибдаты. Молибден (в составе молибдатов) активирует высвобождение ксантиноксидазного апофермента из пузырьков аппарата Гольджи, что приводит к увеличению количества активных молекул ксантиноксидазы.

Показано, что $O_2^{\cdot-}$, образующийся в ксантиноксидазной реакции, ингибирует Ca^{2+} -АТФазу саркоплазматического ретикула гладкомышечных клеток сосудов, угнетая тем самым транспорт Ca^{2+} , что является одной из причин повреждения сосудов при различных патологических состояниях (Меньщикова Е.Б. и др., 2006). Кроме того, $O_2^{\cdot-}$ служит предшественником других форм АКМ, в частности, H_2O_2 и OH^{\cdot} , которые обладают более выраженным цитотоксическим действием.

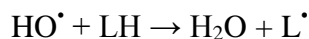
Ксантиноксидаза и ксантиндегидрогеназа присутствуют практически во всех тканях животного организма. В наибольших количествах фермент представлен у крыс – в гепатоцитах, эпителиальных и эндотелиальных клетках; у человека – в клетках печени и тонкого кишечника (Меньщикова Е.Б. и др., 2006). Обнаружено, что ксантиноксидоредуктаза локализована не только в цитоплазме, но и на внешней поверхности плазмалеммы эндотелиоцитов. Небольшие количества фермента обнаруживаются во внеклеточных жидкостях, например, в сыворотке крови, при этом практически весь фермент находится в оксидазной форме за счет действия сывороточных протеаз. Уровень внеклеточного фермента повышается при патологиях, особенно печени.

ПОЛ и его основные этапы

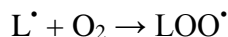
Многие органические соединения могут окисляться по свободнорадикальному механизму, однако наиболее эффективно окисляются полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК). Пероксидация ПНЖК может происходить ферментативно (например, при участии липоксигеназ) или неферментативно под действием АКМ (OH^{\cdot}), генерируемых такими оксидазами, как МПО, NADPH-оксидазы, КОР, или вследствие окружающих факторов (ксенобиотики, УФ-радиация) (Davies S.S., Guo L., 2014).

Реакция цепного окисления липидов играет исключительную роль в клеточной патологии и протекает в несколько стадий, которые получили название "иницирование", "продолжение", "разветвление" и "обрыв" цепи (Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., 2009). Иницирование цепной реакции начинается с того, что в липидный слой мембран или липопротеинов внедряется свободный радикал. Чаще всего это радикал гидроксила. Будучи небольшой по размеру незаряженной частицей, он способен проникать в толщу

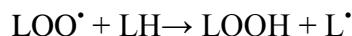
гидрофобного липидного слоя и вступать в химическое взаимодействие с полиненасыщенными жирными кислотами (которые принято обозначать как LH), входящими в состав биологических мембран и липопротеинов плазмы крови. При этом образуются липидные радикалы:



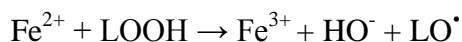
Липидный радикал (L^\bullet) вступает в реакцию с растворенным в среде молекулярным кислородом, при этом образуется новый свободный радикал - радикал липоперекиси (LOO^\bullet):



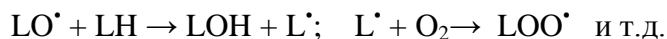
Этот радикал атакует одну из соседних молекул фосфолипида с образованием гидроперекиси липида LOOH и нового радикала L^\bullet :



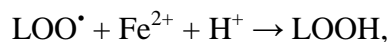
Чередование двух последних реакций и представляет собой цепную реакцию пероксидации (перекисного окисления) липидов. Существенное ускорение пероксидации липидов наблюдается в присутствии небольших количеств ионов двухвалентного железа. В этом случае происходит разветвление цепей в результате взаимодействия Fe^{2+} с гидроперекисями липидов:



Образующиеся радикалы LO^\bullet инициируют новые цепи окисления липидов:



В биологических мембранах цепи могут состоять из десятка и более звеньев. Но в конце концов цепь обрывается в результате взаимодействия свободных радикалов с антиоксидантами (InH), ионами металлов переменной валентности (например, теми же Fe^{2+}) или друг с другом:



Биомаркерами пероксидации липидов являются: гидропероксиды, изопростаны, ТБК-положительные продукты (малоновый диальдегид), диеновые конъюгаты, альдегиды/кетоны, окисленные липопротеины низкой плотности (oxLDL), ПОЛ-модифицированные белки и липофусцин (Niki E., 2014). При артрозе была выявлена высокая концентрация уровня окисленного липопротеина низкой плотности и антител к нему; более того, определение этих показателей в сыворотке крови у больных позволяет прогнозировать эффективность лекарственных препаратов (Зборовский А.Б. и др., 2009).

МДА – важнейший и наиболее изученный продукт пероксидации полиненасыщенных жирных кислот с двумя или более двойными связями (Del Rio D. et al., 2005). Одна из гипотез предполагает, что предшественником МДА *in vivo* является бициклический эндопероксид, схожий с формирующимися дериватами при биосинтезе простагландинов. МДА может также *in vivo* производиться ферментами из различных простагландинов. При нейтральных значениях pH МДА представляет собой енолат-анион и обладает низкой химической активностью, тем не менее, способен взаимодействовать с основаниями нуклеиновых кислот с образованием разных аддуктов. Данные соединения способны индуцировать мутации сдвига рамки считывания и замены оснований в клетках бактерий и млекопитающих. В этом заключается генотоксический эффект МДА. Показана способность МДА к генерации сшивок ДНК-белки, а также межцепочечных сшивок в ДНК, что потенциально имеет важные биологические последствия. МДА может взаимодействовать *in vivo* с первичными аминами. Токсическое действие МДА направлено также и на коллаген – важнейший структурный белок соединительной ткани (Del Rio D. et al., 2005).

Интересно, что некоторые продукты ПОЛ, в частности 4-гидроксиноненаль, участвуют в регуляции роста клеток и их дифференциации, а также регуляции процесса апоптоза (Дубинина Е.Е., 2006), причем в высоких концентрациях 4-гидроксиноненаль индуцирует апоптоз и дифференциацию, а в низких – пролиферацию клеток. В процессе детоксикации 4-гидроксиноненала участвуют изоферменты глутатион-S-трансферазы. В результате ферментативной реакции идет образование конъюгата GSH и 4-гидроксиноненала, который транспортируется во внеклеточное пространство за счет АТФ-зависимого процесса.

В то же самое время, окисленные фосфолипиды мембран участвуют в клеточном сигналинге, подобно таким липидным медиаторам, как простагландины (Davies S.S., Guo L., 2014). Например, некоторые классы oxPL способны индуцировать провоспалительные каскады, однако ограничивают воспалительный ответ на липополисахариды, конкурируя с ко-активаторами рецептора TLR4. Это свидетельствует о том, что окисление фосфолипидов может являться весьма полезным механизмом обратной связи для ослабления избыточного воспалительного ответа на микробную инвазию.

Вероятно, что ПОЛ в физиологических условиях может играть роль одного из иницирующих факторов в передаче сигнала, что сопровождается фазовыми переходами бислоя мембран и изменением конформации белков, обеспечивающими физиологический ответ на изменившуюся ситуацию в организме (Дубинина Е.Е., 2006). Girotti A.W. выделяет несколько степеней выраженности ПОЛ в тканях при состоянии окислительного

стресса: низкую, среднюю, высокую (Girotti A.W., 1998). Именно при низком уровне ПОЛ запускаются механизмы, направленные на образование биологически активных соединений типа цитокинов, простагландинов и т.д., действие которых обеспечивает поддержание жизнедеятельности организма. При интенсификации ПОЛ на двух последующих стадиях происходят процессы апоптоза и некроза тканей.

То, что изменения в окислительно-восстановительном балансе постоянно происходят в процессе дифференциации, старения, трансформации клеток и развития организма, было известно давно (Allen R.G., Tresini M., 2000). Открытие специфических генов и молекулярных каскадов, на которые способны влиять прооксиданты, дало начало гипотезе о действии АКМ в качестве субклеточных мессенджеров в генно-регуляторных и сигнал-передающих каскадах.

При окислительном или токсическом стрессе происходит резкое усиление экспрессии генов СОД, каталазы, ГПО, хиноноксидоредуктазы, глутатион-S-трансферазы и др. Важную роль в регуляции их транскрипции играют т.н. ARE-элементы (antioxidant-responsible elements), представляющие собой последовательности ДНК, расположенные в предпромоторных областях этих генов и взаимодействующие с факторами транскрипции (Nguyen T. et al., 2000; Смирнова О.А. и др., 2011). В отличие от факторов NF- κ B и AP-1, отвечающих на внешние сигналы, главным назначением регуляторной системы ARE является поддержание внутреннего гомеостаза при апоптоз-индуцирующих, канцерогенных и стрессовых воздействиях (Зенков Н.К. и др., 2009). Активность ARE способны регулировать белки Nrf1 и Nrf2 семейства NF-E2 (транскрипционные факторы с основным доменом типа лейциновой молнии). Что касается фактора Nrf2, играющего ведущую роль в регуляции работы ARE (Зенков Н.К. и др., 2009), то в норме он локализован в цитоплазме, неактивен и находится в комплексе с белком-репрессором Keap1. На сегодняшний день наиболее вероятной считается модель конститутивной протеасомной деградации комплекса Nrf2-Keap1 (Зенков Н.К. и др., 2009).

Интересно, что некоторые исследователи отмечают связь между дефицитом Nrf2 и тяжестью заболеваний суставов (Maicas N. et al., 2011). У гомозиготных мышей Nrf2(-/-) отмечалась повышенная продукция TNF α и IL-6 в суставе, а также повышение экспрессии циклооксигеназы-2, индуцибельной NO-синтазы и продукции пероксинитрита.

Антиоксиданты (АО) – соединения различной химической природы, которые способны ингибировать и предотвращать свободнорадикальное окисление на разных этапах. В процессе эволюции в клетках для защиты от АКМ выработались специализированные системы ферментативных антиоксидантов, к которым относятся: семейство супероксиддисмутаз (СОД), каталаза, сопряженная система глутатион-

зависимых ферментов (глутатионпероксидазы, глутатионредуктаза, глутатион-S-трансферазы). К низкомолекулярным антиоксидантам относятся: фенольные антиоксиданты (токоферол, убихинон), полиены (β -каротин, ретиналь), SH-соединения (цистеин, глутатион), конечные продукты азотистого обмена (мочевина, мочевая кислота), пептиды (гомокарнозин, дельта-сон индуцирующий пептид).

Супероксиддисмутаза (СОД) – первый на пути АФК фермент антиоксидантной защиты, был впервые описан в 1969 году Дж. Мак-Кордом и И. Фридовичем. СОД катализирует реакцию дисмутации супероксид-аниона в кислород и гидропероксид, последний далее разлагается до воды с помощью каталазы, глутатионпероксидазы и пероксиредоксина (Yamakura F., Kawasaki H., 2010):



В настоящее время у млекопитающих идентифицировано 3 различных изоформы СОД, а также описана структура кодирующих их генов (Zelko I.N. et al., 2002). Две изоформы СОД – СОД1 и 3 – содержат Cu и Zn в каталитическом центре. СОД1 (Cu,Zn-СОД) наиболее распространена и хорошо изучена, содержится в цитоплазме, ядре и плазматической мембране. СОД3 локализована в экстраклеточных пространствах. СОД1 состоит из двух идентичных субъединиц, имеет молекулярную массу около 32 кДа и обнаружена в цитоплазме, ядре и лизосомах клеток млекопитающих (Ye Z.-W. et al., 2015; Zelko I.N. et al., 2002). СОД3 – наименее изученный фермент из всего семейства СОД; это гомотетрамерный гликопротеин молекулярным весом 135 кДа с высокой аффинностью к гепарину. СОД3 была обнаружена у человека в плазме, лимфе, цереброспинальной жидкости, синовиальной жидкости (Zelko I.N. et al., 2002; Marklund S.L. et al., 1986). Изоформа СОД2 содержит марганец как кофактор и локализована в матриксе митохондрий и хлоропластов клеток эукариот (Mn-СОД). Это гомотетрамер с молекулярной массой каждой субъединицы около 23 кДа. Показана роль СОД2 в процессах клеточной дифференцировки, онкогенезе, в защите от окислительных повреждений при гипоксии (Wispe J.R. et al., 1992). Важнейшая роль СОД2 у млекопитающих доказывается тем, что сбой работы гена СОД2 ведет к летальной нейродегенерации и патологиям сердца у мышей. Мыши, у которых генно-инженерными методами снижена способность к образованию СОД3, обладают высокой чувствительностью к гипероксии, усиливающейся при ишемии (Zelko I.N. et al., 2002).

Каталаза. Типичная гемовая каталаза имеет четыре субъединицы, большую молекулярную массу (250-300 кДа) и обладает очень высокой каталитической активностью (Владимиров Ю.А., 2003).

У млекопитающих СОД и каталаза всегда функционируют совместно. Каталаза работает при высоких концентрациях перекиси водорода, хотя существуют две дополнительные белковые системы, катализирующие восстановление H_2O_2 и содержащие тиоловые группы – глутатионпероксидазы (с глутатионом GSH) и пероксиредоксины (с тиоредоксинами). В этих системах NADPH функционирует как донор атомов водорода и участвует в восстановлении окисленного глутатиона и тиоредоксина с помощью глутатионредуктазы и тиоредоксин редуктазы, соответственно (Ye Z.-W. et al., 2015).

Скорость протекания реакции крайне высока – около 44000 молекул субстрата в секунду на молекулу. При низких концентрациях перекиси каталаза проявляет свойства пероксидазы и способна окислять фенолы, муравьиную кислоту, формальдегид и этанол в присутствии перекиси ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{R}'\text{H}_2 \rightarrow \text{R}' + 2\text{H}_2\text{O}$) (Ткачук В.А. и др., 2012). Катализировать восстановление гидропероксида способны также белки пероксиредоксины.

Стоит отметить, что некоторые типы клеток, в т.ч. хондроциты способны секретировать каталазу в экстраклеточное пространство. Данные свидетельствуют о том, что кроме утилизации АКМ и антиоксидантных защитных эффектов аутокринно каталаза способна участвовать в интенсификации воспалительного процесса за счет индукции про-воспалительных генов, таких, как гены циклооксигеназы-2, интерлейкина-8, стромелизина (Litvinov D., Turpaev K., 2004).

Глутатионпероксидазы (ГПО)– семейство ферментов, катализирующих реакцию восстановления глутатионом нестойких органических гидропероксидов в оксикислоты:

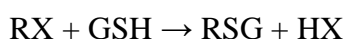
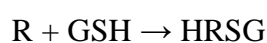


«Классическая» цитозольная ГПО1 представляет собой тетрамер, каждая субъединица содержит по одному атому селена в составе селеноцистеина. Помимо этой изоформы, встречаются также селеновые изоферменты ГПО2 (желудочно-кишечная, в цитозоле клеток печени и кишечника), ГПО3 (внутриклеточная, в плазме), ГПО4 (ГПО гидроперекисей фосфолипидов), и не содержащие селен изоферменты: ГПО5 (секреторная), ГПО6 и ГПО7. Гомозиготные нокаутные мыши по генам *ГПО1*, *ГПО2* жизнеспособны (вероятно, за счет перекрывающей функции пероксиредоксинов), но были более подвержены состояниям окислительного стресса; изоформа ГПО4 была необходима для выживаемости (Deponte M., 2013).

Глутатион-S-трансферазы (GST) используют восстановленный глутатион для конъюгации с гидрофобными соединениями и восстановления органических пероксидов. Глутатион-S-трансферазы можно разделить на структурно различные семейства ферментов – наиболее изученные канонические цитозольные растворимые GST (7 классов

alpha, mu, pi, theta, zeta, omega, sigma); каппа-класс GST (растворимые митохондриальные и/или пероксисомальные); MAPEG-белки (membrane-associated proteins with divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism, гидрофобный микросомальный белок) (Deponte M., 2013; Board P.G., Menon D., 2013). Типичные цитозольные GST – димерные белки, состоящие из субъединиц весом 25-30 кДа, N-терминальный домен включает глутатион-связывающий сайт.

Основная функция GST – детоксификация ксенобиотиков и продуктов ПОЛ посредством их восстановления, глутатионилирования или нуклеофильного замещения гидрофобных групп:



В отличие от селенсодержащей ГПО, для которой лучшими субстратами являются гидрофильные гидроперекиси с малым размером молекулы, GST эффективно восстанавливают гидрофобные гидроперекиси с большим объемом молекулы: гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот (линолевой, арахидоновой), фосфолипидов; а также гидроперекиси мононуклеотидов и ДНК, участвуя тем самым в их репарации (Меньщикова Е.Б. и др., 2006). Кроме того, GST могут конъюгировать с GSH токсичные продукты ПОЛ (ноненали, децинали), тем самым способствуя их выведению из организма. Конъюгаты различных соединений и глутатиона метаболизируются дальше: отщепляются остатки глутамата и глицина, затем аминогруппа цистеинового остатка ацетируется, в результате образуются конечные продукты, меркаптуровые кислоты (Habig W.H. et al., 1974). Меркаптуровые кислоты, т.е. S-алкилированные дериваты N-ацетилцистеина, затем подвергаются экскреции.

1.2. Молекулярно-клеточные механизмы патогенеза гонартроза

Суставы – высокоспециализированные органы, выполняющие свою специфическую функцию за счет суставного хряща и внеклеточного матрикса, способного в физиологических условиях выдерживать высокие циклические нагрузки. Сустав состоит из различных типов соединительной ткани, включая субхондральную кость, хрящ, связки, суставную капсулу (Aigner T., Schmitz N., 2011). Суставная капсула включает внешний волокнистый слой и внутренний слой ткани – синовиальную оболочку (Sutton S. et al., 2009), содержащую метаболически активные клетки синовиоциты, играющие важную роль в питании хондроцитов, а также в поддержании нормальной метаболической среды внутри сустава, например, удалении метаболитов и продуктов деградации матрикса.

Кроме того, синовиоциты продуцируют большие количества медиаторов (цитокины, ростовые факторы), ферментов, расщепляющих матрикс, а также гиалуроновую кислоту, лубрицины, которые выступают в роли смазки для суставных поверхностей (Aigner T., Schmitz N., 2011). Синовиоциты имеют три главных типа, а именно фагоцитирующие макрофаги, фибробласты и дендритные клетки. Именно фибробласты продуцируют коллаген, фибронектин и гиалуроновую кислоту для синовиальной жидкости (Iwanaga T. et al., 2000). Синовиальная жидкость (СЖ) является своеобразным индикатором жизнедеятельности сустава, по своему составу имеет значительное сходство с плазмой крови, но отличается от нее меньшим содержанием белков и присутствием специфического протеогликана гиалуроновой кислоты и других продуктов секреции синовиоцитов (Павлова В.Н., 1980).

Гиалиновый хрящ – аваскулярная ткань, покрывающая суставные поверхности сочленяющихся костей. Он включает хондроциты, расположенные внутри экстраклеточного матрикса (ЭКМ), главными компонентами которого являются преимущественно коллаген II типа и протеогликаны (агрекан), которые соответственно придают прочность и эластичность суставу. Хондроциты занимают менее 5% от общего объема суставного хряща. Способность хряща противостоять внешнему давлению обеспечивается также сульфатированными гликозаминогликанами (ГАГ), например, хондроитинсульфатом (Watanabe H. et al., 1998).

Артроз является системным заболеванием, при котором все ткани и клетки сустава вовлечены в патологический воспалительный процесс, при этом окислительный стресс, дисбаланс процессов репарации и деградации матрикса хряща, митохондриальная дисфункция и апоптоз хондроцитов являются патогенетическими факторами развития дегенеративно-дистрофического процесса в суставе (Clouet J. et al., 2009; Kim J. et al., 2010; Трилис Я.Г. и др., 2012). Артроз диагностируется у 10-12% населения планеты, при этом заболеваемость увеличивается с возрастом: 97% людей старше 65 лет страдают от артроза (Cooper C., 1998). Наиболее часто поражаемыми участками являются суставы рук, колени, бедра и позвоночник (Goldring M.B., Goldring S.R., 2007).

Гонартроз, ГА (деформирующий артроз, остеоартроз) – полиэтиологическое дегенеративно–дистрофическое заболевание, характеризующееся поражением суставного хряща, субхондрального и метафизарного слоя кости, а также синовиальной оболочки, связок, капсулы, мышц, сопровождающееся формированием костно-хрящевых разрастаний, и проявляющееся болью и ограничением движений в суставе (Гонартроз и сходные с ним клинические состояния, клинические рекомендации, РНИИТО, 2013). Частота рентгенологических и/или клинических свидетельств развития гонартроза

увеличивается каждые 10 лет жизни: от 33% у 60-70-летних до 43,7% у 80-летних (Anderson A.S., Loeser R.F., 2010). В развитии остеоартроза коленного сустава важную роль играют такие факторы риска, как пожилой возраст, женский пол, постоянные перегрузки сустава, избыточная масса тела, травмы, генетическая предрасположенность.

Хондроциты суставного хряща высоко специализированы; только они ответственны за поддержание баланса макромолекул экстраклеточного матрикса, включающих коллаген II типа, скопления протеогликанов и неколлагеновых белков (Takacs-Vuia L. et al., 2008). При артрозе разрушается экстраклеточный матрикс, в нем образуются промежутки, нарушается нормальный синтез коллагена и уменьшается способность хондроцитов к регуляции апоптоза (Smith K.J. et al., 2006). Хондроциты обладают низкой способностью к регенерации. В течение ранних стадий артроза (начальная биосинтетическая фаза) происходит увеличение синтетической активности, которое является попыткой регенерации матрикса с помощью таких компонентов, как коллаген II, IV, IX, XI типов, протеогликаны. Хондроциты увеличиваются в размере (гипертрофия), пролиферируют, в глубокой зоне хряща часто наблюдаются крупные клетки с множеством ядер (Poole A.R. et al., 2007; Shapiro I.M. et al., 2007). Нарушенный метаболизм хондроцитов при артрозе ведет к образованию волокон, истощению матрикса, изменениям в количестве, распределении и составе матриксных белков (Pritzker K.P. et al., 2006). Коллаген X типа, не присутствующий в здоровом зрелом суставном хряще, обнаруживается при остеоартрозе, выступая своеобразным маркером (Shapiro I.M. et al., 2007; Четина Е.В., 2011).

Не в такой выраженной степени, как при ревматоидном артрите, но при артрозе также имеют место синовиальное воспаление и достаточно высокие уровни провоспалительных цитокинов и хемокинов, включая IL-8, моноцитарный хемотаксический белок 1 (MCP-1), провоспалительный белок макрофагов 1a (MIP-1a), RANTES, сосудистый эндотелиальный ростовой фактор (VEGF) и др. (Blasioli D.J., Kaplan D.L., 2014). В отличие от этих протеинов, концентрация интерлейкина-1 β (IL-1 β) и фактора некроза опухоли- α (TNF- α) в синовиальной жидкости при артрозе варьирует значительно: большинство пациентов имеет невысокие/неопределяемые количества IL-1 β и TNF- α , но отдельные пациенты характеризуются очень высокими значениями, что делает роль этих цитокинов в патогенезе артроза весьма противоречивой; эти медиаторы продуцируются как резидентными хондроцитами, так и синовиоцитами, в ответ на разнообразные биологические/механические стимулы (Tsuchida A.I. et al., 2014; Blasioli D.J., Kaplan D.L., 2014). Оба цитокина (IL-1 β и TNF- α) снижают синтез главных компонентов экстраклеточного матрикса и ингибируют анаболическую активность

хондроцитов; дополнительно как IL-1 β , так и TNF- α , способны усиливать интенсивность катаболических процессов за счет высвобождения матриксных металлопротеиназ, включая MMP-1,-3,-13 и аггреканы ADAMTS-1,-2 (Blasioli D.J., Kaplan D.L., 2014). Предположительно, именно IL-1 β играет роль в инициации артроза; обнаружена его связь с несколькими сигнальными путями в суставных хондроцитах, например, с гиперактивацией некоторых микроРНК, например, miR-146a, что приводит к гиперэкспрессии фактора VEGF, стимулирующего ангиогенез, и апоптозу хондроцитов (Li J. et al., 2012). Показано наличие повышенных уровней VEGF и его рецепторов в хрящевой ткани при артрозе не только на поздних, но и на ранних стадиях (Tsuchida A.I. et al., 2014).

Кроме перечисленных медиаторов, при артрозе вырабатываются другие провоспалительные молекулы: интерлейкин IL-6, простагландин E2 (в результате индукции экспрессии циклооксигеназы-2, микросомальной PGE синтазы-1 и растворимой фосфолипазы A2) и оксид азота NO \cdot . Установлено, что содержание маркеров системного воспаления коррелируют с интенсивностью болевого синдрома и дисфункцией сустава у пожилых пациентов с гонартрозом, особенно в этой связи обсуждаются сывороточные уровни TNF- α и его растворимого рецептора; предложен особый термин «inflamm-aging» для обозначения особого провоспалительного состояния, возникающего с увеличением возраста (Greene M.A., Loeser R.F., 2015). Устойчивая гиперпродукция про- и противовоспалительных медиаторов начинается после повреждения тканей и травмы сустава; так, уровни IL-1 β , -6, -8, TNF- α в синовиальной жидкости были максимальными на 0-1 дни после травмы передней крестообразной связки коленного сустава, а затем оставались повышенными относительно контроля; такой провоспалительный ответ у отдельных пациентов, не получивших терапию после травмы, может способствовать развитию хронического воспаления и в итоге привести к развитию посттравматического ГА (Lieberthal J. et al., 2015). Важно, что сразу после травмы сустава у пациентов зачастую происходит инфильтрация клеток в синовиальную среду, например, макрофагов, что коррелирует с тяжестью болевого синдрома при гонартрозе (Lieberthal J. et al., 2015). Таким образом, в патогенезе артроза, в том числе, участвует целая сеть провоспалительных медиаторов, продуцируемых клетками хрящевой, костной ткани, синовиальной средой. Вялотекущий воспалительный процесс (синовит), индуцируемый метаболическим синдромом, врожденным иммунитетом (инфламмосомы, а также рецепторы TLR), провоспалительным возрастным состоянием («inflammaging») – некоторые из недавних аргументов в пользу «воспалительной» теории патогенеза артроза (Berenbaum F., 2013). Неслучайно традиционно ведущее место в медикаментозной терапии

остеоартроза занимают различные нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), однако их длительное использование приводит к развитию целого ряда серьезных побочных эффектов (Денисов Л.Н. и др., 2007). Применение некоторых препаратов, восстанавливающих матрикс хрящевой ткани («Стопартроз», содержащий глюкозамин), при артрозе коленных суставов позволяет снизить дозу необходимых НПВП (Денисов Л.Н. и др., 2007).

Дополнительно механические стрессорные нагрузки, статичные или периодические, увеличивают продукцию NO[•] хондроцитами, так же как и экспрессию индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS, NOS2). NO[•] стимулирует деградацию хряща в результате ингибирования синтеза коллагена и протеогликанов, активации MMP, увеличения восприимчивости к окислительным повреждениям. Определенные нейропептиды, особенно нейропептид P, также опосредует воспаление и способствует передаче болевых ощущений (Marshall K.W. et al., 1990; Goldring M.B., Goldring S.R., 2007).

Известна также роль различных противовоспалительных молекул, включая интерлейкины IL-4, IL-10, IL-13, антагонист рецептора IL-1 β (IL-1Ra), в патогенезе артроза. В дополнение к этому показано, что ростовые факторы TGF-1 β и IGF-1 вовлечены в процесс развития артроза (Sutton S. et al., 2009; табл.1).

Таблица 1.

Цитокины, вовлеченные в патогенез остеоартроза (Sutton S. et al., 2009)

Регуляторное соединение	Какими клетками секретируется	Эффект
Провоспалительные цитокины		
TNF α	Синовиоциты, хондроциты	Увеличение резорбции хряща и кости Ингибирование синтеза гликопротеинов и коллагена Экспрессия матриксных металлопротеиназ (MMP) Стимуляция выработки провоспалительных цитокинов другими клетками Стимуляция продукции NO [•] Индукция апоптоза хондроцитов
IL-1 β	Синовиоциты, хондроциты, макрофаги	Увеличение резорбции хряща и кости Ингибирование синтеза протеогликанов Экспрессия матриксных металлопротеиназ (MMP) Продукция протеолитических ферментов Стимуляция выработки провоспалительных

		цитокинов другими клетками Стимуляция продукции NO [•] Индукция апоптоза хондроцитов
IL-6	Синовиоциты, хондроциты	Ингибирование синтеза протеогликанов Уменьшение пролиферации хондроцитов Увеличение активности MMP-2
IL-8	Моноциты, синовиоциты, хондроциты, остеобласты	Привлечение лейкоцитов Хемоаттрактант для нейтрофилов Стимуляция высвобождения провоспалительных цитокинов Кальцификация хондроцитов
IL-18	Макрофаги, синовиальные фибробласты	Стимуляция ангиогенеза Индукция синтеза NO [•] Стимуляция высвобождения провоспалительных цитокинов Гиперплазия синовиальной оболочки Индукция апоптоза хондроцитов Уменьшение экспрессии компонентов матрикса
Противовоспалительные цитокины и другие молекулы		
IL-4	Синовиоциты, хондроциты	Подавление экспрессии генов TNF α и IL-1 β Уменьшение продукции провоспалительных цитокинов, воспаления, васкуляризации и деградации хряща Ингибирование IL-1 β -зависимой продукции простагландина E2 Уменьшение транскрипции MMP-3 и ее активность в суставных хондроцитах Уменьшение образования остеокластов, таким образом, снижение резорбции кости Ингибирование апоптоза синовиоцитов
IL-10	Синовиоциты, хондроциты, макрофаги	Уменьшение продукции TNF- α и IL-1 β мононуклеарами синовиальной жидкости
Нейропептид P	Нервные волокна, в ответ на травмы или воспалительные процессы	Боль в суставе Вазодилатация Активация макрофагов, В-лимфоцитов, тромбоцитов Стимуляция высвобождения IL-1 β , TNF α , IL-6 Индукция пролиферации синовиоцитов, экспрессия протеогликана E2 и коллагеназы Формирование остеокластов

Хондроциты обладают низкой метаболической активностью, благодаря чему способны выживать в относительно гипоксических и аваскулярных условиях (Goldring M.B., Goldring S.R., 2007). При патологии напряжение кислорода в синовиальной

жидкости подвержено флуктуациям в результате феномена ишемии/реперфузии, усиленного метаболизма в ткани и повышенных нагрузок сустава. В ответ на частичные изменения давления кислорода (pO_2), механический стресс, иммуномодулирующие и воспалительные медиаторы хондроциты способны к продукции активированных кислородных метаболитов (Henrotin Y.E. et al., 2003), которые при низких концентрациях действуют в роли вторичных мессенджеров, регулируя множество процессов, включая экспрессию генов цитокинов, MMP, молекул адгезии и компонентов матрикса (Aigner T., Schmitz N., 2011).

Среди важнейших АКМ, продуцируемых хондроцитами, можно назвать оксид азота NO^* и супероксид-анион радикал $O_2^{\bullet-}$, которые выступают источниками других радикалов (пероксинитрит $ONOO^-$ и пероксид водорода H_2O_2). Хондроциты экспрессируют две изоформы NO-синтазы: эндотелиальную (eNOS, NOS3) и индуцибельную (iNOS, NOS2). Индуцибельная форма на генном уровне регулируется множеством ростовых факторов, цитокинов и эндотоксинов.

Супероксид-анион радикалы продуцируются ферментным комплексом NADPH-оксидазой, при этом хондроциты суставного хряща способны экспрессировать все необходимые компоненты данного комплекса (субъединицы $p22^{phox}$, $p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p91^{phox}$). В присутствии иона Fe^{2+} и H_2O_2 хондроциты выделяют гидроксил-радикалы OH^* , которые могут реагировать с нерастворимыми жирными кислотами мембранных липидов, инициируя реакции перекисного окисления (Henrotin Y.E. et al.,

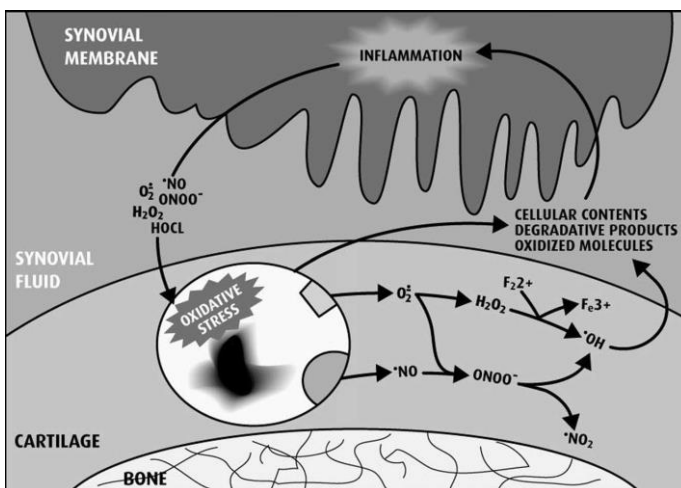


Рис. 2. Роль воспаления и АКМ в патогенезе артроза (по Henrotin Y.E. et al., 2003)

2003).

Продукты деградации ткани и окисленные молекулы, а также радикалы способствуют синовиальному воспалению и формируют своеобразный замкнутый круг, снабжаемый новыми АКМ и продуктами дальнейшей деградации (рис. 2).

Металлы переменной валентности способны усиливать токсичность АКМ (Hippeli S., Elstner E.F., 1999). Ионы Fe^{2+} , а также функционирование ферментов ксантиноксидазы и NADPH-оксидазы катализируют окислительную деполимеризацию гиалуроновой кислоты сустава, играющую роль смазочного материала, тем самым способствуя развитию артроза. В

процессе внутрисуставного воспаления может происходить неполная редокс-комплексация ионов Fe^{2+} кристаллами мочевой кислоты.

АКМ способны повреждать все компоненты экстраклеточного матрикса. Предполагают, что повреждение может быть связано с прямой атакой свободными радикалами молекул протеогликанов и коллагена. Гидроксил-радикалы OH^\bullet способны к разрушению коллагена и модификации его аминокислотного состава: происходит существенное уменьшение содержания 4-гидроксипролина и пролина; увеличение содержания аспартата и глутамата. Фибронектины и ламинины – семейства белков матрикса, которые участвуют в клеточной адгезии и стабилизации других компонентов матрикса. Прямое воздействие системы $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ или $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ вызывает денатурацию и фрагментацию коллагена и фибронектина, при этом происходят также агрегация и образование сшивок; рекомбинантная СОДЗ способна предотвращать эти эффекты в отношении коллагена (Rees M.D. et al., 2008). Фрагменты фибронектина обнаружены в синовиальной жидкости пациентов с артритом (Varilla M.L., Carsons S.E., 2000). Гиалуроновая кислота *in vitro* деполимеризуется ксантинооксидазной системой, что предотвращают ферменты СОД и каталаза. Менее эффективно эта система деполимеризует хондроитинсульфат, дерматансульфат и гепарин – возможно, сульфатирование придает устойчивость к окислению (Rees M.D. et al., 2008).

Установлено, что при артрозе и ревматоидном артрите наблюдается повышение продукции индуцибельной NO-синтазы и, соответственно, NO^\bullet . Высокие локальные концентрации NO^\bullet негативно влияют на функции хондроцитов, ингибируя синтез компонентов матрикса коллагена и протеогликанов, активируя металлопротеиназы, уменьшая экспрессию антагониста рецептора $\text{IL-1}\beta$, ингибируя пролиферацию и провоцируя апоптоз хондроцитов путем активации каспазы-3 и тирозинкиназ (Mazzetti I. et al., 2001; Abramson S.B., 2008; Aigner T., Schmitz N., 2011). Среди микроокружения именно рядом с местами образования активных форм азота наблюдаются явления посттрансляционных модификаций белков и накопление молекул с низкой молекулярной массой. В крови основной путь инактивации NO^\bullet – превращение в нитрат оксигемоглобином в эритроцитах; в то же время судьба NO^\bullet в других клетках и тканях гораздо хуже изучена (Feelisch M., 2008). Проявление цитопротекторных антиоксидантных и цитотоксических свойств NO^\bullet может зависеть от взаимодействия его метаболитов с интермедиатами окислительного и карбонильного стресса (Шумаев К.Б., 2010; Feelisch M., 2008). Не вызывает сомнений, что пероксинитрит ONOO^- играет важную роль в повреждении хрящевой ткани при артрозе; показана его способность нарушать трансмембранный потенциал митохондрий и приводить к высвобождению Ca^{2+}

из них, что активирует Ca^{2+} -зависимые белки кальпаины и способствует запуску каспазо-независимого апоптоза хондроцитов (Whiteman M. et al., 2004).

Вынужденные выживать в гипоксических и аваскулярных условиях, суставные хондроциты *in vitro* демонстрируют высокие уровни гликолиза. Однако *in situ* за счет окислительного фосфорилирования образуется до 25% от всей продуцируемой АТФ, и даже больше при повышенных расходах во время стресса. Нарушение баланса между генерацией АТФ и ее потреблением имеет множество последствий, не только на АТФ-зависимый синтез компонентов матрикса, но и на кальцификацию матрикса хряща кристаллами дигидропирофосфата кальция или гидроксиапатита (Karpouzas G., Terkeltaub R., 1999). Кристаллы обладают цитотоксическим эффектом по отношению к хондроцитам, усиливают синовиальное воспаление. Кальцификация матрикса может быть усилена влиянием NO^{\bullet} и пероксинитрита. АТФ служит главным источником пирофосфата, который подавляет образование кристаллов гидроксиапатита. Уровень экстраклеточного пирофосфата поддерживается хондроцитами относительно высоким по сравнению с другими тканями, он служит для предотвращения кальцификации (Terkeltaub R. et al., 2002). Как отмечают исследователи, митохондрии хондроцитов участвуют в транспорте кальция и поэтому играют ведущую роль в кальцификации экстраклеточного матрикса. Минерализация прослеживается в везикулах матрикса и внутри митохондрий (Blanco F.J. et al., 2004). Митохондрии могут опосредовать апоптотическую гибель клетки, запуская «внутренний» путь апоптоза вследствие митохондриальной дисфункции и высвобождения проапоптотических белков в цитозоль. Нарушение трансмембранной разности потенциалов провоцирует набухание митохондрий, нарушение целостности внешней мембраны, выход проапоптотических факторов (цитохром с, апоптоз-индуцирующий фактор АИФ, прокаспазы) из межмембранного пространства в цитоплазму (Скулачев В.П., 2001). Анализ электрон-транспортной цепи митохондрий хондроцитов больных артрозом показывает значительное снижение активности комплексов II и III по сравнению с нормой (Blanco F.J. et al., 2004), а ингибирование комплексов III или V индуцирует генерацию АКМ митохондриями и активацию NF- κ B в суставных хондроцитах и синовиоцитах *in vitro*, а также вызывает вялотекущий воспалительный процесс и деградацию матрикса через провоспалительные стимулы, в т.ч. простагландин E2, хемокины IL-8, MCP-1, MMP (Lopez-Armada M.J. et al., 2013). Ухудшение митохондриальной функции также увеличивает ответ на провоспалительные цитокины в нормальных хондроцитах и синовиоцитах, что вносит вклад в деструкцию сустава и развитие боли; данные феномены могут быть объяснены активацией инфламмосомы, которая приводит к гиперстимуляции провоспалительного ответа (Lopez-Armada M.J. et al., 2013).

После 40 лет распространенность артрозов в популяции увеличивается пропорционально увеличению возраста (Blanco F.J. et al., 2004). Чем больше возраст, тем больше происходит изменений с протеогликанами и коллагеном экстраклеточного матрикса и хуже становятся механические свойства суставного хряща. Стареющий хрящ характеризуется увеличением содержания кератансульфата, уменьшением хондроитинсульфата без значительных изменений общего содержания сульфатированных гликозаминогликанов, кроме того, нарушается способность хондроцитов синтезировать нормальные протеины матрикса. Свободнорадикальная теория старения предполагает, что хроническая продукция эндогенных АКМ и вследствие этого повреждение клеток опосредуют старение клеток. Хондроциты активно производят АКМ, включая NO^* , H_2O_2 , ONOO^- , которые способны вызывать апоптоз. Ухудшение митохондриальных функций ведет к преобладанию гликолиза и повреждению митохондрий вследствие окислительного стресса. Именно так естественные процессы старения могут способствовать развитию и прогрессии артроза (Blanco F.J. et al., 2004). Протеомные исследования митохондриальных белков показали, что с возрастом в хондроцитах человека происходит снижение содержания Mn-SOD (СОД2) и соотношения восстановленного глутатиона к окисленному (Lotz M., Loeser R.F., 2012). При артрозе ДНК хондроцитов характеризуется укороченной длиной теломер, а продолжительность жизни стареющих хондроцитов, взятых из хряща с признаками артроза, может быть увеличена экзогенным введением теломеразы (Martin J.A., Buckwalter J.A., 2002; Akagi M., 2010). Интересны данные об укорочении длины теломер в лейкоцитах у пациентов с диагнозом артроз суставов кистей рук (Zhai G. et al., 2006), хотя некоторые авторы не находят этой связи (Tamao M. et al., 2010).

Апоптоз – одна из причин гибели хондроцитов при артрозе, которая зачастую сопровождается деградацией и кальцификацией матрикса. Подсчитано, что при сравнении со здоровой хрящевой тканью, при артрозе интенсивность апоптоза хондроцитов увеличена в 4-5 раз (Shapiro I.M. et al., 2007). Поверхностная зона хряща, пораженного артрозом, содержит пустые лакуны, лизосомо-подобные структуры, везикулы матрикса, фрагментированные хондроциты, конденсированные ядра клеток – все эти черты можно назвать соответствующими апоптозу (Kuhn K. et al., 2004). В дополнение к апоптотическим клеткам хрящ также содержит некротические клетки. Гибель клеток коррелирует с возрастом и тяжестью заболевания. TUNEL-позитивные апоптотические клетки гораздо чаще обнаруживаются в поврежденных участках хряща, которые страдают от истощения матриксных протеогликанов. Кальцифицированные области, наблюдающиеся при артрозе, могут происходить из оставшихся апоптотических телец (Kuhn K. et al., 2004; Hashimoto S. et al., 1998). Среди биомаркеров дегенерации и

апоптогенов для хондроцитов обсуждаются: NO^{\bullet} , рецептор смерти Fas, связывающийся со своим лигандом FasL, потеря адгезии между компонентами матрикса и хондроцитами, механический стресс, а также $\text{TNF}\alpha$ и TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), H_2O_2 , неорганические ионы и ростовые факторы (Musumeci G. et al., 2015; Shapiro I.M. et al., 2007), а также стресс эндоплазматического ретикулума, связанный с различными сигнальными путями – с p38 MAPK, гиперактивирующим экспрессию провоспалительного медиатора MMP-13, с белком Chop (C/EBP homologous protein), напрямую вызывающего апоптоз хондроцитов (Hamamura K. et al., 2009; Uehara Y. et al., 2014). Так, донор NO^{\bullet} нитропруссид натрия вызывает апоптоз культивируемых хондроцитов путем ремоделирования цитоскелета, транслокации белка Bax, индукции белка p53 через сигнальные пути MAPK и NF- κ B, митохондриальной дисфункции и, как следствие, активации каспаз -9,-3,-6, что приводит к фрагментации ДНК (Musumeci G. et al., 2015).

1.3. Полиморфные варианты генов и предрасположенность к развитию артроза

Генетическая вариабельность, ограниченная одним видом, получила название *генетического полиморфизма*. Генетический полиморфизм может быть качественным, когда происходят замены нуклеотидов, либо количественным, когда в ДНК варьирует число нуклеотидных повторов различной протяженности. Тот и другой виды полиморфизма встречаются как в смысловых (белок-кодирующих), так и во внегенных последовательностях молекулы ДНК. Генетический полиморфизм можно определить как менделевский признак, встречающийся в популяции по крайней мере в 2 вариантах с частотой не менее 1% для каждого. Наследуемые полиморфные варианты генов играют решающую роль в определении уникального генетического профиля каждого человека, оценке его наследственной предрасположенности к различным частым мультифакториальным заболеваниям. На сегодняшний день выявлены полиморфные варианты, ассоциированные с такими заболеваниями, как бронхиальная астма, сердечно-сосудистые, онкологические заболевания, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, сахарный диабет, остеопороз, иммунные нарушения, ожирение, депрессия и др. (Баранов В.С., 2009).

Артроз, в том числе гонартроз, характеризуется наследственной предрасположенностью, и многие исследования показали роль различных кандидатных генов в развитии артроза коленного и тазобедренного суставов (Valdes A.M. et al., 2004).

Тем не менее, отдельные рассматриваемые генетические полиморфные варианты не являются мутациями, с большой вероятностью повышающими риск развития артроза. Известны работы, изучающие, могут ли несколько аллельных вариантов, ассоциированных с артрозом в отдельности, действительно способствовать риску возникновения данного заболевания. Такие исследования включают анализ относительно большого числа кандидатных генов, т.е. определенной их сети. В частности, наиболее продуктивный подход к анализу ассоциаций с заболеваниями – полногеномный поиск ассоциаций, GWAS (genome-wide association scanning). Этот метод требует репрезентативных выборок в сотни или тысячи индивидов и обязательного анализа генов чувствительности на других популяциях (Valdes A.M. et al., 2008). К другим методам изучения генетических основ комплексных полигенных заболеваний относятся полногеномные анализы сцепления, genome-wide linkage study, и анализ ассоциации кандидатных генов (Kerkhof H.J.M., 2012). Взаимодействие генетической предрасположенности и эпигенетических изменений может выступать как фактор риска развития артроза (Reynard L.N., Louhlin J., 2012).

Несмотря на то, что различные группы исследователей рассматривали более 80 потенциальных кандидатных генов, ассоциированных с развитием артроза, удалось выявить один повсеместный и надежный локус чувствительности к артрозу, а именно точечный полиморфизм *C/T* (rs143383), который локализуется в 3'-нетранслируемом регионе гена фактора роста и дифференциации 5 (*GDF5*) (Reynard L.N., Louhlin J., 2012). Фактор роста *GDF5* – это экстраклеточная сигнальная молекула, член семейства TGF- β . Она участвует в развитии, поддержании и восстановлении тканей суставов (Khan I.M. et al., 2007). Транзиция *C*→*T* (rs143383) впервые была отмечена в связи с артрозом в 2007 году, и с тех пор множество работ подтвердили, что данная ассоциация истинна (Reynard L.N., Louhlin J., 2012; Valdes A.M. et al., 2012). Так, рассматриваемый полиморфизм коррелирует со стадией развития артроза по шкале Келлгрена-Лоуренса, $p=0,0011$ (Valdes A.M. et al., 2012).

Генетики сейчас хорошо понимают, что небольшие выборки в полногеномных поисках ассоциаций резко уменьшают их возможности определить вклад индивидуальных локусов в развитие общей патологии (Reynard L.N., Louhlin J., 2012). На настоящий момент опубликованы несколько крупных исследований, посвященных чувствительности к артрозу, содержащих анализ достаточно большой группы образцов, более 1000 случаев каждое - Роттердамское исследование и британское исследование arcOGEN (**ar**thritis **r**esearch **c**ampaign **O**steoarthritis **G**enetics). Первое из них сосредоточилось на артрозе тазобедренного и коленного суставов, а также суставов кистей рук, в то время как второе

было посвящено артрозу только тазобедренного и коленного суставов. Роттердамское исследование включило в полногеномный поиск ассоциаций 1341 больного с артрозом и 3496 здоровых людей в качестве контроля. Поиск обнаружил с вероятностью ошибки $p=8.0 \times 10^{-8}$ аллели чувствительности к артрозу, локализованные на участке хромосомы 7q22 в составе блока неравновесного сцепления длиной более 500 кб; дополнительные исследования увеличили значимость данного результата (Kerkhof H.J.M. et al., 2010; Evangelou E. et al., 2011). Работа (Evangelou E. et al., 2011) содержит один из самых больших объемов изученных образцов по исследованию гонартроза, а именно почти 8000 случаев. Блок неравновесного сцепления на участке 7q22 включает 6 генов: протеинкиназа *PRKAR2B*, транскрипционный фактор *HPB1*, *COG5*, рецептор *GPR22*, *DUS4L* и *BCAP29* (Evangelou E. et al., 2011). Патологическая активность любого из генов региона 7q22 может привести к развитию гонартроза, поскольку в данном регионе наблюдается сильное неравновесное сцепление.

Интересно, что из перечисленных шести ключевых белков белок GPR22 был обнаружен в хряще и остеоцитах мышей с индуцированным артрозом, в то время как в нормальном хряще он отсутствовал (Kerkhof H.J.M. et al., 2010). Это натолкнуло авторов на предположение, что ген *GPR22* является главным геном во всей рассматриваемой группе, способствующим возникновению данной патологии. До сих пор не обнаружены лиганды, способные связываться с GPR22, поэтому рассматриваемый рецептор относится к группе «сиротских» (класс А). Этот ген является возможной терапевтической мишенью.

Первая стадия британского исследования arcOGEN включила в анализ 3177 больных с артрозом и 4894 здоровых людей в качестве контроля (Panoutsopoulou K. et al., 2011). Применение аналитического подхода для изучения аллельной архитектуры артроза показало, что артроз – это высоко-полигенное заболевание с множеством аллелей чувствительности, обладающих слабым эффектом в отдельности. Исследование выборки из 58917 независимых европейских образцов определило несколько генетических маркеров артроза коленного и/или тазобедренного суставов; один из них – полиморфная замена A/G внутри интрона 32 гена монооксигеназы *MICAL1* в хромосоме 22 (rs2277831) (Panoutsopoulou K. et al., 2011). Что касается ГА, то самый вероятный маркер чувствительности к заболеванию – замена A/G внутри гена *Sborf130* (rs11280). Данный ген кодирует уникальный «сиротский» белок, отдельно стоящий в филогенетическом древе, катализирующий реакции деацетилирования O-ацил-ADP-рибозы. В то же время, для артроза тазобедренного сустава, самым вероятным маркером чувствительности был полиморфный локус T/G внутри интрона 31 гена *COL11A1*, коллаген XI типа, $\alpha 1$ (rs2615977) (Panoutsopoulou K. et al., 2011). Полномасштабное GWAS-исследование

arcOGEN (2 стадии) включило в полногеномный поиск ассоциаций 7410 неродственных пациентов, из которых около 80% пациентов перенесли операцию по полной замене сустава вследствие тяжелого артроза, и 11009 здоровых лиц из Британии (Zeggini E. et al., 2012). В результате удалось обнаружить 5 локусов ($p \leq 5 \times 10^{-8}$) ассоциации с артрозом: наиболее значимым оказался регион хромосомы 3 с SNP rs6976 (миссенс-мутация гена нуклеостемина *GNL3*) и rs11177. Важно, что уровни нуклеостемина оказались повышенными в хондроцитах пациентов с артрозом относительно контроля. Одним из локусов с тенденцией к значимости оказался полиморфизм гена *FTO*, вовлеченного в регуляцию массы тела. Все аллели риска встречались достаточно часто и обладали слабыми эффектами в отдельности (Zeggini E. et al., 2012).

Lee Y.H. et al. провели мета-анализ полногеномных исследований сцепления при артрозе: согласно их данным, генетические регионы 7q34-7q36.3, 11p12-11q13.4, 6p21.1-6q15, 2q31.1-2q34 и 15q21.3-15q26.1 являются наиболее вероятными регионами, содержащими гены чувствительности к артрозу (Lee Y.H. et al., 2006). Было проведено несколько масштабных полногеномных анализов сцепления у семей пациентов с артрозом в Финляндии, Британии, Исландии и США (Peach C.A. et al., 2005). Сообщалось о нескольких обнаруженных полиморфных локусах, при этом в результатах всех перечисленных исследований фигурировала хромосома 2, содержащая данные локусы. Последующие анализы определили ассоциацию с артрозом несинонимичной замены в гене *MATN3* (2p24.1, ген кодирует структурный белок хряща матрилин-3) в исландской популяции; ассоциацию с артрозом двух несинонимичных замен в гене *FRZB* (2q32.1, ген кодирует секретлируемый frizzled-связанный белок 3) в британской популяции, и, наконец, ассоциацию с артрозом локусов генного кластера интерлейкина-1 внутри региона сцепления хромосомы 2 в финской популяции (Peach C.A. et al., 2005). Ген *FRZB* в составе локуса хромосомы 2q является очень вероятным кандидатным геном, широко обсуждалась его роль в развитии кости и сустава, а также в ингибировании Wnt-сигнального пути, метаболизме кости и возникновении артроза (Kerkhof H.J.M. et al., 2008). Тем не менее, Rodriguez-Lopez et al. не обнаружили статистически значимых различий в частотах аллелей гена *FRZB* (rs288326 и rs7775) между контрольной группой и группами пациентов с артрозом (перенесших полную замену сустава: тазобедренного, коленного суставов; суставов кистей рук) в испанской популяции (Rodriguez-Lopez J. et al., 2007).

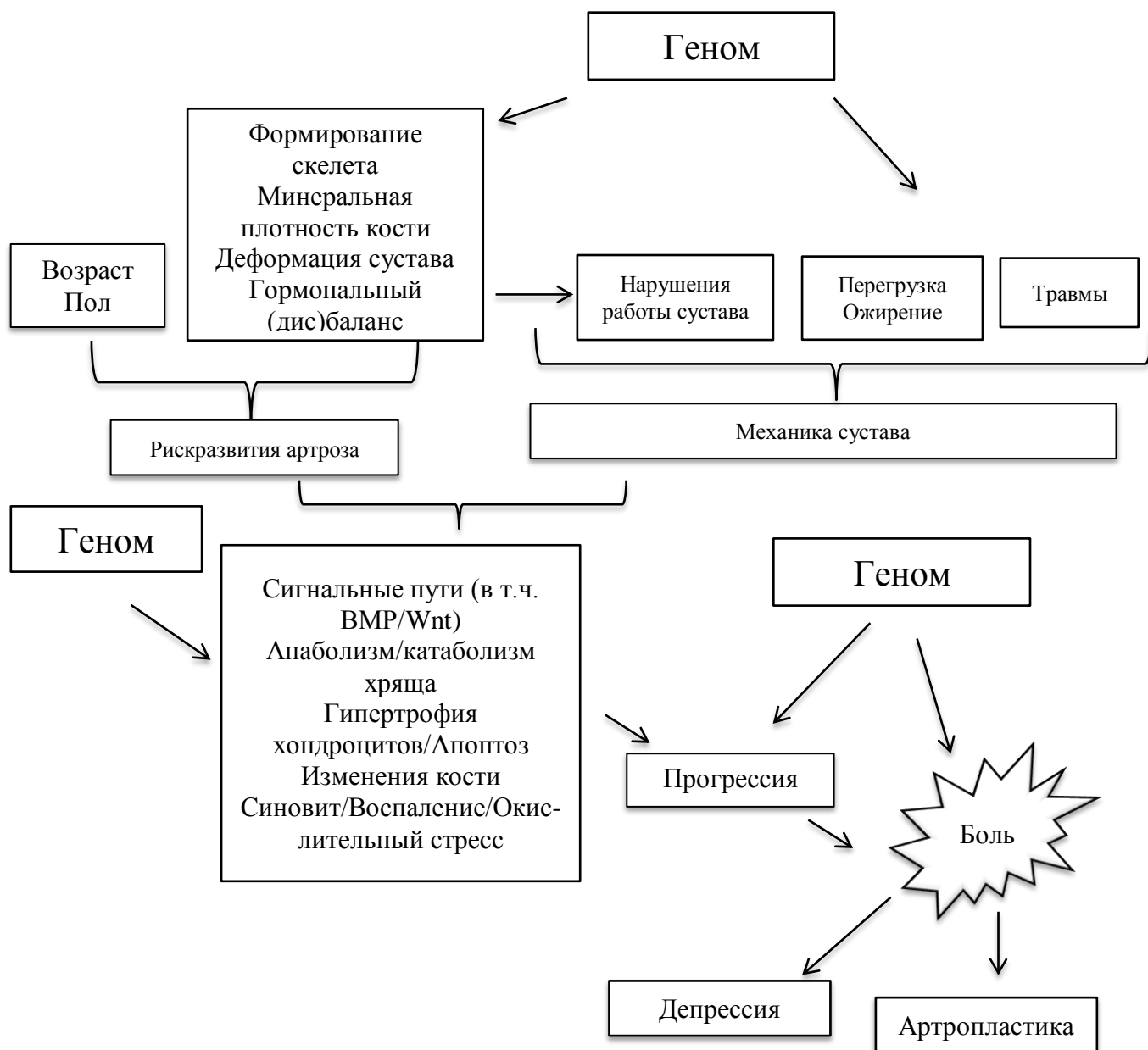


Рис. 3. Роль генетического полиморфизма в развитии артроза (Valdes A.M., Spector T.D., 2010, с изменениями)

Согласно Peach C.A. et al., другими хромосомами, содержащими сцепленные локусы, ассоциированные с артрозом и отмеченные несколькими исследованиями, являются хромосомы 16 и 6, например, локусы 16p12.3-p12.1 и 16q22.1-q23.1 (Peach C.A. et al., 2005). Так, группе Foster T. et al. удалось обнаружить, что полиморфные варианты гена рецептора интерлейкина 4 (*IL4R*), который расположен внутри региона сцепления на хромосоме 16p, ассоциированы с артрозом в белокожей популяции. Обе полиморфные замены - *C/T* (rs1805015; S478P) и *A/G* (rs1801275; Q551R) - приводят к замене аминокислот в функциональном внутриклеточном участке рецептора, тем самым влияя на связывание и фосфорилирование субстратов (Forster T. et al., 2004). Генетические

вариации могут увеличить риск развития артроза различными путями и на различных стадиях (рис. 3). Суставный хрящ – это биомеханическое целое, он совместно с субхондральной костью ослабляет силы, действующие на сустав, преимущественно толчковой нагрузки (Valdes A.M., Spector T.D., 2010). Полиморфные локусы генов молекул, вовлеченных в развитие и/или ремоделирование кости, также могут способствовать формированию предрасположенности к развитию артроза. Так, например, костные морфогенетические белки (BMP, bone morphogenetic proteins) и Wnt-сигнальные гены, контролирующие развитие кости в модельных системах на животных, действительно ассоциированы с риском развития артроза у животных и человека (Valdes A.M., Spector T.D., 2010).

Матриксные металлопротеиназы (MMP) – семейство цинк-зависимых эндопептидаз, которые способны к деградации всех белковых компонентов экстраклеточного матрикса. Два семейства класса металлопротеиназ: агреканы ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs) и матриксные металлопротеиназы - являются главными медиаторами деструкции хряща при артропатологиях (Burrage P.S. et al., 2006).

Матриксные металлопротеиназы влияют на клеточную пролиферацию, дифференциацию, миграцию и гибель, ангиогенез, а также на межклеточные взаимодействия. После открытия первой металлопротеиназы (MMP-1) их семейство значительно расширилось: на настоящий момент известно более 20 металлопротеиназ. Различные воспалительные процессы почти всегда характеризуются нарушенными, обычно увеличенными активностями матриксных металлопротеиназ (Parks W.C. et al., 2004). Многие металлопротеиназы (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13) в норме экспрессируются на низком уровне в суставной ткани, в то время как эта экспрессия значительно увеличивается при артрите. При развитии артроза провоспалительные цитокины (TNF- α и IL-1 β), связываясь с соответствующими рецепторами хондроцитов, активируют сигнальные пути с привлечением транскрипционных факторов NF- κ B и AP-1, приводя к гиперактивации экспрессии матриксных металлопротеиназ (Parks W.C. et al., 2004).

Неравномерный характер распределения матриксных металлопротеиназ может отражать тот факт, что MMP-1 и -8 преимущественно продуцируются клетками синовиальной оболочки и нейтрофилами, соответственно, в то время как экспрессия MMP-13 преобладает в хондроцитах (Burrage P.S. et al., 2006). Ингибиторы MMP используются как средства терапии для остановки деструкции ткани при таких воспалительных патологиях, как артрит.

Промоторы генов матриксных металлопротеиназ на настоящий момент хорошо охарактеризованы, и критичным регулятором экспрессии генов MMP является связывающий сайт для транскрипционного фактора AP-1 (activator protein 1) в позиции -73 (Burrage P.S. et al., 2006). Промоторы MMP-1, -3, -9, -13 содержат такой AP-1-сайт. Экспрессия MMP-1, MMP-3, MMP-9 и MMP-13 индуцируется IL-1 β и TNF α через сигнал-передающие пути, такие как митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК). Кроме того, промоторы генов MMP-1, -3, -9 включают канонические связывающие сайты для транскрипционного фактора NF- κ B, и активация NF- κ B необходима для индукции транскрипции этих генов (Burrage P.S. et al., 2006). Другой регулятор экспрессии MMP – это трансформирующий ростовой фактор β (TGF β). Сигналы TGF β активируют белки-медиаторы SMAD, кофакторы, которые транслоцируются в ядро и регулируют экспрессию генов. Эти белки контролируют экспрессию MMP, напрямую связываясь с промоторами, или через взаимодействие с другими транскрипционными факторами. Промоторы MMP-1 и MMP-3 содержат TGF β -ингибиторный элемент (TIE), ответственный за репрессию с помощью TGF β , а взаимодействия между белками Smad и AP-1 регулируют экспрессию MMP-13. Таким образом, важнейшую роль в регуляции генной экспрессии MMP играют транскрипционные факторы AP-1, Ets, NF- κ B и белки Smad (Burrage P.S. et al., 2006). Исследования подтвердили, что полиморфный локус A/G, локализующийся в интроне 1 гена *SMAD3* (rs12901499), является маркером предрасположенности к артрозу коленного и бедренного сустава, причем данная мутация сопровождалась более высокой экспрессией MMP-2, -9 (Valdes A.M., Spector T.D. et al., 2010).

MMP-3 (стромелизин-1) имеет широкую субстратную специфичность в отношении ламинина, фибронектина и нефибриллярных коллагенов. MMP-3 участвует не только в деградации широкого ряда экстраклеточных матриксных белков, но и, что очень важно, в активации других членов семейства MMP, а именно, MMP-1, -8, -13 (Riancho J.A. et al., 2010; Borghaei R.C. et al., 2009). Роль MMP-3 в деструкции ткани, связанная с воспалением, хорошо известна. Исследования показали, что концентрация белка MMP-3 в ткани тесно связана с полиморфным локусом *-1612(5A/6A)* в промоторе гена MMP-3 (rs3025058): генотип *5A/5A* способствует наибольшей экспрессии данного белка по сравнению с генотипами *5A/6A* и *6A/6A* (Borghaei R.C. et al., 2009). Согласно результатам исследований, полиморфизм *-1612(5A/6A)* не связан с частотой заболеваний височно-нижнечелюстного сустава в турецкой популяции (Taskin N. et al., 2011; Planello A.C. et al., 2011).

MMP-13, или коллагеназа 3, - это фермент, который преимущественно экспрессируется суставными хондроцитами и расщепляет в первую очередь коллаген II типа. MMP-13 играет ключевую роль в деградации хряща, поскольку очень многие катаболические пути повышают активность MMP-13 в хряще. Существует тонкая субстратная специфичность ферментов класса металлопротеиназ: так, MMP-13 имеет в 5-10 раз большую активность в отношении коллагена II типа, чем MMP-1 (Burrage P.S., 2006). Продукция коллагеназ (в том числе MMP-13, MMP-1) и простагландина E2 в результате функционирования циклооксигеназы-2 в хондроцитах усиливается под действием провоспалительных цитокинов (IL-1), что наблюдается при развитии артроза, и блокируется ингибиторами p38-протеинкиназы (Wada Y. et al., 2006). Интересно, что полиморфные варианты гена *COX-2* также связаны с повышенным риском возникновения артроза коленного и тазобедренного суставов: так, промотор гена *COX-2* имеет однонуклеотидный полиморфизм 765G/C (rs20417), при этом аллель *C* ассоциирован с низким, а *G* – с более высоким риском развития артроза (Schneider E.M. et al., 2011). Исследования привели к открытию двух полиморфных локусов в промоторе гена MMP-13. Первый локус – инсерция дополнительного аденинового остатка -291(11A/12A). Второй локус – транзиция -77G/A в регуляторном элементе промотора (rs17860523) (Ye S., 2000).

Регуляция активности MMP опосредуется специфическими тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (TIMP). В отличие от других эндогенных ингибиторов MMP, TIMP ингибируют MMP специфично и производятся теми же клетками, которые продуцируют MMP (Burrage P.S., 2006). На настоящий момент идентифицировано 4 главных семейства TIMP (TIMP-1, -2, -3, -4). Ингибируя MMP-мишень, TIMP нековалентно связывается с ней в стехиометрическом соотношении 1:1. Экспрессия TIMP-1 в клетках соединительных тканей регулируется цитокинами и факторами роста. Экспрессию TIMP-1 индуцируют такие факторы, как TGFβ, IL-6, -11 и другие.

Группа Lee H.J. et al. изучала роль полиморфных локусов генов *TIMP-2* и *TIMP-4* в развитии риска артроза в корейской популяции (Lee H.J. et al., 2008). TIMP-2 связывается с проMMP-2 через гемопексиновый домен последней и ингибирует ее активацию с помощью MT-MMP-1 (MMP мембранного типа). TIMP-4 – это член семейства генов TIMP, идентифицированный позже остальных, ингибирует основные матриксные металлопротеиназы, вовлеченные в развитие артрита, в частности, как и TIMP-2, связывает MMP-2. Удалось показать роль полиморфного локуса *C/T* в 3'-нетранслируемом регионе (rs17035945) гена *TIMP-4*, но не локуса *A/G* (rs2277698) гена *TIMP-2* в развитии артроза в корейской популяции (Lee H.J. et al., 2008). Механизм влияния замены *C/T* гена

TIMP-4 основывается на том, что он изменяет правильный фолдинг мРНК: при экспрессии гена с *C*-аллелем образуются новые структуры РНК типа стебель-петля, которые могут являться сайтами взаимодействия с РНК-связывающими белками. Кроме того, в результате полногеномного поиска ассоциаций был найден полиморфный локус *G/A* в интроне гена *TIMP-2* (rs4789934), который являлся маркером предрасположенности к артрозу в корейской популяции, причем аллель *G* способствовал повышенному риску возникновения патологии (Keam B. et al., 2011).

Синовиальное воспаление как один из важнейших факторов патогенеза артроза опосредуется цитокинами; существуют убедительные свидетельства того, что хондроциты вносят свой вклад в продукцию цитокинов, приводя к деградации матрикса хряща; кроме того, установлено, что множество полиморфных локусов в генах, кодирующих цитокины, особенно кластер генов *IL-1*, *IL-6*, *IL-10*, ассоциированы с повышенным риском развития артроза (Valdes A.M., Spector T.D., 2010).

Хондроциты отвечают на воздействие интерлейкинов *IL-1 α* , *IL-1 β* уменьшением синтеза компонентов матрикса и увеличением синтеза матриксных металлопротеиназ. Антагонист рецептора *IL-1* может препятствовать эффектам *IL-1 α* и *IL-1 β* . Многие исследования пытаются оценить роль полиморфных маркеров гена *IL-1* в развитии артроза коленного или бедренного суставов, но результаты зачастую противоречивы (Smith A.J.P. et al., 2004; Moxley G. et al., 2009; Kerkhof H.J.M. et al., 2011).

Сообщалось о связи точечного полиморфизма в положении *-174G/C* промотора гена *IL6* и риском развития артроза тазобедренного сустава: результаты регрессионного анализа показали, что генотип *CC* независимо ассоциирован со сниженным риском развития данной патологии; аллель *G*, вероятно, приводит к повышенному транскрипционному ответу на стимулы (Pola E. et al., 2005). В то же время, мета-анализ Valdes A.M., Arden N.K. et al., включивший 2511 контрольных лиц, 1101 пациента с артрозом тазобедренного сустава, 1904 пациента с гонартрозом, не обнаружил значимой ассоциации SNP *-174G/C* (rs1800795) и *-597G/A* (rs1800797) гена *IL6*, равно как их гаплотипов, с предрасположенностью к артрозу тазобедренного/коленного суставов (Valdes A.M., Arden N.K. et al., 2010). Комбинация генотипов *CC* (*TGF- β 1*, локус *29T>C* в сигнальной последовательности) и *CC* (*IL-6*, локус *-572T>C*) была особенно «сильно» ассоциирована с тяжестью артроза тазобедренного сустава (Kolundzic R. et al., 2011).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Клинические наблюдения и клинические группы

Критериями включения в группу для анализа являлись следующие характеристики: боль в коленном суставе, затрудненная ходьба, ограничение движений в суставе, подтвержденный диагноз – гонартроз (ГА) I-IV стадий по шкале Kellgren/Lawrence, K/L (рентгенограммы, полная история болезни и анкеты). Критериями исключения были: дисплазия скелета, коллагенозы, алкогольная/наркотическая зависимость, почечная/печеночная недостаточность. Общее количество пациентов составило 160 человек, которые были разделены на две категории соответственно этиологии гонартроза: группа первичного ГА (89 пациентов), группа посттравматического ГА (71 пациент). Пациенты с первичным ГА были разделены на 3 группы, в зависимости от стадии по шкале Kellgren-Lawrence (I, II, III-IV). Пациенты с подтвержденным ПТГА были разделены на три группы соответственно стадии ГА (I, II, III). В группу для генотипирования SNP-локусов были включены 117 пациентов с посттравматическим гонартрозом. В контрольную группу было включено 94 человека без признаков ГА в анамнезе, что было подтверждено рентгенологическим методом. Все обследованные пациенты имели русскую национальности проживали на территории Ростовской области.

Характеристики пациентов, включенных в группы наблюдения, представлены в табл. 2.

Таблица 2.

Основные характеристики пациентов, включенных в клинические группы

Клинические группы		Количество, N	Возраст, лет, M±m	Пол (мужчины/женщины)	BMI, кг/м ² , M±m
1.Первичный (идиопатический) ГА	I K/L	17	37,47±4,81	9/8	23,47±1,72
	II K/L	30	41,40±3,21	16/14	23,51±0,70
	III-IV K/L	42	62,98±1,25	4/38	25,67±0,33
2.Вторичный (посттравматический) ГА	I K/L	9	22,78±2,70	7/2	22,03±1,14
	II K/L	40	38,35±2,31	24/16	24,05±0,57
	III K/L	22	54,36±1,60	7/15	27,38±0,94
3.Группа для генотипирования («случай»)		117	46,33±1,44	46/71	26,7±0,83
4.Контроль		94	44,01±1,55	39/55	25,41±0,58

Примечание. К/L, Kellgren/Lawrence – рентгенологическая классификация стадий гонартроза

2.2. Получение биологического материала

Отбор крови (9 мл) проводили утром натощак путем пункции локтевой вены в пробирки с K_2 -ЭДТА в качестве антикоагулянта. Для оценки уровня апоптоза лимфоцитов периферической крови 4 мл цельной крови без антикоагулянта помещали в вакуумную систему забора крови фирмы Vecton Dickinson (США) и использовали для анализа методом проточной цитофлуориметрии. Синовиальную жидкость (СЖ) собирали в пробирки с гепарином в качестве стабилизатора в стерильных условиях путем артроцентеза коленного сустава.

Определение биохимических и иммунологических показателей проводили в плазме, моноклеарной и эритроцитарной фракциях крови, а также синовиальной жидкости (табл. 3). ДНК для анализа структуры полиморфизмов генов выделяли из лейкоцитов периферической крови.

Таблица 3.

Биохимические и иммунологические показатели, определенные у пациентов с ГА и здоровых лиц

Показатели \ Биоматериал	Плазма крови	Моноклеарная фракция крови	Эритроциты крови	СЖ
Малоновый диальдегид	+		+	+
Супероксиддисмутаза/СУА	+	+	+	+
Каталаза/ $V_{H_2O_2}$	+	+	+	+
Глутатионпероксидаза	+	+	+	+
Глутатион-S-трансфераза		+	+	+
Глутатионредуктаза		+	+	+
Восстановленный глутатион			+	+
Ксантиноксидоредуктаза	+	+		+
Ксантиноксидаза	+			
Мочевая кислота	+			+
Уровень апоптоза		+	(лимфоциты)	
Содержание интерлейкина-1 β	+			+
Содержание фактора некроза опухоли TNF α	+			+

Цельную кровь центрифугировали при 3000 об/мин 10 минут. Плазму крови отделяли от осадка эритроцитов и хранили при температуре + 4⁰ С. Синовиальную

жидкость также центрифугировали для осаждения клеточных элементов 10 минут при 3000 об/мин, для анализа использовали супернатант.

Выделение мононуклеарной фракции осуществляли из цельной крови в градиенте плотности фиколл-верографина, $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$ (Boyum A., 1968). Градиент фиколл-верографина состоял из 36% раствора верографина и 9% раствора фиколла, смешанных в соотношении 7:16. Цельную кровь наслаивали на градиент в центрифужных пробирках в соотношении 1:1, затем центрифугировали при 1500 об/мин в течение 40 мин. После центрифугирования полученное кольцо мононуклеарной фракции (лимфоциты, моноциты) собирали с помощью стеклянного шприца. Затем полученную фракцию дважды отмывали 2 мл изотонического раствора NaCl, забуференного трис-HCl буфером pH 7,4. Полученный после процедур отмывки осадок клеток ресуспендировали в 2 мл забуференного 0,01M трис-HCl буфером pH 7,4 раствора 0,15M NaCl. Для получения лизата клеток мембраны разрушали 1% раствором детергента Тритон X-100 в соотношении 10:1 (до конечной концентрации детергента в пробе 0,1%) при $+4^{\circ} \text{C}$ в течение 20 минут. Плазму крови и синовиальную жидкость для иммуноферментного анализа отбирали в 0,6 мл эппендорфы и хранили при температуре -30°C .

Пробы для генетического анализа готовили следующим образом: 1,5 мл эппендорфы с 800 мкл цельной крови центрифугировали 5 минут при 3000 об/мин, затем плазму аккуратно удаляли, не задевая кольцо лейкоцитов и осадка эритроцитов. Далее такие пробы хранили при температуре -30°C и использовали для выделения ДНК.

2.3. Биохимические методы исследования

2.3.1 Определение содержания продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой

Содержание ТБК-активных продуктов ПОЛ определяли спектрофотометрически (Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г., 1977). Метод определения основан на том, что при нагревании в кислой среде продукты ПОЛ - эндоперекиси - разлагаются с образованием МДА, молекула которого взаимодействует с двумя молекулами 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК) с образованием окрашенного розового триметинового комплекса, имеющего характерный спектр поглощения с максимумом при $\lambda = 535 \text{ нм}$. Метод не является высокоспецифичным, поскольку цветную реакцию с 2-ТБК дает не только МДА, но и другие карбонильные соединения. Поэтому реакция с 2-ТБК отражает уровень ТБК-активных продуктов в целом, который в определенной мере характеризует интенсивность протекания процессов ПОЛ.

Для анализа к 0,2 мл плазмы крови или синовиальной жидкости, 1 мл 1%

гемолизата добавляли 1 мл 30 % раствора ТХУ и 1 мл 0,75% раствора 2-ТБК в 0,1 н NaOH. Пробы помещали в кипящую водяную баню на 20 мин. После инкубации пробирки охлаждали и центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Супернатант отделяли от осадка и измеряли его оптическую плотность при длине волны 535 нм на спектрофотометре DU-800 фирмы Beckman Coulter (США).

Содержание ТБК-активных продуктов выражали в нМ/мг белка/Нв в СЖ, эритроцитах, нМ/мл плазмы крови вычисляли по формуле:

$$C(\text{МДА}) = \frac{D * V_{\text{пр}} * 10^9}{\varepsilon * l * V_{\text{sub}} * C(\text{белка}, \text{Hb})}$$

где

D – экстинкция опытной пробы;

ε – молярный коэффициент экстинкции, $1,56 * 10^5 \text{ M}^{-1} / \text{л}^{-1} * \text{см}^{-1}$;

l – длина оптического пути, см;

$V_{\text{пр}}$ – объем пробы, л;

V_{sub} – объем вносимого биоматериала, мл;

$C(\text{белка}, \text{Hb})$ – концентрация белка/гемоглобина (г/л).

2.3.2 Определение активности супероксиддисмутазы/супероксидустраняющей активности

Для определения активности СОД/СУА применяли спектрофотометрический метод ингибирования супероксиддисмутазой аутоокисления адреналина в адренохром в условиях генерации супероксидного анион-радикала в щелочных условиях (Сирота Т.В., 1999).

Аутоокисление адреналина в адренохром в щелочной среде инициируется супероксидными радикалами и сопровождается восстановлением нитротетразолиевого синего (НТС) до бисформазана, окрашивающего реакцию смесь в темно-фиолетовый цвет. Супероксиддисмутаза, перехватывая супероксидные радикалы, ингибирует образование адренохрома и, как следствие, восстановление НТС.

К 3,5 мл 50мМ Na-карбонатного буфера рН 10,2 добавляли по 100 мкл лизата мононуклеарных клеток, плазмы крови или СЖ или 200 мкл гемолизата (1%), 0,15 мл раствора НТС, приготовленного ex tempore из расчета 1 мг НТС на 2 мл дистиллированной воды. Реакцию запускали добавлением 20 мкл 0,1% раствора адреналина, тщательно перемешивали каждую пробу и инкубировали на водяной бане при $+ 37^{\circ}\text{C}$ в течение 5 минут. В контрольные пробы вместо биосубстрата вносили соответствующее количество 50 мМ Na-карбонатного буфера рН 10,2. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 3% раствора

НСІ. По окончании времени инкубации оптическую плотность измеряли при длине волны 540 нм с использованием спектрофотометра DU-800 фирмы Beckman Coulter (США).

За условную единицу активности фермента принимали 50% ингибирование скорости восстановления НТС. Активность СОД/СУА выражали в усл.ед./мин*мг белка/Нв и вычисляли по формуле:

$$A = \frac{T\%}{50\% * V_{sub} * t * C(\text{белка, Нв})}$$

$$T\% = \frac{E_k - E_o}{E_k} * 100\%$$

T % – процент ингибирования реакции восстановления НТС;

E_k – оптическая плотность контрольной пробы;

E_o – оптическая плотность опытной пробы;

V_{sub} – объем вносимого биоматериала, мл;

t – время инкубации, мин;

$C(\text{белка, Нв})$ - концентрация белка или гемоглобина (г/л).

2.3.3 Определение активности каталазы/скорости утилизации гидропероксида

Активность каталазы определяли по расходу субстрата (H_2O_2), способного образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс желтого цвета (Королук М.А. и др., 1988).

К 2 мл 0,03% перекиси водорода приливали 50 мкл плазмы крови, 100 мкл лизата мононуклеарных клеток или синовиальной жидкости, 20 мкл гемолизата (1%), тщательно перемешивали и инкубировали на водяной бане 7 минут при 37°C. Параллельно для каждой опытной пробы делали контрольную, куда сразу же вносили 2 мл 0,03% перекиси водорода, 1 мл 4% молибдата аммония и соответствующий объем биологического материала. Реакцию в опытных пробах останавливали добавлением 1 мл 4% молибдата аммония. Интенсивность окраски контрольных и опытных проб измеряли при длине волны 410 нм на спектрофотометре DU-800 фирмы Beckman Coulter (США). Об активности каталазы судили по степени уменьшения оптической плотности в опытных пробах по сравнению с контрольными. Активность каталазы в лизате мононуклеарных клетки эритроцитах, а также скорость утилизации гидропероксида в синовиальной жидкости выражали в нМ H_2O_2 /мин*мг белка/Нв. Скорость утилизации гидропероксида в плазме крови выражали в нМ/мл.

Удельную активность фермента рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\Delta D * 10^3}{\varepsilon * t * l * V_{sub} * C(\text{белка, Hb})}$$

ΔD – разница экстинкций контрольной и опытной пробы;

ε – молярный коэффициент экстинкции, $22\ 200\ \text{M}^{-1}/\text{л}^{-1} * \text{см}^{-1}$;

l – длина оптического пути, см;

t – время инкубации, мин;

V_{sub} – объем вносимого биоматериала, мл;

$C(\text{белка, Hb})$ – концентрация белка или гемоглобина (г/л).

2.3.4 Определение активности глутатионпероксидазы

Активность глутатионпероксидазы определяли по скорости окисления восстановленного глутатиона в присутствии гидроперекиси третичного бутила (Моин В.М., 1986). В основе развития цветной реакции лежит взаимодействие SH-групп с 5,5-дитиобис(2-нитробензойной) кислотой (ДТНБК, реактив Элмана) с образованием окрашенного продукта – тионитрофенильного аниона (ТНФА). Об активности ГПО судили по уровню израсходованного восстановленного глутатиона GSH.

В опытные пробирки помещали биоматериал (100 мкл лизата мононуклеарной фракции или 10% гемолизата, 100 мкл плазмы крови или СЖ). Затем в опытные и контрольные пробирки добавляли 0,83 мл приготовленного *ex tempore* 4,8 мМ раствора восстановленного глутатиона в 0,1 М трис-НСl буфере pH 8,5 с добавлением 6 мМ ЭДТА и 12 мМ NaN₃. Для запуска реакции во все пробирки добавляли 70 мкл 1,4 мМ гидроперекиси третбутила и инкубировали на водяной бане при 37°C в течение 5 минут. Для остановки реакции во все пробирки приливали 0,4 мл 10% ТХУ. Затем в контрольные пробирки приливали биоматериал. Пробирки центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин, затем 50 мкл супернатанта переносили в пробирки, содержащие 2,5 мл 0,1 М трис-НСl буфера pH 8,5 с 6 мМ ЭДТА и 12 мМ NaN₃ и добавляли 25 мкл 10 мМ реактива Элмана на метаноле. Инкубационную смесь интенсивно перемешивали и оставляли на 10 минут в темноте для развития окраски. Оптическую плотность опытных и контрольных проб измеряли при 412 нм с использованием прибора DU-800 фирмы Beckman Coulter (США).

Активность фермента выражали в МЕ/г белка/Hb и рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\Delta D * V1 * V2 * 10^6}{\varepsilon * V_{sub1} * V_{sub2} * l * t * C(\text{белка, Hb})}$$

ΔD – разница экстинкций контрольной и опытной пробы;

ε – молярный коэффициент экстинкции, $11\,400\text{ М}^{-1}/\text{л}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$;

l – длина оптического пути, см;

t – время инкубации, мин;

V_1 и V_2 – объемы проб до и после центрифугирования, мл;

V_{sub1} и V_{sub2} – объемы вносимых биоматериалов до и после центрифугирования, мл;

$C(\text{белка}, Hb)$ – концентрация белка/Нб (г/л).

2.3.5 Определение активности глутатион-S-трансферазы

Определение активности глутатион-S-трансферазы основано на оценке скорости реакции ферментативного образования GS-2,4-динитробензола в реакции восстановленного глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом, ХДНБ (Habig et al., 1974).

В пробирки, содержащие 2,5 мл 0,2 М К-фосфатного буфера pH 6,5 добавляли 200 мкл лизата мононуклеарных клеток, 100 мкл СЖ или 2% гемолизата, 100 мкл 10 мМ раствора восстановленного глутатиона, приготовленного ex tempore на 0,2 М К-фосфатном буфере pH 6,5, и 100 мкл 15 мМ раствора ХДНБ на 96% этаноле. Пробы сразу же фотометрировали при длине волны 340 нм с использованием прибора DU 800 фирмы Beckman Coulter (США), ставили на водяную баню и инкубировали при 37°C в течение 5 минут. По истечении срока инкубации пробы повторно фотометрировали при указанных условиях. Для учета неферментативной конъюгации ХДНБ с глутатионом измеряли оптическую плотность контрольных проб, которые вместо биоматериала содержали равное количество 0,2М К-фосфатного буфера pH 6,5.

Конъюгирующую активность глутатион-S-трансферазы (GST) выражали в МЕ/г белка/гемоглобина и оценивали по формуле:

$$A = \frac{((D_{o2} - D_{o1}) - (D_{k2} - D_{k1})) * V_{пр} * 10^6}{\varepsilon * l * t * V_{sub} * C(\text{белка}, Hb)}$$

D_{o1} и D_{o2} – оптическая плотность опытной пробы до и после инкубации;

D_{k1} и D_{k2} – оптическая плотность контрольной пробы до и после инкубации;

ε – молярный коэффициент экстинкции, $9\,100\text{ М}^{-1}/\text{л}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$;

l – длина оптического пути, см;

t – время инкубации, мин;

$V_{пр}$ – суммарный объем пробы после остановки реакции, мл;

V_{sub} – объем вносимого биоматериала, мл;

$C(\text{белка}, Hb)$ – концентрация белка/Нб(г/л).

2.3.6 Определение активности глутатионредуктазы

Активность глутатионредуктазы измеряли по степени окисления NADPH (Юсупова Л.Б., 1989). Поскольку глутатионредуктаза (GR) катализирует реакцию восстановления окисленного глутатиона при участии NADPH в качестве донора электронов, оптическая плотность проб при длине волны 340 нм (λ поглощения NADPH), содержащих биоматериал с глутатионредуктазой, со временем снижается.

К 2,25 мл реакционной смеси, содержащей 2 объема 0,2 М Na,K-фосфатного буфера pH 7,4, 6 объемов 0,1 М KCl и 1 объем 8 мМ ЭДТА, приливали 100 мкл биоматериала (моноклеарные клетки, синовиальная жидкость, 2% гемолизат), 100 мкл 8 мМ раствора окисленного глутатиона, приготовленного ex tempore на дистиллированной воде, и 100 мкл 2 мМ раствора NADPH в 1% NaHCO₃. После тщательного центрифугирования инкубировали при 37°C 10 минут. По окончании срока инкубации измеряли оптическую плотность реакционной смеси при длине волны 340 нм на спектрофотометре DU 800, Beckman Coulter (США). Для учета аутоокисления NADPH измеряли оптическую плотность контрольных проб, в которые вместо 100 мкл окисленного глутатиона вносили равное количество реакционной смеси и фотометрировали при тех же условиях.

Активность глутатионредуктазы выражали в МЕ/г белка/Нб и рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\Delta D * V_{\text{пр}} * 10^6}{\varepsilon * V_{\text{sub}} * l * t * C(\text{белка}, \text{Hb})}$$

ΔD – разница экстинкций контрольной и опытной пробы;

ε – молярный коэффициент экстинкции, 6 220 М⁻¹/л⁻¹*см⁻¹;

l – длина оптического пути, см;

t – время инкубации, мин;

$V_{\text{пр}}$ – суммарный объем пробы, мл;

V_{sub} – объем вносимого биоматериала, мл;

$C(\text{белка}, \text{Hb})$ – концентрация белка/Нб (г/л).

2.3.7 Определение содержания восстановленного глутатиона

В основе метода лежит цветная реакция восстановленного глутатиона (GSH) с 5,5-дитиобис (2-нитробензойной) кислотой (ДТНБК, реагент Элмана) с образованием соединения, которое обладает максимумом поглощения при 412 нм (Ellman Q.L., 1959).

В пробирках к 1,5 мл синовиальной жидкости или 1 мл 1% гемолизата добавляли 0,3 мл 30% раствора ТХУ. Центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин. Затем 500 мкл супернатанта переносили в пробирки, содержащие 1,75 мл 0,3 М трис-НСl буфера рН 8,8, и добавляли 25 мкл 10 мМ реактива Элмана на метаноле, приготовленного *ex tempore*. Холостые пробы содержали 2,25 мл 0,3 М трис-НСl буфера рН 8,8 и 25 мкл 10 мМ реактива Элмана. Оставляли на 10 минут при комнатной температуре для развития окраски и фотометрировали при $\lambda=412$ нм с помощью спектрофотометра DU 800 Beckman Coulter (США).

Содержание глутатиона выражали в $\mu\text{M}/\text{г}$ белка/Нб и рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{\Delta D * V1 * V2 * 10^6}{\varepsilon * V_{sub1} * V_{sub2} * l * C(\text{белка, Нб})}$$

ΔD – разница экстинкций контрольной и опытной пробы;

ε – молярный коэффициент экстинкции, $11\,400 \text{ M}^{-1}/\text{л}^{-1} * \text{см}^{-1}$;

l – длина оптического пути, см;

$V1$ и $V2$ – объемы проб до и после центрифугирования, мл;

V_{sub1} и V_{sub2} – объемы вносимых биоматериалов до и после центрифугирования, мл;

$C(\text{белка, Нб})$ – концентрация белка/Нб (г/л).

2.3.8 Определение активности ксантиноксидоредуктазы

Активность фермента ксантиноксидоредуктазы (КОР) пропорциональна уровню образующейся в результате окисления ксантина мочевой кислоты, которая обладает максимумом поглощения при 293 нм (Avis P.G. et al, 1955, модиф.).

Для определения активности КОР в кювету с длиной оптического пути 1 см вносили: 0,05 мл 0,04 М раствора ксантина в 0,1 н растворе NaOH, 3 мл 0,05 М Na-фосфатного буфера рН 7,8, содержащего $5 \cdot 10^{-5}$ М ЭДТА. Для запуска реакции добавляли в исследуемый раствор биоматериал (100 мкл лизата мононуклеарных клеток, 200 мкл плазмы крови или СЖ), по этой смеси устанавливали контроль оптической плотности. Далее проводили инкубацию на водяной бане при 37°C (3 мин для мононуклеаров, 30 мин для плазмы и СЖ) и измеряли прирост оптической плотности при 293 нм на спектрофотометре DU 800 Beckman Coulter (США). Активность ксантиноксидоредуктазы (КОР) выражали в ME/г белка и вычисляли по формуле:

$$A = \frac{(E_0 - E_k) * V_{пр} * 10^6}{\varepsilon * V_{sub} * t * l * C(\text{белка})}$$

E_k – оптическая плотность контрольной пробы;

E_0 - оптическая плотность опытной пробы;

ε – молярный коэффициент экстинкции, $11\,000\text{ M}^{-1}/\text{л}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$;

l – длина оптического пути, см;

t – время инкубации, мин;

$V_{\text{пр}}$ – суммарный объем пробы, мл;

V_{sub} – объем вносимого биоматериала, мл;

$C(\text{белка})$ – концентрация белка в мононуклеарах, плазме крови и синовиальной жидкости, г/л

2.3.9 Определение активности ксантиноксидазы

Принцип метода определения активности ксантиноксидазы (КО) в плазме крови был основан на способности фермента при преобразовании ксантина в мочевую кислоту генерировать супероксид-анион радикал, о содержании которого можно судить по скорости восстановления нитросинего тетразолия (НТС) в окрашенный продукт – формазан, имеющий максимум светопоглощения при длине волны 540 нм (Арутюнян А.В. и др., 2000, модиф.).

Для определения активности КО в кювету с длиной оптического пути 1 см вносили: 0,05 мл 0,04 М раствора ксантина в 0,1 н растворе NaOH, 3 мл 0,05 М Na-фосфатного буфера pH 7,8, содержащего $5\cdot 10^{-5}$ М ЭДТА и 420 мкМ нитросинего тетразолия (готовили перед исследованием). Для запуска реакции добавляли в исследуемый раствор плазму крови (200 мкл), по этой смеси устанавливали контроль оптической плотности. Далее проводили инкубацию на водяной бане при 37°C (30 мин для плазмы) и измеряли прирост оптической плотности при 540 нм на спектрофотометре DU 800 Beckman Coulter (США). Активность ксантиноксидазы (КО) выражали в МЕ/г белка и вычисляли по формуле:

$$A = \frac{(E_0 - E_k) \cdot V_{\text{пр}} \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot V_{\text{sub}} \cdot t \cdot l \cdot C(\text{белка})}$$

E_k – оптическая плотность контрольной пробы;

E_0 - оптическая плотность опытной пробы;

ε – молярный коэффициент экстинкции, $7200\text{ M}^{-1}/\text{л}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$;

l – длина оптического пути, см;

t – время инкубации, мин;

$V_{\text{пр}}$ – суммарный объем пробы, мл;

V_{sub} – объем вносимого биоматериала, мл;

$C(\text{белка})$ – концентрация белка в плазме крови, г/л.

2.3.10 Определение содержания мочевой кислоты

Концентрацию мочевой кислоты ($\mu\text{M}/\text{л}$) в плазме крови и синовиальной жидкости определяли колориметрическим методом (коммерческий набор «Витал», Россия). Метод основан на восстановлении фенантролинового комплекса мочевой кислотой, интенсивность окраски комплекса пропорциональна концентрации мочевой кислоты в исследуемом материале. Для этого готовили опытные, калибровочную и холостую пробы следующим образом: в пробирки соответственно вносили по 25 мкл биоматериала, калибратора с известной концентрацией мочевой кислоты, дистиллированной воды, затем добавляли по 1 мл рабочего реагента. Пробы перемешивали, инкубировали при температуре 20-25°C точно 10 минут. Измеряли оптическую плотность опытных и калибровочной проб против холостой пробы при длине волны 500 нм.

Расчет вели по формуле:

$$C = \frac{E_{\text{пр}}}{E_{\text{к}}} * C(\text{к}), \mu\text{M}/\text{л}$$

$E_{\text{пр}}$ – оптическая плотность опытной пробы;

$E_{\text{к}}$ - оптическая плотность калибровочной пробы;

$C(\text{к})$ – концентрация мочевой кислоты в калибраторе, $\mu\text{M}/\text{л}$.

2.3.11 Определение общего белка

В основе метода Lowry в модификации Shacterle-Pollack (Shacterle G.R., Pollack R.L., 1973) лежит реакция с реагентом Фолина-Чокалтеу, активным компонентом которого является комплекс «молибдат-вольфрамат-фосфорная кислота». Возникающее окрашивание связано с одновременным протеканием биуретовой реакции на пептидные связи и восстановления реагента Фолина циклическими аминокислотами, входящими в состав белковых молекул. Интенсивность окраски реакционной смеси определяли на спектрофотометре DU-800 фирмы Beckman Coulter (США).

К 100 мкл суспензии мононуклеаров добавляли 0,9 мл 0,1 н NaOH. В каждую пробу добавляли 1 мл щелочного реагента (20% K_2CO_3 , 0,05% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,1% Na,K-виннокислого в 0,5 М NaOH), тщательно перемешивали и оставляли на 10 минут. Параллельно подготавливали контроль, в который вместо биоматериала вносили 100 мкл физиологического раствора. Затем в пробы добавляли по 2 мл рабочего раствора реагента Фолина, приготовленного *ex tempore* разведением реагента Фолина в 17 раз дистиллированной водой. Пробы тщательно перемешивали и ставили в темноту на 30 мин при комнатной температуре. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 750 нм. Калибровочную кривую строили по стандартному раствору сывороточного

альбумина. Концентрацию белка в суспензии моноклеаров выражали в мг/мл.

2.3.12 Иммуноферментный анализ

Для определения концентрации интерлейкина-1 β (IL-1 β) и фактора некроза опухоли- α (TNF α) в плазме крови и синовиальной жидкости пациентов с гонартрозом и здоровых лиц использовали коммерческие наборы для иммуноферментного анализа IL-1 β ИФА-БЕСТ и TNF α ИФА-БЕСТ производства ЗАО «Вектор-Бест», Россия, в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Результаты ИФА оценивали на спектрофотометре StatFax 2100, США, при длинах волн $\lambda_1=450$ нм и $\lambda_2=630$ нм.

Основные этапы иммуноферментного анализа были следующими:

1. Подготавливали компоненты набора, полностью размораживали исследуемые образцы, хранившиеся в эппендорфах при -30 °С.
2. Вносили во все лунки планшета по 100 мкл раствора для разведения образцов.
3. Вносили в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов, по 100 мкл калибровочных образцов 0; 5; 20; 40; 100; 250 пг/мл. В следующую пару лунок вносили по 100 мкл контрольного образца. В остальные лунки вносили по 100 мкл исследуемых образцов.
4. Стрипы заклеивали липкой пленкой и инкубировали 2 часа в шейкере при 37 °С с частотой 700 об/мин. За 10 мин до окончания инкубации готовили рабочий раствор конъюгата №1: к 0,6 мл концентрата конъюгата №1 добавляли 12 мл раствора 1.
5. Промывали лунки планшета 5 раз раствором 1 по 350 мкл в каждую лунку.
6. В лунки планшета вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата №1. Стрипы закрывали пленкой, инкубировали в шейкере 60 мин при температуре 37 °С, при 700 об/мин. За 10 мин до окончания инкубации готовили рабочий раствор конъюгата № 2: к 0,6 мл концентрата конъюгата № 2 добавляли 12 мл раствора для разведения конъюгата № 2.
7. Промывали лунки планшета 5 раз раствором 1 по 350 мкл в каждую лунку.
8. В лунки планшета вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата № 2. Стрипы закрывали пленкой, инкубировали в шейкере 30 мин при температуре 37 °С, при 700 об/мин. За 10 мин до окончания инкубации готовили рабочий раствор ТМБ (тетраметилбензидин): к 0,84 мл концентрата ТМБ добавляли 12 мл СБР (субстратный буферный раствор).
9. Промывали лунки планшета 5 раз раствором 1 по 350 мкл в каждую лунку.
10. В лунки планшета вносили по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина.

Планшет выдерживали в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре 18-25 °С.

11. В лунки планшета вносили по 100 мкл стоп-реагента.
12. Измеряли оптическую плотность с помощью спектрофотометра в двухволновом режиме: основной фильтр - 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм. Определяли концентрацию цитокина в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

2.4. Генетические методы исследования

2.4.1. Выделение геномной ДНК

Для выделения геномной ДНК из периферической крови использовали коммерческий набор реагентов «ДНК-Экспресс-кровь» (Литех, Москва) и эппендорфы с замороженными при -30°С форменными элементами крови (лейкоциты, эритроциты).

Основные этапы выделения ДНК:

1. Полностью размораживали содержимое пробирки при комнатной температуре.
2. Вносили в пробирку реактив «ДНК-экспресс-кровь». Его объем должен быть равен объему оставшихся в пробирке форменных элементов и плазмы (в опыте в пробирке находилось 500 мкл форменных элементов, соответственно прибавляли 500 мкл реагента «ДНК-экспресс-кровь»). Закрывали пробирку.
3. Содержимое пробирки в течение 10 секунд тщательно перемешивали на вортексе.
4. Устанавливали пробирку в предварительно прогретый до 99 °С термостат, выдерживали 15 минут, затем центрифугировали со скоростью 12 000 оборотов в минуту при комнатной температуре в течение 60 секунд.

Полученный супернатант использовали в качестве исследуемого образца ДНК.

2.4.2. Проведение полимеразной цепной реакции

Для выявления полиморфных аллелей генов про/антиоксидантных ферментов, цитокинов и матриксных металлопротеиназ использовали коммерческие диагностические наборы «SNP-экспресс» (Литех, Москва). Анализ основан на одновременном проведении двух реакций амплификации с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Одна пара праймеров комплементарна нормальному (т.е. более распространенному) аллелю, вторая

комплементарна полиморфному аллелю. Данный анализ позволяет выявлять как гетерозиготное носительство полиморфных аллелей, так и гомозиготное состояние.

Ход работы:

1. Готовили и пронумеровывали пробирки для проведения амплификации. Для каждой пробы необходимы две пробирки - N (норма) и P (патология).

2. Готовили рабочие смеси реагентов для амплификации из расчета на 1 пробу: 17 мкл разбавителя; 2,5 мкл реакционной смеси; 0,2 мкл Taq-полимеразы. Готовили две рабочие смеси: с реакционной смесью «норма» и с реакционной смесью «патология».

3. После добавления Taq-полимеразы, которое производили в последнюю очередь, тщательно перемешивали смесь пипетированием.

4. Добавляли по 20 мкл соответствующей рабочей амплификационной смеси во все соответствующие пробирки для амплификации.

5. Добавляли во все пробирки по 1 капле минерального масла.

6. Вносили по 5 мкл образца ДНК в пробирку с рабочей амплификационной смесью «норма» и в пробирку с рабочей амплификационной смесью «патология». В пробирке отрицательного контроля смешивали равное количество рабочей амплификационной смеси, минерального масла, а также 5 мкл разбавителя.

7. Пробирки закрывали и центрифугировали в течение 3 - 5 секунд при 3000 оборотах в минуту.

8. Переносили пробирки в амплификатор для проведения реакции амплификации. Использовали «горячий старт», то есть пробирки вносили в прогретый до 94 °С амплификатор.

Режим амплификации:

93 °С - 1 минута

1 цикл

93 °С - 10 секунд

64 °С - 10 секунд

72 °С - 20 секунд

35 циклов

72 °С - 1 минута

1 цикл

10°С – хранение (Storage).

2.4.3. Детекция продуктов амплификации

Разделение продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Ход работы:

1. Заливали в аппарат для электрофореза ТАЕ - буфер, приготовленный на дистиллированной воде разбавлением 50xТАЕ: в 50 раз (рН = 8,3).

2. Готовили 3% агарозный гель. Добавляли к 100 мл расплавленной агарозы 10 мкл 1% раствора бромистого этидия.

3. Охлаждали расплавленную агарозу до температуры 50 – 60 °С и помещали в планшет для заливки геля. Для получения карманов в агарозном геле устанавливали гребенку. Объем карманов должен быть не менее 20 - 25 мкл. После застывания агарозы переносили планшет с гелем в камеру для проведения электрофореза.

4. Наносили в карманы геля по 10 - 15 мкл амплификата.

5. Подключали камеру для электрофореза к источнику питания и задавали напряжение 10 - 15 В/см геля. Оптимальное время проведения электрофореза составляло 15-20 минут.

Анализ электрофореграмм осуществляли под ультрафиолетом (длина волны УФ света - 310 нм) на трансиллюминаторе BioRad, США (рис. 4).

Норма	Патология	Интерпретация
+ T	- C	+/- TT
+ T	- C	+/- TT
+ T	- C	+/- TT
- T	+ C	-/+ CC
+ T	+ C	+/+ TC

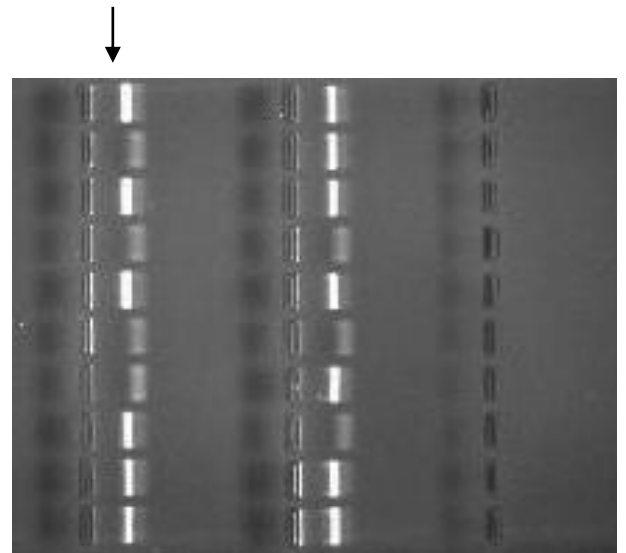


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК полиморфизма *T-31C* гена *IL1b*

Популяционный анализ *in silico* полиморфных локусов изучаемых генов проводили с использованием баз данных ALFRED, GenBank, OMIM, NCBI.

2.5. Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводили с помощью пакета STATISTICA 6.1. Для проверки гипотезы о соответствии распределения полученных вариантов нормальному распределению использовали критерий Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Для оценки различий между сравниваемыми группами в случае несоответствия типа распределения выборок нормальному использовали непараметрический U-тест Манна-Уитни для двух независимых выборок, тест Краскела-Уоллиса и медианный тест для сравнения нескольких независимых групп. Данные анализов представляли в виде медианы (25%-75% квартили); выбросы находили, используя построенные классические 2M диаграммы размаха с указанием выбросов. Различия между двумя выборками считали достоверными при $p < 0,05$. При $0,05 < p < 0,1$ рассматривали тенденцию к изменениям. При $p > 0,1$ различия считали недостоверными. Корреляционный анализ проводили с использованием непараметрического рангового коэффициента корреляции Спирмена. При коэффициенте корреляции $|R| \leq 0,25$ силу корреляционных отношений оценивали как слабую, при $0,25 < |R| < 0,75$ как умеренную, $|R| \geq 0,75$ как сильную при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Методы множественной регрессии использовали для анализа связи между несколькими независимыми переменными и зависимой переменной (категориальными или непрерывными). Использовали процедуры пошаговой регрессии «с включением», что позволяет нивелировать возможную корреляцию между независимыми переменными, которыми были: пол, возраст, индекс массы тела пациента, стадия гонартроза, биохимические/генетические факторы. Подчинение остатков нормальному распределению проверялось с помощью нормального вероятностного графика остатков. Если распределение остатков являлось ненормальным, использовали метод логарифмирования вариант для получения Гауссова распределения, аналогично подходу (Sugiyama S. et al., 2003).

Для сравнения частот аллелей и генотипов исследуемых полиморфных маркеров в группах с наличием и отсутствием заболевания использовался критерий χ^2 . Нулевой гипотезой считается предположение об отсутствии различий (т.е. происхождении двух исследуемых выборок из одной популяции) между группами, альтернативной – об их наличии. До использования мультипликативной общей модели наследования проверяли соответствие изучаемых выборок равновесию Харди-Вайнберга (HWE). Для оценки

относительного риска развития заболевания вычисляли значение OR (отношение шансов, odds ratio) с помощью программы он-лайн Калькулятор в исследованиях «случай-контроль» (http://gen-exp.ru/calculator_or.php). В программу вводили количества генотипированных доноров с наличием или отсутствием данного генотипа (NN, NP, PP) среди больных пациентов и здоровых лиц, соответственно. OR=1 рассматривали как отсутствие ассоциации; OR < 1 – как отрицательную ассоциацию аллеля или генотипа с заболеванием (“фактор устойчивости”); OR > 1 – как положительную ассоциацию (“фактор предрасположенности”). Рассчитывали также доверительные интервалы (CI, confidence interval), которые представляют собой интервалы значений, в пределах которых с вероятностью 95% находится ожидаемое рассматриваемого параметра; в данном случае, значение OR.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Активность антиоксидантных ферментов в крови и синовиальной жидкости пациентов с первичным и посттравматическим гонартрозом

Полученные результаты свидетельствуют о том, что содержание малонового диальдегида в плазме крови при первичном ГА не отличается от нормы (табл. 4). В плазме крови на I и II стадиях ПТГА наблюдается значимое увеличение содержания МДА/тенденция к возрастанию (соответственно, $p=0,012$, $p=0,078$). Концентрация МДА в эритроцитах на всех стадиях первичного ГА повышена относительно нормы: на I стадии – на 60% ($p=0,008$), II – на 21% ($p=0,026$), III – на 32% ($p=0,008$), (рис. 5).

Таблица 4

Содержание МДА в крови и СЖ пациентов с гонартрозом и здоровых лиц

Показатель	Значение показателя в плазме по группам, медиана (25%; 75% квантили)			
	Контроль	I	II	III
Первичный ГА				
МДА, плазма, нМ/мл	25,45 (18,37-29,32)	26,86 (23,43-30,71)	24,49 (18,74-30,58)	22,48 (19,85-24,93)
МДА, СЖ, нМ/мл	-	1,25 (0,87-1,60)	1,07 (0,77-2,25)	1,36 (1,19-1,82)
МДА, эритроциты, нМ/мг Нб $\Delta\%^K$	5,01 (4,55-6,28)	8,02 (7,24-9,26) +60*	6,04 (5,35-8,06) +21*	6,62 (5,71-7,42) +32*
ПТГА				
МДА, плазма, нМ/мл $\Delta\%^K$ $\Delta\%^1$	25,45 (18,37-29,32)	35,33 (32,21-37,98) +39*	27,63 (23,46-32,12) +9*	26,50 (19,51-33,81) -25*
МДА, СЖ, нМ/мл	-	1,55 (0,74-4,40)	1,29 (0,98-1,61)	1,08 (0,81-1,36)
МДА, эритроциты, нМ/мг Нб $\Delta\%^K$	5,01 (4,55-6,28)	7,19 (6,42-8,34) +44*	6,24 (5,24-7,74) +25*	5,89 (4,22-7,28) +18*

Примечание к Таблицам 4-13.

$\Delta\%^K$ – процент изменений относительно контрольной группы;

$\Delta\%^1$ – процент изменений относительно группы I;

$\Delta\%^2$ – процент изменений относительно группы II.

*- $P<0,05$; • - $0,05<p<0,1$.

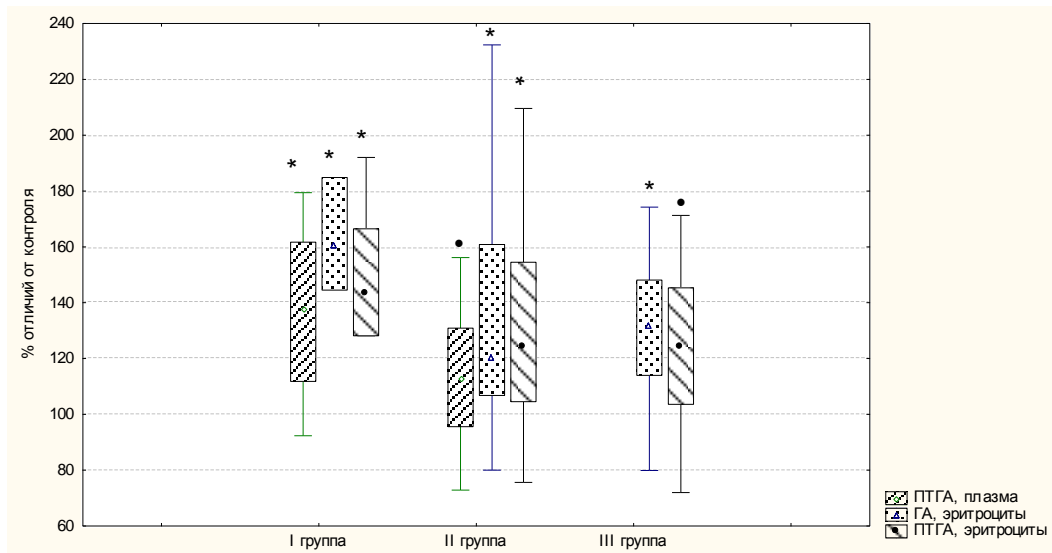


Рис. 5. Содержание МДА в плазме и эритроцитах при первичном и посттравматическом гонартрозе различных групп

Обозначения (здесь и далее): * - достоверные различия относительно контроля; • - тенденция к достоверности различий относительно контроля; ГА – первичный гонартроз; ПТГА – посттравматический гонартроз. Представлены только достоверные различия относительно контроля/группы ГА другой этиологии ($p < 0,05$) или тенденция к таким различиям ($p < 0,1$)

Исследование показало, что концентрация малонового диальдегида в эритроцитах при ПТГА I, II стадий увеличена на 44% ($p=0,026$) и 25% ($p=0,017$), соответственно, для III стадии отмечена тенденция к возрастанию ($p=0,081$). В СЖ значение этого показателя не отличается между различными стадиями, как при первичном, так и при посттравматическом ГА. Содержание МДА в СЖ и плазме при ПТГА положительно коррелируют ($R=0,443$, $p=0,008$). Сравнение показателей между группами первичного и посттравматического ГА показало, что на поздней III стадии концентрация МДА в СЖ на 26% больше при первичном ГА ($p=0,040$), (рис. 6). Таким образом, в крови больных ГА как идиопатической, так и посттравматической природы наблюдается активация процессов перекисного окисления липидов, которая на поздних стадиях более выражена у пациентов с первичным гонартрозом.

Малоновый диальдегид (МДА) – вторичный продукт перекисного окисления липидов (ПОЛ), способный вступать в реакции с аминокислотными соединениями (белки, пептиды, нуклеотиды, аминокислоты) с образованием аддуктов (ALE, advanced lipid peroxidation end products), что приводит к внутри- и межмолекулярным сшивкам и нарушениям функций белков и других аминокислотных соединений (Pamplona R., 2008). Малоновый диальдегид ковалентно присоединяется к аминокислотным молекулам, включая лизин, фосфатидилхолин, формируя поперечные сшивки, например, белок-фосфолипидные агрегаты. В частности, образующиеся аддукты способны к индукции адгезии моноцитов к эндотелиальным клеткам, что способствует развитию воспаления

(Davies S.S., Guo L., 2014). Такие продукты ПОЛ, как МДА и 4-гидроксиноненаль, обнаружены в хрящевой ткани при артрозе и способствуют процессам ее деградации (Shah R. et al., 2005).

Иммуноблотинг показывает, что продукты липопероксидации – МДА и 4-гидроксиноненаль – обнаруживаются в экстрактах клеточной культуры хондроциты-матрикс; при этом антиоксидант витамин Е снижает образование аддуктов типа альдегид-белок (Tiku M.L. et al., 2000). При сравнении содержания МДА в синовиальной жидкости внезапно погибших людей, не имевших суставной патологии, пациентов с идиопатическим деформирующим артрозом и посттравматическим артрозом обнаружено повышение концентрации МДА только у пациентов с ПТГА (Матвеева Е.Л. и др., 2013), в другой работе этих же авторов сообщалось о значимом снижении концентрации МДА в СЖ и при остеоартрозе, и при повреждениях мениска сустава, относительно показателя погибших здоровых лиц (Матвеева Е.Л. и др., 2014). Другие авторы сообщают о том, что содержание МДА в СЖ при гонартрозе выше контрольного показателя (люди без признаков гонартроза), но эта разница не была статистически достоверной (Ostalowska A. et al., 2006; Спиркина Е.С., Матвеева Е.Л., Гасанова А.Г., 2013). Показано, что при остеоартрозе наблюдаются изменения реологических свойств крови на фоне активации процессов перекисного окисления липидов, при этом концентрация МДА преимущественно увеличивалась в мембранах эритроцитов (Королева С.В. и др., 2005). Концентрация МДА в сыворотке крови собак с моделированным в эксперименте гонартрозом достоверно повышалась относительно контроля (Спиркина Е.С., Матвеева Е.Л., Степанов М.А., 2013). При введении антиоксиданта мексидола в сустав крыс с индуцированным посттравматическим артритом наблюдалась коррекция процессов липопероксидации и снижение концентрации МДА (Шутова М.И. и др., 2012). Известно, что продукты ПОЛ могут рассматриваться как первичные медиаторы стресса, концентрация которых резко увеличивается после травмы или оперативного вмешательства (Kreinhoff U. et al., 1990), что мы и наблюдали в крови пациентов с посттравматическим гонартрозом. Сообщалось об отрицательной корреляции между уровнем МДА и общей антиоксидантной способностью плазмы (Sarban S. et al., 2005).

Супероксидулирующая активность плазмы крови у пациентов II и III групп первичного ГА повышена относительно нормы – на 14% ($p=0,035$) и 29% ($p=0,016$), соответственно (рис. 7, табл. 5). Скорость утилизации гидропероксида в плазме крови у этих пациентов оказалась увеличенной по сравнению с контролем на всех стадиях ГА: в I группе – на 27% ($p=0,045$), во II – на 27% ($p=0,048$), в III – на 46% ($p=0,002$) (рис. 8). Отмечена тенденция к возрастанию значений этих показателей в плазме III группы: СУА -

относительно I группы пациентов ($p=0,057$), $V_{H_2O_2}$ - относительно II группы пациентов ($p=0,09$). Установлено, что СУА синовиальной жидкости II и III групп первичного ГА повышена относительно значения СУА СЖ I группы: в II группе – на 48% ($p=0,034$), в III группе – на 39% ($p=0,020$), (рис. 6). Скорость утилизации H_2O_2 не отличается между группами пациентов с первичным ГА, при этом $V_{H_2O_2}$ в СЖ положительно коррелирует с содержанием МДА в этом биологическом материале ($R=0,388$, $p=0,041$). СУА – это интегральный показатель для биологических жидкостей, характеризующий элиминацию супероксидного анион-радикала $O_2^{\bullet-}$ разными путями, в т.ч. с участием Э-СОД, церулоплазмينا, низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбат, мочева кислота, ураты и др.). Скорость утилизации перекиси водорода в плазме также является интегральным показателем, характеризующим расщепление гидропероксида различными компонентами плазмы – каталазой, глутатионпероксидазой (ГПО), пероксиредоксином, селен-содержащими белками, а также отражает использование перекиси водорода как субстрата миелопероксидазой и эозинпероксидазой (Меньщикова Е.Б. и др., 2006).

В мононуклеарных клетках II и III групп пациентов с первичным ГА происходит значительная активация СОД по сравнению с контролем – на 66% ($p<0,001$) и 93% ($p<0,001$), соответственно; активность СОД у пациентов III группы имеет тенденцию к возрастанию относительно I ($p=0,057$), (рис. 7). При этом активность каталазы в мононуклеарной фракции крови тоже увеличивается в равной степени - на 27% ($p=0,003$, $p=0,030$) - во II и III группах пациентов (рис. 8). В эритроцитах крови пациентов всех стадий первичного ГА происходит значительное увеличение активности СОД - на 177% ($p=0,013$), 128% ($p=0,004$) и 134% ($p=0,005$), соответственно, не сопровождающееся сопряженной активацией каталазы.

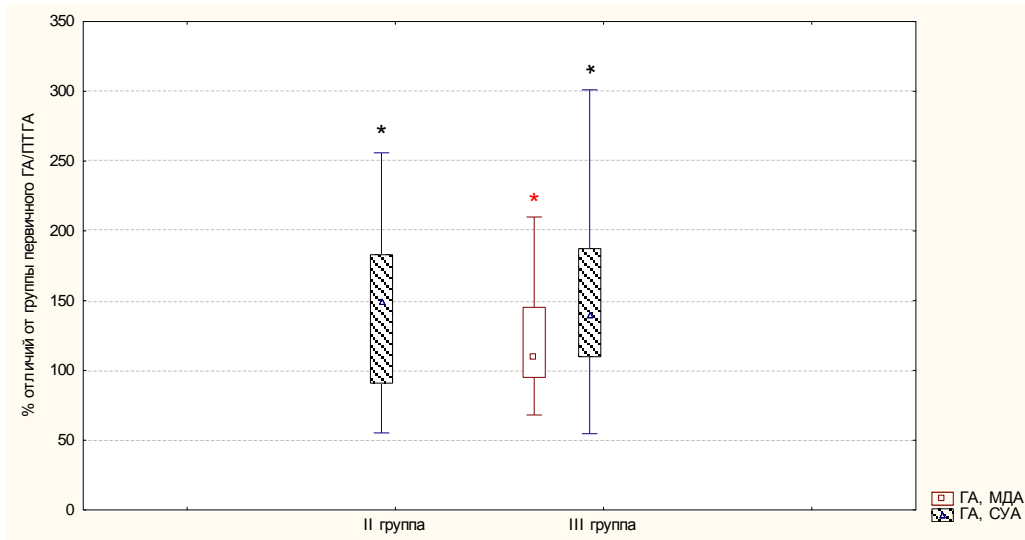


Рис. 6. Содержание МДА и СУА в синовиальной жидкости при первичном и посттравматическом гонартрозе различных групп

Обозначения (здесь и далее): * - достоверные различия относительно I группы первичного ГА/ПТГА; * - достоверные различия между группами первичного и посттравматического ГА. Представлены только достоверные различия относительно группы I/группы ГА другой этиологии ($p < 0,05$) или тенденция к таким различиям ($p < 0,1$)

СУА плазмы крови при посттравматическом гонартрозе различных стадий, как показало исследование, находится в пределах нормы (табл. 6). Скорость утилизации гидропероксида в плазме крови у этих больных превышает норму: на I стадии – на 43% ($p=0,039$), на II– на 40% ($p=0,025$), на III – на 52% ($p=0,003$), (рис. 8). В синовиальной жидкости супероксидустраниющая активность и скорость утилизации H_2O_2 у пациентов с различными стадиями ПТГА на одном уровне.

Активность СОД в мононуклеарных клетках на поздней III стадии ПТГА возрастает на 50% ($p=0,024$), на ранних I-II стадиях – остается в пределах контроля. При этом активность каталазы – не изменяется во всех группах пациентов. Активность СОД в эритроцитах крови на II и III стадиях ПТГА выше нормы, соответственно, на 101% ($p=0,018$) и 83% ($p=0,030$). Активность каталазы в эритроцитах, аналогично мононуклеарам крови, не показывает значимых различий с контролем.

Таблица 5

Активность супероксиддисмутазы/супероксидустраниющая активность и каталазы/скорость утилизации гидропероксида в крови и СЖ пациентов с первичным ГА

Показатель	Значение показателя в плазме по группам, медиана (25%; 75% квантили)			
	Контроль	1	2	3
$V_{H_2O_2}$, плазма, нМ/мл	23,78 (18,20-25,35)	30,09 (25,44-42,27)	30,24 (22,98-37,13)	34,79 (29,31-41,50)
$\Delta\%^k$		+27*	+27*	+46*
$\Delta\%^l$				

$\Delta\%^2$				+15*
$V_{H_2O_2}$, СЖ, нМ/мг белка	-	0,33 (0,11-0,74)	0,30 (0,15-0,87)	0,36 (0,21-0,64)
Каталаза, мононуклеары, нМ/мг $\Delta\%^k$	7,28 (6,68-8,26)	8,11 (3,64-13,21)	9,23 (7,94-11,91)	9,23 (7,09-11,0)
Каталаза, эритроциты, нМ/мг Нб	53,07 (41,65-58,39)	49,62 (43,90-60,48)	48,58 (44,78-68,00)	51,39 (44,09-56,02)
СУА, плазма, у.е./мин*мг $\Delta\%^k$ $\Delta\%^1$	1,50(1,42-1,59)	1,44 (1,20-1,66)	1,71 (1,51-2,10)	1,94 (1,51-2,28)
СУА, СЖ, у.е./мин*мг $\Delta\%^1$	-	2,75 (0,69-3,64)	4,08 (2,50-5,03)	3,83 (3,02-5,15)
СОД, мононуклеары, у.е./мин*мг $\Delta\%^k$ $\Delta\%^1$	1,49 (1,27-1,82)	1,81 (1,07-2,61)	2,48 (1,95-3,56)	2,88 (1,63-3,84)
СОД, эритроциты, у.е./мин*мгНб $\Delta\%^k$ $\Delta\%^1$	1,63 (1,41-2,29)	4,51 (4,20-4,65) +177*	3,72 (2,21-4,19) +128* -18*	3,82 (2,05-4,56) +134*

Таблица 6

Активность супероксиддисмутазы/супероксидустраниющая активность и каталазы/скорость утилизации гидропероксида в крови и СЖ пациентов с ПТГА

Показатель	Значение показателя в плазме по группам, медиана (25%; 75% квантили)			
	Контроль	1	2	3
$V_{H_2O_2}$, плазма, нМ/мл $\Delta\%^k$	23,78 (18,20-25,35)	34,09 (31,64-36,75) +43*	33,24 (24,14-47,12) +40*	36,13 (26,02-48,79) +52*
$V_{H_2O_2}$, СЖ, нМ/мл	-	0,50 (0,28-0,72)	0,37 (0,30-0,61)	0,62 (0,50-0,74)
Каталаза, мононуклеары, нМ/мг	7,28 (6,68-8,26)	8,05 (4,12-9,99)	8,05 (6,07-14,04)	7,44 (4,98-10,07)
Каталаза, эритроциты, нМ/мг Нб	53,07 (41,65-58,39)	63,44 (49,26-85,43)	53,66 (45,69-70,71)	49,58 (40,42-53,60)
СУА, плазма, у.е./мин*мг	1,50 (1,42-1,59)	1,99 (0,77-2,21)	1,57 (1,20-1,85)	1,59 (1,15-2,00)
СУА, СЖ, у.е./мин*мг	-	2,14 (0,66-3,63)	2,47 (2,09-3,59)	2,85 (2,29-3,37)
СОД, мононуклеары, у.е./мин*мг $\Delta\%^k$	1,49 (1,27-1,82)	1,53 (1,11-1,73)	1,80 (1,27-2,48)	2,23 (1,52-3,34) +50*
СОД, эритроциты, у.е./мин*мгНб $\Delta\%^k$	1,63 (1,41-2,29)	2,48 (1,76-2,90)	3,28 (1,85-4,25) +101*	2,99 (2,04-4,90) +83*

При сравнении активности СОД у пациентов с первичным гонартрозом и ПТГА с соответствующими стадиями заболевания оказалось, что значения многих показателей СУА/СОД выше или имеют тенденцию к возрастанию при первичном ГА. Так, это удалось показать для СУА плазмы на II и III стадиях (тенденция, $p=0,09$; $p=0,05$, соответственно); СУА СЖ на II и III стадиях (в 1,65 раза, $p=0,018$; тенденция, $p=0,068$, соответственно); активности СОД в мононуклеарах на II стадии (в 1,38 раза, $p=0,029$); активности СОД в эритроцитах на I стадии (в 1,82 раза, $p=0,047$). На III стадии скорость утилизации H_2O_2 в СЖ при посттравматическом ГА в 1,7 раза больше, чем при первичном ГА ($p=0,047$).

Таким образом, общей характеристикой для первичного и посттравматического ГА является мощная активация СОД в эритроцитах крови, не сопровождающаяся сопряженной активацией каталазы. Такая же картина наблюдалась в мононуклеарах крови на поздней III стадии посттравматического ГА. В результате замедляется утилизация гидропероксида, который может накапливаться в клетках крови, вызывая различные цитотоксические эффекты. Известно, что гидропероксид путем реакций Фентона и Габера-Вейса может вносить вклад в образование гидроксильного радикала, обладающего мощным цитотоксическим потенциалом (Меньщикова Е.Б. и др., 2006). С другой стороны, перекись водорода, являясь субстратом миело- и эозинпероксидаз, может способствовать образованию гипогалоидов, повреждающих молекулы путем окисления или галогенирования (Панасенко О.М., Сергиенко В.И., 2010).

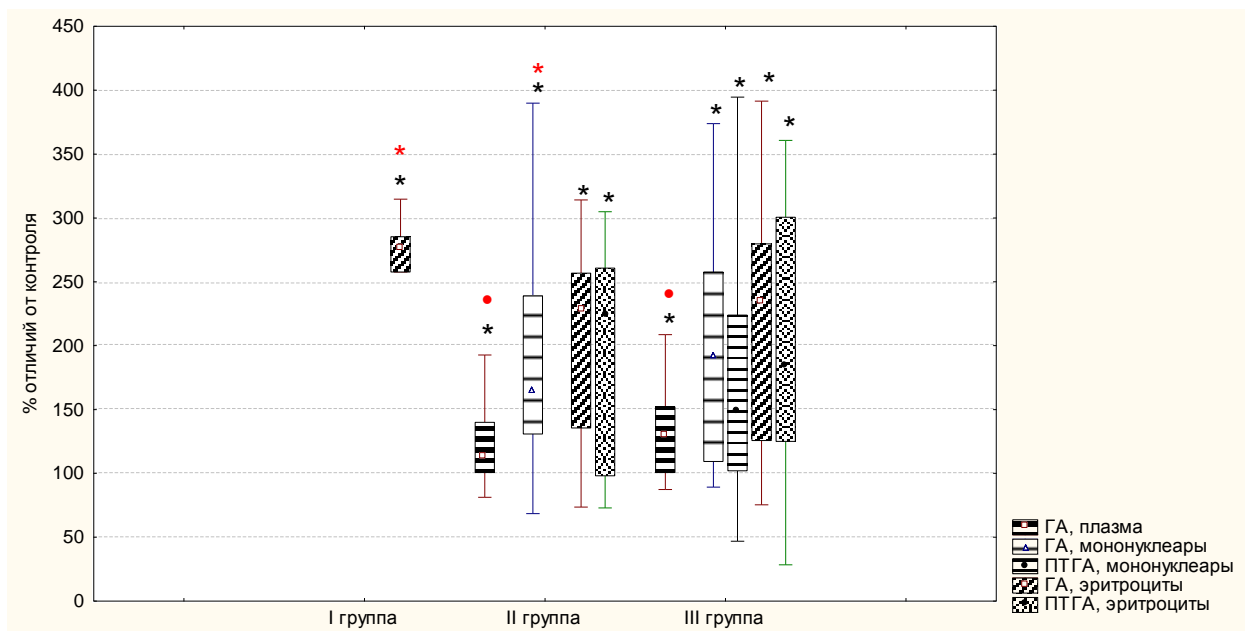


Рис. 7. Активность СОД/СУА в плазме, мононуклеарах и эритроцитах при первичном и посттравматическом гонартрозе различных групп. Обозначения: аналогично Рис. 5; * - достоверные различия между группами первичного и посттравматического ГА соответствующих стадий; • - тенденция к достоверному различию между группами первичного и посттравматического ГА

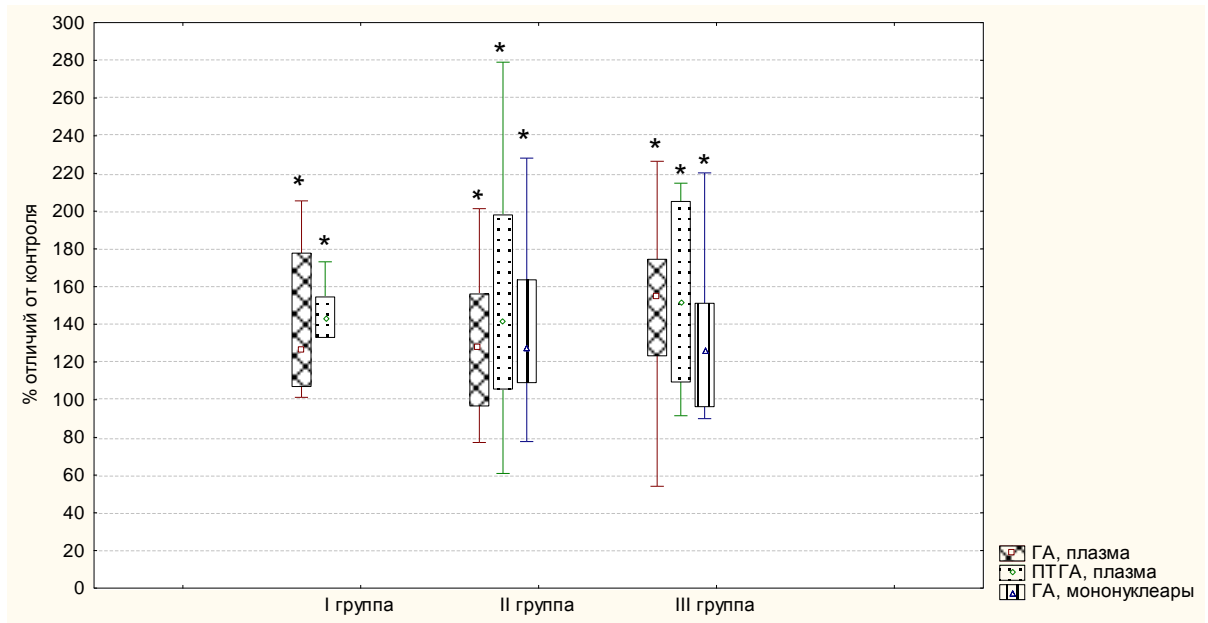


Рис. 8. Активность каталазы/скорость утилизации гидропероксида в плазме и мононуклеарах при первичном и посттравматическом гонартрозе различных групп. Обозначения: аналогично Рис. 5,7.

Для первичного ГА, в отличие от ПТГА, характерно увеличение СУА в СЖ по мере утяжеления стадии, а также однонаправленный рост активности СОД/СУА и каталазы/ $V_{H_2O_2}$ в плазме и мононуклеарных клетках крови на II и III стадиях.

Активные формы кислорода, включая супероксидный анион-радикал, гидропероксид и гидроксильный радикал, опосредуют повреждение суставного хряща у пациентов с гонартрозом; в синовиальной жидкости таких пациентов уровень оксидантов зачастую повышен (Ostalowska A. et al., 2006). Ранее было продемонстрировано, что у больных остеоартрозом на фоне повышения содержания продуктов ПОЛ отмечалось снижение уровня активности каталазы сыворотки и эритроцитов, а также антиокислительной активности плазмы (Алексеев Е.Ю., Говорин А.В., 2011). Другими авторами также сообщалось о незначительном снижении активности каталазы в эритроцитах при остеоартрозе относительно показателя здоровых лиц (Sarban S. et al., 2005; El-barbary A.M. et al., 2011). Согласно полученным нами результатам, на всех стадиях как первичного, так и посттравматического гонартроза, именно эритроциты крови характеризовались значительным накоплением вторичного продукта ПОЛ – малонового диальдегида – одновременно с выраженным дисбалансом функционирования сопряженных ферментов СОД и каталазы, а именно значительной активацией СОД на фоне не изменившейся активности каталазы. Следовательно, причиной интенсификации

процессов ПОЛ в эритроцитах может являться избыточное накопление гидропероксида, и, как следствие, гидроксильных радикалов, известных своим цитотоксичным и ПОЛ-инициирующим действием. Кроме того, отмечалась тенденция к отрицательной корреляции между стадией ПТГА и активностью каталазы в эритроцитах ($p=0,058$), что указывает на важность протекторного антиоксидантного действия каталазы.

Активность СОД (в синовиальной жидкости общая активность и две изоформы Cu,ZnSOD, MnSOD), как при первичном, так и посттравматическом гонартрозе была значительно увеличенной (Ostalowska A. et al., 2006). Наши результаты свидетельствуют об увеличении супероксидустрояющей активности в СЖ при усугублении дегенеративного процесса в суставе – на II, III стадии относительно I (при первичном ГА). Активность каталазы в синовиальной жидкости при гонартрозе не отличалась от нормы, а при травматических повреждениях мениска коленного сустава - снижалась (Матвеева Е.Л. и др., 2014; Спиркина Е.С., Матвеева Е.Л., Гасанова А.Г., 2013). Нами не обнаружено различий в активности каталазы в СЖ на разных стадиях первичного/посттравматического ГА. У пациентов с гонартрозом содержание МДА в эритроцитах, а также активность СОД в эритроцитах были значительно повышенными относительно контроля, что согласуется с нашими результатами; но значения этих показателей снижались до уровня нормы после лечения пациентов гомеопатическими препаратами (Pinto S. et al., 2008). Согласно собственным результатам, обнаружена положительная корреляция СУА плазмы и синовиальной жидкости со стадией К/Л первичного ГА (соответственно, $R=0,290$, $p=0,035$, $R=0,297$, $p=0,021$), а также с возрастом пациента (соответственно, $R=0,373$, $p=0,007$, $R=0,278$, $p=0,033$); СУА плазмы положительно коррелирует с СУА СЖ ($R=0,605$, $p<0,001$) и активностью СОД в мононуклеарах ($R=0,396$, $p=0,009$). Вместе с тем, другими авторами сообщалось о значительном снижении активности антиоксидантов СОД и каталазы в эритроцитах на всех стадиях гонартроза; в группы для исследования включались только женщины (Трилис Я.Г. и др., 2012).

Активность глутатионпероксидазы (ГПО) в плазме крови (рис. 9, табл. 7) у пациентов с первичным ГА I-II стадий не отличается от контроля, на III стадии – больше контроля на 31% ($p=0,018$). В отличие от первичного, при посттравматическом гонартрозе активность ГПО в плазме крови на I стадии меньше нормы на 19% ($p=0,038$) и на 26% меньше по сравнению с I стадией первичного ГА ($p=0,02$), на II стадии – не отличается от нормы, на III стадии – наблюдается тенденция к повышению активности относительно контроля ($p=0,073$) и достоверное увеличение на 54% относительно I группы пациентов с ПТГА ($p=0,036$). Активность ГПО в СЖ при первичном гонартрозе (рис. 10, табл. 8)

отличается только между II и III группами пациентов: на 36% выше при поздних стадиях ($p=0,027$); при ПТГА – отмечена тенденция к увеличению активности ГПО на III стадии относительно I ($p=0,09$), на II стадии показатель был в 1,5 раза больше по сравнению с первичным ГА ($p=0,043$). Активность ГПО в плазме крови при ПТГА ($R=0,394$, $p=0,034$), а также в СЖ при первичном ГА ($R=0,377$, $p=0,036$) и ПТГА (тенденция, $p=0,078$) положительно коррелирует со стадией по К/Л.

Как показало исследование активности ГПО в мононуклеарных клетках крови, при первичном ГА значение этого показателя не отличается от нормы и между группами пациентов ($N=2,49$, $p=0,477$), а при посттравматическом гонартрозе выше нормы во всех группах пациентов: в I группе – на 54% ($p=0,01$), во II – на 44% ($p=0,043$), в III – на 87% ($p<0,001$), на III стадии значение было выше такового для первичного ГА в 1,5 раза ($p=0,021$). Показано, что при первичном гонартрозе активность ГПО в мононуклеарах крови положительно коррелирует с активностью каталазы в мононуклеарах ($R=0,798$, $p<0,001$), а при посттравматическом гонартрозе – с активностью СОД в мононуклеарах ($R=0,604$, $p=0,008$).

Таблица 7

Активность глутатионпероксидазы и содержание восстановленного глутатиона в крови и СЖ пациентов с первичным ГА

Показатель	Значение показателя в плазме по группам, медиана (25%; 75% квантили)			
	Контроль	1	2	3
ГПО, плазма, МЕ/г $\Delta\%^k$	32,95 (29,88-40,54)	35,83 (35,58-38,49)	39,09 (31,39-49,66)	43,17 (36,47-46,13) +31*
ГПО, СЖ, МЕ/г $\Delta\%^1$ $\Delta\%^2$	-	36,25 (31,65-37,93)	29,37 (24,33-35,52)	40,02 (35,07-51,09) +36*
ГПО, мононуклеары, МЕ/г	721,03 (512,22-924,03)	824,84 (734,25-1760,0)	999,45 (531,54-1448,36)	872,17 (579,70-1035,81)
ГПО, эритроциты, МЕ/г Нб $\Delta\%^k$ $\Delta\%^1$	262,83 (226,30-303,29)	143,96 (124,48-153,05) -45*	214,88 (160,10-229,84) -18* +49*	200,87 (162,33-217,83) -24* +40*
GSH, эритроциты, мкМ/г Нб $\Delta\%^k$ $\Delta\%^1$ $\Delta\%^2$	11,45 (10,30-12,46)	9,52 (8,23-9,86) -17*	7,24 (6,60-8,65) -37*	10,29 (8,10-10,83) -10* +42*
GSH, СЖ, мкМ/г $\Delta\%^1$	-	0,55 (0,20-1,05)	1,58 (1,07-2,67) +187*	3,02 (0,94-3,97) +449*

Активность глутатионпероксидазы и содержание восстановленного глутатиона в крови и СЖ пациентов с ПТГА

Показатель, единица измерения	Значение показателя в плазме по группам, медиана (25%; 75% квантили)			
	Контроль	1	2	3
ГПО, плазма, МЕ/г	32,95 (29,88-40,54)	26,64 (23,09-28,71)	35,68 (25,20-39,0)	41,14 (33,44-52,66)
$\Delta\%^k$ $\Delta\%^l$		-19*		+25* +54*
ГПО, СЖ, МЕ/г	-	36,97 (22,65-45,75)	44,09 (29,74-62,24)	52,74 (36,09-75,90)
$\Delta\%^k$				+43*
ГПО, мононуклеары, МЕ/г	721,03 (512,22-924,03)	1107,81 (1028,38-1587,66)	1039,93 (685,61-1583,42)	1345,96 (1029,38-1995,46)
$\Delta\%^k$		+54*	+44*	+87*
ГПО, эритроциты, МЕ/г Hb	262,83 (226,30-303,29)	203,21 (100,76-215,20)	214,69 (147,95-261,04)	212,37 (196,61-236,74)
$\Delta\%^k$		-23*	-18*	-19*
GSH, эритроциты, мкМ/г Hb	11,45 (10,30-12,46)	6,98 (5,01-9,03)	8,26 (6,65-10,69)	9,19 (7,45-11,24)
$\Delta\%^k$		-39*	-28*	-20*
GSH, СЖ, мкМ/г	-	1,31 (1,06-1,65)	0,72 (0,29-1,64)	0,87 (0,32-1,42)

Активность глутатионпероксидазы в эритроцитарной фракции крови ниже нормы на всех стадиях первичного гонартроза: на I стадии – на 45% ($p < 0,001$), на II – на 18% ($p = 0,003$), на поздних III-IV стадиях – на 24% ($p < 0,001$), при этом активность во II и III группах на 49% ($p = 0,006$) и 40% ($p = 0,045$) выше относительно данных I группы, соответственно. Аналогичные изменения наблюдались при ПТГА: снижение активности ГПО в I группе – на 23% ($p = 0,005$), во II – на 18% ($p = 0,006$), в III – на 19% ($p = 0,006$).

Анализ содержания восстановленного глутатиона в эритроцитах крови показал, что при всех стадиях первичного ГА концентрация GSH снижена - на 17% в I группе ($p = 0,028$), на 37% во II группе ($p < 0,001$), на 10% в III группе ($p = 0,02$). Аналогичные изменения установлены для пациентов с посттравматическим ГА: снижение GSH в эритроцитах - на 39% в I группе ($p = 0,007$), на 28% во II группе ($p = 0,010$), на 20% в III группе ($p = 0,035$), (рис. 9). Уровень GSH в эритроцитах положительно коррелирует с активностью глутатионпероксидазы в эритроцитах при ПТГА ($R = 0,427$, $p = 0,003$).

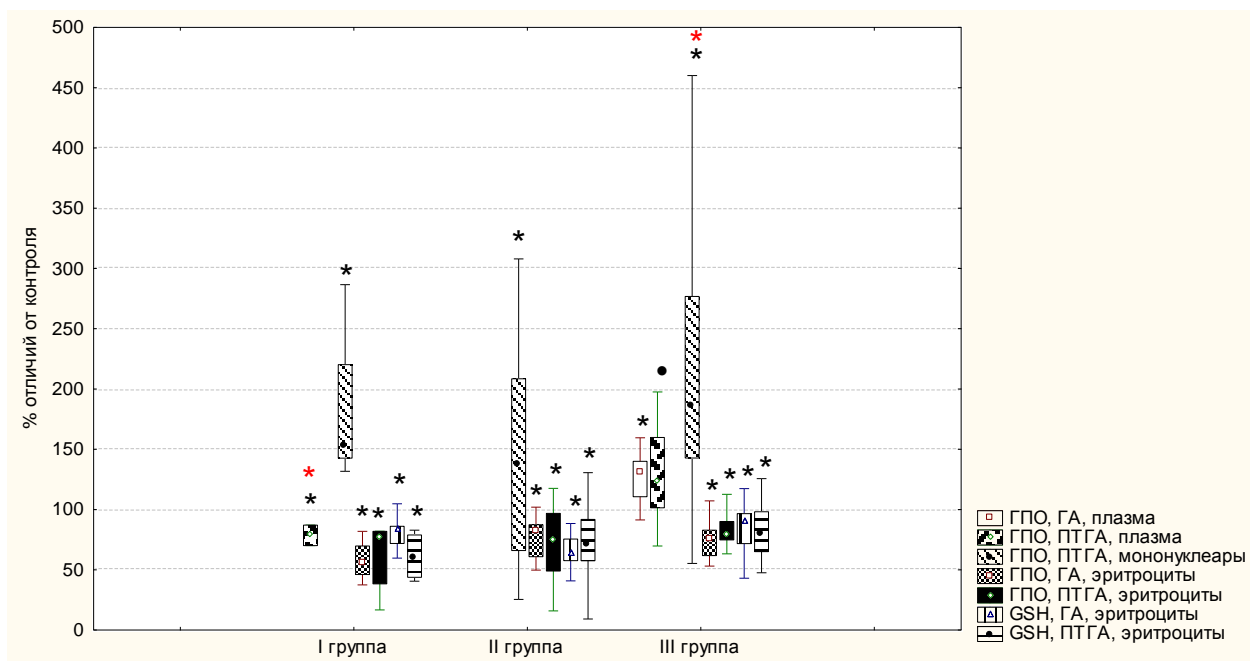


Рис. 9. Активность ГПО в плазме, мононуклеарах и эритроцитах, а также содержание восстановленного глутатиона при первичном и посттравматическом гонартрозе различных групп. Обозначения: Аналогично Рис. 5,7

В синовиальной жидкости при первичном ГА содержание GSH значительно увеличивается при усугублении дегенеративного процесса в суставе и коррелирует со стадией по K/L ($R=0,504$, $p=0,004$): относительно показателя I стадии содержание GSH в 2,9 раза выше на II стадии ($p=0,019$), в 5,5 раза выше на поздних стадиях ($p=0,008$). Наоборот, при ПТГА содержание GSH в СЖ на различных стадиях не отличается, но на II и III стадиях уменьшается относительно показателя на соответствующей стадии первичного ГА (тенденция, $p=0,057$; в 3,5 раза, $p=0,027$), (рис. 10).

Поскольку глутатионпероксидаза, способная, наряду с каталазой, к разложению гидропероксида, уменьшает свою активность в эритроцитах крови пациентов с первичным и посттравматическим ГА, то нарушение баланса функционирования антиоксидантных ферментов и процесс накопления гидропероксида в клетках крови еще более усугубляются. Следует отметить, что образуемая супероксиддисмутазой перекись водорода вызывает деградацию гемовых белков и высвобождение ионов железа из гемоглобина, что усиливает цитотоксическое действие перекиси. Более того, при действии избыточной концентрации перекиси водорода наблюдается инактивация ферментативных антиоксидантов каталазы и ГПО (Regan E.A. et al., 2008); показано, что гидропероксид способен к индукции апоптоза хондроцитов путем Ca^{2+} -сигналинга при участии ERK-киназ (Asada S. et al., 2001). Еще одним семейством ферментов, участвующих в

элиминации H_2O_2 и других АКМ, являются пероксиредоксины: показано, что хондроцитами конститутивно экспрессируется пероксиредоксин 5; причем уровень экспрессии повышен при артрозе, и провоспалительные цитокины $IL-\beta$ и $TNF\alpha$ способствуют усилению экспрессии пероксиредоксина 5 (Wang M.-X. et al., 2002).

Значительное истощение внутриклеточных запасов восстановленного глутатиона в эритроцитах на всех стадиях первичного и посттравматического ГА, доказанное настоящим исследованием, может приводить к падению активности глутатион-зависимых ферментов в этих клетках, использующих GSH как косубстрат, например, ГПО, а также к накоплению гидропероксидов, дисульфидов и окисленного глутатиона в клетках крови (Deponte M., 2013). Известно, что роль глутатиона в защите эритроцитов от действия гемолитиков и метгемоглобинообразователей, окислителей, а также восстановлении дисульфидных связей исключительно велика (Коржов В.И. и др., 2007). Особую роль в поддержании клеточного редокс-баланса играет митохондриальный GSH, поскольку митохондрии являются основным источником АФК; более того, запуску митохондриального апоптотического сигналинга предшествует нарушение баланса GSH/GSSG (Калинина Е.В. и др., 2014). Другими авторами сообщается как о снижении содержания глутатиона в синовиальной жидкости при артрозе - относительно группы пациентов с травмой коленного сустава без признаков артроза (Regan E.A. et al., 2008), так и об отсутствии таких различий (Sutipornpalangkul W. et al., 2009). Данные противоречия могут быть объяснены отсутствием выделения групп пациентов исходя из стадии и этиологии ГА.

Таким образом, при ПТГА, в отличие от первичного ГА, наблюдаются: значительная активация глутатионпероксидазы в мононуклеарных клетках крови, частично компенсирующая происходящий сдвиг баланса СОД и каталазы в сторону генерации гидропероксида на поздней стадии артроза; снижение активности ГПО в плазме крови на ранних стадиях; более низкие показатели концентрации восстановленного глутатиона в СЖ. Со стадией по К/Л положительно коррелирует активность глутатионпероксидазы в синовиальной жидкости и при первичном, и при посттравматическом гонартрозе, а также содержание GSH в СЖ при первичном ГА.

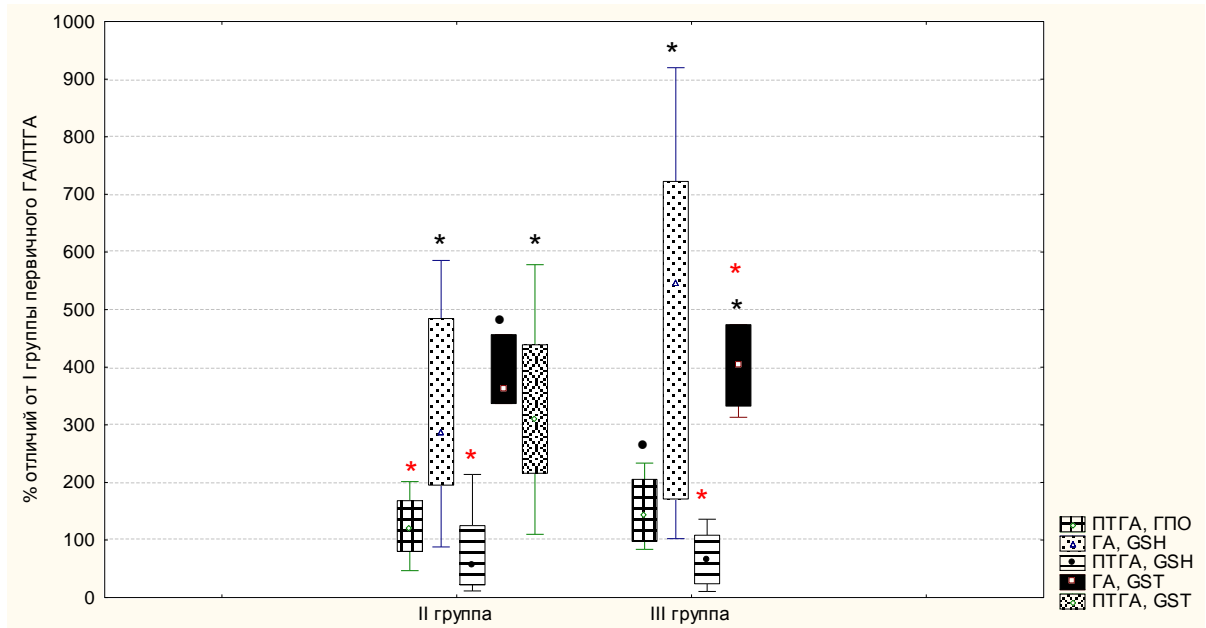


Рис. 10. Активность глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы, уровень восстановленного глутатиона в синовиальной жидкости при первичном и посттравматическом гонартрозе различных групп
Обозначения: Аналогично Рис. 6.

Известно, что в случае избыточного образования АКМ ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} и др.) или их преодоления барьера ферментативных антиоксидантов СОД и каталазы восстановленный глутатион GSH осуществляет их инактивацию, при этом сам превращается в GSSG, который далее восстанавливается в глутатионредуктазной реакции либо выводится из клетки (Коржов В.И. и др., 2007). Глутатион устраняет избыток перекисных соединений (H_2O_2 и органических пероксидов) при действии глутатионпероксидазы.

Важнейшую протективную роль глутатионпероксидазы в защите хондроцитов от окислительного стресса отражает тот факт, что эндемичная хроническая остеохондропатия, характеризующаяся некрозом эпифизальных хондроцитов (болезнь Кашин-Бека), распространена именно в регионах с дефицитом селена, который входит в состав активного центра ГПО; активность ГПО и содержание селена в плазме крови таких больных значительно снижены (Moreno-Reyes R. et al., 2003). Следует отметить, что селен является также компонентом фермента йодтиронин дейодиназы, который конвертирует тиреоидный гормон Т4 в его активную форму Т3, которая может способствовать гипертрофии хондроцитов и минерализации хрящевого матрикса (Goldring M.B., 2013). Если сравнивать вклад каталазы и глутатионпероксидазы в восстановление гидропероксида, то считается, что для клетки в целом роль ГПО особенно важна, поскольку каталаза сосредоточена в основном в пероксисомах, а глутатионпероксидаза

защищает от чаще возникающих низких концентраций перекиси в цитозоле, митохондриях и даже ядре клетки – ГПО4 (Коржов В.И. и др., 2007; Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., 2010). Сообщается об участии некоторых изоформ ГПО в регуляции процесса апоптоза; например, ГПО4 способна восстанавливать гидроперекиси внутри мембран, которые образуются благодаря функционированию липоксигеназы, которая способна вызывать апоптоз через ступенчатую активацию фактора AIF (Brigelius-Flohe R., Maiorino M., 2013).

Установлено, что активность глутатион-S-трансферазы (GST) в синовиальной жидкости при первичном ГА выше во II и III группах по сравнению с данными I группы: во II группе ($p=0,08$), в III группе – в 4 раза ($p=0,038$), (табл. 9, рис. 10). Увеличенная супероксидустраниющая активность СЖ пациентов во II-III группах первичного ГА способствует генерации гидропероксида, при этом активность каталазы и ГПО, как мы показали, не отличается от данных I группы пациентов. При этом во II и III группах пациентов с первичным ГА наблюдается очень значительное возрастание активности GST и содержания GSH относительно показателей I группы. Возможно, это связано с тем, что Se-независимые глутатион-S-трансферазы также могут проявлять пероксидазную активность, используя GSH в качестве косубстрата (Калинина Е.В. и др., 2014). Так, в синовиальной жидкости активность GST положительно коррелирует с супероксидустраниющей активностью при первичном ГА ($R=0,568$, $p=0,022$).

Активность GST в СЖ пациентов с диагнозом посттравматический гонартроз II группы значительно выше по сравнению с группой I (в 3,1 раза, $p=0,025$) и III (в 4,1 раза, $p=0,007$), (рис. 10). Активность GST увеличивается и в мононуклеарах, и в эритроцитах групп I-III относительно нормы, не зависимо от стадии первичного ГА (рис. 11, табл. 9). Так, в мононуклеарной фракции возрастание активности составляет 63%-101% (для I-III групп $p=0,013$, $0,041$, $<0,001$, соответственно), а в эритроцитарной – 57%-170% (для I-III групп $p=0,015$, $0,026$, $0,003$, соответственно). Аналогичные изменения наблюдали для посттравматического ГА, за исключением того, что на ранней I стадии ПТГА показатели были в пределах нормы. Для активности глутатион-S-трансферазы в мононуклеарах крови пациентов с ПТГА II и III стадий установлено повышение активности относительно контроля (тенденция, $p=0,08$; 46%, $p=0,015$) так же, как значительное повышение активности GST в эритроцитах II и III групп (в 2,3 раза, $p=0,029$; в 2,8 раза, $p=0,002$). На поздней III стадии артроза активность GST в СЖ в 2,9 раза выше при первичном ГА по сравнению с ПТГА ($p=0,016$), такая же тенденция отмечается для активности GST в мононуклеарах крови ($p=0,09$).

Такое значительное повышение активности глутатион-S-трансферазы в эритроцитах пациентов с первичным ГА и ПТГА может являться компенсаторным ответом на интенсификацию процесса перекисного окисления липидов, уровень вторичного продукта которого (МДА) в эритроцитах при всех стадиях первичного и посттравматического ГА оказался, как мы показали, выше нормы. Глутатион-S-трансферазы защищают от эндогенных метаболитов, образующихся при окислительном стрессе, и конъюгируют с GSH токсичные продукты ПОЛ типа 4-гидроксиноненаля, способствуя их выведению из организма (Hayes J. D. et al., 2005). Возможно, увеличение активности глутатион-S-трансферазы в эритроцитах может способствовать значительному уменьшению содержания в них восстановленного глутатиона, что было характерно и для первичного ГА, и для ПТГА.

Известно, что некоторые изоформы GST регулируют пути клеточного сигналинга (Board P.G., Menon D., 2013). Так, GSTP является возможным ингибитором сигнальных киназ (Jun киназы, ASK1) путем белок-белковых взаимодействий, следовательно, может модулировать процессы выживания/апоптоза клетки. Показано, что GST участвуют в нескольких реакциях синтеза и метаболизма простагландинов (Christ-Hazelhof E. et al., 1976; Board P.G., Menon D., 2013). Так, была исследована способность разных изоформ GST осуществлять изомеризацию простагландина H в простагландин D, в результате которой образуется смесь простагландина F2, простагландина E2 и простагландина D2, соотношение между которыми зависит от разновидности фермента. Простагландины являются аутокринными и паракринными медиаторами, воздействующими на многие клетки организма, в частности, опосредующие воспалительные процессы.

Таблица 9

Активность глутатион-S-трансферазы в крови и СЖ пациентов с гонартрозом

Показатель, единица измерения	Значение показателя в плазме по группам, медиана (25%; 75% квантили)			
Первичный ГА				
Группа	Контроль	1	2	3
GST, СЖ, МЕ/г $\Delta\%^{1}$	-	0,046 (0,034-0,114)	0,167 (0,155-0,210) +263*	0,186 (0,153-0,218) +304*
GST, мононуклеары, МЕ/г $\Delta\%^{k}$	7,95 (5,43-9,79)	12,97 (11,04-24,45) +63*	14,73 (7,46-15,84) +85*	15,97 (11,60-18,45) +101*
GST, эритроциты, МЕ/г $\Delta\%^{k}$	1,61 (1,30-2,12)	4,34 (1,84-5,05) +170*	2,52 (2,13-3,91) +57*	2,84 (2,45-3,88) +76*
ПТГА				
GST, СЖ, МЕ/г	-	0,10 (0,072-0,133)	0,308 (0,216-0,439)	0,076 (0,064-0,09)

$\Delta\%_1^1$ $\Delta\%_2^2$			+208*	-75*
GST, мононуклеары, МЕ/г $\Delta\%_k^k$	7,95 (5,43-9,79)	10,45 (5,04-16,22)	11,00 (7,29-14,53)	11,59 (9,50-14,92)
GST, эритроциты, МЕ/г $\Delta\%_k^k$ $\Delta\%_1^1$ $\Delta\%_2^2$	1,61 (1,30-2,12)	1,58 (1,49-4,03)	3,72 (1,69-5,63)	4,55 (3,33-5,87)
			+38*	+46*
			+131*	+183*
				+188*
				+5

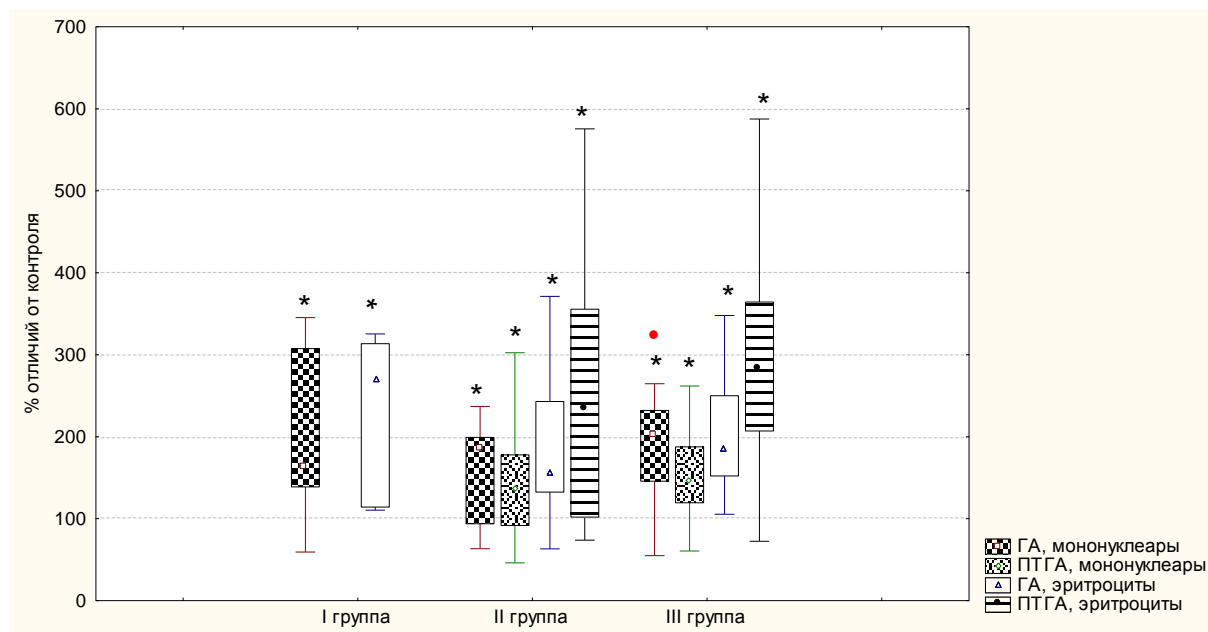


Рис. 11. Активность GST в мононуклеарах и эритроцитах при первичном и посттравматическом гонартрозе различных групп. Обозначения: Аналогично Рис. 5,7

Активность глутатионредуктазы (GR) в СЖ общей группы пациентов (первичный ГА и посттравматический ГА) не отличается между различными стадиями. При гонартрозе происходит значительное возрастание активности глутатионредуктазы в мононуклеарах крови (рис. 12, табл. 10) на всех стадиях, составляющее 90-144% (в I группе – $p=0,018$, во II и III группах – $p<0,001$). В эритроцитах крови на II стадии ГА наблюдается тенденция к увеличению активности GR по сравнению с нормой ($p=0,08$).

В общей выборке пациентов (первичный ГА, ПТГА) отмечены значимые положительные корреляции между активностями глутатионредуктазы и каталазы ($R=0,661$, $p<0,001$), глутатионредуктазы и ГПО ($R=0,365$, $p=0,048$) в мононуклеарной фракции.

Как показало настоящее исследование, при увеличении стадии ГА активность глутатионпероксидазы (при первичном и ПТГА) и глутатион-S-трансферазы (при первичном ГА, II стадии ПТГА) в синовиальной жидкости возрастает, что не наблюдали для активности глутатионредуктазы. Глутатионредуктаза – димерная оксидоредуктаза,

которая превращает окисленный глутатион (GSSG) в две молекулы восстановленного глутатиона, используя кофактор NADPH и простетическую группу FAD (Deponte M., 2013). Активация GR в моноклеарной фракции, возможно, связана с нарушением редокс-баланса, приводящего к накоплению гидропероксида. Ранее исследователями сообщалось о значительном повышении активностей ферментов глутатионового цикла (ГПО, GST, GR) в синовиальной жидкости пациентов и с первичным, и с посттравматическим ГА, по сравнению с СЖ здоровых людей, однако, отмечается, что активность этих ферментов в СЖ в абсолютных значениях достаточно низка (Ostalowska A. et al., 2006). Показано, что при воспалительном процессе в суставе, например, при ревматоидном артрите, наблюдается трехкратное увеличение активности глутатионредуктазы, необходимой для детоксикации АКМ, а также увеличенные активности коллагеназы и эластазы (Bazzichi L. et al., 2002). Ранее сообщалось о значительном повышении активности ГПО, GST и глутатионредуктазы в СЖ при ГА по сравнению с нормой, особенно в случае гонартроза (Ostalowska A. et al., 2007).

3.2 Активность ксантиноксидоредуктазы, ксантиноксидазы и содержание мочевой кислоты в крови и синовиальной жидкости пациентов с первичным и посттравматическим гонартрозом

Ксантиноксидоредуктаза (КОР) катализирует превращение гипоксантина в ксантин и далее в мочевую кислоту (МК) на заключительном этапе пуринового метаболизма (Сумбаев В.В., Розанов А.Я., 2001), при этом в ксантиноксидазной (КО) форме в результате функционирования фермента наблюдается продукция $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 . С другой стороны, образуемая мочевая кислота способна играть роль антиоксиданта во внеклеточных жидкостях. КОР конститутивно экспрессируется как дегидрогеназа, но вследствие посттрансляционных модификаций (окисление тиоловых групп) или необратимого протеолитического расщепления КОР превращается в ксантиноксидазу (Stabler T., Kraus V.B., 2012).

Таблица 10

Активность глутатионредуктазы и ксантиноксидазы в крови и СЖ пациентов с первичным и посттравматическим гонартрозом (*общая группа*)

Показатель, единица измерения	Значение показателя в плазме по группам, медиана (25%; 75% квартили)			
	Контроль	1	2	3
Группа				
GR, СЖ, МЕ/г	-	0,554 (0,547-0,647)	0,508 (0,282-0,870)	0,477 (0,330-0,606)
GR, моноклеары, МЕ/г	10,85 (7,84-12,93)	20,64 (12,40-30,70)	26,45 (17,79-33,27)	26,05 (17,79-32,92)

$\Delta\%^\kappa$		+90*	+144*	+140*
GR, эритроциты, МЕ/г $\Delta\%^\kappa$	5,27 (2,51-8,67)	6,96 (5,47-12,93)	9,56 (6,97-12,28) +81*	7,85 (7,0-9,85)
КО, плазма, МЕ/г $\Delta\%^\kappa$	0,0027 (0,002-0,0047)	0,01 (0,009-0,0126)	0,0086 (0,0034-0,023) +219*	0,019 (0,016-0,026) +604*

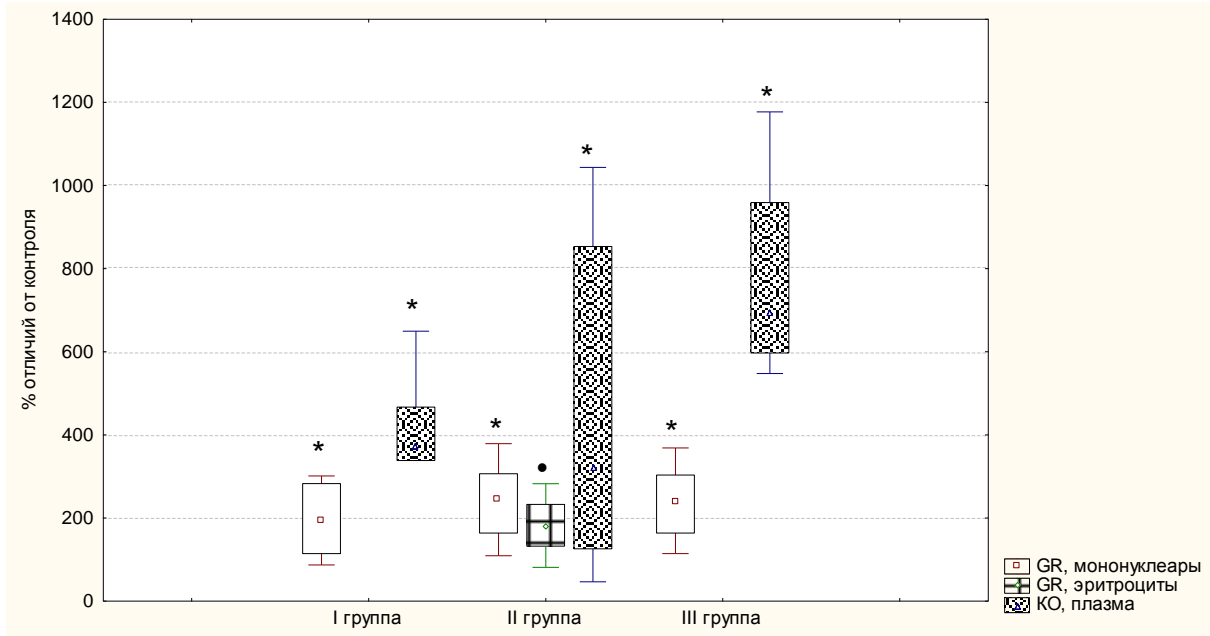


Рис. 12. Активность глутатионредуктазы и ксантиноксидазы при первичном и посттравматическом гонартрозе различных групп. Обозначения: Аналогично Рис. 5,7

Таблица 11

Активность ксантиноксидоредуктазы и содержание мочевой кислоты в крови и СЖ пациентов с первичным ГА

Показатель, единица измерения	Контроль	1	2	3
Группа				
КОР, СЖ, МЕ/г $\Delta\%^1$ $\Delta\%^2$	-	0,060 (0,035-0,10)	0,032 (0,019-0,052)	0,12 (0,095-0,164) +100* +244*
КОР, плазма, МЕ/г $\Delta\%^\kappa$	0,028 (0,024-0,040)	0,054 (0,042-0,074) +93*	0,047 (0,030-0,056) +68*	0,042 (0,037-0,044) +50*
КОР, мононуклеары, МЕ/г $\Delta\%^\kappa$ $\Delta\%^1$	48,29 (40,58-52,11)	62,65 (52,86-80,55) +30*	64,08 (50,10-89,58) +33*	105,87 (63,41-128,18) +119* +69*
МК, СЖ, мкМ/л	-	406,08 (307,19-539,86)	325,54 (200,80-340,05)	271,72 (228,76-336,97)
МК, плазма, мкМ/л $\Delta\%^\kappa$	209,28 (183,45-268,98)	300,60 (269,13-540,64) +44*	319,89 (275,04-406,05) +53*	329,12 (278,45-360,74) +57*

Активность ксантиноксидоредуктазы и содержание мочевины в крови и СЖ пациентов с ПТГА

Показатель, единица измерения	Значение показателя в плазме по группам, медиана (25%; 75% квантили)			
	Контроль	1	2	3
КОР, СЖ, МЕ/г $\Delta\%^1$ $\Delta\%^2$	-	0,015 (0,005-0,029)	0,022 (0,01-0,043)	0,055 (0,044-0,085) +267* +112*
КОР, плазма, МЕ/г $\Delta\%^k$ $\Delta\%^1$ $\Delta\%^2$	0,028 (0,024-0,040)	0,028 (0,020-0,032)	0,036 (0,032-0,050) +29* +29*	0,040 (0,035-0,044) +43* +43*
КОР, мононуклеары, МЕ/г $\Delta\%^k$ $\Delta\%^1$ $\Delta\%^2$	48,29 (40,58-52,11)	78,42 (74,62-82,36) +62*	56,0 (52,43-67,57) +16* -29*	70,84 (61,26-78,64) +47* +27*
МК, СЖ, мкМ/л	-	238,14 (93,27-394,49)	334,45 (211,12-394,02)	282,45 (244,03-352,31)
МК, плазма, мкМ/л $\Delta\%^k$	209,28 (183,45-268,98)	191,02 (167,94-347,38)	256,36 (220,38-428,47) +23*	327,31 (287,09-360,51) +56*

Оценка общей активности ксантиноксидоредуктазы (дегидрогеназной и оксидазной) показала, что при сравнении с нормой активность КОР в плазме крови пациентов с первичным ГА возрастает во всех группах ГА: в I группе - на 93% ($p=0,005$), во II - на 68% ($p=0,043$), в III - на 50% ($p=0,043$) (рис. 13, табл. 11). В I группе ПТГА активность КОР в плазме крови не отличается от нормы, но в 1,9 раза меньше соответствующего показателя при первичном ГА ($p=0,014$); значимое увеличение активности КОР происходило во II и III группах ПТГА - на 29% ($p=0,025$) и 43% ($p=0,018$), соответственно (табл. 12). Активность КОР в плазме при ПТГА положительно коррелирует с СУА плазмы ($R=0,629$, $p=0,001$), а также стремится к корреляции со стадией по К/Л (тенденция, $p=0,06$).

В мононуклеарной фракции активность КОР возрастает во всех группах пациентов с первичным ГА (I-III) - на 30% ($p=0,009$), 33% ($p=0,048$), 119% ($p=0,002$), соответственно. На наиболее тяжелых III-IV стадиях ГА активность КОР в мононуклеарах больше по сравнению с показателем I стадии (тенденция, $p=0,08$). Оказалось, активность КОР в мононуклеарных клетках увеличивается при усилении дегенеративного процесса в суставе при первичном ГА и положительно коррелирует с рентгенологической стадией по К/Л ($R=0,462$, $p=0,035$), а также с активностью СОД в мононуклеарной фракции ($R=0,736$,

$p=0,003$), что, вероятно, связано с супероксид-элиминирующей функцией СОД. Для активности КОР в мононуклеарной фракции при ПТГА также наблюдали возрастание на I стадии на 62% ($p=0,004$), на II стадии – на 16% ($p=0,018$), на III стадии – на 47% ($p<0,001$), а также положительную корреляцию с активностью СОД в мононуклеарах ($R=0,505$, $p=0,023$).

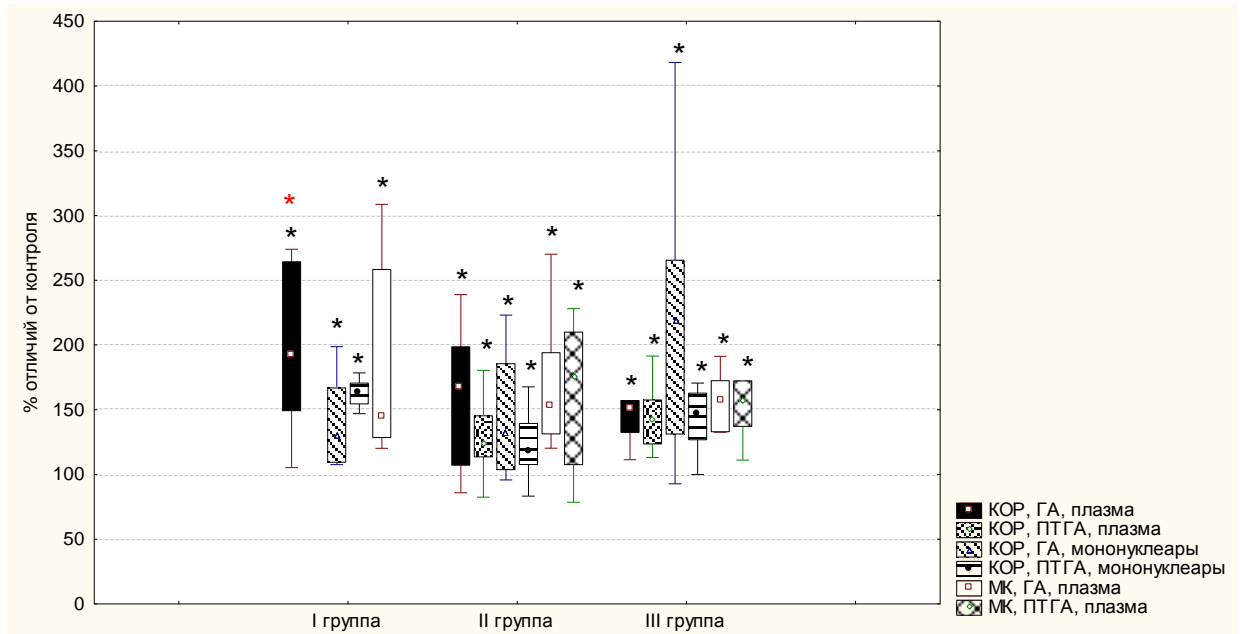


Рис. 13. Активность КОР в плазме и мононуклеарах, а также уровень мочевой кислоты при первичном и посттравматическом гонартрозе различных групп. Обозначения: Аналогично Рис. 5,7

Показано, что активность КОР в СЖ (табл. 11) в III группе первичного ГА значимо больше показателя II группы в 3,4 раза ($p=0,039$) и больше показателя I группы (тенденция, $p=0,08$); активность КОР в СЖ тесно коррелирует с содержанием МДА в СЖ ($R=0,893$, $p=0,007$), а также с возрастом пациента ($R=0,579$, $p=0,012$) и стадией по K/L ($R=0,59$, $p=0,027$).

При посттравматическом гонартрозе активность КОР в синовиальной жидкости в III группе (табл. 12) была существенно выше по сравнению с показателями пациентов ранних стадий: относительно I группы – в 3,7 раза ($p=0,007$), относительно II группы – в 2,1 раза ($p=0,024$). Отмечается тесная положительная корреляция активности КОР в СЖ с рентгенологической стадией ПТГА ($R=0,62$, $p<0,001$), так же, как корреляция с возрастом пациента ($R=0,389$, $p=0,049$). Активность КОР (в абсолютных значениях) на I стадии в 4 раза выше при первичном ГА относительно ПТГА ($p=0,043$), на III стадии – в 2,2 раза выше ($p=0,007$). Таким образом, активация ксантиноксидоредуктазы более характерна для

первичного гонартроза; активность КОР в различном биологическом материале (синовиальная жидкость, плазма и моноклеарная фракция крови) может являться биохимическим диагностическим маркером стадии как первичного, так и посттравматического гонартроза.

Корреляционные взаимосвязи между активностью СОД/СУА и активностью КОР согласуются с теми данными, согласно которым повышение активности ксантиноксидоредуктазы вызывает достоверное увеличение активности супероксиддисмутазы и каталазы (Сумбаев В.В., Розанов А.Я., 2001).

Изучение активности прооксидантной формы – ксантиноксидазы (рис. 12, табл. 10) - показало, что у пациентов смешанной группы (первичный и посттравматический гонартроз) во всех группах наблюдается значительная активация КО в плазме крови: в I группе – в 3,7 раза ($p=0,008$), во II – в 3,2 раза ($p=0,012$), в III – в 7 раз ($p=0,007$). Следует отметить, что ксантиноксидаза особенно важна в патогенезе суставных патологий, поскольку более 50% синовиальной КОР представлено именно оксидазной формой (Hanachi N. et al., 2009); циркулирующая сывороточная КОР почти всегда представляет собой протеолитически генерируемую ксантиноксидазу. Результаты свидетельствуют о том, что активность ксантиноксидазы в СЖ увеличивается после травмы сустава, и это увеличение ассоциировано с продукцией АКМ, судя по данным анализа карбонильных групп белков (Stabler T., Kraus V.B., 2012). Chen В.Х. с коллегами установили, что при артрозе содержание гипоксантина в гомогенатах синовиальной оболочки значительно повышено, что свидетельствует о большей предрасположенности к образованию АКМ и повреждению тканей (Chen В.Х. et al., 1989). Продуцируемые ксантиноксидазой АКМ ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и др.) обладают выраженным провоспалительным действием (Battelli M.G. et al., 2014), способствуя образованию экссудата, адгезии и диапедезу моноклеарных клеток, а также последующей гиперэкспрессии КОР моноклеарами, продукции АКМ, пероксинитрита и цитокинов. При нарушении наружной мембраны митохондрий из межмембранного пространства выделяется термолабильный фактор, вызывающий необратимое превращение ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу (Saksela M. et al., 1999). Генерируемый ксантиноксидазой супероксид при высоких концентрациях является дополнительным индуктором апоптоза клеток.

Содержание мочевой кислоты достоверно повышено в плазме всех групп пациентов с первичным ГА (рис. 13, табл. 11): в I группе – на 44% ($p=0,004$), во II группе – на 53% ($p=0,003$), в III группе - на 57% ($p=0,004$), при этом уровень мочевой кислоты в СЖ не отличается между различными стадиями. В отличие от пациентов с первичным ГА, при ПТГА наблюдается увеличенное содержание МК в плазме, начиная со II группы

(тенденция, $p=0,08$), то же – для III группы (на 56%, $p<0,001$), в СЖ – содержание МК между группами не отличается (рис. 13, табл. 12). Обнаружено, что уровень МК в плазме при ПТГА положительно коррелирует с индексом массы тела пациента ($R=0,517$, $p=0,003$) и со стадией ГА ($R=0,370$, $p=0,04$).

Содержание мочевой кислоты в сыворотке крови уже обсуждалось в качестве фактора, тесно ассоциированного с тяжестью гонартроза (стадией по K/L) и интенсивностью болевого синдрома в общей выборке пациентов и только у женщин (Srivastava R.N. et al., 2013). С другой стороны, мочевая кислота является антиоксидантом: по своим антирадикальным свойствам мочевая кислота близка к енольным антиоксидантам и в то же время является эффективным хелатором ионов железа и меди, МК способна ингибировать пероксинитрит и главный продукт его расщепления радикал NO_2^{\cdot} , гидроксильные радикалы, $\text{O}_2^{\cdot-}$; аминокислоты связывают ионы металлов переменной валентности, образуя стабильные комплексы (Меньщикова Е.Б. и др., 2006).

Повышение уровня мочевой кислоты в плазме крови может являться следствием повышения активности ксантиноксидоредуктазы – действительно, при первичном ГА одновременное увеличение уровня МК и активности КОР наблюдаются во всех группах пациентов; а при ПТГА – только в группах II и III.

В работе (Denoble A.D. et al., 2011) было продемонстрировано, что в выборке пациентов с гонартрозом концентрация мочевой кислоты в СЖ высоко достоверно коррелировала с уровнями IL-18 и IL-1 β , что согласуется с тем фактом, что мочевая кислота является провоспалительным сигналом, участвующим в активации NALP3 инфламмосомы с последующей продукцией активных форм цитокинов IL-18 и IL-1 β . Согласно нашим данным, не наблюдается корреляционных связей между концентрациями IL-1 β и мочевой кислоты в плазме крови ($p=0,482$) или в СЖ ($p=0,892$).

Таким образом, нарушение баланса антиоксидантной системы и окислительный стресс, с одной стороны, и воспалительный компонент в патогенезе гонартроза, с другой стороны, могут быть связаны через мочевую кислоту и функционирование ксантиноксидоредуктазы.

3.3 Уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови при гонартрозе

Представленные данные, касающиеся нарушения редокс-равновесия в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с гонартрозом, подтверждаются результатами оценки уровня апоптоза лимфоцитов периферической крови методом проточной лазерной цитофлуориметрии (рис. 14). При помощи

цитофлуориметрического анализа FITC-меченные аннексины совместно с пропидиумом йодидом позволяют точно дифференцировать клетки, находящиеся на разных стадиях апоптоза и некроза. Согласно полученным результатам, процент лимфоцитов на стадии раннего апоптоза от общего их числа у здоровых лиц составляет 5,54 (5,35-6,2)%, у больных с первичным гонартрозом – 8,51 (6,15-10,08)%, что на 53% выше нормы ($p=0,013$), у больных с ПТГА – 8,85 (8,10-12,18)%, что на 60% выше нормы ($p<0,001$). Это свидетельствует о значительной интенсификации апоптоза лимфоцитов при гонартрозе как идиопатической, так и посттравматической природы.

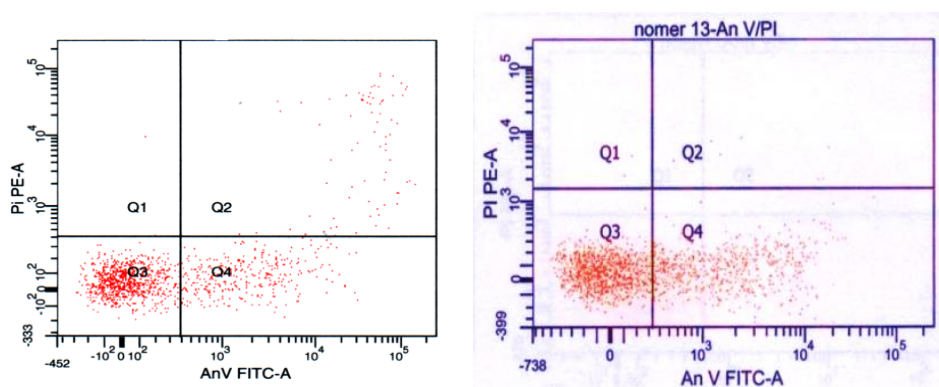


Рис. 14. Оценка уровня апоптоза лимфоцитов с помощью двойного окрашивания йодидом пропидия и аннексином V, меченным ФИТЦ (метод лазерной проточной цитофлуориметрии). Слева – контроль, справа - гонартроз

Известно, что митохондриальная дисфункция и апоптоз хондроцитов – типичные патогенетические события при артрозе. Roach H.I. с соавт. в 2004 г. предложили новый термин – хондроптоз – для обозначения особого типа клеточной гибели хондроцитов. Черты, которые в наибольшей степени отличают хондроптоз от классического апоптоза: увеличение, расширение шероховатого эндоплазматического ретикулума (ЭР) одновременно с увеличением размеров аппарата Гольджи; множество аутофагических вакуолей; выход клеточного материала в экстраклеточное пространство; конечная дезинтеграция клеточных остатков (Roach H.I. et al., 2004). В люмене ЭР локализуется каспаза-12, которая специфически активируется в клетках, подверженных стрессу ЭР, и способна активировать каспазу-9 без участия цитохрома *c* (Morishima N. et al., 2002). При нарушении функционирования ЭР (т.н. «стресс ЭР») может происходить активация определенных факторов транскрипции и изменение экспрессии генов, например, активация Nrf1, в неактивном состоянии заякоренного на мембране ЭР (Смирнова О.А. и др., 2011). Бенгус Л.М. считает, что лизосомальные протеазы так же важны в процессе хондроптоза, как каспазы – для апоптоза (Бенгус Л.М., 2012).

Электронно-микроскопические исследования подтверждают наличие в хрящевой ткани хондроцитов, находящихся как на ранних (целостная клеточная и ядерная оболочки), так и поздних стадиях (фрагментация ядра, апоптотические тельца) апоптоза (Внуков В.В., Кролевец И.В. и др., 2015).

Увеличенная экспрессия каспазы-3, играющей ведущую роль в процессе апоптоза, в суставном хряще наблюдается при артрозе у человека и хирургически индуцированной модели артроза у собак (Kim H.A. et al., 2000). Эта экспрессия коррелирует с процессами апоптоза хондроцитов. Апоптоз в воспаленном и поврежденном суставе может происходить и каспазо-независимым путем (Whiteman M. et al., 2007). При заболеваниях суставов инфильтрующие сустав лейкоциты продуцируют H_2O_2 и $HOCl$ – последний под действием фермента миелопероксидазы, $-HOCl$ вызывает быстрые конформационные изменения белка Вах, открытие пор во внешней митохондриальной мембране, выход и транслокацию в ядро проапоптотических факторов AIF и EndoG; активация каспаз не наблюдается.

Механические стимулы индуцируют выброс провоспалительных медиаторов ($IL-1\beta$, NO^*), матриксных металлопротеиназ в эксплантах хрящевой ткани (Kuhn K. et al., 2004), а травмирующее давление вызывает гибель хондроцитов. TUNEL-позитивные клетки могут быть выявлены сразу после травмы.

3.4. Содержание провоспалительных цитокинов в крови и синовиальной жидкости пациентов с первичным и посттравматическим гонартрозом

В результате проведенного анализа обнаружено увеличение на 47% ($p=0,007$) содержания $IL-1\beta$ в плазме крови общей выборки пациентов с гонартрозом, относительно показателя здоровых лиц (рис. 15, табл. 13). Увеличение концентрации $IL-1\beta$ в СЖ общей группы пациентов относительно плазмы крови здоровых лиц также статистически значимо (на 65%, $p=0,002$). Деление общей выборки пациентов на группы первичного и посттравматического ГА показало, что уровень $IL-1\beta$ в плазме крови увеличивается в 2 раза, т.е. более значительно, при первичном гонартрозе (на 82%, $p=0,017$), чем при посттравматическом гонартрозе (41%, $p=0,044$). При этом содержание цитокина и в плазме, и в СЖ между двумя группами пациентов не различается. Увеличение содержания $IL-1\beta$ в СЖ пациентов с первичным ГА (на 77%, $p=0,012$) также является более значительным, чем у пациентов с ПТГА (на 53%, $p=0,012$) по сравнению с плазмой крови здоровых лиц. Данные результаты свидетельствуют о том, что при первичном ГА

продукция провоспалительного цитокина IL-1 β более выражена, чем при посттравматическом гонартрозе.

Изучение патогенеза артроза позволило расценивать его как хроническое воспалительное заболевание, при котором важную роль играет дисбаланс цитокинов. Воспалительные изменения при артрозе включают гипертрофию синовиальной оболочки и инфильтрацию в нее смешанной популяции клеток, включая синовиальные макрофаги, активированные Т- и В-лимфоциты, продуцирующие провоспалительные цитокины (Goldring S.R., Goldring M.B., 2004). Предполагают, что воспалительный процесс в синовиальной оболочке вносит значительный вклад в возникновение боли и деградацию суставного хряща при артрозе. Синовиоциты, так же как хондроциты и инфильтрованные лейкоциты, являются главными клетками, вовлеченными в патогенез артроза (Sutton S. et al., 2009).

При сравнении пациентов с травмой передней крестообразной связки коленного сустава, которая является важнейшим фактором риска ГА, и здоровых лиц было обнаружено значительное увеличение содержания IL-1 β в синовиальной жидкости пациентов с травмой, при этом концентрация IL-1 β и тяжесть повреждения позитивно коррелировали (Marks P.H., Donaldson M.L., 2005). Однако такой корреляции не наблюдалось в настоящем исследовании ($p=0,45$). Результаты показывают, что уровень IL-1 β в СЖ коленного сустава умеренно увеличивается в начальный временной период после травмы передней крестообразной связки и не уменьшается даже через 3 месяца после травмы, следовательно, IL-1 β играет роль и при остром, и при хроническом воспалительном процессе. При этом концентрация IL-1 β в СЖ после травмы значимо выше по сравнению с показателем у здоровых людей (Bigoni M. et al., 2013).

Высказывалась идея о превентивном внутрисуставном введении ингибиторов IL-1 в травмированный или поврежденный сустав в целях предотвращения развития посттравматического гонартроза (Lawrence J.T.R. et al., 2011). Показано, что оперативное вмешательство на мениске приводит к возрастанию катаболической активности ткани мениска, а именно экспрессии генов *IL1*, *iNOS* и высвобождению NO $^{\circ}$, что может способствовать прогрессии ОА (Gupta T. et al., 2008). Более того, IL-1 приводил к возрастанию числа повреждений ДНК (разрывы, модификации пуринов и пиримидинов), что ассоциировалось с увеличенной продукцией NO $^{\circ}$; при добавлении СОД или ингибитора iNOS количество повреждений снижалось (Davies C.M. et al., 2008). Известно, что IL-1 β регулирует экспрессию генов ЦОГ2, MMP13, iNOS в хондроцитах и других типах клеток через индукцию и активацию большого количества транскрипционных

факторов, включая NF- κ B, AP-1, которые вовлечены в сигнальные пути, индуцируемые стрессом или воспалением. При этом интересно, что механические сигналы играют важнейшую роль в гомеостазе кости (Agarwal S. et al., 2003). Небольшие нагрузки ингибируют провоспалительные каскады, предотвращая транслокацию NF- κ B в ядро и транскрипционную активацию ряда провоспалительных генов. Наоборот, большие нагрузки индуцируют активацию провоспалительных генов.

Таблица 13

Содержание провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α в плазме крови и синовиальной жидкости обследованных групп пациентов с ГА и здоровых лиц

Группа / Показатель	ПТГА+первичный ГА	ПТГА	Первичный ГА	Контроль
IL-1 β , плазма, пг/мл $\Delta\%^k$	1,25(1,0-1,7) +47*	1,2(1,0-1,35) +41*	1,55(1,1-1,7) +82*	0,85(0,5-1,4)
IL-1 β , СЖ, пг/мл $\Delta\%^k$ (плазма здоровых людей)	1,4(1,2-1,7) +65*	1,3(1,2-1,7) +53*	1,5(1,1-2,0) +77*	-
TNF α , плазма, пг/мл $\Delta\%^k$	-	0,71(0-3,57)	-	2,29(1,0-3,43)
TNF α , СЖ, пг/мл $\Delta\%^k$	-	1,64(0,14-2,79)	-	-

Известно, что в норме суставные хондроциты продуцируют ограниченные количества IL-1 β , но при артрозе концентрация этого цитокина значительно увеличивается как в хондроцитах, так и в синовиоцитах. Хондроциты в хряще при артрозе экспрессируют IL-1, IL-1 β -конвертирующий фермент (каспаза-1), рецептор IL-1R (Goldring M.B., Goldring S.R., 2007). IL-1 β способен увеличивать продукцию NO \cdot индуцибельной NO-синтазой (iNOS) и других активированных кислородных метаболитов, таким образом, может усиливать образование пероксинитрита ONOO \cdot , который обуславливает, по крайней мере, часть повреждающих эффектов NO \cdot и может в конечном итоге привести к запуску апоптоза хондроцитов (Daheshia M., Yao J.Q., 2008).

IL-1 β и TNF α активируют экспрессию литических матриксных металлопротеиназ в хондроцитах, особенно MMP-1, -3, -8, -13, и агреканиз ADAMTS 4/5; в данном процессе воспалительной активации, вероятно, одну из ключевых ролей играет простагландин E2 (Gosset M. et al., 2010). Некоторые матриксные металлопротеиназы, например, MMP-1, -3, -9, -12, могут высвобождать активную форму TNF α из мембрано-заякоренного предшественника, а также протеолитически активировать/инактивировать IL-1 β (Elkington

P.T.G. et al., 2005). IL-1 β также индуцирует другие провоспалительные цитокины (IL-6, IL-17, IL-18) и подавляет экспрессию генов, ассоциированных с фенотипом дифференцированных хондроцитов, включая *COL2A1* (Goldring M.B., Goldring S.R., 2007).

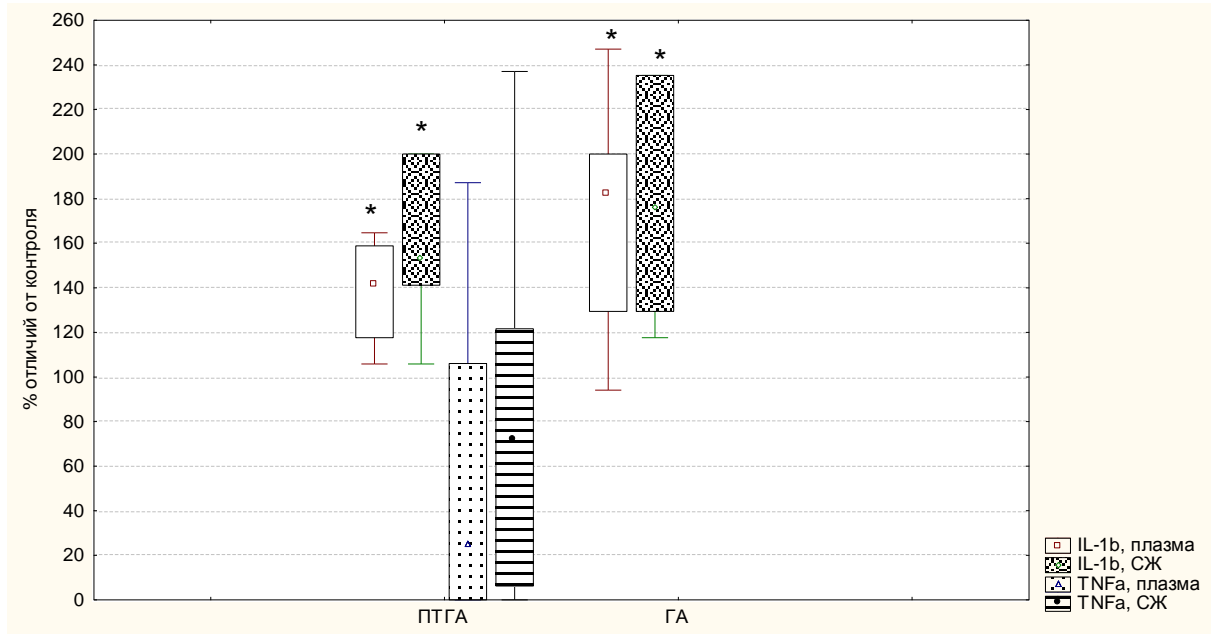


Рис. 15. Содержание цитокинов IL-1 β и TNF α в плазме крови и синовиальной жидкости при первичном и посттравматическом гонартрозе. * - достоверные различия относительно контроля.

IL-1 β тормозит экспрессию ингибиторов ММР (TIMP), синтез коллагена и протеогликанов, повышает экспрессию активатора плазминогена, стимулирует высвобождение некоторых эйкозаноидов, в т.ч. простагландинов и лейкотриенов, определяет уровень катаболического процесса при артрозе (Бадюкин В.В., 2013). IL-1 β участвует в ремоделировании костной ткани за счет активации остеокластов, модулирует активность различных болевых медиаторов, в т.ч. фактора роста нервов, простагландинов, субстанции Р. Для ингибирования выработки и активности IL-1 при артрозе в клинике используют диацереин (Балабанова Р.М., 2011). Выявленные различия уровней этого провоспалительного цитокина указывают на необходимость внутрисуставного применения фармакологических препаратов, блокирующих IL-1 β , при первичном и посттравматическом гонартрозе.

Проведенное исследование продемонстрировало, что содержание TNF α в плазме крови и СЖ пациентов с диагнозом посттравматический гонартроз не отличается от нормального показателя в плазме (соответственно, $p=0,281$; $p=0,894$), (табл. 13, рис. 15).

TNF α обнаруживается в СЖ пациентов с артрозом; подобно IL-1, он способен активировать в хондроцитах продукцию катаболических протеаз (Scanzello C.R., Goldring S.R., 2012). Многие авторы исследовали уровни экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α при артрозе. Так, было показано значительное увеличение уровней экспрессии IL-1 β и TNF α в группе пациентов с артроскопией коленного сустава по сравнению с группой артропластики коленного сустава (Benito M.J. et al., 2005). С другой стороны, продемонстрировано, что содержание TNF α в СЖ в период сразу после травмы передней крестообразной связки коленного сустава было очень низко, но со временем прогрессивно возрастало, что свидетельствует об участии TNF α в хроническом воспалительном процессе (Bigoni M. et al., 2013). С другой стороны, результаты некоторых работ демонстрируют, что IL-1 β и TNF α в СЖ при посттравматическом или первичном гонартрозе или не обнаруживаются, или остаются на очень низком уровне (Teunis T. et al., 2014).

Экспрессия IL-1 β и TNF α наблюдалась преимущественно в выстилающем и подлежащем слоях синовиальной оболочки при артроскопии коленного сустава, причем уровень этой экспрессии был выше у пациентов со стадиями 2,3 по K/L, чем со стадией 4 по K/L (Ning L. et al., 2011). В результате нашего исследования также установлена тенденция к достоверной отрицательной корреляции между содержанием TNF α в СЖ и стадией гонартроза ($R=-0,478$, $p=0,09$). В работе (Stannus O. et al., 2010) показано, что уровень TNF α в сыворотке крови ассоциирован с сужением суставной щели при остеоартрозе коленного сустава у пожилых людей. С другой стороны, согласно результатам (Orita S. et al., 2011), уровень TNF α в синовиальной жидкости не коррелировал со стадией гонартроза по шкале K/L, но был связан с показателями болевых ощущений пациентов по шкале WOMAC.

Исследования свидетельствуют о том, что стимуляция провоспалительными цитокинами IL-1 β и TNF α или механические стимулы приводят к активации транскрипционного фактора NF-kB через ИКК-зависимый канонический путь в суставных хондроцитах, который опосредует IL-1 β /TNF α -индуцируемую экспрессию генов MMP-1,-3,-13 (Roman-Blas J.A., Jimenez S.A., 2006). Показано, что лиганды рецептора PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) способны ингибировать продукцию провоспалительных медиаторов, в т.ч. IL-1 β и TNF α при артрозе и ревматоидном артрите,

что обуславливает терапевтические возможности применения данных лигандов, например, простагландина 15-d-PGJ2 (Giaginis C. et al., 2009). Цитокины IL-1 β и TNF α способствуют внутриклеточному окислительному стрессу путем индукции генерации АКМ; вносят вклад в процесс ангиогенеза, например, путем привлечения эндотелиальных клеток-предшественниц и миелоидных клеток (макрофагов), облегчения VEGF-индуцированной миграции и стимуляции продукции тканевого активатора плазминогена (Kvietys P.R., Granger D.N., 2012). Известно, что прогрессирование артроза может облегчаться за счет роста новых кровеносных сосудов из субхондральной кости в хрящевую ткань, остеохондрального ангиогенеза, который тесно связан с воспалением и сенситизацией нервных волокон, приводящей к развитию болевого синдрома (Bonnet C.S., Walsh D.A., 2005). Повреждения хряща вследствие травм коленного сустава очень часто сопряжены с другими патологическими состояниями сустава – разрывами передней крестообразной связки, травмами мениска – и приводят к возрастанию уровней провоспалительных цитокинов в синовиальной жидкости. TNF α усиливает эффект травмы хряща; однако в начальной временной фазе после грубой травмы хряща TNF α не провоцирует апоптоз хондроцитов, но вносит вклад в деградацию хряща после травмы посредством ранней индукции экспрессии гена MMP-1 (Hogrefe C. et al., 2012). Исследования *in vitro* свидетельствуют о том, что IL-1 β , TNF α или фрагменты фибронектина не могут индуцировать апоптоз в хондроцитах, если экстраклеточный матрикс (ЭКМ) не поврежден экспериментально (при культивировании хондроцитов) или вследствие патогенетических процессов при артрозе; таким образом, ЭКМ является необходимым фактором выживания хондроцитов (Fischer V.A. et al., 2000). При этом IL-1 β и TNF α по-разному регулируют активацию проапоптотических путей в культивируемых хондроцитах, полученных из хряща коленного сустава (Lopez-Armada M.J. et al., 2006). Так, TNF α в отличие от IL-1 β индуцировал постепенное увеличение экспрессии каспазы-1, -8 и расщепление поли(ADP-рибозо)полимеразы.

3.5. Анализ ассоциации полиморфных локусов генов интерлейкинов, матриксных металлопротеиназ, NO-синтаз и антиоксидантных ферментов с посттравматическим гонартрозом.

3.5.1. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов провоспалительных цитокинов *IL-1 β* , *TNF α* у пациентов с ПТГА и здоровых лиц. Анализ ассоциации содержания *IL-1 β* и *TNF α* с генотипом *T-31C IL-1 β* и *G-308A* гена *TNF α* .

Согласно результатам генотипирования, распределение частот встречаемости генотипов указанных локусов соответствует закону Харди-Вайнберга в контрольной группе – для полиморфизма *T-31C* промотора гена *IL-1 β* $\chi^2=1,28$, $p=0,26$; для полиморфизма *C+3953T* гена *IL-1 β* $-\chi^2=0,96$, $p=0,33$; и для полиморфизма *G-308A* гена *TNF α* $-\chi^2=0,62$, $p=0,43$.

Установлено, что частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфных локусов *T-31C* (rs1143627) и *C+3953T* (rs1143634) гена *IL-1 β* и *G-308A* (rs1800629) гена *TNF α* не различаются между группой пациентов с посттравматическим гонартрозом и контрольной группой (табл. 14).

Таблица 14.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных локусов генов провоспалительных цитокинов *IL-1 β* , *TNF α* у пациентов с посттравматическим гонартрозом и здоровых лиц

	Общая группа, %			Женщины, %		Мужчины, %	
	Контроль	ПТГА	Информация БД (ALFRED, NCBI, dbSNP)	Контроль	ПТГА	Контроль	ПТГА
<i>IL-1β T-31C</i> (rs1143627)							
ТТ	47,1	48,6	40,7	50,0	56,1	52,0	39,3
ТС	38,6	41,7	46,0	38,9	36,6	32,0	46,4
СС	14,3	9,7	13,3	11,1	7,3	16,0	14,3
Т	66,4	69,4	63,7	69,4	74,4	68,0	62,5
С	33,6	30,6	36,3	30,6	25,6	32,0	37,5
OR (95%CI)							
ТТ	1,06 (0,55-2,05)			1,28 (0,52-3,14)		0,60 (0,20-1,78)	
ТС	1,14 (0,58-2,23)			0,91 (0,36-2,28)		1,84 (0,60-5,65)	
СС	0,65 (0,23-1,81)			0,63 (0,13-3,03)		0,88 (0,19-3,94)	
Т	1,15 (0,70-1,89)			1,28 (0,63-2,59)		0,78 (0,35-1,75)	
С	0,87 (0,53-1,43)			0,78 (0,39-1,58)		1,28 (0,57-2,85)	
χ^2_1 (p)	0,72 (0,70)			0,46 (0,79)		1,19 (0,55)	
χ^2_2 (p)	0,30 (0,59)			0,47 (0,49)		0,35 (0,55)	
<i>IL-1β C+3953T</i> (rs1143634)							
СС	54,3	60,0	63,7	46,7	61,7	54,5	57,1
СТ	42,9	36,0	31,0	46,7	36,2	45,5	35,7

TT	2,8	4,0	5,3	6,6	2,1	0,0	7,2
C	75,7	78,0	79,2	70,0	79,8	77,3	75,0
T	24,3	22,0	20,8	30,0	20,2	22,7	25,0
OR (95%CI)							
CC	1,26 (0,56-2,84)			1,84 (0,57-5,95)		1,11 (0,27-4,52)	
CT	0,75 (0,33-1,70)			0,65 (0,20-2,10)		0,67 (0,16-2,75)	
TT	1,42 (0,14-14,13)			0,30 (0,02-5,19)		2,17 (0,10-48,86)	
C	1,14 (0,58-2,22)			1,69 (0,67-4,28)		0,88 (0,27-2,83)	
T	0,88 (0,45-1,72)			0,59 (0,23-1,50)		1,13 (0,35-3,64)	
χ^2_1 (p)	0,51 (0,77)			1,49 (0,47)		0,99 (0,61)	
χ^2_2 (p)	0,14 (0,71)			1,25 (0,26)		0,04 (0,83)	
<i>TNFα G-308A (rs1800629)</i>							
GG	72,3	68,4	67,3	68,0	64,7	71,4	73,5
GA	26,6	28,2	31,0	32,0	32,4	25,7	22,4
AA	1,1	3,4	1,8	0,0	2,9	2,9	4,1
G	85,6	82,5	82,7	84,0	80,9	84,3	84,7
A	14,4	17,5	17,3	16,0	19,1	15,7	15,3
OR (95%CI)							
GG	0,83 (0,46-1,50)			0,86 (0,40-1,87)		1,11 (0,42-2,92)	
GA	1,08 (0,59-1,99)			1,02 (0,47-2,22)		0,84 (0,30-2,30)	
AA	3,29 (0,36-29,96)			3,80 (0,18-80,85)		1,45 (0,13-16,61)	
G	0,79 (0,47-1,34)			0,81 (0,41-1,60)		1,03 (0,44-2,41)	
A	1,27 (0,75-2,15)			1,24 (0,63-2,46)		0,97 (0,42-2,26)	
χ^2_1 (p)	1,39 (0,50)			1,52 (0,47)		0,19 (0,91)	
χ^2_2 (p)	0,77 (0,38)			0,38 (0,54)		0,01 (0,94)	

Примечание. Здесь и далее: χ^2_1 – Критерий χ^2 при сравнении частот встречаемости генотипов в группах контроля и ПТГА, χ^2_2 – Критерий χ^2 при сравнении частот встречаемости аллелей в группах контроля и ПТГА. $p < 0,05$ выделены полужирным шрифтом.

IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra (антагонист рецептора IL-1) и два рецептора IL-1, тип 1 и 2 (IL-1RI, IL-1RII) кодируются единым кластером генов (соответственно, гены *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL1R1*, *IL1R2*), локализованными на хромосоме 2q14 (Smith A.J.P. et al., 2004). В промоторном регионе гена *IL-1 β* показаны точечные замены *T-31C*, *G-511A*, а в кодирующей части гена описан полиморфизм в пятом экзоне *C+3953T*. Ген *TNF* лежит внутри кластера генов МНС (major histocompatibility complex) на шестой хромосоме в регионе 6p23-q12. Описаны полиморфные замены (практически все – замена G→A) в участках промотора гена *TNF α* : -1031, -862, -574, -308 и др. (Коненков В.И., Смольникова М.В., 2003). Аллельные варианты в промоторных и интронных областях генов *TNF* и его рецепторов, а также гена *IL-1 β* могут быть ассоциированы с повышенной или пониженной продукцией цитокина, а также с развитием целого ряда заболеваний, ключевую роль в которых играют данные цитокины, например, ревматоидный артрит, инфекционные заболевания.

Группа авторов Smith A.J.P. et al. установила сцепление между девятью полиморфными локусами в промоторе гена *IL1R1*, восемью локусами в генном комплексе

IL1A-IL1B-IL1RN и их ассоциацию с гонартрозом. Исследование британских популяций показало, что один из распространенных гаплотипов кластера *IL1A-IL1B-IL1RN* в 2-4 раза повышает риск развития ГА (*2C-CTG-ITT*); другой (протективный) *IL1B-IL1RN* – в 4-5 раз его снижает (*CCA-ITT*). Таким образом, протективный гаплотип отличается от гаплотипа риска двумя аллелями – в локусах *-31T>C* и *-511G>A* гена *IL1B*. Следует отметить, что аллель *-31T* в отличие от *-31C* (полиморфизм rs1143627) создает дополнительный ТАТА-бокс, к которому присоединяется ТАТА-связывающий белок (ТВР), что усиливает экспрессию гена *IL1B*, одного из основных медиаторов воспаления в суставе с развивающимся артрозом. Таким образом, аллели *IL1B-31T* и *-511G* могут вносить вклад в гаплотип риска развития ГА (Smith A.J.P. et al., 2004). Кроме описанных замен гена *IL1B* в промоторе, описан также полиморфизм в пятом экзоне (*C+3953T*), аллель *T* которого, вероятно, ассоциирован с повышенной экспрессией указанного гена (Коненков В.И., Смольникова М.В., 2003).

С другой стороны, мета-анализ результатов нескольких исследований не показал влияния различных гаплотипов кластера *IL-1* на риск развития гонартроза (Moxley G. et al., 2009). В мета-анализ (Kerkhof H.J.M. et al., 2011) были включены результаты 6 опубликованных и 8 неопубликованных исследований, 3595 пациентов с артрозом тазобедренного сустава и 5013 пациентов с артрозом коленного сустава, соответственно 6559 и 9132 контрольных лиц. Мета-анализ не обнаружил ассоциации гаплотипа *C-G-C* (rs1143634, rs16944, rs419598) полиморфных локусов генов *IL1B* и *IL1RN* с риском возникновения артроза тазобедренного/коленного сустава. Обнаружено снижение частоты генотипа *IL-1β -31CC* у пациентов, перенесших острый инфаркт миокарда, с нормальным индексом массы тела относительно здоровых лиц; при этом ни в общей группе пациентов, ни в группе пациентов с увеличенным ИМТ не было выявлено различий относительно здоровых лиц (Шевченко А.В. и др., 2010).

Показано, что аллель *G* полиморфных локусов *-308G/A* и *-238G/A* гена *TNFα* ассоциирован с более высокими уровнями мРНК и растворимого *TNFα* у пациентов с гонартрозом (Munoz-Valle J.F. et al., 2014). В то же время, полиморфизм *-308G/A* гена *TNFα* не является маркером предрасположенности к гонартрозу в изученной западно-мексиканской популяции (Munoz-Valle J.F. et al., 2014), а также в турецкой популяции (Sezgin M. et al., 2008). В последней работе показано также, что данный полиморфизм не влияет на стадию гонартроза. В то же время, в работе (Han L. et al., 2012) была продемонстрирована тесная связь между носительством аллеля *-308A* локуса *-308G/A* гена *TNFα* и восприимчивостью к гонартрозу в корейской популяции. Было установлено, что

количество $TNF\alpha$, продуцируемого мононуклеарными клетками, постепенно снижается в зависимости от генотипа маркера $G-308A$ гена $TNF\alpha$ в направлении от гомозигот GG к гомозиготам AA (Гончарова И.А. и др., 2008). Вероятно, в культуре клеток и в организме человека, особенно у представителей различных популяций, на ассоциацию аллеля A с уровнем продукции белка влияет характер сцепления этого маркера с близлежащими локусами, например, локусом $HLA-DR$ (Гончарова И.А. и др., 2008).

Анализ возможных корреляционных связей с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена между генотипом полиморфизма $T-31C$ промотора гена $IL1b$, с одной стороны, и уровнем $IL-1\beta$ в плазме, с другой стороны, не дал статистически значимых результатов: для пациентов с ГА ($p=0,45$) и для здоровых лиц ($p=0,23$). Аналогичные результаты получены при анализе уровня $IL-1\beta$ в синовиальной жидкости пациентов с ГА и генотипом полиморфизма $T-31C$ ($R=-0,38$, $p=0,277$). Метод множественной регрессии с учетом возраста, пола, ИМТ пациента и стадии ГА подтвердил данные результаты. Согласно данным литературы, предполагается, что аллель $-31T$ в позиции -31 ТАТА-бокса промотора гена $IL1b$ увеличивает его транскрипционную активность за счет лучшего связывания с транскрипционными факторами, например, ТВР (TATA binding protein) (Chen H. et al., 2006). Однако, по мнению большинства исследователей, на сегодняшний день нет однозначного ответа на вопрос относительно того, $IL-1\beta$ $-31T$ или $IL-1\beta$ $-31C$ ответственен за повышенный уровень экспрессии белка, возможно, из-за тесного взаимодействия с другими SNP, типа $IL-1\beta$ $-511C>T$ (Chen H. et al., 2006).

Для определения связи между содержанием цитокина $TNF\alpha$ в плазме крови или синовиальной жидкости и генотипом локуса $G-308A$ гена $TNF\alpha$ использовалась множественная регрессия с учетом возраста, пола, индекса массы тела и рентгенологической стадии по К/Л (для пациентов с ПТГА). В результате анализа в уравнение регрессии ($R=0,543$, $p=0,08$) для зависимой переменной содержания $TNF\alpha$ в плазме у здоровых лиц был включен один статистически значимый предиктор: $y = 3,07 - 1,59x_1 - 0,766x_2$, где x_1 – генотип $G-308A$ ($p=0,032$): $GG - 0$, $GA - 1$, $AA - 2$, x_2 – пол ($p=0,265$): $0 -$ женский, 1 -мужской (табл. 15). Следовательно, мутантный аллель $-308A$ связан со снижением содержания цитокина $TNF\alpha$ в плазме здоровых лиц. Действительно, при стратификации здоровых лиц по генетическому признаку на две группы – $-308GG$ и $-308GA$ – получена тенденция к различию содержания $TNF\alpha$ в их плазме ($p= 0,051$): у лиц с генотипом $-308GG$ оно равнялось $2,93$ ($1,43-3,71$) пг/мл, у лиц с генотипом $-308GA$ – $1,0$ ($0-2,43$) пг/мл (рис. 16).

Для переменной содержания $TNF\alpha$ в плазме у пациентов с ГА в уравнение регрессии ($R=0,632$, $p=0,06$) были включены значимые предикторы - возраст ($\beta=0,645$, $SEM(\beta)=0,246$, $p=0,02$) и пол пациента ($\beta=0,592$, $SEM(\beta)=0,242$, $p=0,028$), а также генотип $G-308A$ ($\beta=-0,306$, $SEM(\beta)=0,212$, $p=0,17$).

Таблица 15.

Результаты множественного регрессионного анализа для содержания $TNF\alpha$ в плазме и СЖ пациентов с ПТГА и здоровых лиц

Зависимая переменная	Без учета возраста, пола, ИМТ, К/Л (для пациентов с ГА)		С учетом возраста, пола, ИМТ, К/Л (для пациентов с ГА)	
	Коэффициент линейной регрессии β для независимой переменной $G-308A$ гена $TNF\alpha$	P	Коэффициент линейной регрессии β для независимой переменной $G-308A$ гена $TNF\alpha$	P
$TNF\alpha$, плазма крови здоровых лиц	-0,476	0,053	-0,561	0,032
$TNF\alpha$, плазма крови пациентов с ПТГА	-0,192	0,144	-0,306	0,170
$TNF\alpha$, СЖ пациентов с ПТГА	-0,281	0,291	-0,362	0,198

В уравнение регрессии ($R=0,613$, $p=0,09$) для концентрации $TNF\alpha$ в СЖ больных ПТГА был включен генотип полиморфизма $G-308A$, однако он не был статистически значимым: $y = 4,58 - 0,06x_1 - 1,57x_2$, где x_1 – возраст ($p=0,163$); x_2 – генотип локуса $G-308A$ ($p=0,198$): $GG- 0$, $GA - 1$, $AA - 2$ (табл. 15). Однако при стратификации больных ПТГА на две группы – $-308GG$ и $-308GA/AA$ (носители мутантного аллеля) – оказалось, что концентрация $TNF\alpha$ в СЖ двух этих групп значимо различается ($p=0,028$): у пациентов с генотипом $-308GG- 2,0$ (0,79-4,14) пг/мл, у пациентов с генотипом $-308GA/AA - 0,22$ (0-0,72) пг/мл. Следует отметить, что корреляционный анализ двух переменных – уровня $TNF\alpha$ в СЖ и полиморфизма $G-308A$ гена $TNF\alpha$ - у больных ПТГА показал значимую отрицательную корреляцию между этими показателями ($R=-0,538$, $p=0,032$), (рис. 16).

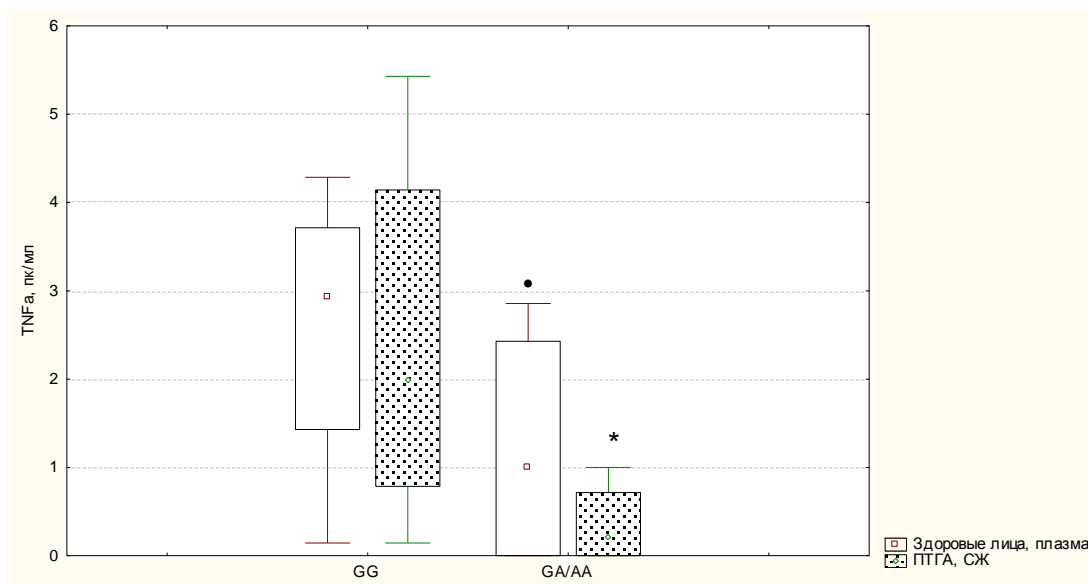


Рис. 16. Содержание цитокина $TNF\alpha$ в плазме здоровых лиц и СЖ пациентов с ПТГА с различными генотипами полиморфного локуса $G-308A TNF\alpha$

Таким образом, носительство мутантного аллеля $-308GA/AA$ приводит к снижению содержания $TNF\alpha$ в плазме крови здоровых лиц и в СЖ пациентов с ПТГА. При сравнении концентраций $TNF\alpha$ в плазме крови здоровых лиц и больных ПТГА с генотипом только $-308GG$ получено, что эти концентрации не отличаются; то же получено для генотипов $-308GA/AA$. Данные результаты согласуются с работой (Munoz-Valle J.F. et al., 2014), в которой было показано, что уровень экспрессии мРНК гена $TNF\alpha$ и уровни $TNF\alpha$ в сыворотке были повышены при генотипе GG по сравнению с генотипом GA у пациентов с гонартрозом. Такая же зависимость была продемонстрирована этими же авторами для пациентов с ревматоидным артритом. Результаты исследований здоровых лиц свидетельствуют о том, что лица-носители генотипа $-308GG$ имеют уровень $TNF\alpha$ выше по сравнению с генотипом $-308GA$ (Haddy N. et al., 2005), а также более высокий уровень экспрессии мРНК в лейкоцитах крови (Helmig S. et al., 2011).

3.5.2. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов матриксных металлопротеиназ $MMP-1$ и $MMP-12$ и тканевого ингибитора металлопротеиназ $TIMP-1$ у пациентов с ПТГА и здоровых лиц.

Согласно результатам генотипирования, распределение частот встречаемости генотипов $MMP/TIMP$ соответствует закону Харди-Вайнберга в контрольной группе – для локуса $-1607 1G/2G$ промотора гена $MMP-1$ - $\chi^2=0,06$, $p=0,81$; для локуса $A-82G$ гена $MMP-12$ - $\chi^2=0,32$, $p=0,57$; и для локуса $C536T$ гена $TIMP1$ - $\chi^2=0$, $p=1$. Разделение

пациентов с ПТГА и здоровых лиц по полу также не нарушало равновесие Харди-Вайнберга.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфных локусов *-1607 1G/2G* (rs1799750) гена *MMP-1* и *C536T* (rs1803571) гена *TIMP1* не различаются между группой пациентов с посттравматическим гонартрозом и контрольной группой (табл. 16). При этом после разделения по половому признаку обнаружены различия в частотах аллелей и генотипов локуса *-1607 1G/2G* у женщин с ПТГА и здоровых женщин. Оказалось, что генотип *2G/2G* в 3,07 раз повышает риск развития ПТГА у женщин.

Таблица 16.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных локусов генов матриксных металлопротеиназ *MMP-1* и *MMP-12* и тканевого ингибитора металлопротеиназ *TIMP-1* у пациентов с посттравматическим гонартрозом и здоровых лиц

	Общая группа, %			Женщины, %		Мужчины, %	
	Контроль	ПТГА	Информация БД (ALFRED, NCBI, dbSNP)	Контроль	ПТГА	Контроль	ПТГА
-16071G/2GMMP-1 (rs1799750)							
1G/1G	27,7	18,8	16,7	32,0	16,9	20,0	22,4
1G/2G	51,1	55,6	53,3	52,0	46,2	48,6	65,3
2G/2G	21,2	25,6	30,0	16,0	36,9	31,4	12,2
1G	53,2	46,6	56,7	58,0	40,0	44,3	55,1
2G	46,8	53,4	43,3	42,0	60,0	55,7	44,9
OR (95%CI)							
1G/1G	0,61 (0,32-1,16)			0,43 (0,18-1,04)		1,16 (0,40-3,36)	
1G/2G	1,20 (0,69-2,06)			0,79 (0,38-1,66)		1,99 (0,82-4,84)	
2G/2G	1,28 (0,67-2,43)			3,07 (1,24-7,62)		0,30 (0,10-0,93)	
1G	0,77 (0,52-1,13)			0,48 (0,28-0,82)		1,54 (0,83-2,86)	
2G	1,30 (0,89-1,91)			2,07 (1,22-3,52)		0,65 (0,35-1,20)	
χ^2_1 (p)	2,41 (0,30)			7,38 (0,03)		2,29 (0,13)	
χ^2_2 (p)	1,82 (0,18)			7,34 (0,007)		1,91 (0,17)	
A-82G MMP-12 (rs2276109)							
AA	77,7	66,7	79,6	80,0	64,7	77,1	69,4
AG	20,2	24,8	19,5	18,0	27,9	20,0	20,4
GG	2,1	8,5	0,9	2,0	7,4	2,9	10,2
A	87,8	79,1	89,4	89,0	78,7	87,1	79,6
G	12,2	20,9	10,6	11,0	21,3	12,9	20,4
OR (95%CI)							
AA	0,58 (0,31-1,07)			0,46 (0,20-1,08)		0,67 (0,25-1,82)	
AG	1,30 (0,68-2,51)			1,77 (0,72-4,32)		1,03 (0,35-3,02)	
GG	4,30 (0,92-20,13)			3,89 (0,44-34,38)		3,86 (0,43-34,63)	
A	0,53 (0,31-0,90)			0,46 (0,22-0,96)		0,58 (0,24-1,35)	
G	1,90 (1,11-3,25)			2,19 (1,04-4,64)		1,74 (0,74-4,09)	
χ^2_1 (p)	4,76 (0,03)			3,77 (0,05)		1,26 (0,26)	

χ^2_2 (p)	5,58 (0,02)			4,36 (0,04)		1,63 (0,2)	
<i>C536TTMMP1(rs1803571)</i>							
CC	100	98,2	99,0	100	96,4	100	100
CT	0	1,8	1,0	0	3,6	0	0
TT	0	0	0	0	0	0	0
C	100	99,1	99,0	100	98,2	100	100
T	0	0,9	1,0	0	1,8	0	0
OR (95% CI)							
CC	0,32 (0,01-8,07)			0,35 (0,01-8,88)		1,46 (0,03-76,97)	
CT	3,11 (0,12-77,93)			2,89 (0,11-74,17)		0,69 (0,01-36,25)	
TT	1,02 (0,02-52,18)			0,93 (0,02-48,56)		0,69 (0,01-36,25)	
C	0,32 (0,01-8,05)			0,35 (0,01-8,84)		1,46 (0,03-75,55)	
T	3,08 (0,12-76,43)			2,84 (0,11-71,23)		0,68 (0,01-35,26)	
χ^2_1 (p)	1,03 (0,6)			0,95 (0,62)		0 (1)	
χ^2_2 (p)	1,02 (0,31)			0,94 (0,33)		0 (1)	

Гены MMP-1, -3, -7, -8, -10, -12, -13 локализованы единым кластером на длинном плече хромосомы 11 (Chen Y. et al., 2012). Показано, что полиморфные аллели генов матриксных металлопротеиназ влияют на уровни экспрессии этих генов и могут быть связаны с теми или иными дегенеративными патологиями.

Для гена *MMP-1* (коллагеназа-1) известен полиморфный локус *-1607(1G/2G)* в области промотора (rs1799750). Наличие *2G* создает дополнительный сайт (5'-GGA-3') для транскрипционных факторов семейства Ets и ведет к значительному усилению транскрипционной активности и как следствие повышенной продукции про-MMP-1 (Rutter J.L. et al., 1998). Наоборот, при *1G* варианте инсерция гуанилового остатка в промоторе не наблюдается, в данном случае отмечается транскрипционный уровень ниже базального. В то же время, некоторые работы содержат противоречивые данные об ассоциации полиморфных локусов *MMP-1* с суставными заболеваниями: так, группа Taskin N. et al. не нашли взаимосвязи данного полиморфизма *-1607(1G/2G)* в промоторе гена *MMP-1* и частоты заболеваний височно-нижнечелюстного сустава, в то время, как исследователи Planello A.C. et al. показали, что генотип *2G/2G* является маркером повышенного риска возникновения этой патологии относительно генотипов *1G/2G* и *1G/1G* (Taskin N. et al, 2011; Planello A.C. et al., 2011). Возможными причинами этих противоречий могут быть гетерогенная природа генетических заболеваний и отдаленность изучаемых популяций.

Исходя из данных литературы, показанная нами ассоциация генотипа *2G/2G* гена *MMP1* с риском развития ПТГА у женщин может быть связана с увеличением продукции MMP-1 и, вследствие этого, с активацией катаболических процессов в синовиальной среде сустава. Согласно результатам нашего исследования, получены значимые различия частот встречаемости аллелей локуса *A-82G* (rs2276109) гена *MMP-12* в общих выборках

пациентов с ПТГА и здоровых лиц, а также только у женщин. Таким образом, отмечается ассоциация данного полиморфизма с развитием ПТГА. Так, аллель *-82G* гена *MMP-12* ассоциирован с посттравматическим гонартрозом, поскольку наличие данного аллеля увеличивает в 1,90 раза риск развития патологии в общей выборке. Аллель *-82A* может иметь «протективное» значение (табл. 16).

Известно, что женщины более подвержены развитию гонартроза, чем мужчины. Возможными причинами этого факта являются анатомические (меньший объем хрящевой ткани), генетические и гормональные (колебания уровня эстрогенов) характеристики женщин, по сравнению с мужчинами (Name S.L., Alexander R.A., 2013). Многие авторы предполагают, что эстрогены могут серьезно влиять на развитие артроза, а эстрогеновая заместительная терапия может играть протективную роль при артрозе, однако, эти протективные эффекты эстрогенов были продемонстрированы не во всех исследованиях (Riancho J.A. et al., 2010). В работе Riancho J.A. et al. изучалось влияние полиморфных замен двух генов, связанных с эстрогеновым обменом: *C/G* в гене *CYP19A1*(rs1062033), кодирующем фермент ароматазу, который превращает андрогеновые предшественники в эстрогены в периферических тканях; и *-397C/T* в гене *ESR1*, эстрогенового рецептора 1 (rs2234693). Оказалось, что оба изученных локуса являются маркерами повышенного риска развития артроза. Генотип чувствительности приводит к уменьшению экспрессии *CYP19A1* в костных препаратах пациентов с артрозом. Стратификационный анализ показал, что влияние полиморфных замен гена *CYP19A1* более важно для женщин, чем для мужчин, и в случае гонартроза более, чем в случае артроза тазобедренного сустава.

В то время, как роль некоторых матриксных металлопротеиназ (MMP-1, -3, -9, -13) в деградации хряща достаточно изучена, уровни экспрессии и роль MMP-12 (макрофагальной металлоэластазы) в хондроцитах и синовиоцитах пока слабо охарактеризованы. Матриксная металлопротеиназа 12 (MMP-12) входит в отдельную подгруппу MMP, и как все матриксные металлопротеиназы, синтезируется в виде профермента, имеет ионы Zn^{2+} в активном центре и консервативные последовательности, а также С-гемопексиноподобный домен, отвечающий за субстратную специфичность (Ганусевич И.И., 2010). Ген *MMP-12* картирован в области 11q22.2-22.3 и включает 10 экзонов и 9 интронов; промотор гена имеет сайты взаимодействия с такими факторами транскрипции, как TCF-4, LBP- сайт, сайт AP-1, ТАТА бокс (Yamana K. et al., 2005). В промоторе гена *MMP-12* найдено несколько полиморфных локусов, значительно влияющих на экспрессию: *A-82G*; *-1079T ins/del*; *C-1839G* (Johnson M., Toms S., 2005).

Показано, что гиперэкспрессия MMP-12 у трансгенных кроликов значительно расширяла область хряща, пораженную артрозом, и приводила к значительной

инфильтрации макрофагов на ранней стадии, дегенерации суставного хряща с истощением протеогликанов на поздних стадиях (Wang X. et al., 2004). Иммуногистохимические анализы свидетельствуют об экспрессии MMP-12 в хряще и субхондральной кости пациентов с артрозом, что не наблюдается в норме; при этом с утяжелением патологии экспрессия распространяется от хряща к кости и прослеживается в апоптотических остеоцитах субхондральной кости (Kaspiris A. et al., 2012). Показано, что MMP-12 действует как модулятор функций других MMP; например, усиливает экспрессию и активацию MMP-9 в суставных хондроцитах человека, обработанных провоспалительным цитокином IL-1 (Oh H. et al., 2008).

Известна роль MMP-12 в воспалении и ангиогенезе, т.е. росте новых кровеносных сосудов (Jorgmsjo S. et al., 2000). Данные процессы являются взаимосвязанными событиями в патофизиологии артроза: при ангиогенезе чувствительные нервные окончания внедряются в хрящевую ткань, при воспалении эти нервные окончания подвергаются сенситизации, в результате чего возникает болевой синдром (Bonnet C.S., Walsh D.A., 2005). Ангиогенез и экспрессия литических металлопротеиназ могут стимулироваться провоспалительными цитокинами в начальный период после травмы коленного сустава, тем самым способствуя развитию посттравматического артроза. Ангиогенез способствует посттравматическому ремоделированию субхондральной кости и формированию остеофитов; одновременно с этим фрагменты суставного хряща (фрагменты фибронектина), проникающие в синовиальную жидкость, служат хемоаттрактантами для активированных макрофагов (Cattano N.M. et al., 2013). Матриксная металлопротеиназа-12 секретируется активированными и инфильтрующими макрофагами, среди ее белковых субстратов можно назвать эластин, фибронектин, ламинин, коллаген IV типа, плазминоген (Rodriguez D. et al., 2010). Полиморфная замена $A \rightarrow G$ в точке -82 промотора гена *MMP-12* (аллель -82A более распространен) влияет на аффинность транскрипционного фактора AP-1, и, следовательно, транскрипционную активность промотора этого гена (Ye S., 2000). Аллель -82A обладает большим сродством к AP-1 и большей транскрипционной активностью в различных макрофагальных клеточных линиях. Аллель -82A ассоциирован с такими патологиями, как сужение коронарных артерий при сердечной недостаточности, диабете (Jorgmsjo S. et al., 2000). Обсуждалась роль этого полиморфизма в связи с риском новообразований (Shin A. et al., 2005) и легочных заболеваний (Van Diemen C.C. et al., 2011). В работе (Kader K.A. et al., 2007) было показано, что генотип GG полиморфизма A-82G связан с возможной потерей ангиостатического эффекта, т.е. угнетения ангиогенеза, матриксной металлопротеиназой-12 и риском новообразований. Белок ангиостатин, образующийся путем расщепления плазминогена макрофагальной металлоэстеразой,

является ингибитором ангиогенеза (Cornelius L.A. et al., 1998). Интересно, что уровень синовиального ангиостатина был выше при воспалительном артрите коленного сустава, чем при гонартрозе, несмотря на тот факт, что процесс ангиогенеза более выражен при артритах (Gok M. et al., 2013). Поскольку воспаление, рост кровеносных сосудов в синовиальной среде сустава, их иннервация и сенситизация особенно характерны для посттравматического артроза, то данный полиморфизм гена *MMP-12* может влиять на предрасположенность к развитию гонартроза после травмы. Показано, что посттравматический гонартроз характеризуется, по крайней мере, такой же высокой генетической предрасположенностью, как первичный артроз, не связанный с травматическими повреждениями (Valdes A.M. et al., 2013). Проведенное исследование продемонстрировало, что с развитием ПТГА ассоциирован аллель *-82G* гена *MMP-12*, который, согласно литературным данным, приводит к сниженной экспрессии катаболического фермента, но, с другой стороны, тем самым может оказывать влияние на процессы ангиогенеза и рекрутинга активированных макрофагальных клеток. Показано, что гипоксия посредством активации транскрипционного фактора *HIF-2 α* способна индуцировать экспрессию хондроцитами генов матриксных металлопротеиназ, в т.ч. *MMP12*, а также *NOS2* (Yang S. et al., 2010).

Существуют свидетельства того, что нарушение баланса между активированными матриксными металлопротеиназами и их тканевыми ингибиторами (TIMP) играет важную роль в разрушении и ремоделировании суставного хряща у пациентов с артропатологиями. Баланс между количествами MMP и TIMP в синовиальной жидкости и прилегающих тканях может быть мерой повреждения хрящевого матрикса в результате деятельности матриксных металлопротеиназ. Было показано, что эндотелий синовиальной оболочки при ревматоидном артрите синтезирует значительно меньшие уровни тканевого ингибитора металлопротеиназ TIMP1 по сравнению с эндотелием в норме (Jackson C.J et al., 1998).

Ген *TIMP1* локализован на X-хромосоме (Xp11.3-p11.23), имеет 6 экзонов, его транскрипция индуцируется различными цитокинами и гормонами. Уникальной особенностью гена *TIMP1* является его расположение внутри интрона 6 гена синапсина I, транскрибируется *TIMP1* в обратном направлении (NCBI Genes & Expression Database). Внутри гена *TIMP1* имеются два региона, подавляющие его транскрипцию, - в промоторе и интроне 1 (Dean G. et al., 2000). В последнем шестом экзоне, в единственном регионе гена *TIMP1*, ответственном за связывание и предотвращение активации MMP-9, расположен точечный полиморфизм миссенс-мутация *C536T (Ile158Ile)*, который не изменяет аминокислотную последовательность белка TIMP-1, но может оказывать

влияние на сплайсинг. Данный полиморфизм связан с повышенным риском развития астмы у австралийских женщин (Lose F. et al., 2005). Согласно результатам проведенного исследования, частота встречаемости данного полиморфизма *C536T* низка и среди здоровых лиц, и среди пациентов с ПТГА; не наблюдается ассоциации *C536T* с риском ПТГА (табл. 16).

3.5.3. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов NO-синтаз (*nNOS*, *eNOS3*) у пациентов с ПТГА и здоровых лиц. Анализ ассоциации уровня маркеров нитрозильного стресса и полиморфных локусов генов NO-синтаз.

Согласно результатам генотипирования, распределение частот встречаемости генотипов соответствует закону Харди-Вайнберга в контрольной группе – для локуса *G-84A* гена *nNOS* - $\chi^2=3,05$, $p=0,08$; *T-786C* гена *eNOS* – $\chi^2=0,46$, $p=0,5$; *G7958A* гена *SOD1* - $\chi^2=0,39$, $p=0,53$; *T58C* гена *SOD2* - $\chi^2=0,01$, $p=0,93$; *C-262T* гена *CAT* - $\chi^2=0,21$, $p=0,65$; *Ile105Val* гена *GSTP1*- $\chi^2=3,62$, $p=0,06$. Разделение пациентов с ПТГА и здоровых лиц по половому признаку также не нарушает равновесие Харди-Вайнберга.

Установлено, что частоты встречаемости аллелей полиморфного локуса *-84G>A* гена *nNOS* значительно различаются между пациентами с ПТГА и контрольной группами (табл. 17). Таким образом, аллель *-84A* гена *NOS1* ассоциирован с посттравматическим гонартрозом, поскольку наличие данного аллеля увеличивает в 2,02 раза риск развития патологии. Аллель *-84G* может иметь «протективное» значение.

Таблица 17.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных локусов генов NO-синтаз (*NOS1*, *NOS3*) у пациентов с посттравматическим гонартрозом и здоровых лиц

	Общая группа, %			Женщины, %		Мужчины, %	
	Контроль	ПТГА	Информация БД (ALFRED, NCBI, dbSNP)	Контроль	ПТГА	Контроль	ПТГА
<i>nNOSG-84A</i> - rs не найден в dbSNP, частоты генотипов по (Saur D.et al., 2004)							
GG	85,1	70,1	82,7	79,6	69,1	88,6	72,0
GA	12,8	28,2	16,0	16,3	29,4	11,4	26,0
AA	2,1	1,7	1,2	4,1	1,5	0	2,0
G	91,5	84,2	82,7	87,8	83,8	94,3	85,0
A	8,5	15,8	17,3	12,2	16,2	5,7	15,0
OR (95%CI)							
GG	0,41 (0,21-0,82)			0,57 (0,24-1,36)		0,33 (0,10-1,11)	
GA	2,68 (1,30-5,56)			2,14 (0,85-5,36)		2,72 (0,81-9,21)	
AA	0,80 (0,11-5,79)			0,35 (0,03-3,98)		2,15 (0,09-54,37)	
G	0,50 (0,27-0,92)			0,72 (0,34-1,54)		0,34 (0,11-1,08)	
A	2,02 (1,08-3,76)			1,38 (0,65-2,95)		2,91 (0,92-9,19)	
χ^2_1 (p)	5,06 (0,02)			3,22 (0,2)		3,60 (0,17)	

χ^2_2 (p)	7,41 (0,02)		0,71 (0,4)		3,58 (0,06)	
<i>eNOS</i> -786T>C (rs2070744)						
TT	35,1	29,6	39,1	34,0	28,3	37,1 31,9
TC	51,1	50,9	50,0	50,0	53,3	48,6 46,8
CC	13,8	19,4	10,9	16,0	18,4	14,3 21,3
T	60,6	55,1	64,1	59,0	55,0	61,4 55,3
C	39,4	44,9	35,9	41,0	45,0	38,6 44,7
OR (95%CI)						
TT	0,78 (0,43-1,41)		0,77 (0,34-1,73)		0,79 (0,32-1,99)	
TC	0,99 (0,57-1,73)		1,14 (0,54-2,42)		0,93 (0,39-2,24)	
CC	1,50 (0,71-3,20)		1,18 (0,43-3,20)		1,62 (0,50-5,26)	
T	0,80 (0,54-1,18)		0,85 (0,50-1,45)		0,78 (0,41-1,46)	
C	1,26 (0,84-1,87)		1,18 (0,69-2,01)		1,29 (0,69-2,42)	
χ^2_1 (p)	1,41 (0,49)		0,43 (0,81)		0,71 (0,7)	
χ^2_2 (p)	1,27 (0,26)		0,36 (0,55)		0,61 (0,43)	

В кодирующем регионе гена нейрональной NO-синтазы (*nNOS*), локализованного на участке 12q24.22 и насчитывающего 35 экзонов, обнаружено 19 полиморфных локусов; 3 SNP были идентифицированы в экзоне 1c, только один из них, -84G>A, является функционально значимым и снижает уровень транскрипции гена на 30% (Serra A. et al., 2011; Saur D. et al., 2004). В целом в гене *nNOS* насчитывается по крайней мере 124 SNP, при этом ни одного в кодирующем регионе. Ген *eNOS* локализован на участке хромосомы 7q35-36 и содержит 26 экзонов, на сегодняшний день идентифицированы около 400 полиморфных локусов в этом гене (Liu D. et al., 2014; Ryk C. et al., 2011). Полиморфизм -786T>C в промоторе гена *eNOS* имеет частоту минорного аллеля среди представителей европеоидной расы - 0,30 - и ассоциирован с сердечно-сосудистыми патологиями, диабетической нефропатией и раком простаты и молочной железы (Ryk C. et al., 2011). Анализ литературы показывает, что ассоциации полиморфных локусов генов NO-синтаз с развитием артроза не изучены.

Известно, что нейрональная NO-синтаза (nNOS) функционирует в различных типах клеток за пределами нервной системы. Для *nNOS*-нокаутных мышей характерны нарушения желудочно-кишечного тракта, а также замедленный рост и меньшая длина трубчатых костей. Хрящевая ткань таких мышей содержит уменьшенное количество хондроцитов с преждевременным завершением клеточного цикла и повышенным уровнем апоптоза (Amin A.R. et al., 1995; Saur D. et al., 2004; Yan Q. et al., 2012). В работе (Van't Hof et al., 2004) продемонстрировано, что *nNOS*-нокаутные мыши имели увеличенную минеральную плотность костной ткани, но сниженные темпы ее обмена, что связывают с важной ролью данной изоформы в регуляции этих процессов (Van't Hof R.J. et al., 2004).

Точечная замена в позиции -84G>A экзона 1c промотора гена *nNOS*, вероятно, вносит вклад в снижение экспрессии гена *nNOS*: генотип -84AA и аллель -84A связаны со

сниженной на 30% экспрессией *nNOS*, что ослабляет важнейший сигнальный путь NO/cGMP/cGMP-зависимые киназы (Miao X. et al., 2010). Известно, что этот путь подавляет активность каспаз, частично благодаря регуляции генов семейства Bcl-2 (Olson S.Y., Garban H.J., 2008). Таким образом, репрессия данного пути может привести к активации каспазного каскада и индукции апоптоза. Аллель *A* полиморфизма *-84G>A*, согласно результатам нашего исследования, встречается в группе пациентов с ПТГА в 1,86 раза чаще по сравнению со здоровыми людьми; можно предположить сопряженное снижение экспрессии гена *nNOS* и изменение регуляции соответствующих каскадов, например, каспазного каскада апоптотической гибели. Интересно, что согласно некоторым данным, NO-синтаза может быть ассоциирована с внутренней митохондриальной мембраной (т.н. митохондриальная NOS) и являться миристоилированным и фосфорилированным продуктом гена *nNOS* (Elfering S.L. et al., 2002).

Статистически значимых различий частот генотипов и аллелей полиморфизма *-786T>C* гена *NOS3* между группами пациентов с гонартрозом и здоровых лиц в исследовании не установлено (табл. 17). С использованием люциферазного теста было показано, что замена *T→C* в позиции *-786* приводит к значительному уменьшению активности промотора гена *NOS3*, соответственно к снижению экспрессии, и вносит вклад в предрасположенность пациентов с мутантным генотипом к развитию коронарного спазма (Nakayama M. et al., 1999).

Для определения связи между уровнем нитрозильного стресса и генотипом пациентов использовался множественный регрессионный анализ. В качестве зависимой переменной было принято содержание нитритов/нитратов (NO_x^-) в плазме или СЖ, в качестве независимых переменных - пол, возраст, индекс массы тела, рентгенологическая стадия заболевания и генотип полиморфных локусов *-786T>C NOS3* и *-84G>A NOS1*. В результате для зависимой переменной - NO_x^- в плазме крови - в уравнение регрессии ($R=0,584$, $p=0,043$) был включен генотип полиморфизма *-786T>C NOS3*, однако, этот предиктор не был статистически значимым ($p=0,322$). Из всех переменных в уравнение регрессии ($R=0,567$, $p=0,014$) для содержания NO_x^- в синовиальной жидкости были также включены два предиктора: $y = 2,5 - 0,199x_1 + 0,023x_2$, где x_1 - генотип полиморфизма *-786T>C NOS3* ($p=0,049$): *TT* - 0, *TC* - 1, *CC* - 2, x_2 - ИМТ ($p=0,08$). Результаты данного математического моделирования свидетельствуют о том, что генотип полиморфизма *-786T>C NOS3* статистически достоверно связан с концентрацией нитритов/нитратов в СЖ при посттравматическом гонартрозе. Сравнив уровни содержания NO_x^- в СЖ трех групп пациентов с различными генотипами (*-786 TT, TC, CC*), обнаружена тенденция к

различию этих трех групп ($N=5,9$, $p=0,0523$): при генотипе *TT* содержание NO_x^- составило 23,13 (21,78-26,64) мкМ/л, при генотипе *TC* – 22,38 (13,82-23,68) мкМ/л, при генотипе *CC* – 11,22 (11,09-16,70) мкМ/л. Эти результаты согласуются с данными литературы о снижении активности промотора гена у здоровых лиц носителей мутантного аллеля *C* (Nakayama M. et al., 1999). Пациенты с диабетом, имеющие генотип *TC*, также характеризуются более низким уровнем образования NO , чем гомозиготы *TT* (Welkriana P.W. et al., 2011). Протеомный и экспрессионный анализ культуры эндотелиальных клеток человека с генотипом двух видов – *TT* и *CC* показывает, что клетки с генотипом *CC* обладают сниженной экспрессией *NOS3* и сниженной способностью к синтезу NO^* , по сравнению с клетками, имеющими генотип *TT* (Asif A.R. et al, 2009). Концентрация NO_x^- в плазме крови у здоровых людей и пациентов с глаукомой в египетской популяции также была значительно меньше при генотипе (*TC+CC*), по сравнению с генотипом *TT* полиморфизма *-786T>C NOS3* (Emam W.A. et al., 2014).

Иммунологическими методами показано, что наличие нитротирозина, который является индикатором окислительных повреждений, в образцах хрящевой ткани обезьян и человека ассоциировано со старением хряща и с развитием ОА (Loeser R.F. et al., 2002). Была обнаружена позитивная корреляция между уровнем нитротирозина в образцах хрящевой ткани и содержанием $\text{IL-1}\beta$; при этом в некоторых участках хряща, взятых от более пожилых лиц, отмечалось наличие нитротирозина одновременно с отсутствием $\text{IL-1}\beta$, что свидетельствует о возраст-обусловленном окислительном повреждении, не зависящем от $\text{IL-1}\beta$ (Loeser R.F. et al., 2002). Согласно нашим результатам, можно говорить о тенденции того, что содержание $\text{IL-1}\beta$ и нитритов/нитратов NO_x^- в плазме крови общей выборки пациентов с ГА находятся в положительной корреляционной зависимости ($R=0,433$, $p=0,064$), при этом уровень NO_x^- не зависит от возраста пациента ($p=0,99$). Для СЖ такая зависимость не была обнаружена ($p=0,926$).

3.5.4. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов антиоксидантных ферментов *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GSTP1* у пациентов с ПТГА и здоровых лиц. Анализ ассоциации активности ферментов супероксиддисмутазы, каталазы, глутатион-S-трансферазы полиморфных локусов генов *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GSTP1*.

Статистически значимых различий частот генотипов и аллелей полиморфных замен генов *SOD1* и *SOD2* между группами пациентов с ПТГА и здоровых лиц не было установлено (табл. 18). Ген *SOD1* (*Cu,Zn-SOD*) человека расположен в области хромосомы

21q22, состоит из 5 экзонов и 4 интронов (Miao L., Clair D.K., 2009). Генотип полиморфизма *G7958A* в интроне 1 гена *SOD1*, вероятно, влияет на уровень экспрессии и альтернативный сплайсинг *СОD1*, при этом была установлена ассоциация мутантного аллеля *-7958A* с более высоким риском развития рака желудка у китайцев (Yi J.-F. et al., 2010). В другой работе (Han L. et al., 2013) такой ассоциации и корреляции полиморфизма *G7958A* гена *SOD1* с уровнем экспрессии данного гена не было обнаружено для корейской популяции. Ген *SOD2* локализован на участке 6q25.3 и имеет 5 экзонов и 4 интрона. Потенциально важной полиморфной заменой является замена аминокислоты изолейцина на треонин в позиции 58 аминокислотной последовательности белка MnSOD (замена *C→T* в позиции 339 экзона 3 в нуклеотидной последовательности). *58Thr* в молекуле белка менее устойчив и более подвержен инактивации путем реакций S-тионилирования, по сравнению с *58Ile*, за счет изменений тетрамерной структуры MnSOD. Клетки раковой опухоли с генотипом *58IleIle MnSOD* характеризуются повышением в 3 раза активности данного фермента относительно *58ThrThr MnSOD* при одинаковом уровне белка (Miao L., Clair D.K., 2009; Borgstahl G.E. et al., 1996). Проведенное генотипирование показало, что данный полиморфизм встречается достаточно редко: среди обследованных пациентов с ПТГА и здоровых людей только один пациент имел гомозиготную мутацию в гене *SOD2 (ThrThr)* и двое (один в выборке «случай», один – в выборке «контроль») характеризовались гетерозиготной мутацией – *IleThr*. Эти данные согласуются с данными о частотах встречаемости генотипов локуса *Ile58Thr* в других популяциях; так, анализ выборки из 248 человек тайской популяции не выявил ни одного случая наличия генотипов *IleThr* или *ThrThr* (Attatipraholkun W., Wikainarakul K., 2013).

Таблица 18.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных локусов генов антиоксидантных ферментов *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GSTP1* у пациентов с посттравматическим гонартрозом и здоровых лиц

	Общая группа, %			Женщины, %		Мужчины, %	
	Контроль	ПТГА	Информация БД (ALFRED, NCBI, dbSNP)	Контроль	ПТГА	Контроль	ПТГА
<i>SOD1 G7958A (rs4998557)</i>							
GG	71,8	77,9	79,7	82,5	80,0	57,1	75,0
GA	26,9	19,2	18,6	17,5	15,0	39,3	25,0
AA	1,3	2,9	1,7	0	5,0	3,6	0
G	85,3	87,5	89,0	91,3	87,5	76,8	87,5
A	14,7	12,5	11,0	8,7	12,5	23,2	12,5

OR (95%CI)							
GG	1,38 (0,70-2,72)			0,85 (0,30-2,38)		2,25 (0,82-6,20)	
GA	0,65 (0,32-1,30)			0,83 (0,28-2,45)		0,52 (0,19-1,43)	
AA	2,29 (0,23-22,42)			4,93 (0,25-98,08)		0,21 (0,01-5,24)	
G	1,21 (0,66-2,21)			0,67 (0,26-1,73)		2,12 (0,87-5,13)	
A	0,83 (0,45-1,51)			1,49 (0,58-3,84)		0,47 (0,19-1,15)	
χ^2_1 (p)	1,91 (0,38)			2,11 (0,35)		3,52 (0,17)	
χ^2_2 (p)	0,39 (0,53)			0,69 (0,41)		2,83 (0,09)	
<i>SOD2 T58C, Ile58Val</i> - rs не найден в dbSNP, частоты генотипов по (Attatirpaholkun W., Wikainarakul K., 2013)							
IleIle	97,1	97,8	100	93,8	98,1	100	97,4
IleVal	2,9	1,1	0	6,2	1,9	0	0
ValVal	0	1,1	0	0	0	0	2,6
Ile	98,5	98,4	100	96,9	99,1	100	97,4
Val	1,5	1,6	0	3,1	0,9	0	2,6
OR (95%CI)							
IleIle	1,36 (0,12-15,54)			3,53 (0,21-59,90)		1,12 (0,04-29,30)	
IleVal	0,36 (0,02-5,97)			0,28 (0,02-4,80)		0,29 (0,01-15,50)	
ValVal	1,13 (0,04-28,44)			0,30 (0,01-15,86)		0,90 (0,03-23,52)	
Ile	0,90 (0,09-8,81)			3,45 (0,21-56,79)		0,68 (0,03-14,69)	
Val	1,11 (0,11-10,86)			0,29 (0,02-4,77)		1,47 (0,07-31,76)	
χ^2_1 (p)	0,91 (0,63)			0,86 (0,65)		0,29 (0,87)	
χ^2_2 (p)	0,01 (0,93)			0,85 (0,36)		0,58 (0,45)	
<i>CAT C-262T (rs1001179)</i>							
CC	62,8	60,7	54,9	58,3	64,7	68,6	55,1
CT	31,9	39,3	40,7	33,3	35,3	28,6	44,9
TT	5,3	0	4,4	8,4	0	2,8	0
C	78,7	80,3	75,2	75,0	82,4	82,9	77,6
T	21,3	19,7	24,8	25,0	17,6	17,1	22,4
OR (95%CI)							
CC	0,92 (0,52-1,60)			1,31 (0,61-2,80)		0,56 (0,23-1,40)	
CT	1,38 (0,78-2,45)			1,09 (0,50-2,38)		2,04 (0,81-5,13)	
TT	0,07 (0-1,27)			0,07 (0-1,37)		0,23 (0,01-5,87)	
C	1,10 (0,69-1,78)			1,56 (0,82-2,95)		0,71 (0,33-1,56)	
T	0,91 (0,56-1,46)			0,64 (0,34-1,22)		1,40 (0,64-3,06)	
χ^2_1 (p)	0,19 (0,66)			5,88 (0,05)		3,44 (0,18)	
χ^2_2 (p)	0,17 (0,68)			1,85 (0,17)		0,71 (0,40)	
<i>GSTP1 Ile105Val, A/G (rs1695)</i>							
IleIle	36,6	35,9	31,9	43,8	41,2	40,0	28,6
IleVal	54,5	51,3	54,9	52,1	44,1	51,4	61,2
ValVal	8,9	12,8	13,2	4,1	14,7	8,6	10,2
Ile	63,8	61,5	59,3	69,8	63,2	65,7	59,2
Val	36,2	38,5	40,7	30,2	36,8	34,3	40,8
OR (95%CI)							
IleIle	0,97 (0,57-1,66)			0,90 (0,43-1,90)		0,60 (0,24-1,50)	
IleVal	0,88 (0,52-1,48)			0,73 (0,35-1,52)		1,49 (0,62-3,59)	
ValVal	1,50 (0,64-3,50)			3,97 (0,83-19,00)		1,21 (0,27-5,44)	
Ile	0,91 (0,62-1,32)			0,74 (0,43-1,30)		0,76 (0,40-1,43)	
Val	1,10 (0,76-1,61)			1,34 (0,77-2,35)		1,32 (0,70-2,50)	
χ^2_1 (p)	0,91 (0,63)			3,44 (0,18)		1,20 (0,55)	
χ^2_2 (p)	0,26 (0,61)			1,08 (0,30)		0,74 (0,39)	

С использованием множественной регрессии мы установили, что изученные полиморфные локусы генов *SOD1* и *SOD2* не являются значимыми предикторами активности супероксиддисмутазы в плазме, синовиальной жидкости, моонуклеарной фракции и эритроцитах ($p > 0,05$), вероятно, вследствие того, что изучалась суммарная активность всех трех изоформ СОД. Кроме того, активность СОД зависит не только от уровня транскрипции, но также определяется посттрансляционными модификациями фермента: для СОД1 и СОД2 известны нитрование, фосфорилирование, глутатионилирование (Yamakura F., Kawasaki H., 2010). Так, взаимодействие Cu,Zn-СОД с активными формами азота приводит к нитрованию единственного остатка триптофана (Trp) в 6-нитроTrp. Нитрование тирозина Туг 34 Mn-СОД под действием пероксинитрита приводит к образованию 3-нитротирозина и инактивации фермента.

Наиболее активно изучаемым полиморфным локусом гена *CAT* является замена $C > T$ в позиции -262 GC-богатого региона промотора (rs1001179). Собственно ген каталазы локализован на хромосоме 11p13, его длина составляет 34 кб, ген содержит 13 экзонов и 12 интронов, кодирует белок, состоящий из 256 аминокислот (Babusikova E. et al., 2013). Результаты исследований ассоциации между генотипом *C-262T* и различными заболеваниями человека (астма, нейропатия, рак) являются достаточно противоречивыми (Crawford A. et al., 2012). Наше исследование не показало различий частот генотипов и аллелей полиморфизма гена *CAT* между группами пациентов с ПТГА и здоровых лиц (табл. 18).

В результате множественного регрессионного анализа для зависимой переменной – активность каталазы в моонуклеарах - в уравнение регрессии ($R=0,632$, $p=0,00286$) были включены два предиктора: $y = 2,48 + 0,509x_1 - 0,028x_2$, где x_1 – генотип полиморфного локуса *C-262T* гена *CAT* ($p=0,0036$): СС – 0, СТ – 1, ТТ – 2; x_2 – ИМТ пациента ($p=0,084$). Для активности каталазы в плазме или СЖ в уравнение не было включено достоверных предикторов. В случае с зависимой переменной - активность в эритроцитах – уравнение ($R=0,592$, $p=0,049$) имело следующий вид: $y = 3,88 + 0,246x_1 + 0,013x_2 + 0,2x_3 - 0,204x_4$, где x_1 – генотип полиморфного локуса *C-262T* гена *CAT* ($p=0,0367$): СС – 0, СТ – 1, ТТ – 2; x_2 – ИМТ пациента ($p=0,242$); x_3 – пол пациента ($p=0,063$): 0 – женский, 1 – мужской; x_4 – рентгенологическая стадия ГА по Kellgren/Lawrence ($p=0,0186$). Результаты данного математического моделирования свидетельствуют о том, что генотип полиморфизма *C-262T CAT* статистически достоверно связан с активностью каталазы в моонуклеарной фракции и эритроцитах крови; причем аллель -262T ассоциирован с увеличенной активностью каталазы.

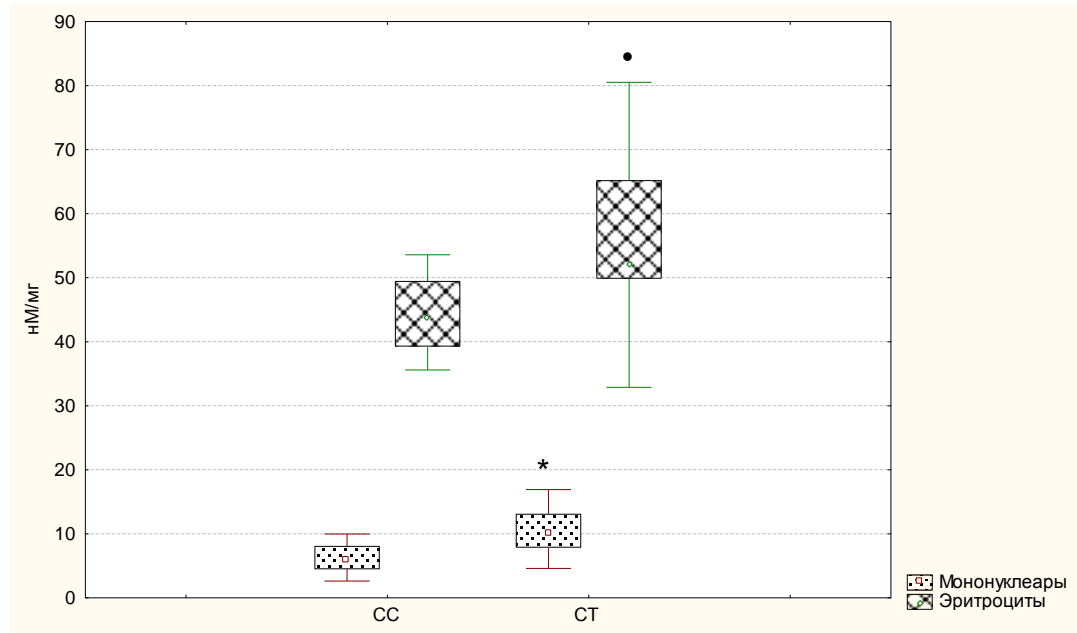


Рис. 17. Активность каталазы в мононуклеарных клетках и эритроцитах крови пациентов с ПТГА с различными генотипами полиморфного локуса *C-262T CAT*

У лиц-носителей мутантного аллеля (*CT*) при ГА активность каталазы в мононуклеарах была равна 10,06 (7,92-13,07) нМ/мг белка; у пациентов с генотипом *CC* – 5,77 (4,55-8,05) нМ/мг белка. Установлено, что действительно при наличии гетерозиготной мутации (генотип *CT*) при ГА активность каталазы в мононуклеарных клетках более чем в 2 раза выше по сравнению с больными, имеющими нормальный генотип *CC* ($U=27,0$; $p=0,0076$). Однако активность каталазы в эритроцитах пациентов с генотипом *CT* (51,95 (49,92-65,17) нМ/мг Hb) значимо не отличалась от показателя пациентов с нормальным генотипом *CC* (45,23 (39,66-49,58) нМ/мг Hb) – $p=0,125$ (рис. 17).

Полученные результаты согласуются со следующими данными литературных источников. Показано, что уровень белка каталазы в эритроцитах у здоровых лиц носителей мутантного аллеля *T* локуса *C-262T* промотора гена *CAT* значительно выше по сравнению с лицами, гомозиготными по аллелю *C*; мутация *C→T* в 5'-нетранслируемой промоторной последовательности увеличивает экспрессию белка (Forsberg L. et al., 2001). Аналогичная ассоциация генотипа *-262TT* с более высокой активностью каталазы в эритроцитах крови наблюдались у больных с диабетической нейропатией в русской популяции (Chistiakov D.A. et al., 2006). С другой стороны, в некоторых исследованиях отмечается связь аллеля *T* с меньшей активностью фермента по сравнению с аллелем *C* (Crawford A. et al., 2012).

Значимых различий частот генотипов и аллелей полиморфизма *Ile105Val* гена *GSTP1* между группами пациентов с ПТГА и здоровых лиц не установлено (табл. 18). Ген *GSTP1* человека расположен на участке 11q13; при этом два SNP (*Ile105Val*, т.е. 313A>G и A114V) идентифицированы и активно исследуются. Аминокислотный остаток 105 в молекуле *GSTP1* способен влиять на архитектуру гидрофобного субстрат-связывающего Н-сайта, однако, результаты исследований стабильности и активности двух вариантов – *105Ile* (A) и *105Val* (G) – достаточно противоречивы (Board P.G., Menon D., 2013). С использованием множественного регрессионного анализа нами показано, что активность глутатион-S-трансферазы (GST) в эритроцитах достоверно и отрицательно коррелирует с генотипом полиморфного локуса *Ile105Val* гена *GSTP1*: $y = 3,18 - 0,103x_1 + 0,025x_2 - 0,457x_3$ (R=0,6628, p=0,00023), где x_1 – ИМТ пациента (p=0,0005); x_2 – возраст (p=0,0069); x_3 – генотип полиморфного локуса *Ile105Val* (p=0,0156): *IleIle* – 0, *IleVal* – 1, *ValVal* – 2. Для активности GST в мононуклеарах крови и синовиальной жидкости достоверной связи с генотипом *Ile105Val* не было получено. При сравнении активности GST в эритроцитах двух групп пациентов с различными генотипами - *IleIle* (5,53(4,03-9,12)МЕ/г Hb) и *IleVal+ValVal* (3,40(2,19-4,64)МЕ/г Hb) - наблюдалась значимое уменьшение активности GST на 39% у пациентов-носителей мутантного аллеля относительно значения пациентов с нормальным генотипом *IleIle* (U=90,0, p=0,038).

Таким образом, согласно нашим результатам, аллель *105Val* локуса *Ile105Val* ассоциирован с более низкой активностью глутатион-S-трансферазы в эритроцитах крови. Некоторые авторы указывают на то, что вариантный аллель *105Val* значительно снижает активность фермента в отношении к детоксикации ксенобиотиков, в частности, ХДНБ (1-хлор-2,4-динитробензола), т.е. ХДНБ-конъюгирующую активность (Watson M.A. et al., 1998). Следует отметить, что активность GST в нашем исследовании определяли именно по скорости реакции восстановленного глутатиона с ХДНБ (Habig et al., 1974).

3.5.4. Моделирование межгенных взаимодействий методом редукции многофакторной размерности (MDR).

Известно, что артроз является мультифакториальным заболеванием, в основе которого лежит взаимодействие приобретенных факторов и наследственной предрасположенности, определяемой целым множеством генов. Тем не менее, отдельные рассматриваемые полиморфные замены не являются мутациями, с большой вероятностью повышающими риск развития артроза; исходя из этого, особую значимость приобретают полногеномные поиски ассоциаций (GWAS) и анализы сцепления генов (Prieto-Montana J.R., Riancho J.A., 2009). Метод редукции многофакторной размерности (MDR) был

разработан для моделирования межгенных (эпистаз) и ген-средовых взаимодействий высокого порядка, которые невозможно оценить с помощью традиционно используемых параметрических методов, и является альтернативой другим методам, например, логистической регрессии (Moore J.H., Williams S.W., 2002). Адекватность MDR-модели оценивается двумя главными параметрами – контрольной взвешенной точностью и воспроизводимостью. Используя метод 10-кратной воспроизводимости (Cross-validation consistency, CVC), все данные разделяются на 10 групп, из которых 9 – опытных, 1 – контрольная. CVC – это количество раз выбора наилучшей модели из всего набора данных (Moore J.H., 2010).

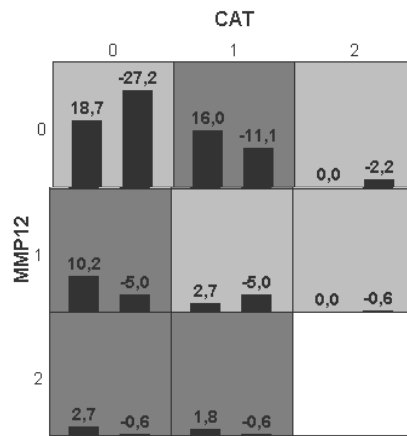
Анализ межгенных взаимодействий проводили с помощью программ MDR v.3.0.2 и ее модифицированной версии, позволяющей работать с неравными выборками «случай-контроль», - Generalized MDR, GMDR v.0.9. С помощью опций Exhaustive search (полный мультилокусный анализ) и Forced search (принудительный поиск) были получены следующие результаты. Наиболее значимыми среди всех возможных моделей оказались: двухлокусная модель *CAT C-262T*×*MMP-12 A-82G* (следует отметить, что оба эти гена локализованы на одной хромосоме - 11), трехлокусная модель *CAT C-262T*×*MMP-12 A-82G*×*NOS1 G-84A*, четырехлокусная модель *CAT C-262T*×*MMP-12 A-82G*×*NOS1 G-84A*×*IL1b T-31C*, пятилокусная модель *CAT C-262T*×*MMP-12 A-82G*×*NOS1 G-84A*×*IL1b T-31C*×*NOS3 T-786C* (табл. 19, рис. 18).

Таблица 19.

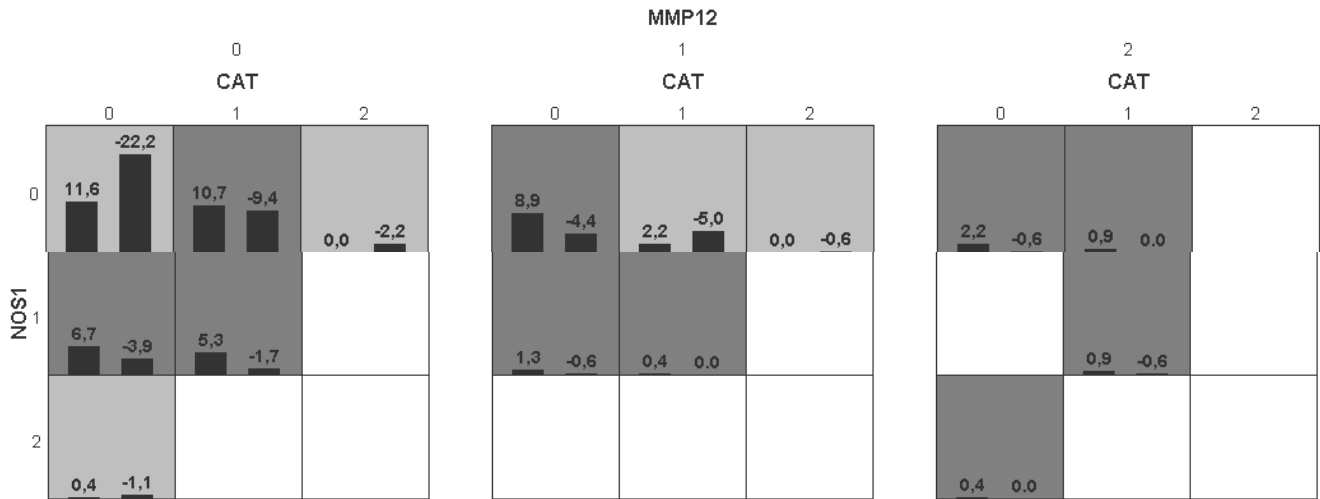
Наиболее значимые модели взаимодействия изученных генов-кандидатов

Оптимальная модель	Опытная взвешенная точность (Training Balanced Accuracy)	Контрольная взвешенная точность (Testing Balanced Accuracy)	Статистическая значимость (p)	Воспроизводимость (Cross-validation consistency)
<i>CAT C-262T</i> × <i>MMP-12 A-82G</i>	0,6301	0,6334	10 (0,0010)	10/10
<i>CAT C-262T</i> × <i>MMP-12 A-82G</i> × <i>NOS1 G-84A</i>	0,6624	0,6331	8 (0,0547)	10/10
<i>CAT C-262T</i> × <i>MMP-12 A-82G</i> × <i>NOS1 G-84A</i> × <i>IL1b T-31C</i>	0,6898	0,6208	9 (0,0107)	10/10
<i>CAT C-262T</i> × <i>MMP-12 A-82G</i> × <i>NOS1 G-84A</i> × <i>IL1b T-31C</i> × <i>NOS3 T-786C</i>	0,7447	0,6200	10 (0,0010)	10/10

1).

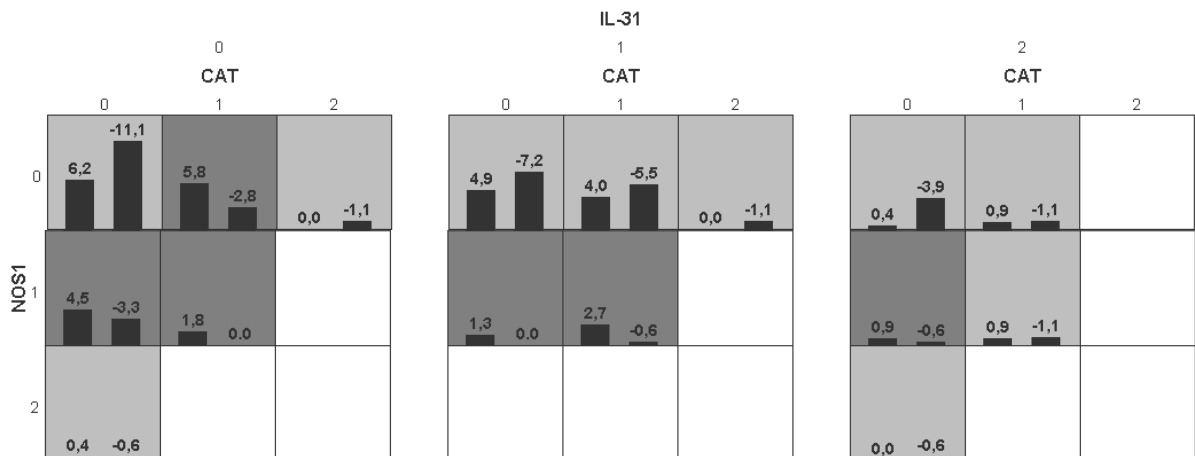


2).



3).

MMP12 = 0



4).

MMP12 = 0, IL-31 = 0

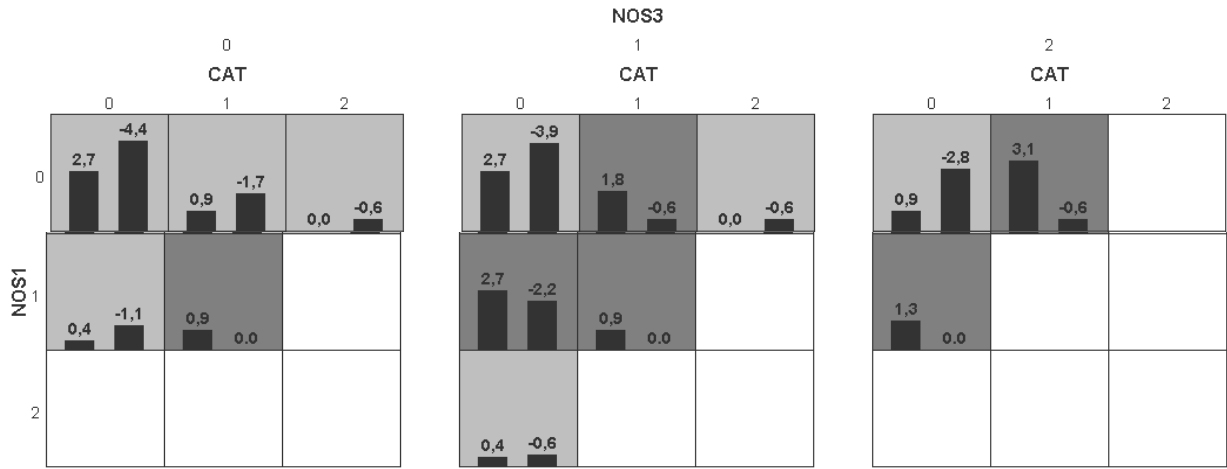


Рис. 18. Графическое представление моделей межгенных взаимодействий изученных генов-кандидатов, полученной с использованием программы GMDR. 1 – Двухлокусная модель; 2 – трехлокусная модель; 3 – четырехлокусная модель; 4 – пятилокусная модель. Примечание: темно-серым цветом обозначены генотипы повышенного риска; светло-серым – генотипы пониженного риска; в ячейках слева – группа ПТГА; справа – контрольная группа. Обозначения генотипов: 0 – нормальная гомозигота; 1 – гетерозигота; 2 – мутантная гомозигота.

В результате моделирования межгенных взаимодействий также была получена горизонтальная дендрограмма наиболее значимых межгенных взаимодействий генов-кандидатов предрасположенности к ПТГА (рис. 19).

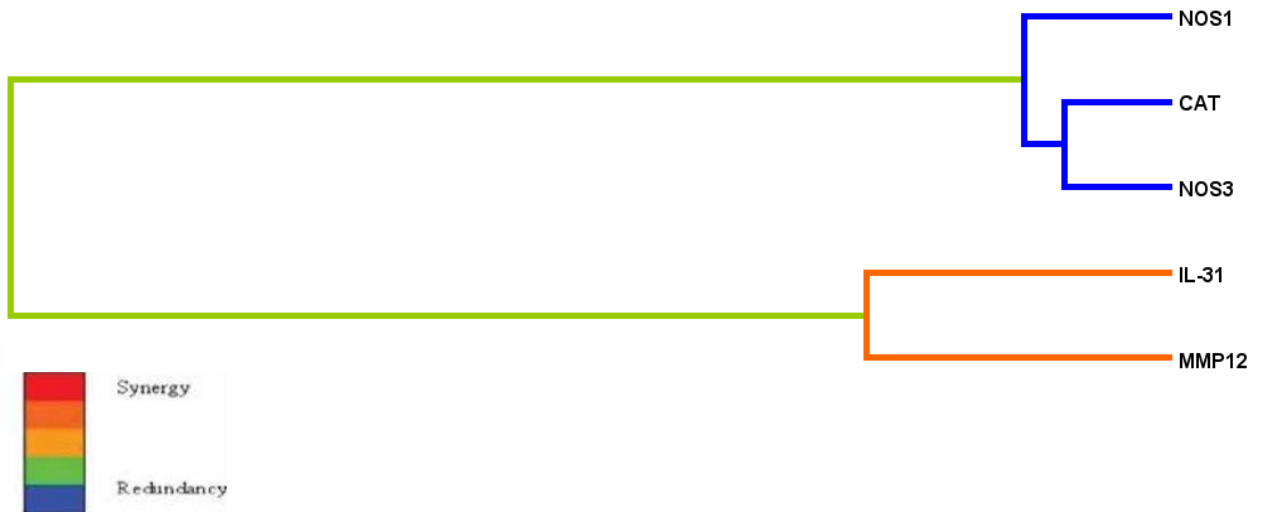


Рис. 19. Дендрограмма наиболее значимых межгенных взаимодействий генов-кандидатов предрасположенности к ПТГА. Короткие линии обозначают сильное взаимодействие локусов; длинные – указывают на слабую связь. Цвета в легенде: красный цвет означает высокую степень синергизма генных локусов; оранжевый – меньшую степень синергизма; желтый – независимость отдельных локусов; зеленый и синий цвет – антагонизм эффектов с большей или меньшей степенью. Примечание: IL-31 – мутация *T-31C* гена *IL-1β*

Полученные результаты свидетельствуют о том, что полиморфные локусы генов NO-синтаз (*NOS1*, *NOS3*), каталазы (*CAT*), матричной металлопротеиназы-12 (*MMP-12*) и интерлейкина-1 β (*IL-1b*) играют роль в детерминации предрасположенности к посттравматическому гонартрозу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многие патогенетические факторы (генетическая предрасположенность, особенности метаболизма, травмы и механические стимулы и др.) вносят вклад в прогрессирование артроза, однако до конца механизм развития данной суставной патологии не ясен. В основе развития артроза, среди других патогенетических механизмов, лежит нарушение баланса прооксидантной и антиоксидантной систем и активация свободнорадикального окисления, приводящая к повреждению тканей сустава. АКМ в синовиальной среде сустава играют значительную роль в развитии воспалительного ответа, липопероксидации и старении клеток суставного хряща - хондроцитов. Показано, что для стареющих хондроцитов характерно укорочение теломера, ассоциированное с различными внутренними или внешними стрессорными факторами, такими, как механические перегрузки, окислительный стресс, гипоксия (Mobasher A. et al., 2015).

Мы наблюдали повышение уровня маркера липопероксидации малонового диальдегида в плазме и эритроцитах крови при гонартрозе. Доказано, что некоторые антиоксиданты обладают хондропротективным эффектом при артрозе. Так, антиоксидант галловая кислота ингибировала провоспалительные медиаторы iNOS и COX-2, а также предотвращала снижение содержания СОД, агреккана и коллагена при индуцированном артрозе (Wen L. et al., 2015). Более того, ключевой транскрипционный фактор Nrf2, регулирующий экспрессию генов антиоксидантных ферментов, способен выступать хондропротектором при артрозе, особенно в случае его гиперактивации с помощью ацетилирования (Cai D. et al., 2015).

В ходе работы был проанализирован редокс-статус клеток крови, а также редокс-показатели плазмы и синовиальной жидкости при гонартрозе. Установлено, что в эритроцитах пациентов как с первичным, так и посттравматическим гонартрозом, происходит нарушение баланса функционирования антиоксидантных ферментов, включая СОД, каталазу и ГПО, что может приводить к накоплению гидропероксида в клетках, а также значительное снижение уровня восстановленного глутатиона. Известно, что H_2O_2 ингибирует синтез протеогликанов матрикса хрящевой ткани, а также активность фермента гликолиза глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в хондроцитах, индуцирует апоптоз хондроцитов, а также приводит к генерации АФК и дисфункции митохондрий. Макрофаги и полиморфноядерные лейкоциты, присутствующие в синовиальной жидкости, являются главным источником H_2O_2 (Akyol S. et al., 2014). При этом антиоксиданты, например, ресвератрол, способны ингибировать апоптоз хондроцитов *in vitro*, индуцированный NO^{\bullet} (Eo S.-H. et al., 2013). Митохондриальная дисфункция, в свою

очередь, может значительно стимулировать продукцию митохондриальных АФК, индуцировать провоспалительные каскады (экспрессия циклооксигеназы-2, PGE₂) в культивируемых *in vitro* клетках синовиальной оболочки и синовиоцитах, вероятно, путем активации транскрипционного фактора NF-κB (Valcarcel-Ares M.N. et al., 2014). Показано, что супероксид митохондриального происхождения играет важнейшую роль в развитии и прогрессировании остеоартроза, а дефицит митохондриальной СОД2 в хондроцитах приводит к гиперпродукции митохондриального супероксида и дисфункции, а также дегенерации хрящевой ткани (Koike M. et al., 2015). Важно отметить, что в культивируемых *in vitro* бычьих хондроцитах провоспалительный цитокин IL-1β приводит к дисрегуляции активности антиоксидантных ферментов, способствуя резкому усилению экспрессии генов MnSOD и глутатионпероксидазы и снижению экспрессии гена каталазы, что приводит к накоплению гидропероксида в митохондриях и, как следствие, к митохондриальной дисфункции, типичной для хондроцитов при остеоартрозе (Mathy-Hartert M. et al., 2008). Кроме того, известно, что провоспалительные цитокины IL-1β и TNFα приводят к митохондриальной дисфункции в хондроцитах человека посредством повреждения митохондриальной ДНК, нарушения биоэнергетики, которые коррелировали с индукцией апоптоза (Kim Y. et al., 2010).

Таким образом, как показано в наших исследованиях, в патологическом каскаде при артрозе важнейшая роль отводится развитию окислительного стресса, детерминированного сдвигом равновесия в системе прооксиданты↔антиоксиданты и усилением свободнорадикального окисления. Все эти процессы приводят к повреждению и дегенерации не только различных структур сустава, но и глубоким структурно-метаболическим нарушениям в клетках крови.

Согласно результатам наших исследований, при гипероксии, которая является экспериментальной моделью окислительного стресса, в лейкоцитах крови крыс происходит нарушение баланса активности антиоксидантных ферментов: на фоне активации СОД наблюдается ингибирование каталазы, глутатион-S-трансферазы и глутатионпероксидазы, что может приводить к накоплению гидропероксида, запуску реакций Фентона, Габера-Вейса и повышенной продукции высокотоксичного гидроксильного радикала (Внуков В.В., Гуценко О.И. и др., 2015). При этом предварительное введение митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 нормализует активность СОД и GST и повышает активность каталазы и глутатионпероксидазы. Вероятно, повышение активности глутатион-S-трансферазы является следствием активации гена транскрипционного фактора *Nrf2*, являющегося компонентом редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2; известно, что гены

изоформ данного фермента, в т.ч. *GSTP1*, позитивно регулируются Nrf2. В настоящее время Nrf2 рассматривается как "мастер регулятор" антиоксидантного ответа, модулирующего экспрессию сотен генов, включающих не только антиоксидантные ферменты, но большое количество генов, которые контролируют разнообразные процессы, такие как иммунный и воспалительный ответы, тканевое ремоделирование и фиброз, детоксикацию ксенобиотиков и др. (Hybertson V.M. et al., 2011). Показана хондропротекторная роль сигнальной системы Nrf2/ARE в развитии остеоартроза как в экспериментальных моделях на животных, так и клинических исследованиях (Abusarah J. et al., 2014; Cail D. et al., 2015). К настоящему времени обнаружены различные индукторы сигнальной системы Nrf2/ARE, к которым, как выяснено в наших исследованиях, также относится митохондриально-направленный антиоксидант - катионное производное пластохинона SkQ1 (Внуков В.В., Гуценко О.И. и др. 2015). В соответствии с этим представляет интерес дальнейшие исследования влияния митохондриально-адресованного антиоксиданта на сигнальную систему Nrf2/ARE при ГА, что послужит обоснованием для разработки инновационных технологий лечения дегенеративных заболеваний суставов.

В мононуклеарных клетках при первичном ГА наблюдается одновременная активация СОД и каталазы (на II-IV стадиях), а при посттравматическом – повышение активности СОД только на поздней стадии и значительная активация глутатионпероксидазы. При этом в мононуклеарных клетках при гонартрозе как первичной, так и посттравматической этиологии происходит повышение активности глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы и ксантиноксидоредуктазы; активация глутатион-зависимых ферментов может являться ответом на процессы липопероксидации, генерации АКМ и снижение содержания восстановленного глутатиона. Известно, что поддержание оптимального соотношения GSH/GSSG в клетке является существенным для нормального ее функционирования и выживания, а сам глутатион может выступать эффективной «ловушкой» свободных радикалов (Калинина Е.В. и др., 2014). Сдвиг редокс-статуса мононуклеарных клеток способен индуцировать их гибель путем апоптоза, что и наблюдалось для первичном и посттравматическом гонартрозе.

В научной литературе обсуждаются различные потенциальные маркеры ранних стадий и степени тяжести артроза, например, аутоантигены (VICM, цитруллинированный виментин как предиктор рентгенологической стадии артроза; антитела к хондроитин сульфату хряща в сыворотке крови больных остеоартрозом), маркеры деградации хряща (фрагменты фибронектина, олигомерный белок хрящевого матрикса), увеличенная протеолитическая активность синовиальной жидкости (активация матриксных

металлопротеиназ), рост уровня адипокинов, изменения активности ферментов пуринового метаболизма, например, аденозиндезамидазы и адениндезаминазы в лизатах клеток крови, и т.д. (Karsdal M.A., et al., 2014; Van Spil W.E. et al., 2012; Zavodovsky B.V. et al., 2008; Зборовская И.А. и др., 2012). В настоящей работе доказано, что активность ксантиноксидоредуктазы в синовиальной жидкости, плазме и моноклеарной фракции крови является диагностическим биохимическим маркером стадии первичного/посттравматического гонартроза, а уровень мочевой кислоты в плазме крови – маркером стадии посттравматического ГА. Содержание мочевой кислоты в синовиальной жидкости (Denoble A.E. et al., 2011) и сыворотке крови (Srivastava R.N. et al., 2013) уже обсуждалось как маркер степени тяжести и клинко-рентгенологической стадии гонартроза. Установлено, что синовиальная КОР практически на 50% представляет собой оксидазную форму фермента, уровень этого фермента коррелирует с тяжестью воспалительных изменений сустава (Hanachi N. et al., 2009). Активность ксантиноксидазы в синовиальной жидкости положительно коррелирует с продукцией активных форм кислорода, азота, степенью окислительных повреждений белков (карбонильные группы) и отрицательно коррелирует с уровнем маркера синтеза коллагена II – СРІІ (СІІ synthesis C-peptide) - у пациентов с травмой сустава (Stabler T. et al., 2015).

Для пациентов с первичным гонартрозом всех стадий и посттравматическим ГА II и III стадий характерно значительное увеличение содержания мочевой кислоты в плазме крови. Известно, что мочевая кислота рассматривается в качестве провоспалительного сигнала и относится к дистресс-ассоциированным молекулярным паттернам (DAMP), участвующим в активации молекулярного комплекса инфламмосомы NALP3 (NLRP3) с последующей продукцией активных форм цитокинов IL-1 β , IL-18, IL-33 (Denoble A.D. et al., 2011). Одна из существующих моделей активации NLRP3 инфламмосомы предполагает, что все агонисты NLRP3, среди которых мочевая кислота, усиливают генерацию АФК, вероятно, с помощью NADPH-оксидаз (Schroder K., Tschopp J., 2010). В настоящей работе установлено, что достоверное увеличение содержания IL-1 β в плазме и СЖ наблюдалось как при первичном, так и при посттравматическом ГА, и было более характерно для первичного гонартроза.

В работе установлено, что активность некоторых антиоксидантных ферментов (каталаза, глутатион-S-трансфераза), а также содержание цитокина TNF α и уровень нитритов/нитратов в СЖ зависят от генотипа полиморфных локусов генов *CAT*, *GSTP1*, *TNF α* , *eNOS*. Замены *C-262T CAT*, *G-308A TNF α* , *T-786C eNOS* локализованы в промоторах соответствующих генов и влияют на скорость экспрессии, а следовательно, способны оказывать влияние на содержание/активность белка (Forsberg L. et al., 2001; Гончарова

И.А. и др., 2008; Nakayama M. et al., 1999). Замена *Ile105Val*, т.е. *313A>G*, гена *GSTP1* способна изменять архитектуру гидрофобного субстрат-связывающего сайта молекулы фермента, и, вследствие этого, влиять на активность глутатион-S-трансферазы (Board P.G., Menon D., 2013).

Одновременно с установлением связей генотипов полиморфных локусов и активности антиоксидантных ферментов или содержания цитокинов удалось выявить SNP-локусы, ассоциированные с генетической предрасположенностью пациентов к развитию посттравматического гонартроза в исследуемой популяции. Такими локусами, как показал генетический скрининг, являются SNP генов NO-синтазы (*NOS1*), матричной металлопротеиназы-12 (*MMP-12*). Согласно результатам иммунологических и протеомных исследований (Amin A.R. et al., 1995), NO-синтаза, выделенная из хряща с признаками выраженного артроза, сходна с нейрональной конститутивной NO-синтазой (*nNOS*, *NOS1*) и служит источником оксида азота, вносящего вклад в воспаление и деструкцию хряща, наблюдающиеся при артрозе. Известно, что нейрональная и эндотелиальная NO-синтазы играют важную роль в пролиферации, созревании и апоптозе хондроцитов. У *nNOS*- и *eNOS*-нокаутных мышей наблюдались нарушения данных процессов и сниженное количество пролиферирующих хондроцитов (Yan Q. et al., 2010; 2012). Иммуногистохимические исследования хряща и субхондральной кости пациентов с артрозом показывают, что *MMP-12* экспрессируется при артрозе, чего не наблюдается в норме; более того, повышенная экспрессия *MMP-12* положительно коррелирует с возрастом и индексом массы тела пациентов с артрозом, а также с тяжестью патологии (Kaspiris A. et al., 2015). Кроме того, *MMP-12* экспрессируется при развитии костной ткани при развитии плода, хондроцитами *in vivo*; обсуждается роль *MMP-12* как негативного регулятора процесса ангиогенеза, особенно при развитии костной ткани у плода. Известно, что гиалиновый хрящ обладает высоким уровнем антиангиогенной активности, а *MMP-12* способна генерировать ангиостатин из плазминогена (Kerkela E. et al., 2001).

В проведенном исследовании методом лазерной цитофлуориметрии показано, что как при первичном, так и посттравматическом ГА наблюдается повышение интенсивности апоптоза лимфоцитов периферической крови, который идентифицируется по экстернализации фосфатидилсерина (ФС) во внешний монослой мембран лимфоцитов с помощью FITC-меченого аннексина-V. Это может быть обусловлено различными причинами, важная из которых - выраженный дисбаланс прооксидантных и антиоксидантных процессов при ГА и образование разнообразного спектра активированных кислородных метаболитов, способствующих индукции программируемой

клеточной гибели. Повышение интенсивности ПОЛ в крови, показанное в данном исследовании, может приводить к окислительной деструкции связей белков цитоскелета (аннексинов) с липидами внутреннего монослоя мембран лимфоцитов. В результате нарушения этих связей становится возможным переход во внешний монослой мембраны ФС, в норме локализованного во внутреннем монослое. Повышение уровня апоптоза лимфоцитов периферической крови при ГА согласуется с ранее проведенными электронно-микроскопическими исследованиями, согласно которым у больных с ПТГА было показано наличие в хрящевой ткани коленного сустава хондроцитов, находящихся на различных стадиях апоптоза (Внуков В.В., Кролевец И.В. и др., 2015). Причем, в исследовании (Кролевец И.В. и др., 2008) показано, что деструктивно-дистрофические изменения хряща при ГА обусловлены микроциркуляторными нарушениями в синовиальной оболочке и синовитом, который носит очаговый характер, маркируя locus повреждения. Полагают, что главными путями апоптоза хондроцитов при ГА являются рецепторный, митохондриальный и ЭПР-зависимый пути программируемой клеточной гибели (Kim H.A., Blanco F.J., 2007).

На рис. 20 представлена интегральная гипотетическая схема, отражающая роль антиоксидантных ферментов и провоспалительных цитокинов в механизмах гонартроза.

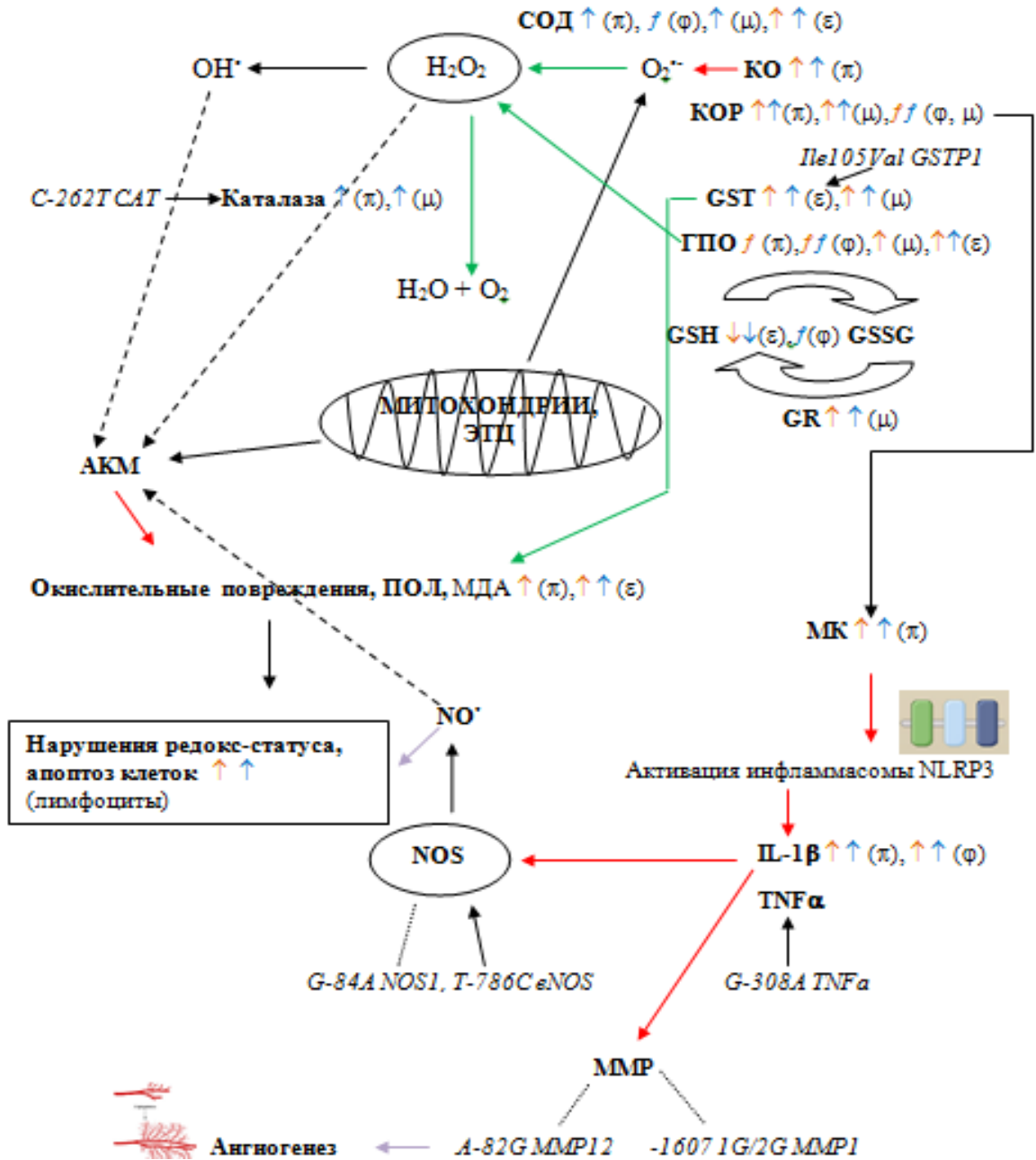


Рис. 20. Гипотетическая схема, отражающая роль антиоксидантных, прооксидантных ферментов, провоспалительных цитокинов в патогенезе гонартроза. Условные обозначения: \uparrow, \downarrow - изменения при первичном гонартрозе, \uparrow, \downarrow - изменения при посттравматическом гонартрозе; f - корреляция со стадией гонартроза по шкале Kellgren/Lawrence, f - при первичном ГА, f - при ПТГА; (ϵ) – эритроциты крови; (μ) – мононуклеары крови; (π) – плазма крови; (ϕ) – синовиальная жидкость; \rightarrow - антиоксидантный эффект; \rightarrow - прооксидантный (провоспалительный) эффект, \cdots - полиморфный локус, ассоциированный с развитием ПТГА в изучаемой популяции; \rightarrow - регуляция процесса.

ВЫВОДЫ

1. При первичном и посттравматическом гонартрозе наблюдается повышенный уровень малонового диальдегида в эритроцитах крови. В синовиальной жидкости накопление МДА более выражено при первичном ГА.
2. Для пациентов с первичным ГА характерен однонаправленный рост активностей СОД/СУА и каталазы/ $V_{H_2O_2}$ в плазме и мононуклеарах крови, а также рост СУА в синовиальной жидкости по мере увеличения стадии заболевания. Для первичного ГА и ПТГА характерно нарушение баланса функционирования СОД и каталазы, а также значительная инактивация ГПО и снижение уровня восстановленного глутатиона в эритроцитах крови. При посттравматическом гонартрозе наблюдается значительная активация глутатионпероксидазы в мононуклеарных клетках и синовиальной жидкости, что согласуется со снижением содержания GSH в СЖ. Повышение активности глутатион-S-трансферазы в клетках крови и СЖ более характерно для первичного ГА, особенно поздних стадий. В мононуклеарных клетках общей выборки пациентов с гонартрозом наблюдается активация глутатионредуктазы.
3. При первичном и посттравматическом гонартрозе наблюдается активация ксантиноксидоредуктазы (КОР) в мононуклеарных клетках крови. Повышение активности КОР и уровня мочевой кислоты (МК) в плазме крови более характерно для пациентов с первичным гонартрозом. В плазме крови общей выборки пациентов с гонартрозом наблюдается активация прооксидантной формы КОР - ксантиноксидазы. Активность КОР в синовиальной жидкости, плазме и мононуклеарной фракции крови является биохимическим маркером стадии первичного и посттравматического гонартроза, а уровень МК в плазме крови – посттравматического ГА.
4. При первичном и посттравматическом гонартрозе значительно повышается интенсивность апоптоза лимфоцитов периферической крови.
5. Содержание провоспалительного цитокина IL-1 β в плазме крови и синовиальной жидкости при первичном и посттравматическом ГА повышается относительно нормы, причем, прирост более значителен при первичном гонартрозе. Уровень TNF α в плазме крови и СЖ пациентов с диагнозом посттравматический гонартроз не отличается от показателя в плазме здоровых лиц.
6. Генотип полиморфных локусов *G7958A SOD1*, *Ile58Thr SOD2*, *G-84A NOS1*, *T-31C IL-1 β* не оказывает влияния на активность СОД, содержание нитритов/нитратов и IL-1 β , соответственно, согласно данным множественного регрессионного анализа. Генотип полиморфного локуса *C-262T CAT* связан с активностью каталазы в эритроцитах и мононуклеарной фракции крови, при этом аллель *-262T* ассоциирован с увеличенной

активностью каталазы при посттравматическом гонартрозе. Аллель *105Val* локуса *Ile105Val GSTP1* ассоциирован с более низкой активностью глутатион-S-трансферазы в эритроцитах крови пациентов с ПТГА. Варианты *-786T>C* гена *eNOS* связаны с концентрацией нитритов/нитратов в синовиальной жидкости при посттравматическом гонартрозе, при этом генотипу *-786CC* соответствует значительно меньший уровень нитритов/нитратов в СЖ. Содержание TNF α связано с генотипом локуса *G-308A TNFa*, причем носительство мутантного аллеля *-308A* приводит к снижению содержания TNF α у пациентов с посттравматическим гонартрозом и здоровых лиц.

7. Полиморфными локусами-маркерами повышенного риска развития посттравматического гонартроза в изученной популяции являются: *A-82G MMP-12* и *G-84A nNOS* в общих выборках; *-1607 1G/2G MMP-1* у женщин.
8. Наибольшей достоверностью и воспроизводимостью среди возможных MDR- и GMDR-мультилокусных моделей для детерминации риска развития посттравматического гонартроза в исследованной популяции обладает пятилокусная модель *CAT C-262T×MMP-12 A-82G×NOS1 G-84A×IL1b T-31C×NOS3 T-786C*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеенко Е.Ю., Говорин А.В. Оценка маркеров воспаления и показателей оксидативного стресса у больных остеоартрозом в сочетании с артериальной гипертензией // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26, № 1, Выпуск 1. – С. 54-58.
2. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма // Методические рекомендации. СПб: ИКФ «Фолиант», 2000 – С. 38-39.
3. Бадюкин В.В. Современные аспекты патогенетической терапии остеоартроза // Медицинский совет. – 2013. – № 12. – С. 77-83.
4. Балабанова Р.М. Роль интерлейкина 1 при остеоартрозе и возможности его блокирования // Современная ревматология. – 2011. – № 1. – С. 58-62.
5. Баранов В.С. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины. СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. – 528 с.
6. Бенгус Л.М. Хондрциты: фагоцитоз и хондроптоз (дискуссии, поиски и гипотезы) // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2012. – Т. 2, № 3. – Р. 182-196.
7. Белоусов В.В., Ениколопов Г.Н., Мишина Н.М. Компартиментализация передачи сигналов, опосредованных активными формами кислорода // Биоорг. химия. – 2013. – Т. 34, № 4. – С. 383-399.
8. Владимиров Ю.А. Зачем нужна белковая кристаллография? // Природа. – 2003. – № 11. – С. 26-34.
9. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И., Козлов А.В. Свободные радикалы в живых системах. Серия «Биофизика». - Т. 29. М.: ВИНТИ, 1991 – 249 с.
10. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Усп. биол. химии. - 2009. – Т. 49. – С. 341-388.
11. Внуков В.В., Гуценко О.И., Милютин Н.П. и др. Влияние SkQ1 на экспрессию гена *Nrf2*, ARE-контролируемых генов антиоксидантных ферментов и их активность в лейкоцитах крови крыс при окислительном стрессе // Биохимия. - 2015. - Т. 80, вып. 12. - С. 1861-1870.
12. Внуков В.В., Кролевец И.В., Панина С.Б. и др. Ассоциация полиморфизма генов NO-синтазы с развитием посттравматического гонартроза у жителей Ростовской области // Экологическая генетика. – 2015. – Т. 13. – С. 15-22.
13. Галушко Е.А., Большакова Т.Ю., Виноградова И.Б. и др. Структура ревматических заболеваний среди взрослого населения России по данным эпидемиологического

- исследования (предварительные результаты) // Научно–практическая ревматология. - 2009. - № 1. - С. 11-17.
14. Ганусевич И.И. Роль матричных металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях. I. Характеристика ММП, регуляция их активности, прогностическое значение // Онкология. – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 10-6.
 15. Гончарова И.А., Белобородова Е.В., Фрейдин М.Б. и др. Ассоциация полиморфных маркеров генов иммунной системы с количественными признаками, патогенетически значимыми для хронического вирусного гепатита // Молекулярная биология. – 2008. – Т. 42, № 2. – С. 242-246.
 16. Денисов Л.Н., Слезина И.Г., Петрова М.С. и др. Опыт применения стопартроза у больных остеоартрозом коленных суставов // Научно-практическая ревматология. – 2007. - № 3. – С. 34-39.
 17. Дмитриева Л.А. Роль цитокинов в патогенезе остеоартроза (обзор литературы) // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2007. - № 4. – С. 165-169.
 18. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. СПб: Мед. Пресса, 2006. - 397 с.
 19. Зборовский А.Б., Заводовский Б.В., Никитина Н.В. и др. Возможности прогнозирования эффективности неомыляемых соединений бобов сои и авокадо при терапии остеоартроза в зависимости от уровня окисленных липопротеинов низкой плотности в сыворотке крови и антител к ним // Альманах современной науки и образования. – 2009. - № 11-1. – С. 133-135.
 20. Зборовская И.А., Бедина С.А., Галаева О.Ю. и др. Энзимологические особенности лимфоцитов и эритроцитов у больных остеоартрозом на ранней стадии заболевания // Здоровье семьи – 21 век. – 2012. – Т. 3. - № 3. – С. 0421200104/0056 . - ISSN 2077-2548.
 21. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Вольский Н.Н., Козлов В.А. Внутриклеточный окислительный стресс и апоптоз // Успехи современной биологии. – 1999. – Т. 119, № 5. – С. 440-450.
 22. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Ткачев В.О. Некоторые принципы и механизмы редокс-регуляции // Кислород и антиоксиданты. - 2009. - № 1. – С. 3-64.
 23. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов // Успехи биол. химии. – 2014. – Т. 54. – С. 299-348.

24. Коненков В.И., Смольникова М.В. Структурные основы и функциональная значимость аллельного полиморфизма генов цитокинов человека и их рецепторов // Медицинская иммунология. – 2003. – Т. 5, № 1-2. С. 11-28.
25. Коржов В.И., Жадан В.Н., Коржов М.В. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты // Журнал АМН Украины. – 2007. – Т. 13, № 1. – С. 3-19.
26. Корнилов Н.Н. Гонартроз и сходные с ним клинические состояния (клинические рекомендации). СПб: ФГБУ «РНИИТО им. Р.Р. Вредена» Минздрава России, 2013 – 15 с.
27. Королева С.В., Львов С.Е., Мясоедова С.Е., Рослова Э.П. Особенности нарушений системной микроциркуляции при остеоартрозе // Травматология и ортопедия России. – 2005. – Т. 32, № 2. – С. 21-25.
28. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы// Лаб. дело. - 1988. - № 1. - С. 16-19.
29. Кролевец И.В., Петручик А.С., Андреева И.И. Динамика параметров иммунной системы при различных технологиях оперативного лечения посттравматического гонартроза // Цитокины и воспаление (Cytokines & Inflammation). - 2008. - Т. 7. - № 3. - С. 53–54.
30. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Глутатион ядра клетки и его функции // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56, вып. 6. – С. 657-662.
31. Матвеева Е.Л., Карасев Е.А., Карасева Т.Ю. и др. Изменения показателей пероксидации и белкового спектра в синовиальной жидкости больных с патологией суставов // Международный ж-л прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. - № 9. – С. 46-49.
32. Матвеева Е.Л., Спиркина Е.С., Гасанова А.Г. и др. Биохимические изменения в синовиальной жидкости больных остеоартрозом коленного сустава различной этиологии // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2013. - № 5. – С. 60-63.
33. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Фирма Слово, 2006. – 556 с.
34. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. - 1986. - № 12. - С. 724-727.
35. Насонова В.А. Остеоартроз – проблема полиморбидности // Consilium Medicum - 2009. - Т. 11, № 2. - С. 5-8.
36. Павлова В. Н. Синовиальная среда суставов. М.: Медицина, 1980 – 296 с.

37. Панасенко О.М., Сергиенко В.И. Галогенирующий стресс и его биомаркеры // Вестник Российск. АМН. – 2010. - № 1. – С. 27-39.
38. Плетюшкина О.Ю., Фетисова Е.К., Лямзаев К.Г. и др. Пероксид водорода, образуемый внутри митохондрий, участвует в передаче апоптозного сигнала от клетки к клетке // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 1. – С. 75-84.
39. Сирота Т. В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутазы // Вопр. мед.химии. – 1999. - № 3. – С. 14-15.
40. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода // Соросовский образовательный журнал. – 2001. - Т. 7, № 6. – С. 4-10.
41. Смирнова О.А., Иванов А.В., Иванова О.Н. и др. Клеточные системы защиты от окислительного стресса и стресса эндоплазматического ретикулума: механизмы регуляции и влияние вируса гепатита С // Молекулярная биология. - 2011. - Т. 45, № 1. - С. 127-141.
42. Спиркина Е.С., Матвеева Е.Л., Гасанова А.Г. Сравнительная характеристика биохимического состава синовиальной жидкости коленных и локтевых суставов человека // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2013. - № 2(90). – С. 87-89.
43. Спиркина Е.С., Матвеева Е.Л., Степанов М.А. Биохимические исследования показателей пероксидации в сыворотке крови собак с моделью дегенеративно-дистрофических изменений в суставах // Гений ортопедии. – 2013. - № 2. – С. 106-108.
44. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977 - С. 66-68.
45. Сумбаев В.В., Розанов А.Я. Ксантинооксидаза как компонент системы генерирования активных форм кислорода // Современные проблемы токсикологии. - 2001. - № 1. - С. 16-22.
46. Ткачук В.А., Тюрин-Кузьмин П.А., Белоусов В.В., Воротников А.В. Пероксид водорода как новый вторичный посредник // Биологические мембраны. - 2012. - Т. 29, № 1-2. - С. 21-37.
47. Тодоров И.Н. Митохондрии: окислительный стресс и мутации митохондриальной ДНК в развитии патологий, процессе старения и апоптозе // Российский химический журнал. - 2007. – Т.51, № 1. – С. 93-106.

48. Трилис Я.Г., Мещерякова М.Г., Кириллова Н.В. и др. Исследование показателей окислительно-восстановительный стресса в крови больных остеоартрозом коленного сустава // Рос.медико-биолог. вестник им. академика И.П. Павлова. – 2012. – № 1. – С. 8-10.
49. Четина Е.В. Клеточные и молекулярные механизмы разрушения суставного хряща при остеоартрозе. Автореферат дис. на соиск. ...доктора биологических наук. Москва. – 2011. – 51 с.
50. Шевченко А.В., Голованова О.В., Коненков В.И. и др. Полиморфизм промоторного региона гена IL-1 β у пациентов с острым инфарктом миокарда в анамнезе // Медицинская иммунология. – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 219-226.
51. Шумаев К.Б. Роль динитрозильных комплексов железа в защите биомолекул и клеточных структур от окислительного, нитрозативного и карбонильного стрессов. Автореферат дис. на соиск. ... доктора биологических наук. Москва. – 2010. – 50 с.
52. Шутова М.И., Козлов С.А., Захватов А.Н., Кузнецов С.И. Коррекция нарушений процессов липопероксидации и метаболизм коллагена при посттравматическом артрите в эксперименте // Современные проблемы науки и образования. – 2012. - №2. – URL: www.science-education.ru/102-5858.
53. Юсупова Л.Б. О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов // Лаб. дело. – 1989. - № 4. - С. 19-21.
54. Янковский О.Ю. Токсичность кислорода и биологические системы: эволюционные, экологические и медико-биологические аспекты. СПб, 2000 - С. 190-227.
55. Abramson S.B. Osteoarthritis and nitric oxide // Osteoarthritis Cartilage. – 2008. – Vol. 16. - Suppl. 2. – S15-S20.
56. Abusarah J., Shi Q., Fahmi H. et al. The role of Nrf2 transcription factor in osteoarthritis // Abstract 237 / Osteoarthritis Cartilage. - 2014. - Vol. 22. - S146.
57. Agarwal S., Long P., Seyedain A. et al. A central role for the nuclear factor-kB pathway in anti-inflammatory and proinflammatory actions of mechanical strain // FASEB J. – 2003. - Vol. 17. - P. 899-901.
58. Aigner T., Schmitz N. In: Pathogenesis and pathology of osteoarthritis, In: Hochberg M., Silman A., Smolen J., Weinblatt M., Weisman M. eds. Rheumatology 5th edition. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2011. - P. 1741–1759.
59. Akagi M. Chondrocyte senescence and osteoarthritis: role of oxidized LDL-induced oxidative stress // Acta Med Kinki Univ. - 2010. - Vol. 35. - No. 1. - P. 1-13.
60. Akyol S., Yukselten Y., Cakmak O. et al. Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage in Human Chondrocytes: The Prophylactic Effects of *Hypericum Perforatum* Linn

- Extract on Deoxyribonucleic acid Damage, Apoptosis and Matrix Remodeling by a Disintegrin-Like and Metalloproteinase With Thrombospondin Motifs Proteinases // Arch. Rheumatol. – 2014. – Vol. 29. – No. 3. – P. 203-214.
61. Allen R.G., Tresini M. Oxidative stress and gene regulation // Free Radical Biol. Med. – 2000. - Vol. 28. - No. 3. - P. 463–499.
 62. Amin A.R., Cesare P.E., Vyas P. et al. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase // J. Exp. Med. – 1995. – Vol. 182. – P. 2097-2102.
 63. Anderson A.S., Loeser R.F. Why is osteoarthritis an age-related disease? // Best Prac. Res. Clin. Rheumatol. – 2010. – Vol. 24. – P. 15-26.
 64. Anderson D.D., Chubinskaya S., Guilak F. et al. Post-traumatic osteoarthritis: improved understanding and opportunities for early intervention // J. Orthop. Res. – 2011. - Vol. 29. - P. 802-809.
 65. Asada S., Fukuda K., Nishisaka F. et al. Hydrogen peroxide induces apoptosis of chondrocytes; involvement of calcium ion and extracellular signal-regulated protein kinase // Inflamm. Res. – 2001. – Vol. 50. – No. 1. – P. 19-23.
 66. Asif A.R., Oellerich M., Armstrong V.W. et al. T-786C polymorphism of the nos-3 gene and the endothelial cell response to fluid shear stress – a proteome analyses // J. Proteome. Res. – 2009. – Vol. 8. – No. 6. – P. 3161-3168.
 67. Attatippaholkun W., Wikainapakul K. Predominant genotypes and alleles of two functional polymorphisms in the manganese superoxide dismutase gene are not associated with Thai cervical or breast cancer // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. – 2013. – Vol. 14. – P. 3955-3961.
 68. Avis P.G., Bergel F., Bray R.C. Cellular constituents. The chemistry of xanthine oxidase // J. Chem. Soc. – 1955. – P. 1100-1105.
 69. Babusikova E., Jesenak M., Evinova A. et al. Frequency of polymorphism -262 C/T in catalase gene and oxidative damage in Slovak children with bronchial asthma // Arch. Bronconeumol. – 2013. – Vol. 49. – No. 12. – P. 507-512.
 70. Barilla M.L., Carsons S.E. Fibronectin fragments and their role in inflammatory arthritis // Semin. Arthritis Rheum. - 2000. - Vol. 29. - P. 252-265.
 71. Bartosz G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? // Biochem. Pharmacol. – 2009. – Vol. 77. – P. 1303-1315.
 72. Battelli M.G., Bolognesi A., Polito L. Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: new emerging roles for a multi-tasking enzyme // Biochim. Biophys. Acta. - 2014. - Vol. 1842. - No. 9. - P. 1502-1517.

73. Bazzichi L., Ciompi M.L., Betti L. et al. Impaired glutathione reductase activity and levels of collagenase and elastase in synovial fluid in rheumatoid arthritis // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 2002. – Vol. 20. - No. 6. – P. 761-766.
74. Benito M.J., Veale D.J., FitzGerald O. et al. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis // *Ann. Rheum. Dis.* – 2005. – Vol. 64. – P. 1263-1267.
75. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!) // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2013. – Vol. 21. – P. 16-21.
76. Bigoni M., Sacerdote P., Turati M. et al. Acute and late changes in intraarticular cytokine levels following anterior cruciate ligament injury // *J. Orthop. Res.* – 2013. – Vol. 31. – No. 2. – P. 315-321.
77. Blanco F.J., Lopez-Armada M.J., Maneiro E. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis // *Mitochondrion.* – 2004. – Vol. 4. – P. 715-728.
78. Blasioli D.J., Kaplan D.L. The roles of catabolic factors in the development of osteoarthritis // *Tissue Engin. Part 2.* – 2014. – Vol. 20. - No. 4. – P. 355-363.
79. Board P.G., Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2013. - Vol. 1830. - P. 3267-3288.
80. Bonnet C.S., Walsh D.A. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation // *Rheumatology.* – 2005. – Vol. 44. –P. 7-16.
81. Borghaei R.C., Gorski G., Javadi M. et al. NF- κ B and ZBP-89 regulate MMP-3 expression via a polymorphic site in the promoter // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 2009. – Vol. 382. - No. 2. – P. 269-273.
82. Borgstahl G.E., Parge H.E., Hickey M.J. et al. Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface // *Biochemistry.* – 1996. – Vol. 35. – P. 4287-4297.
83. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* – 1968. – Vol. 97. – P. 77-89.
84. Brigelius-Flohe R., Maiorino M. Glutathione peroxidases // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1830. – P. 3289-3303.
85. Burrage P.S., Mix K.S., Brinckerhoff C.E. Matrix metalloproteinases: Role in arthritis // *Front. Biosci.* - 2006. - Vol. 11. - P. 529-543.
86. Burton G.J., Jauniaux E. Oxidative stress // *Best Prac. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* – 2011. – Vol. 25. – P. 287-299.

87. Bylund J., Brown K.L., Movitz C. et al. Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: how, where and what for? // *Free Radical Biol. Med.* – 2010. - Vol. 49. - P. 1834–1845.
88. Cai D., Yin S., Yang J. et al. Histone deacetylase inhibition activates Nrf2 and protects against osteoarthritis // *Arthritis Res. Ther.* – 2015. – Vol. 17. – P. 269-280.
89. Cai D., Yin S., Yang J. et al. Histone deacetylase inhibition activates Nrf2 and protects against osteoarthritis // *Arthritis Res. Ther.* - 2015. - Vol. 17. – P. 269-281.
90. Carballal S., Bartsaghi S., Radi R. Kinetic and mechanistic considerations to assess the biological fate of peroxynitrite // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2014. - Vol. 1840. - P. 768-780.
91. Cattano N.M., Barbe M.F., Massicotte V.S. et al. Joint trauma initiates knee osteoarthritis through biochemical and biomechanical processes and interactions // *OA Musculoskelet. Med.* – 2013. – Vol. 1. – No. 1. – P. 1-6.
92. Chen B.X., Francis M.J., Duthie R.B. et al. Oxygen free radical in human osteoarthritis // *Chinese Medical Journal.* – 1989. – Vol. 102. - No. 12. – P. 931-933.
93. Chen H., Wilkins L.M., Aziz N. et al. Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context // *Hum. Mol. Gen.* – 2006. – Vol. 15. – No. 4. – P. 519-529.
94. Chen Y., Nixon N.B., Dawes P.T., Matthey D.L. Influences of variations across the MMP-1 and MMP-3 genes on the serum levels of MMP-1 and -3 and disease activity in rheumatoid arthritis // *Genes Immun.* - 2012. - Vol. 13. - P. 29-37.
95. Chistiakov D.A., Zotova E.V., Savost'yanov K.V. et al. // The -262T>C promoter polymorphism of the catalase gene is associated with diabetic neuropathy in type 1 diabetic Russian patients // *Diabetes Metab.* – 2006. – Vol. 32. – No. 1. – P. 63-68.
96. Christ-Hazelhof E., Nugteren D.H., Van Dorp D.A. Conversions of prostaglandin endoperoxides by glutathione-S-transferases and serum albumins // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1976. - Vol. 450. - P. 450-461.
97. Clouet J., Vinatier C., Merceron C. et al. From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage // *Drug Discov. Today.* – 2009. – Vol. 14. – P. 913-925.
98. Cooper C. Epidemiology of osteoarthritis. In: Klippel J.H., Dieppe P.A., eds. *Rheumatology*. 2nd ed. London: Mosby, 1998. - P.1-20.
99. Cornelius L.A., Nehring L.C., Harding E. et al. Matrix metalloproteinases generate angiotensin: effects on neovascularization // *J. Immunol.* - 1998. – Vol. 161. – P. 6845-6852.

100. Daheshia M., Yao J.Q. The interleukin 1 β pathway in the pathogenesis of osteoarthritis // *J. Rheumatol.* – 2008. – Vol. 35. – P. 2306-2312.
101. Davies C.M., Guilak F., Weinberg J.B., Fermor B. Reactive nitrogen and oxygen species in interleukin-1-mediated DNA damage associated with osteoarthritis // *Osteoarthritis Cartilage.* - 2008. –Vol. 16. – P. 624-630.
102. Davies S.S., Guo L. Lipid peroxidation generates biologically active phospholipids including oxidatively N-modified phospholipids // *Chem. Phys. Lipids.* - 2014. - Vol. 181. - P. 1-33.
103. Dean G., Young D.A., Edwards D.R., Clark I.M. The human tissue inhibitor of metalloproteinases (*TIMP*)-1 gene contains repressive elements within the promoter and intron 1 // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – No. 42. – P. 32664-32671.
104. Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress // *Nutr. Metab. Cardiovas.* – 2005. - Vol. 15. - P. 316-328.
105. Denoble A.E., Huffman K.M., Stabler T.V. et al. Uric acid is a danger signal of increasing risk for osteoarthritis through inflammasome activation // *PNAS.* – 2011. – Vol. 108. – No. 5. – P. 2088-2093.
106. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes // *Biochim. Biophys. Acta* – 2013. – Vol. 1830. – P. 3217-3266.
107. Edd S.N., Giori N.J., Andriacchi T.P. The role of inflammation in the initiation of osteoarthritis after meniscal damage // *J. Biomech.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.02.035>.
108. El-barbary A.M., Khalek M.A.A., Elsalawy A.M., Hazaa S.M. Assessment of lipid peroxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients // *The Egyptian Rheumatologist.* – 2011. – Vol. 33. – P. 179-185.
109. Elfering S.L., Sarkela T.M., Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 38079-38088.
110. Elkington P.T.G., O’Kane C.M., Friedland J.S. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease // *Clin. Exp. Immunol.* – 2005. – Vol. 142. – P. 12-20.
111. Ellman Q.L. Tissue sulfhydryl groups // *Arch. Biochem.* - 1959. – Vol. 82. – P. 70-77.
112. Emam W.A., Zidan H.E., Abdulhalim B.-E.H. et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and susceptibility to high-tension primary open-angle glaucoma in an Egyptian cohort // *Mol. Vis.* – 2014. – Vol. 20. – P. 804-811.

113. Eo S.-H., Cho H., Kim S.-J. Resveratrol inhibits nitric oxide-induced apoptosis via the NF-kappa B pathway in rabbit articular chondrocytes // *Biomol. Ther.* – 2013. – Vol. 21. – No. 5. – P. 364-370.
114. Evangelou E., Valdes A.M., Kerkhof H.J.M. et al. Meta-analyses of genome-wide association studies confirms a susceptibility locus for knee osteoarthritis on chromosome 7q22 // *Ann. Rheum. Dis.* - 2011. - Vol. 70. - P. 349-355.
115. Feelisch M. The chemical biology of nitric oxide – an outsider’s reflections about its role in osteoarthritis // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2008. – Vol. 16. - Suppl. 2. – S3-S13.
116. Fischer B.A., Mundle S., Cole A.A. Tumor necrosis factor-alpha induced DNA cleavage in human articular chondrocytes may involve multiple endonucleolytic activities during apoptosis // *Microsc. Res. Tech.* – 2000. – Vol. 50. – No. 3. – P. 236-242.
117. Forsberg L., Lyrenas L., de Faire U., Morgenstern R. A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels // *Free Radical Biol. Med.* - 2001. - Vol. 30. - P. 500-505.
118. Forster T., Chapman K., Loughlin J. Common variants within the interleukin 4 receptor α gene (IL4R) are associated with susceptibility to osteoarthritis // *Hum. Genet.* - 2004. - Vol. 114. - P. 391-395.
119. Giaginis C., Giagini A., Theocharis S. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) as potential therapeutic agents to treat arthritis // *Pharmacol. Res.* – 2009. – Vol. 60. – P. 160-169.
120. Girotti A.W. Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems // *J. Lipid Res.* – 1998. – Vol. 39. – No. 8. - P.1529-1542.
121. Gok M., Erdem H., Gogus F. et al. Relationship of ultrasonographic findings with synovial angiogenesis modulators in different forms of knee arthritides // *Rheumatol. Int.* – 2013. – Vol. 33. – P. 879-885.
122. Goldring S.R., Goldring M.B. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2004. – S27-36.
123. Goldring M.B., Goldring S.R. Osteoarthritis // *J. Cell. Physiol.* – 2007. – Vol. 213. – P. 626–634.
124. Goldring M.B. Insight into function of DIO2, a susceptibility gene in human osteoarthritis, as an inducer of cartilage damage in a rat model: is there a role for chondrocyte hypertrophy? // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2013. – Vol. 21. – P. 643-645.

125. Gonzalez A. Osteoarthritis year 2013 in review: genetics and genomics // Osteoarthritis Cartilage (2013) – <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2013.07.001>.
126. Gosset M., Pigenet A., Salvat C. et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-3 and -13 synthesis induced by IL-1 β in chondrocytes from mice lacking microsomal prostaglandin E synthase-1 // J. Immunol. – 2010. – Vol. 185. – P. 6244-6252.
127. Greene M.A., Loeser R.F. Aging-related inflammation in osteoarthritis // Osteoarthritis Cartilage. – 2015. – Vol. 23. – P. 1966-1971.
128. Guix F.X., Uribealago I., Coma M., Munoz F.J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain // Prog. Neurobiol. - 2005. - Vol. 76. - P. 126-152.
129. Gupta T., Zielinska B., McHenry J., Kadmiel M. IL-1 and iNOS gene expression and NO synthesis in the superior region of meniscal explants are dependent on the magnitude of compressive strains // Osteoarthritis Cartilage. – 2008. – Vol. 16. – P. 1213-1219.
130. Habig W.H., Pabst M.J., Jacoby W.B. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. – 1974. - Vol. 249. – No. 22. – P. 7130-7139.
131. Haddy N., Sass C., Maumus S. et al. Biological variations, genetic polymorphism and familial resemblance of TNF α and IL-6 concentrations: STANISLAS cohort // Eur. J. Hum. Genet. – 2005. – Vol. 13. – P. 109-117.
132. Hamamura K., Goldring M.B., Yokota H. Involvement of p38 MAPK in regulation MMP13 mRNA in chondrocytes in response to surviving stress to endoplasmic reticulum // Arch. Oral Biol. – 2009. – Vol. 54. – P. 279-286.
133. Hame S.L., Alexander R.A. Knee osteoarthritis in women // Curr. Rev. Muskuloskelet. Med. – 2013. – Vol. 6. – P. 182-187.
134. Han L., Lee S.W., Yoon J.H. et al. Association of *SOD1* and *SOD2* single nucleotide polymorphisms with susceptibility to gastric cancer in a Korean population // APMIS. – 2013. – Vol. 121. – P. 246-256.
135. Han L., Song J.H., Yoon J.H. et al. TNF- α and TNF- β polymorphisms are associated with susceptibility to osteoarthritis in a Korean population // Korean J. Pathol. – 2012. – Vol. 46. – P. 30-37.
136. Hanachi N., Charef N., Baghiani A. et al. Comparison of xanthine oxidase levels in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other joint inflammations // Saudi Med. J. – 2009. – Vol. 30. - No. 11. – P. 1422-1425.

137. Hashimoto S., Ochs R.L., Rosen F. et al. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 3094-3099.
138. Hayes J. D., Flanagan J. U., Jowsey I. R. Glutathione transferases // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 2005. - Vol. 45. - P. 51-88.
139. Haynes V., Elfering S.L., Squires R.J. et al. Mitochondrial nitric-oxide synthase: role in pathophysiology // *Life.* –2003. - Vol. 55. - No. 10-11. - P. 599-603.
140. Helmig S., Aliahmadi N., Stephan P. et al. TNF α -308 genotypes are associated with TNF α and TGF- β mRNA expression in blood leucocytes of humans // *Cytokine.* – 2011. – Vol. 53. – No. 3. – P. 306-310.
141. Henrotin Y.E., Bruckner P., Pujol J.-P. L. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage // *Osteoarthritis Cartilage.* - 2003. – Vol. 11. – P. 747–755.
142. Hippeli S., Elstner E.F. Transition metal ion-catalyzed oxygen activation during pathogenic processes // *FEBS Lett.* –1999. – Vol. 443. - P. 1-7.
143. Hogrefe C., Joos H., Maheswaran V. et al. Single impact cartilage trauma and TNF- α : interactive effects do not increase early cell death and indicate the need for bi-/multidirectional therapeutic approaches // *Int. J. Mol. Med.* – 2012. – Vol. 30. – P. 1225-1232.
144. Hubertsson J., Petersson I.F., Thorstensson C.A., Englund M. Risk of sick leave and disability pension in working-age women and men with knee osteoarthritis // *Ann. Rheum. Dis.* - 2013. - Vol. 72. - P. 401-405.
145. Hunt J., Massey V., Dunham R., Sands R.H. Redox potentials of milk xanthine dehydrogenase // *J. Biol. Chem.* - 1993. - Vol. 268. - No. 25. - P. 18685-18691.
146. Hybertson B.M., Gao B., Bose S.K. et al. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation // *Mol. Aspects Med.* - 2011. - Vol. 32. - P. 234–246.
147. Iwanaga T., Shikichi M., Kitamura H. et al. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint // *Arch. histol.cytol.* – 2000. – Vol. 63. – P. 17–31.
148. Jackson C.J., Arkell J., Nguyen M. Rheumatoid synovial endothelial cells secrete decreased levels of tissue inhibitor of MMP (TIMP) // *Ann. Rheum. Dis.* – 1998. – Vol. 57. – P. 158-161.
149. Johnson M., Toms S. Mitogenic signal transduction pathways in meningiomas: novel targets for meningioma chemotherapy? // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2005. – Vol. 64. – P. 1029-1036.

150. Jormsjo S., Ye S., Moritz J. et al. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest coronary artery disease // *Circ. Res.* - 2000. – Vol. 86. – P. 998-1003.
151. Jones R.D., Hancock J.T., Morice A.H. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? // *Free Radical Biol. Med.* – 2000. - Vol. 29. - No. 5. – P. 416–424.
152. Kader K.A., Liu J., Shao L. et al. Matrix metalloproteinase polymorphisms are associated with bladder cancer invasiveness // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13. – P. 2614-2620.
153. Kapoor M., Martel-Pelletier J., Lajeunesse D. et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2011. – Vol. 7. – P. 33-42.
154. Karpouzas G., Terkeltaub R. New developments in the pathogenesis of articular cartilage calcification // *Curr. Rheum.Rep.* - 1999. – Vol. 1. – P. 121-127.
155. Karsdal M.A., Christiansen C., Ladel C. et al. Osteoarthritis – a case for personalized health care? // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2014. – Vol. 22. – P. 7-16.
156. Kaspiris A., Khaldi L., Chronopoulos E. et al. Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) immunoexpression in the osteochondral unit in osteoarthritis correlates with BMI and disease severity // *Pathophysiol.* – 2015. – Vol. 22. – P. 143-151.
157. Kaspiris A., Papadimitriou E., Chronopoulos E. et al. Immunolocalization of the human metalloelastase MMP-12 in the cartilage and subchondral bone in osteoarthritis // *Bone.* – 2012. – Vol. 50. – Supple. 1. – S185.
158. Keam B., Hwang J.-Y., Go M.J. et al. Genome-wide association study identified TIMP2 genetic variant with susceptibility to osteoarthritis // *Genomics Inform.* – 2011. – Vol. 9. – No. 3. – P. 121-126.
159. Kerkela E., Bohling T., Herva R. et al. Human macrophage metalloelastase (MMP-12) expression is induced in chondrocytes during fetal development and malignant transformation // *Bone.* – 2001. – Vol. 29. - No. 5. – P. 487-493.
160. Kerkhof H.J.M. Genetics of osteoarthritis: What a pain! // *Optima Grafische Communicatie*, Rotterdam, 2012 – 306 pp.
161. Kerkhof H.J.M., Doherty M., Arden N.K. et al. Large-scale meta-analyses of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist polymorphisms on risk of radiographic hip and knee osteoarthritis and severity of knee osteoarthritis // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2011. – Vol. 19. – P. 265-271.

162. Kerkhof H.J.M., Lories R.J., Meulenbelt I. et al. A genome-wide association study identifies an osteoarthritis susceptibility locus on chromosome 7q22 // *Arthritis Rheum.* - 2010. - Vol. 62. - No. 2. - P. 499-510.
163. Kerkhof H.J.M., Uitterlinden A.G., Valdes A.M. et al. Radiographic osteoarthritis at three joint sites and FRZB, LRP5 and LRP6 polymorphisms in two population-based cohorts // *Osteoarthritis Cartilage.* - 2008. - Vol. 16. - P. 1141-1149.
164. Khan I.M., Redman S.N., Williams R. et al. The development of synovial joints // *Curr. Top. Dev. Biol.* - 2007. - Vol. 79. - P. 1-36.
165. Kim H.A., Blanco F.J. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage // *Curr. Drug Targets.* - 2007. - Vol. 8, No. 2. - P. 333-345.
166. Kim H.A., Lee Y.J., Seong S.C. et al. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis // *J. Rheumatol.* - 2000. - Vol. 27. - P. 455-462.
167. Kim J., Xu M., Xo R. et al. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes // *Osteoarthritis Cartilage.* - 2010. - Vol. 8. - P. 424-432.
168. Koike M., Nojiri H., Ozawa Y. Mechanical overloading causes mitochondrial superoxide and SOD₂ imbalance in chondrocytes resulting in cartilage degeneration // *Sci. Rep.* - 2015. - Vol. 5. - 11722; doi: 10.1038/srep11722.
169. Kolundzic R., Trkulja V., Mikolaucic M. et al. Association of interleukin-6 and transforming growth factor-β1 gene polymorphisms with developmental hip dysplasia and severe adult hip osteoarthritis: a preliminary study // *Cytokine.* - 2011. - Vol. 54. - P. 125-128.
170. Kreinhoff U., Elmadfa I., Salomon F., Weidler B. Antioxidant status after surgical stress // *Infusionstherapie.* - 1990. - Vol. 17. - No. 5. - P. 261-267.
171. Kuhn K., D'Lima D.D., Hashimoto S., Lotz M. Cell death in cartilage // *Osteoarthritis Cartilage.* - 2004. - Vol. 12. - P. 1-16.
172. Kvietys P.R., Granger D.N. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation // *Free Radical Biol. Med.* - 2012. - Vol. 52. - P. 556-592.
173. Lacza Z., Snipes J.A., Zhang J. et al. Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS // *Free Radical Biol. Med.* - 2003. - Vol. 35. - No. 10. - P. 1217-1228.
174. Lawrence J.T.R., Birmingham J., Toth A.P. Prevention of posttraumatic arthritis through interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha inhibition // *Clin. Orthop. Relat. Res.* - 2011. - Vol. 469. - P. 3522-3526.

175. Lee H.J., Lee G.H., Nah S. et al. Association of TIMP-4 gene polymorphism with the risk of osteoarthritis in the Korean population // *Rheumatol. Int.* - 2008. - Vol. 28. - No. 9. - P. 845-50.
176. Lee Y.H., Rho Y.H., Choi S.J. et al. Osteoarthritis susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis // *Rheumatol. Int.* - 2006. - Vol. 26. - No. 11. - P. 996-1000.
177. Li J., Huang J., Dai L. et al. miR-146a, an IL-1 β responsive miRNA, induces vascular endothelial growth factor and chondrocyte apoptosis by targeting Smad4 // *Arthritis Res. Ther.* - 2012. - Vol. 14. - R75.
178. Lieberthal J., Sambamurthy N., Scanzello C.R. Inflammation in joint injury and post-traumatic osteoarthritis // *Osteoarthritis Cartilage.* - 2015. - Vol. 23. - P. 1825-1834.
179. Litvinov D., Turpaev K. Extracellular catalase induces cyclooxygenase 2, interleukin 8, and stromelysin genes in primary human chondrocytes // *Biochimie.* - 2004. - Vol. 86. - P. 945-950.
180. Liu D., Jiang Z., Dai L. et al. Association between the -786T>C polymorphism in the promoter region of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and risk of coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis // *Gene.* - 2014. - Vol. 545. - P. 175-183.
181. Loeser R.F., Carlson C.S., Del Carlo M., Cole A. Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage // *Arthritis Rheum.* - 2002. - Vol. 46. - No. 9. - P. 2349-2357.
182. Lopez-Armada M.J., Carames B., Lires-Dean M. et al. Cytokines, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β , differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes // *Osteoarthritis Cartilage.* - 2006. - Vol. 14. - P. 660-669.
183. Lopez-Armada M.J., Riveiro-Naveira R.R., Vaamonde-Garcia C., Valcarcel-Ares M.N. Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response // *Mitochondrion* - 2013. - Vol. 13. - P. 106-118.
184. Lose F., Thompson P.J., Duffy D. et al. A novel tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) polymorphism associated with asthma in Australian women // *Thorax.* - 2005. - Vol. 60. - P. 623-628.
185. Lotz M., Loeser R.F. Effects of aging on articular cartilage homeostasis // *Bone.* - 2012. - Vol. 51. - P. 241-248.
186. Maicas N., Ferrandiz M.L., Brines R. et al. Deficiency of Nrf2 accelerates the effector phase of arthritis and aggravates joint disease // *Antioxid. Redox Signaling.* - 2011. - Vol. 15. - No. 4. - P. 889-901.

187. Marklund S.L., Bjelle A., Elmqvist L.G. Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and in reactive arthritides // *Ann. Rheum. Dis.* – 1986. – Vol. 45. – P. 847–851.
188. Marks P.H., Donaldson M.L. Inflammatory cytokine profiles associated with chondral damage in the anterior cruciate ligament-deficient knee // *Arthroscopy.* - 2005. – Vol. 21. – P. 1342-1347.
189. Marshall K.W., Chiu B., Inman R.D. Substance P and arthritis: analysis of plasma and synovial fluid levels // *Arthritis Rheum.* – 1990. – Vol. 33. – P. 87–90.
190. Martin J.A., Buckwalter J.A. Human chondrocyte senescence and osteoarthritis // *Biorheology.* – 2002. - Vol. 39. - No. 1-2. - P. 145-52.
191. Martinez-Ruiz A., Cadenas S., Lamas S. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms // *Free Radical Biol. Med.* - 2011. - Vol. 51. - P. 17-29.
192. Mathy-Hartert M., Hogge L., Sanchez C. et al. Interleukin-1 β and interleukin-6 disturb the antioxidant enzyme system in bovine chondrocytes: a possible explanation for oxidative stress generation // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2008. – Vol. 16. – P. 756-763.
193. Mazzetti I., Grigolo B., Pulsatelli L. et al. Differential roles of nitric oxide and oxygen radicals in chondrocytes affected by osteoarthritis and rheumatoid arthritis // *Clin. Sci.* – 2001. – Vol. 101. – P. 593-599.
194. Miao L., Clair D.K. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease // *Free Rdic. Biol. Med.* – 2009. – Vol. 47. – P. 344-356.
195. Miao X., Garcia-Barcelo M.M., So M. et al. Lack of association between nNOS - 84G>A polymorphism and risk of infantile hypertrophic pyloric stenosis in a Chinese population // *J. Pediatr. Surg.* – 2010. – Vol. 45. – P. 709-713.
196. Miller R.E., Miller R.J., Malfait A.-M. Osteoarthritis joint pain: The cytokine connection // *Cytokine.* – 2014. – Vol. 70. – P. 185-193.
197. Mobasheri A., Matta C., Zakany R., Musumeci G. Chondrosenescence: definition, hallmarks and potential role in the pathogenesis of osteoarthritis // *Maturitas.* – 2015. – Vol. 80. – P. 237-244.
198. Moore J.H., Williams S.W. New strategies for identifying gene-gene interactions in hypertension // *Ann. Med.* – 2002. – Vol. 34. – P. 88-95.
199. Moore J.H. Detecting, characterizing, and interpreting nonlinear gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction // *Adv. Gen.* – 2010. – Vol. 72. – P. 101-116.

200. Moreno-Reyes R., Mathieu F., Boelaert M. et al. Selenium and iodine supplementation of rural Tibetan children affected by Kashin-Beck osteoarthropathy // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2003. – Vol. 78. - No. 1. – P. 137-144.
201. Morishima N., Nakanishi K., Takenouchi H. et al. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12 // *J. Biol. Chem.* - 2002. - Vol. 277. - No. 37. - P. 34287-34294.
202. Moxley G., Meulenbelt I., Chapman K. et al. Interleukin-1 region met-analysis with osteoarthritis phenotypes // *Osteoarthritis Cartilage.* - 2009. - Vol. 18. - P. 200-207.
203. Munoz-Valle J.F., Oregon-Romero E., Rangel-Villalobos H. et al. High expression of TNF alpha is associated with -308 and -238 TNF alpha polymorphisms in knee osteoarthritis // *Clin. Exp. Med.* – 2014. – Vol. 14. – P. 61-67.
204. Musumeci G., Castrogiovanni P., Trovato F.M. et al. Biomarkers of chondrocyte apoptosis and autophagy in osteoarthritis // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16. – P. 20560-20575.
205. Nakayama M., Yasue H., Yoshimura M. et al. T⁻⁷⁸⁶→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm // *Circulation.* – 1999. – Vol. 99. – P. 2864-2870.
206. Niki E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1840. – P. 809-817.
207. Ning L., Ischijima M., Kaneko H. et al. Correlations between both the expression levels of inflammatory mediators and growth factor in medial perimeniscal synovial tissue and the severity of medial knee osteoarthritis // *Int. Orthop.* – 2011. – Vol. 35. – P. 831-838.
208. Nguyen T., Huang H.C., Pickett C.B. Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK // *J. Biol. Chem.* - 2000. - Vol. 275. - P. 15466–15473.
209. Oh H., Yang S., Park M., Chun J.-S. Matrix metalloproteinase MMP-12 regulates MMP-9 expression in interleukin-1-treated articular chondrocytes // *J. Cell Biochem.* – 2008. – Vol. 105. – P. 1443-1450.
210. Olson S.Y., Garban H.J. Regulation of apoptosis-related genes by nitric oxide in cancer // *Nitric Oxide.* – 2008. – Vol. 19. – P. 170-176.
211. Orita S., Koshi T., Mitsuka T. et al. Associations between proinflammatory cytokines in the synovial fluid and radiographic grading and pain-related scores in 47 consecutive patients with osteoarthritis of the knee // *BMC Musculoskelet. Disord.* – 2011. – Vol. 12. – P. 144.

212. Ostalowska A., Birkner E., Wiecha M. et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint // *Osteoarthritis Cartilage*. – 2006. – Vol. 14. – P. 139-145.
213. Ostalowska A., Kasperczyk S., Kasperczyk A. et al. Oxidant and anti-oxidant systems of synovial fluid from patients with knee post-traumatic arthritis // *J. Orthop. Res.* - 2007. - Vol. 25. - No. 6. - P. 804-812.
214. Pamplona R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2008. - Vol. 1777. - P. 1249-1262.
215. Panoutsopoulou K., Southam L., Elliott K.S. et al. Insights into the genetic architecture of osteoarthritis from stage 1 of the arcOGEN study // *Ann. Rheum. Dis.* - 2011. - Vol. 70. -P. 864–867.
216. Parks W.C., Wilson C.L., Lopez-Boado Y.S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity // *Nat. Rev. Immunol.* - 2004. - Vol. 4. - P. 617-629.
217. Peach C.A., Carr A.J., Loughlin J. Recent advances in the genetic investigation of osteoarthritis // *Trends Mol. Med.* - 2005. - Vol. 11. - No. 4. - P. 186-191.
218. Pendleton A., Arden N., Dougados M. et al. EULAR recommendations for the management of knee osteoarthritis: report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT) // *Ann. Rheum. Dis.* – 2000. – Vol. 59. – P. 936-944.
219. Pinto S., Rao A.V., Rao A. Lipid peroxidation, erythrocyte antioxidants and plasma antioxidants in osteoarthritis before and after homeopathic treatment // *Homeopathy*. – 2008. – Vol. 97. – P. 185-189.
220. Planello A.C., Campos M.I.G., Meloto C.B. et al. Association of matrix metalloproteinase gene polymorphism with temporomandibular joint generation // *Eur. J.Oral Sci.* - 2011. - Vol. 119. - P. 1-6.
221. Pola E., Papaleo P., Rola R., Gaetani E., Tamburelli F.C., Aulisa L., Logroscino C.A. Interleukin-6 gene polymorphism and risk of osteoarthritis of the hip: a case-control study // *Osteoarthritis Cartilage*. – 2005. – Vol. 13. – P. 1025-1028.
222. Poole A.R, Guilak F., Abramson S.B. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Moskowitz R.W., Altman R.W., Hochberg M.C., Buckwalter J.A., Goldberg V.M., editors. *Osteoarthritis: Diagnosis and medical/surgical management*. 4th edition. Philadelphia: Lippincott, Williams, and Wilkins, 2007. – P. 27–49.

223. Prieto-Montana J.R., Riancho J.A. Osteoarthritis as a genetic condition // *Rev. esp. cir. ortop. traumatol.* – 2009. – Vol. 53. – No. 4. – P. 271-277.
224. Pritzker K.P., Gay S., Jimenez S.A. et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: Grading and staging // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2006. – Vol. 14. – P. 13–29.
225. Radak Z., Boldogh I. 8-oxo-7,8-dihydroguanine: links to gene expression, aging and defense against oxidative stress // *Free Radical Biol. Med.* – 2010. - Vol. 49. – P. 587-596.
226. Radi R., Bush K.M., Cosgrove T.P., Freeman B.A. Reaction of xanthine oxidase-derived oxidants with lipid and protein of human plasma // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1991. – Vol. 286. - No. 1. – P. 117-125.
227. Reczek C.R., Chandel N.S. ROS-dependent signal transduction // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2015. – Vol. 33. – P. 8-13.
228. Rees M.D., Kennett E.C., Whitelock J.M., Davies M.J. Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies// *Free Radical Biol. Med.* - 2008. - Vol. 44. - P. 1973-2001.
229. Regan E.A., Bowler R.P., Crapo J.D. Joint fluid antioxidants are decreased in osteoarthritic joints compared to joints with macroscopically intact cartilage and subacute injury // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2008. – Vol. 16. – P. 515-521.
230. Reynard L.N., Louhlin J. Genetics and epigenetics of osteoarthritis // *Maturitas.* - 2012. - Vol. 71. - No. 3. - P. 200-204.
231. Riancho J.A., Garcia-Ibarbia C., Gravani A. et al. Common variations in estrogen-related genes are associated with severe large-joint osteoarthritis: a multicenter genetic and functional study // *Osteoarthritis Cartilage.* - 2010. - Vol. 18. - P. 927-933.
232. Roach H.I., Aigner T., Kouri J.B. Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? // *Apoptosis.* - 2004. - Vol. 9. - P. 265-277.
233. Rodriguez D., Morrison C.J., Overall C.M. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics // *Biochim Biophys Acta.* – 2010. –Vol. 1803. – P. 39-54.
234. Rodriguez-Lopez J., Pombo-Suarez M., Liz M. et al. Further evidence of the role of frizzled-related protein gene polymorphisms in osteoarthritis // *Ann. Rheum. Dis.* - 2007. - Vol. 66. - P. 1052-1055.
235. Rogers R., Shepstone L., Dieppe F. Is osteoarthritis a systemic disorder? // *Arthr. Rheum.* – 2004. – Vol. 50. – P. 452-457.

236. Roman-Blas J.A., Jimenez S.A. NF- κ B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis // *Osteoarthritis Cartilage*. – 2006. – Vol. 14. –P. 839-848.
237. Rutter J.L., Mitchell T.I., Buttice G. et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription // *Cancer Res*. - 1998. - Vol. 58. - P. 5321-5325.
238. Ryk C., Wiklund N.P., Nyberg T., Verdier P.J. Polymorphisms in nitric-oxide synthase 3 may influence the risk of urinary-bladder cancer // *Nitric Oxide*. – 2011. – Vol. 25. – P. 338-343.
239. Saksela M., Lapatto R., Raivio K.O. Irreversible conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase by a mitochondrial protease // *FEBS Lett*. - 1999. - Vol. 443. – No. 2. - P. 117-120.
240. Sarban S., Kocyigit A., Yazar M., Isikan U.E. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis // *Clinical Biochemistry*. – 2005. – Vol. 38. – P. 981-986.
241. Saur D., Vanderwinden J. M., Seidler B. et al. Single nucleotide promoter polymorphism alters transcription of neuronal nitric oxide synthase exon 1c in infantile hypertrophic pyloric stenosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – Vol. 101. – No. 6. – P. 1662-1667.
242. Scanzello C.R., Goldring S.R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis // *Bone*. – 2012. – Vol. 51. – No. 2. – P. 249-257.
243. Schneider E.M., Du W., Fiedler J. et al. The (-765 G \rightarrow C) promoter variant of the COX-2/PTGS2 gene is associated with a lower risk for end-stage hip and knee osteoarthritis // *Ann. Rheum. Dis*. - 2011. - Vol. 70. - P. 1458-1460.
244. Schroder K., Tschopp J. The inflammasomes // *Cell*. – 2010. – Vol. 140. – P. 821-832.
245. Serra A., Schuchardt K., Genuneit J. et al. Genomic variants in the coding region of neuronal nitric oxide synthase (NOS1) in infantile hypertrophic pyloric stenosis // *J. Pediatr. Surg*. – 2011. – V. 46. – P. 1903-1908.
246. Sezgin M., Barlas I.O., Ankarali H.C. et al. Tumour necrosis factor α -308G/A gene polymorphism: lack of association with knee osteoarthritis in a Turkish population // *Clin. Exp. Rheumatol*. – 2008. – Vol. 26. – P. 763-768.

247. Shacterle G.R., Pollack R.L. A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biological material // *Annal. Biochem.* - 1973. - Vol. 51. - P. 654-655.
248. Shah R., Raska Jr. K., Tiku M. L. The presence of molecular markers of *in vivo* lipid peroxidation in osteoarthritic cartilage: a pathogenic role in osteoarthritis // *Arthritis Rheum.* - 2005. - Vol. 52. - P. 2799-2807.
249. Shapiro I.M., Adams C.S., Srinivas V., Freeman T.A. Chondrocyte Hypertrophy and Apoptosis at the Cartilage-Bone Interface // *Bone and Osteoarthritis (Topics in Bone Biology, Vol. 4)*. – 2007. - P. 109-129.
250. Sher J.U., Pillinger M.H., Abramson S.B. Nitric oxide synthases and osteoarthritis // *Curr. Rheum. Rep.* - 2007. - Vol. 9. - P. 9-15.
251. Shin A., Cai Q., Shu X.-O. et al. Genetic polymorphisms in the matrix metalloproteinase 12 gene (MMP12) and breast cancer risk and survival: the Shanghai Breast Cancer Study // *Breast Cancer Res.* – 2005. – Vol. 7. – No. 4. – R506-512.
252. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine // *Redox Biol.* – 2015. – Vol. 4. – P. 180-183.
253. Smith A.J.P., Keen L.J., Billingham M.J. et al. Extended haplotypes and linkage disequilibrium in the *IL1R1-IL-1A-IL-1B-IL-1RN* gene cluster // *Genes Immun.* - 2004. - Vol. 5. - P.451-460.
254. Smith K.J., Bertone A.L., Weisbrode S.E., Radmacher M. Gross, histologic, and gene expression characteristics of osteoarthritic articular cartilage of the metacarpal condyle of horses // *Am. J. Vet. Res.* – 2006. – Vol. 67. – P. 1299–1306.
255. Srivastava R.N., Sanghi D., Mishra A. et al. Serum uric acid as a predisposing factor of clinic-radiological severity of osteoarthritis knee // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2013. – Vol. 21. – S251.
256. Stabler T., Kraus V.B. Xanthine oxidase response in acute joint injury // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2012. – Vol. 20. – S74-75.
257. Stabler T., Zura R.D., Hsueh M.F., Kraus V.B. Xanthine oxidase injurious response in acute joint injury // *Clin. Chim. Acta.* – 2015. – Vol. 451. – P. 170-174.
258. Stannus O., Jones G., Cicuttini F. et al. Circulating levels of IL-6 and TNF- α are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2010. – Vol. 18. – P. 1441-1447.
259. Sugiyama S., Itokazu M., Suzuki Y., Shimizu K. Procollagen II C propeptide level in the synovial fluid as a predictor of radiographic progression in early knee osteoarthritis // *Ann. Rheum. Dis.* – 2003. – Vol. 62. – P. 27-32.

260. Sutipornpalangkul W., Morales N.P., Charoencholvanich K., Harnroongroj T. Lipid peroxidation, glutathione, vitamin E, and antioxidant enzymes in synovial fluid from patients with osteoarthritis // *Int. J. Rheum. Dis.* – 2009. – Vol. 12. – P. 324-328.
261. Sutton S., Clutterbuck A., Harris P. et al. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis // *Vet. J.* – 2009. – Vol. 179. – P. 10–24.
262. Takacs-Buia L., Iordachel C., Efimov N. et al. Pathogenesis of osteoarthritis: chondrocyte replicative senescence or apoptosis? // *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*. – 2008. - 74B. – P. 356–362.
263. Tamayo M., Mosquera A., Rego J.I. et al. Differing patterns of peripheral blood leukocytes telomere length in rheumatologic diseases // *Mutat. Res.* - 2010. - Vol. 683. - P. 68-73.
264. Taskin N., Ulucan K., Degin K. et al. Investigation of the MMP1 and MMP3 promoter polymorphisms in temporomandibular joint disorder // *J. Cell Mol. Biol.* - 2011. - Vol. 9. - No. 1. - P. 63-68.
265. Terkeltaub R., Johnson K., Murphy A., Ghosh S. Invited review: the mitochondrion in osteoarthritis // *Mitochondrion*. – 2002. – Vol. 1. – P. 301-319.
266. Teunis T., Beekhuizen M., Van Osch G.V.M. et al. Soluble mediators in posttraumatic wrist and primary knee osteoarthritis // *Arch. Bone Jt. Surg.* – 2014. – Vol. 2. – No. 3. – P. 146-150.
267. Tiku M.L., Shah R., Allison G.T. Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 20069-20076.
268. Tsuchida A.I., Beekhuizen M., Hart M.C. et al. Cytokine profiles in the joint depend on pathology, but are different between synovialfluid, cartilage tissue and cultured chondrocytes // *Arthritis Res. Ther.* – 2014. – Vol. 16. – P. 441.
269. Uehara Y., Hirose J., Yamabe S. et al. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis contributes to articular cartilage degeneration via C/EBP homologous protein // *Osteoarthritis Cartilage*. – 2014. - <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2014.04.025>.
270. Valcarcel-Ares M.N., Riveiro-Naveira R.R., Vaamonde-Garcia C. et al. Mitochondrial dysfunction promotes and aggravates the inflammatory response in normal human synoviocytes // *Rheumatology*. – 2014. – Vol. 53. – P. 1332-1343.
271. Valdes A.M., Arden N.K., Tamm A. et al. A meta-analysis of interleukin-6 promoter polymorphisms on risk of hip and knee osteoarthritis // *Osteoarthritis Cartilage*. – 2010. - Vol. 18. – P. 699-704.

272. Valdes A.M., Doherty S., Muir K.R. et al. The genetic contribution to severe post-traumatic osteoarthritis // *Ann. Rheum. Dis.* – 2013. – Vol. 72. – P. 1687-1690.
273. Valdes A.M., Doherty S., Muir K.R. et al. Genetic contribution to radiographic severity in osteoarthritis of the knee // *Ann. Rheum. Dis.* - 2012. - Vol. 71. - No. 9. - P. 1537-1540.
274. Valdes A.M., Doherty M., Spector T.D. The additive effect of individual genes in predicting risk of knee osteoarthritis // *Ann. Rheum. Dis.* - 2008. - Vol. 67. - P. 124-127.
275. Valdes A.M., Hart D.J., Jones K.A. et al. Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis // *Arthritis Rheum.* - 2004. - Vol. 50. - P. 2497-2507.
276. Valdes A.M., Spector T.D. The clinical relevance of genetic susceptibility to osteoarthritis // *Best Pract. Res. Cl. Rh.* - 2010. - Vol. 24. - P. 3-14.
277. Valdes A.M., Spector T.D., Tamm A. et al. Genetic variation in the SMAD3 gene is associated with hip and knee osteoarthritis // *Arthritis Rheum.* - 2010. - Vol. 62. - No. 8. - P. 2347-2352.
278. Valko M., Leibfritz D., Moncol J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* - 2007. - Vol. 39. - P. 44-84.
279. Van Diemen C.C., Postma D.S., Siedlinski M. et al. Genetic variation in TIMP1 but not MMPs predict excess FEV₁ decline in two general population-based cohorts // *Respiratory Res.* - 2011. – Vol. 12. – No. 57. – P. 1-8.
280. Van Spil W.E., Welsing P.M.J. et al. Cross-sectional and predictive associations between plasma adipokines and radiographic signs of early-stage knee osteoarthritis: data from CHECK // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2012. – Vol. 20. – P. 1278-1285.
281. Van't Hof R.J., Macphee J., Libouban H. et al. Regulation of bone mass and bone turnover by neuronal nitric oxide synthase // *Endocrinol.* – 2004. – Vol. 145. – No. 11. – P. 5068-5074.
282. Wada Y., Shimada K., Sugimoto K. et al. Novel p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor R-130823 protects cartilage by down-regulating matrix metalloproteinase-1, -13 and prostaglandin E2 production in human chondrocytes // *Int. Immunopharmacol.* – 2006. – Vol. 6. – P. 144-155.
283. Wang M.-X., Wei A., Yuan J. et al. Expression and regulation of peroxiredoxin 5 in human osteoarthritis // *FEBS Lett.* – 2002. – Vol. 531. – P. 359-362.

284. Wang X., Liang J., Koike T. et al. Overexpression of human matrix metalloproteinase-12 enhances the development of inflammatory arthritis in transgenic rabbits // *Am. J. Pathol.* – 2004. – Vol. 165. – No. 4. – P. 1375-1383.
285. Watanabe H., Yamada Y., Kimata K. Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function // *J. Biochem. (Tokyo)* – 1998. – Vol. 124. – P. 687–693.
286. Watson M.A., Stewart R.K., Smith G.B.J. et al. Human glutathione-S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution // *Carcinogenesis*. – 1998. – Vol. 19. – No. 2. – P. 275–280.
287. Welkriana P.W., Sunatri, Hastuti P. T-786C polymorphism in nitric oxide synthase 3 gene and nitric oxide level of diabetic retinopathy in Javanese population. *Indonesian Journal of Biotechnology*. – 2011. – Vol. 16. – No. 2. – P. 126-131.
288. Wen L., Qu T.B., Zhai K. et al. Gallic acid can play a chondroprotective role against AGE-induced osteoarthritis progression // *J. Orthop. Sci.* – 2015. – Vol. 20. – P. 734-741.
289. Whiteman M., Armstrong J.S., Cheung N.S. et al. Peroxynitrite mediates calcium-dependent mitochondrial dysfunction and cell death via activation of calpains // *FASEB J.* – 2004. – Vol. 18. – P. 1392-1397.
290. Whiteman M., Chu S.H., Siau J.L. et al. The pro-inflammatory oxidant hypochlorous acid induces Bax-dependent mitochondrial permeabilisation and cell death through AIF/EndoG-dependent pathways // *Cell. Signal.* - 2007. – Vol. 19. – P. 705-714.
291. Wispe J.R., Warner B.B., Clark, J.C. et al. Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – P. 23937–23941.
292. Yamakura F., Kawasaki H. Post-translational modifications of superoxide dismutase // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2010. - Vol. 1804. - P. 318-325.
293. Yamana K., Bilim V., Hara N. et al. Prognostic impact of FAS/CD95/APO-1 in urothelial cancers: decreased expression of Fas is associated with disease progression // *Br. J. Cancer.* – 2005. – Vol. 93. – P. 544-551.
294. Yan Q., Feng Q., Beier F. Endothelial nitric oxide synthase deficiency in mice results in reduced chondrocyte proliferation and endochondral bone growth // *Arthritis Rheum.* – 2010. – Vol. 62. – No. 7. – P. 2013-2022.
295. Yan Q., Feng Q., Beier F. Reduced chondrocyte proliferation, earlier cell cycle exit and increased apoptosis in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2012. – V. 20. – P. 144-151.

296. Yang S., Kim J., Ryu J.-H. et al. Hypoxia-inducible factor-2 α is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction // *Nature Med.* – 2010. – Vol. 16. – P. 687-693.
297. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases // *Matrix Biol.* - 2000. - Vol. 19. - P. 623-629.
298. Ye Z.-W., Zhang J., Townsend D.M., Tew K.D. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – Vol. 1850. – P. 1607-1621.
299. Yi J.-F., Li Y.-M., Liu T. et al. Mn-SOD and CuZn-SOD polymorphisms and interactions with risk factors in gastric cancer // *World J. Gastroenterol.* – 2010. - Vol. 16. – No. 37. – P. 4738-4746.
300. Zavodovsky B.V., Dmitrenko O.S., Sivordova L.E., Zborovskaya I.A. Chondroprotectors efficiency and level of antibodies chondroitine sulfate in osteoarthritis patients // *Ann. Rheum. Dis.* - 2008. - Vol. 67. - Suppl II. - P. 632.
301. Zeggini E., Panoutsopoulou K., Southam L. et al. Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study // *Lancet.* – 2012. – Vol. 380. – No. 9844. – P. 815-823.
302. Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the Cu,Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression // *Free Radical Biol. Med.* – 2002. – Vol. 33. - No. 3. – P. 337–349.
303. Zhai G., Aviv A., Hunter D.J. et al. Reduction of leucocyte telomere length in radiographic hand osteoarthritis: a population-based study // *Ann. Rheum. Dis.* - 2006. - Vol. 65. - P. 1444-1448.