

На правах рукописи



Панина Светлана Борисовна

**РОЛЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ
ЦИТОКИНОВ В МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ ГОНАРТРОЗА**

Специальность 03.01.04. – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж - 2016

Работа выполнена в Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет»

Научный руководитель

Кандидат биологических наук, доцент
Милютина Наталья Петровна

Официальные оппоненты

Горошинская Ирина Александровна
Доктор биологических наук, профессор,
ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский
онкологический институт» Минздрава РФ,
лаборатория изучения патогенеза злокачественных
опухолей, главный научный сотрудник

Бородулин Владимир Борисович
Доктор медицинских наук, профессор,
ГБОУ ВПО «Саратовский государственный
медицинский университет имени В.И. Разумовского»
Минздрава РФ, кафедра биохимии, заведующий

Ведущая организация

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и экспериментальной ревматологии»
(г. Волгоград)

Защита диссертации состоится « 09 » июня 2016 года в 15:30 часов на заседании диссертационного совета Д 212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394006, г. Воронеж, Университетская пл., 1, ауд. 59.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Минобрнауки Российской Федерации и на сайте Воронежского государственного университета <http://www.science.vsu.ru>.

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке Воронежского госуниверситета.

Автореферат разослан «06» апреля 2016 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



Грабович Маргарита Юрьевна

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 сустава, 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 (Kroon 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, ксантинооксидазы 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 $IL-1\beta$ и $TNF\alpha$ 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, $IL-1\beta$, $TNF\alpha$;
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/Lawtence. На основании полученных результатов разработан инновационный способ дифференциальной диагностики стадии гонартроза (патентная заявка №2014153253), учитывающий показатели плазмы и моноклеарной 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 гонартоза 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 α в плазме и СЖ (аллель *A*).
5. Модель *CAT C-262T* \times *MMP-12 A-82G* \times *NOS1 G-84A* \times *IL1b T-31C* \times *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, результатов и их обсуждения (5 глав), заключения, выводов, списка литературы (303 источника). Иллюстративный материал включает 19 таблиц и 20 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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, 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 Kellren-Lawrence (I, II, III-IV). Группа I (17 человек) включала пациентов I стадии: возраст 37,47 \pm 4,81 лет, 9 мужчин/8 женщин, ИМТ 23,47 \pm 1,72 кг/м². Группа II (30 человек) включала пациентов II стадии: возраст 41,40 \pm 3,21 лет, 16 мужчин/14 женщин, ИМТ 23,51 \pm 0,70 кг/м². Группа III (42 человека) включала пациентов III-IV стадии: возраст 62,98 \pm 1,25 лет, 4 мужчины/38 женщин, ИМТ 25,67 \pm 0,33 кг/м². Пациенты с подтвержденным ПТГА были разделены на три группы соответственно стадии ГА: группа I включала 9 пациентов I стадии, возраст 22,78 \pm 2,70 лет, 7 мужчин/2

женщины, ИМТ $22,03 \pm 1,14$ кг/м². Группа II – 40 пациентов II стадии, возраст $38,35 \pm 2,31$ лет, 24 мужчин/16 женщин, ИМТ $24,05 \pm 0,57$ кг/м². Группа III – 22 пациента III стадии, возраст $54,36 \pm 1,60$ лет, 7 мужчин/15 женщин, ИМТ $27,38 \pm 0,94$ кг/м². В группу для генотипирования SNP-локусов были включены 117 пациентов с ПТГА (46 мужчин/71 женщина; возраст $46,33 \pm 1,44$ лет; ИМТ $26,7 \pm 0,83$ кг/м²). В контрольную группу было включено 94 человека (возраст $44,01 \pm 1,55$ лет; 39 мужчин/55 женщин; ИМТ $25,41 \pm 0,58$ кг/м²) без признаков ГА в анамнезе, что было подтверждено рентгенологическим методом. Все обследованные пациенты имели русскую национальность и проживали на территории Ростовской области.

Получение биологического материала. Забор крови (9 мл) проводили утром натощак путем пункции локтевой вены в пробирки с К₂-ЭДТА в качестве антикоагулянта. Синовиальную жидкость (СЖ) собирали в пробирки с гепарином путем артроцентеза коленного сустава. Определение биохимических и иммунологических показателей проводили в плазме, мононуклеарной фракции и эритроцитах крови, а также синовиальной жидкости. ДНК для анализа полиморфных локусов выделяли из лейкоцитов периферической крови. Выделение мононуклеарной фракции осуществляли из цельной крови в градиенте плотности фиколл-верографина, $\rho = 1,077$ г/см³ (Boyum A., 1968).

Биохимические, цитофлуориметрические и иммунологические методы исследования. Интенсивность процессов перекисного окисления оценивали по уровню вторичного молекулярного продукта – малонового диальдегида (МДА), путем реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г., 1977). Активность супероксиддисмутазы/супероксидустраняющую активность (СОД/СУА) определяли спектрофотометрическим методом по ингибированию супероксиддисмутазой аутоокисления адреналина в адренохром в условиях генерации супероксидного анион-радикала в щелочных условиях (Сирота Т.В., 1999). Активность каталазы/скорость утилизации гидропероксида ($V_{H_2O_2}$) определяли по расходу гидропероксида, образующего с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс желтого цвета (Королюк М.А. и др., 1988). Активность глутатионпероксидазы (ГПО) определяли по скорости окисления восстановленного глутатиона в присутствии гидроперекиси третичного бутила (Моин В.М., 1986). Определение активности глутатион-S-трансферазы (GST) основано на оценке скорости реакции ферментативного образования GS-2,4-динитробензола в реакции восстановленного глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом (Habig et al., 1974). Активность глутатионредуктазы (GR) измеряли по степени окисления NADPH (Юсупова Л.Б., 1989). Метод определения содержания восстановленного глутатиона (GSH) основан на его реакции с 5,5-дитиобис (2-нитробензойной) кислотой с образованием соединения, которое обладает максимумом поглощения при 412 нм (Ellman Q.L., 1959). 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.). Активность ксантиноксидазы определяли по способности фермента генерировать супероксидный анион-радикал, о содержании которого судили по скорости восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в окрашенный продукт – формазан, имеющий максимум светопоглощения при длине волны 540 нм (Арутюнян А.В. и др., 2000, модиф.). Концентрацию мочевой кислоты (МК) определяли колориметрическим методом (коммерческий набор «Витал», Россия). Содержание маркеров нитрозильного стресса - нитритов/нитратов - оценивали колориметрическим методом, основанным на реакции Грисса (Голиков П.П., Николаева Н.Ю., 2004). Оптическую плотность определяли на спектрофотометре DU-800 фирмы Beckman Coulter (США). Апоптоз лимфоцитов крови оценивали методом проточной лазерной цитофлуориметрии на приборе FACS Canto, фирмы Becton Dickinson (США) с использованием набора AnnexinV-FITC apoptosis detection kit 1, фирмы BD Pharmingen (США). Для определения концентрации IL-1 β и TNF α 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.

Молекулярно-биологические методы исследования. Для выделения геномной ДНК из периферической крови использовали коммерческий набор реагентов «ДНК-Экспресс-кровь» (Литех, Россия). Для идентификации полиморфных локусов генов использовали полимеразную цепную реакцию. В исследовании были использованы коммерческие диагностикумы SNP-экспресс (Литех, Россия). Цикл в амплификаторе TerCyc (Россия) повторялся 35 раз: денатурация 70 с при 93°C, отжиг 10 с при 64°C, элонгация 80 с при 72°C. Ампликоны разделяли путем электрофореза в 3% агарозном геле, окрашивали этидиум бромидом и визуализировали в трансиллюминаторе GelDoc (BioRad, США). Популяционный анализ *in silico* полиморфных локусов изучаемых генов был проведен с использованием баз данных ALFRED, GenBank, OMIM, NCBI.

Статистический анализ проводился с помощью пакета STATISTICA 6.1. Для оценки различий между сравниваемыми группами использовали непараметрический U-тест Манна-Уитни для двух независимых выборок, тест Краскела-Уоллиса (H-критерий) и медианный тест для сравнения нескольких независимых групп. Данные анализов представляли в виде медианы (25%-75% квартили). Различия между двумя выборками считали достоверными при $p < 0,05$. При $0,05 < p < 0,1$ рассматривали тенденцию к изменениям. Корреляционный анализ проводили с использованием непараметрического рангового коэффициента корреляции Спирмена. Методы множественной регрессии использовали для анализа связи между несколькими независимыми переменными и зависимой переменной. Для сравнения частот аллелей и генотипов исследуемых полиморфных локусов в группах с наличием и отсутствием заболевания использовался критерий χ^2 , до этого проверяли соответствие изучаемых выборок равновесию Харди-Вайнберга. 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). При OR=1 рассматривали как отсутствие ассоциации; OR<1 – как отрицательную ассоциацию аллеля или генотипа с заболеванием (“протективный аллель/генотип”); OR>1 – как положительную ассоциацию (“аллель/генотип риска”), рассчитывали также доверительные интервалы (CI, confidence interval). Анализ межгенных взаимодействий проводили с помощью программ MDRv.3.0.2 и ее модифицированной версии –Generalized MDR, GMDRv.0.9.

АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В КРОВИ И СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И УРОВЕНЬ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ С ГОНАРТРОЗОМ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что содержание малонового диальдегида в плазме крови при первичном ГА не отличается от нормы. В плазме крови при I и II стадиях ПТГА наблюдается значимое увеличение содержания МДА или тенденция к возрастанию его уровня (соответственно, $p=0,012$, $p=0,078$).

Концентрация МДА в эритроцитах при всех стадиях первичного ГА повышена относительно нормы на 21-60% (рис. 1). Исследование показало, что концентрация МДА 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 уровня МДА ($p=0,081$).

При поздней - III стадии - концентрация МДА в СЖ на 26% больше при первичном ГА ($p=0,040$), (рис. 2). Таким образом, в крови больных ГА как идиопатической, так и посттравматической природы наблюдается активация процессов перекисного окисления липидов, которая при поздних стадиях более выражена у пациентов с первичным гонартрозом.

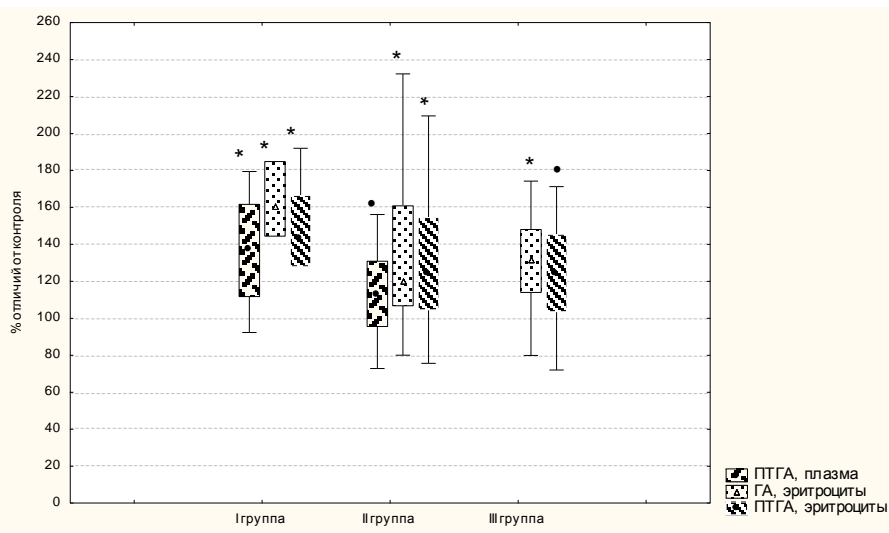


Рис. 1. Содержание МДА в плазме и эритроцитах при первичном и посттравматическом гонартрозе различных групп. Обозначения (здесь и далее): * - достоверные различия относительно контроля; • - тенденция к достоверности различий относительно контроля; ГА – первичный гонартроз; ПТГА – посттравматический гонартроз. Представлены только достоверные различия относительно контроля/группы ГА другой этиологии ($p<0,05$) или тенденция к таким различиям ($p<0,1$).

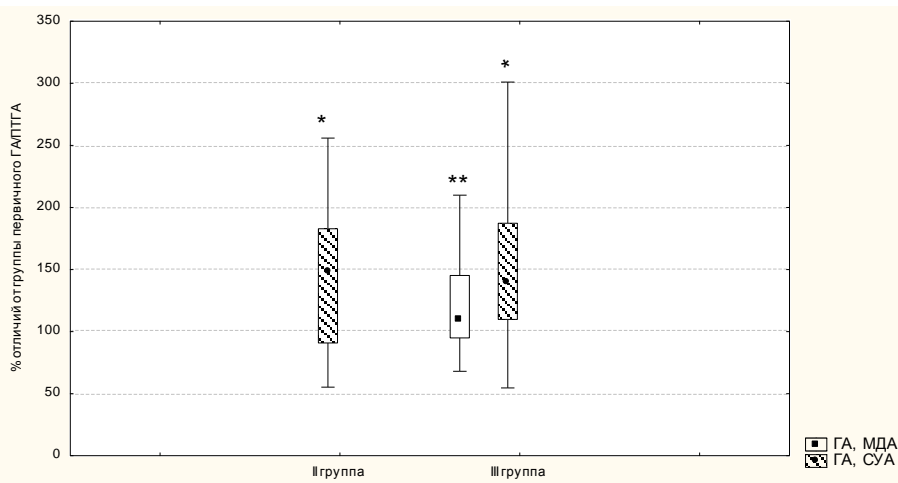


Рис. 2. Содержание МДА и СУА в синовиальной жидкости при первичном и посттравматическом гонартрозе различных групп. Обозначения (здесь и далее): * - достоверные различия относительно I группы первичного ГА/ПТГА; ** - достоверные различия между группами первичного и посттравматического ГА. Представлены только достоверные различия относительно группы I/группы ГА другой этиологии ($p<0,05$) или тенденция к таким различиям ($p<0,1$).

Супероксидустраняющая активность плазмы крови у пациентов II и III групп с первичным ГА повышена относительно нормы – на 14% ($p=0,035$) и 29% ($p=0,016$), соответственно (рис. 3). Скорость утилизации гидропероксида в плазме крови у этих пациентов увеличена на 27-46% по сравнению с контролем при всех стадиях ГА (рис. 4).

Установлено, что СУА синовиальной жидкости II и III групп при первичном ГА повышена относительно значения СУА СЖ I группы: во II группе – на 48% ($p=0,034$), в III группе – на 39% ($p=0,020$), (рис. 2); при этом скорость утилизации H_2O_2 не отличается между группами пациентов с первичным ГА. В мононуклеарных клетках II, 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 (рис. 3). При этом активность каталазы в мононуклеарной фракции крови увеличивается во II и III группах пациентов – на 27% ($p=0,003$, $p=0,030$), (рис. 4). В эритроцитах крови пациентов всех стадий при первичном ГА происходит значительное увеличение активности СОД – на 128-177%, не сопровождающееся сопряженной активацией каталазы.

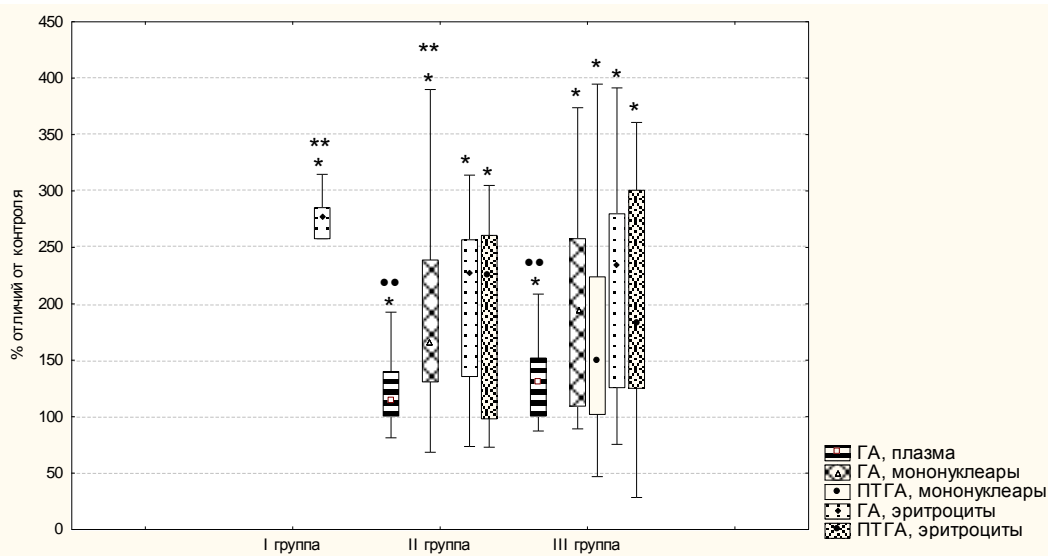


Рис. 3. Активность СОД/СУА в плазме, мононуклеарах и эритроцитах при первичном и посттравматическом гонартрозе различных групп. Обозначения: аналогично рис. 1; ** - достоверные различия между группами первичного и посттравматического ГА соответствующих стадий; •• - тенденция к достоверному различию между группами первичного и посттравматического ГА

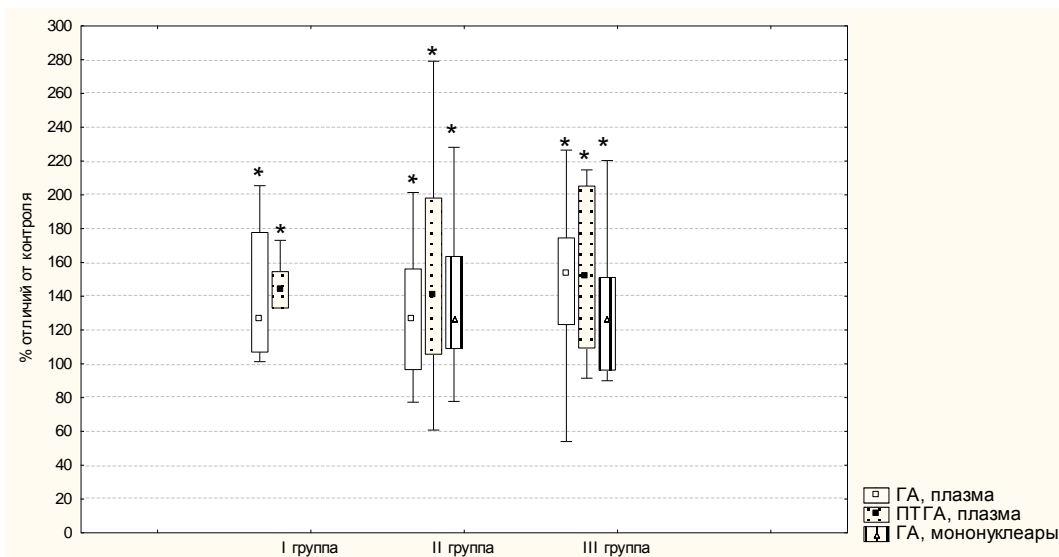


Рис. 4. Активность каталазы/скорость утилизации гидропероксида в плазме и мононуклеарах при первичном и посттравматическом гонартрозе различных групп. Обозначения: аналогично рис. 1,3.

СУА плазмы крови при посттравматическом гонартрозе различных стадий находится в пределах нормы, тогда как скорость утилизации гидропероксида в плазме крови превышает норму во всех группах больных – на 40-52% (рис. 4). Активность СОД в мононуклеарных клетках при поздней III стадии ПТГА возрастает на 50% ($p=0,024$), на ранних I, II стадиях – остается в пределах контроля; активность каталазы – не изменяется во всех группах пациентов. Активность СОД в эритроцитах крови при II, 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.

Таким образом, общей особенностью для первичного и посттравматического ГА является мощная активация СОД в эритроцитах крови, не сопровождающаяся сопряженной активацией каталазы. Аналогичная картина наблюдается в мононуклеарах крови при поздней (III) стадии посттравматического ГА, что может приводить к накоплению гидропероксида в клетках крови. Для первичного ГА, в отличие от ПТГА, характерно увеличение СУА в СЖ по мере увеличения стадии, а также однонаправленный рост активности СОД/СУА и каталазы/ $V_{H_2O_2}$ в плазме и мононуклеарных клетках крови на II, III стадиях.

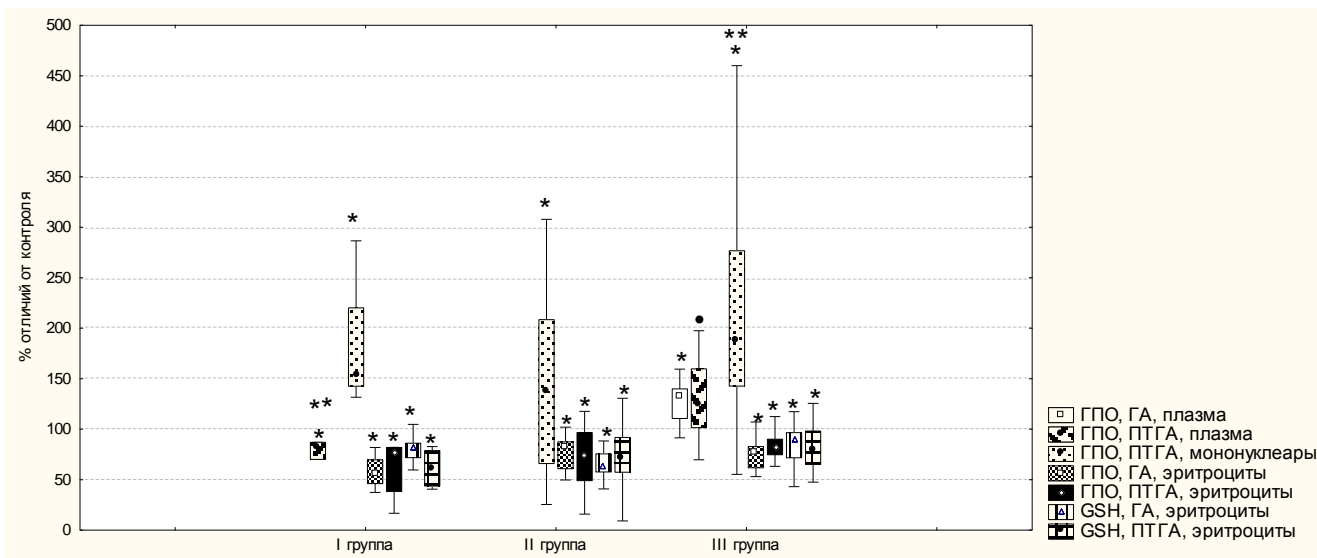


Рис. 5. Активность ГПО в плазме, мононуклеарах и эритроцитах и содержание восстановленного глутатиона при первичном и посттравматическом гонартрозе различных групп
Обозначения: Аналогично рис. 1,3

Активность глутатионпероксидазы (ГПО) в плазме крови (рис. 5) у пациентов с первичным ГА I, II стадий не отличается от контроля, на III стадии – превышает контроль на 31% ($p=0,018$). В отличие от первичного ГА, при посттравматическом гонартрозе

активность ГПО в плазме крови на I стадии ниже 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. 6) отличается только между II и III группами пациентов: на 36% выше при поздних стадиях ($p=0,027$); при ПТГА – на II стадии данный показатель в 1,5 раза выше по сравнению с первичным ГА ($p=0,043$).

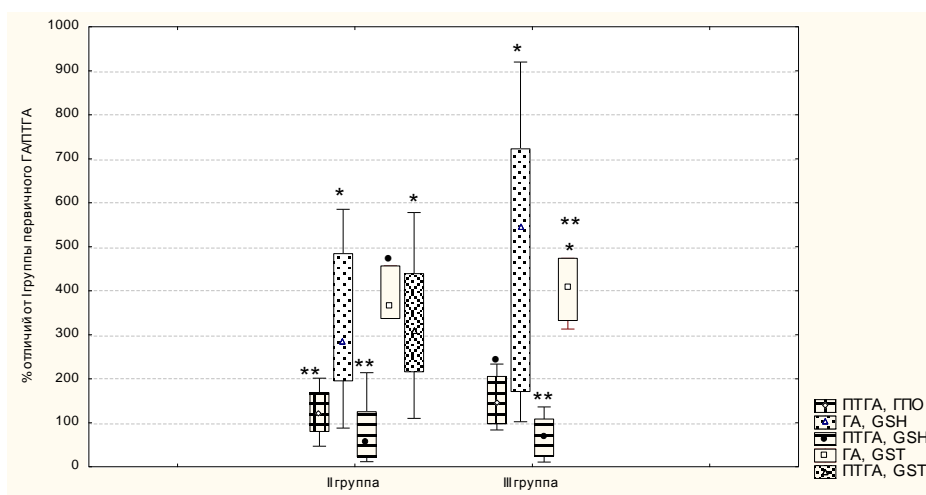


Рис. 6. Активность глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы, уровень восстановленного глутатиона в синовиальной жидкости при первичном и посттравматическом гонартрозе различных групп

Обозначения: аналогично рис. 2.

Активность ГПО в мононуклеарных клетках при первичном ГА не отличается от нормы и между группами пациентов ($N=2,49$, $p=0,477$), а при посттравматическом гонартрозе - выше нормы на 44-87% во всех группах пациентов, на III стадии активность ГПО выше в 1,5 раза, чем при первичном ГА ($p=0,021$). Показано, что активность ГПО в эритроцитах ниже нормы на 18-45% на всех стадиях первичного гонартроза. Аналогичные изменения наблюдаются на I-III стадиях ПТГА - снижение активности ГПО на 18-23%. Содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах на всех стадиях первичного ГА снижено на 10-37%. Аналогичные изменения установлены для пациентов с посттравматическим ГА: снижение уровня GSH составляет 20-39% относительно нормы. В синовиальной жидкости при первичном ГА содержание GSH значительно увеличивается при усугублении дегенеративного процесса в суставе и коррелирует со стадией K/L ($R=0,504$, $p=0,004$). Напротив, при ПТГА содержание GSH в СЖ незначительно отличается на разных стадиях, но на II (тенденция, $p=0,057$) и III (в 3,5 раза, $p=0,027$) стадиях меньше относительно уровня GSH, характерного для первичного ГА. Снижение активности глутатионпероксидазы в эритроцитах крови пациентов с

первичным и посттравматическим ГА способно усилить сдвиг баланса функционирования антиоксидантных ферментов.

Установлено, что активность глутатион-S-трансферазы (GST) в синовиальной жидкости при первичном ГА выше во II, III группах по сравнению с данными I группы (рис. 6). Активность GST увеличивается и в мононуклеарах, и в эритроцитах групп I-III относительно нормы независимо от стадии первичного ГА (рис. 7). Аналогичные изменения наблюдаются для посттравматического ГА, за исключением того, что при ранней I стадии ПТГА показатели - в пределах нормы. На поздней (III) стадии артроза активность GST в СЖ в 2,9 раза выше при первичном ГА по сравнению с ПТГА ($p=0,016$).

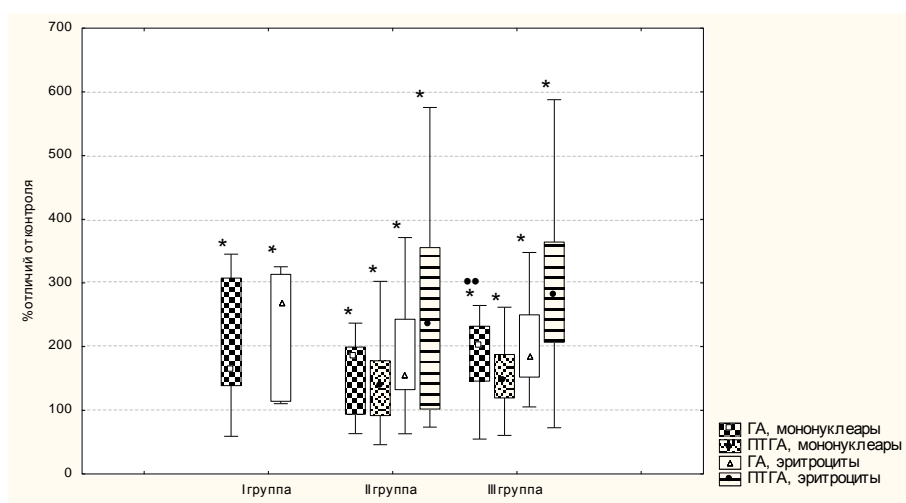


Рис. 7. Активность GST в мононуклеарах и эритроцитах при первичном и посттравматическом гонартрозе различных групп. Обозначения: аналогично рис. 1,3

Можно полагать, что значительное повышение активности глутатион-S-трансферазы в эритроцитах пациентов с первичным ГА и ПТГА может, с одной стороны, являться компенсаторным ответом на интенсификацию процессов ПОЛ, а с другой стороны, приводить к уменьшению содержания в эритроцитах восстановленного глутатиона, что было характерно для первичного ГА и ПТГА.

Активность глутатионредуктазы (GR) в СЖ общей выборки пациентов (первичный ГА и посттравматический ГА) не отличается между различными стадиями. При гонартрозе происходит значительное возрастание, составляющее 90-144%, активности глутатионредуктазы в мононуклеарах крови на всех стадиях заболевания (рис. 8).

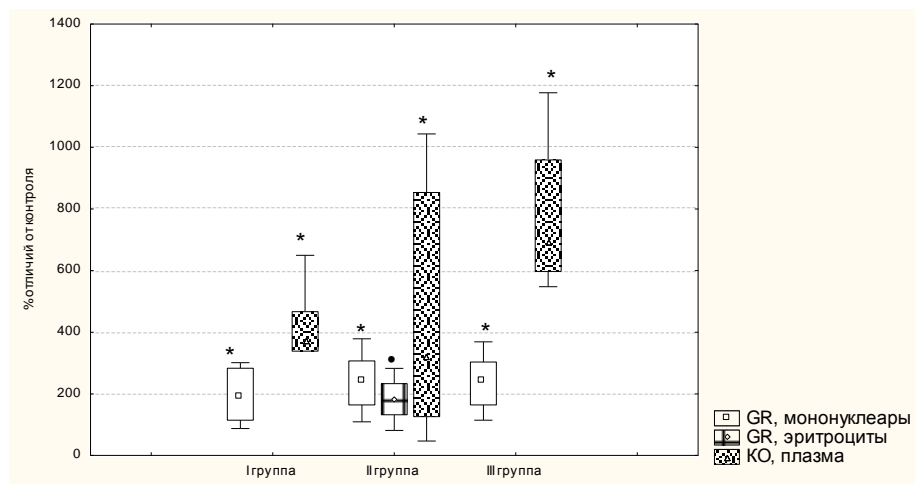


Рис. 8. Активность глутатионредуктазы и ксантиноксидазы при первичном и посттравматическом гонартрозе различных групп. Обозначения: аналогично рис. 1,3.

Оценка общей активности ксантиноксидоредуктазы (дегидрогеназной и оксидазной) показывает, что при сравнении с нормой активность КОР в плазме крови пациентов с первичным ГА возрастает на 50-93% на всех стадиях ГА (рис. 9). На I стадии 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 происходит во II, III группах при ПТГА – на 29% ($p=0,025$) и 43% ($p=0,018$), соответственно. Активность КОР в плазме при ПТГА положительно коррелирует с СУА плазмы ($R=0,629$, $p=0,001$), а также обнаруживает тенденцию к корреляции со стадией К/L ($p=0,06$). В мононуклеарной фракции активность КОР возрастает во всех группах пациентов с первичным ГА (I-III) – на 30-119%. Установлено, что активность КОР в мононуклеарных клетках увеличивается при усугублении дегенеративного процесса в суставе при первичном ГА и положительно коррелирует с рентгенологической стадией по К/L ($R=0,462$, $p=0,035$). Активность КОР в мононуклеарной фракции при ПТГА также возрастает на 16-62% на всех стадиях. Показано, что активность КОР в СЖ в III группе первичного ГА 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 со стадией по К/L ($R=0,59$, $p=0,027$). Отмечается тесная положительная корреляция активности КОР в СЖ с рентгенологической стадией ПТГА ($R=0,62$, $p<0,001$). Следует отметить, что активация ксантиноксидоредуктазы более выражена при первичном гонартрозе. Активность КОР в синовиальной жидкости, плазме и мононуклеарной фракции крови является биохимическим маркером стадии как первичного, так и посттравматического гонартроза. Изучение активности прооксидантной формы фермента – ксантиноксидазы (КО) (рис. 8) - показало, что у пациентов смешанной выборки (первичный и посттравматический гонартроз) всех групп 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 ($p=0,007$) относительно контроля.

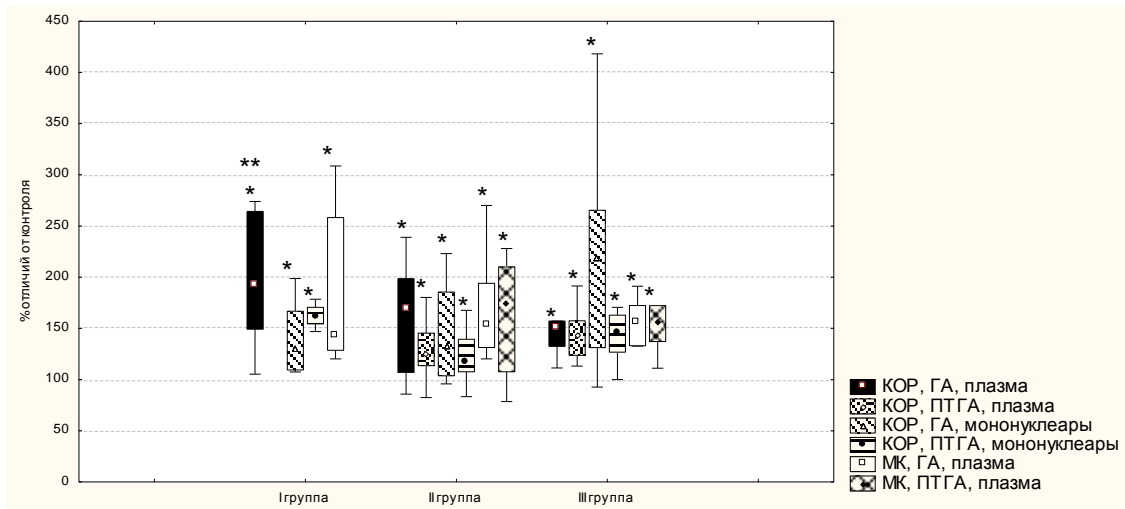


Рис. 9. Активность КОР в плазме, мононуклеарах и уровень мочевой кислоты при первичном и посттравматическом гонартрозе различных групп. Обозначения: аналогично рис. 1,3

Содержание мочевой кислоты достоверно повышено на 44-57% в плазме всех групп пациентов с первичным ГА (рис. 9), при этом уровень мочевой кислоты в СЖ не отличается между различными стадиями. При ПТГА наблюдается увеличенное содержание МК в плазме, начиная со II стадии (тенденция, $p=0,08$), на III стадии отмечен прирост на 56% ($p<0,001$). В СЖ не обнаружено изменения уровня МК между группами пациентов. Установлено, что уровень МК в плазме при ПТГА положительно коррелирует с индексом массы тела пациента ($R=0,517$, $p=0,003$) и со стадией ГА ($R=0,370$, $p=0,04$). Повышение уровня мочевой кислоты в плазме крови может являться следствием повышения активности ксантиноксидоредуктазы. Действительно, при первичном ГА одновременное повышение уровня МК и активности КОР наблюдаются во всех группах пациентов; а при ПТГА – только во II и III группах.

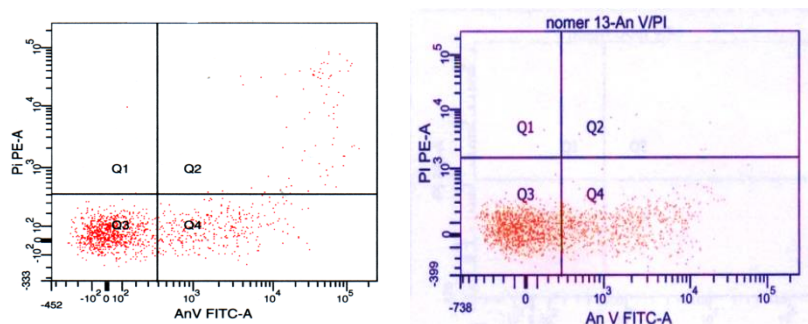


Рис. 10. Оценка уровня апоптоза лимфоцитов с помощью двойного окрашивания йодидом пропидия и аннексином V, меченным ФИТЦ (метод лазерной проточной цитофлуориметрии). Слева – контроль, справа - гонартроз

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 с использованием ФИТС-меченого

аннексина V одновременно с пропидиумом йодидом (рис. 10). Согласно полученным результатам, количество 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 исследованной этиологии.

СОДЕРЖАНИЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В КРОВИ И СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

В результате проведенного анализа обнаружено увеличение на 47% ($p=0,007$) содержания IL-1 β в плазме крови и на 65% ($p=0,002$) в СЖ общей выборки пациентов с гонартрозом, относительно показателя здоровых лиц (рис. 11). Деление общей выборки пациентов на группы первичного и посттравматического ГА показало, что уровень IL-1 β в плазме крови увеличивается более значительно при первичном гонартрозе (на 82%, $p=0,017$), чем при посттравматическом гонартрозе (на 41%, $p=0,044$).

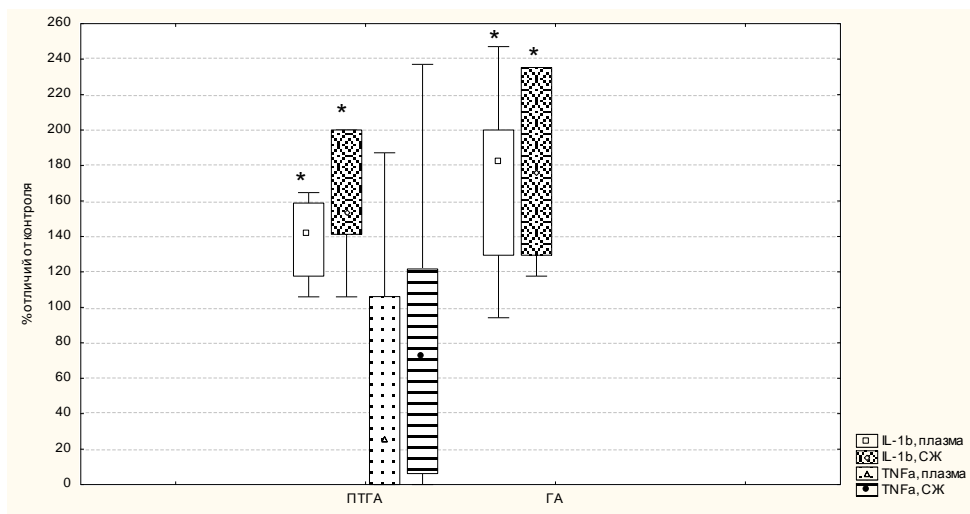


Рис. 11. Содержание цитокинов IL-1 β и TNF α в плазме крови и синовиальной жидкости при первичном и посттравматическом гонартрозе. * - достоверные различия относительно контроля.

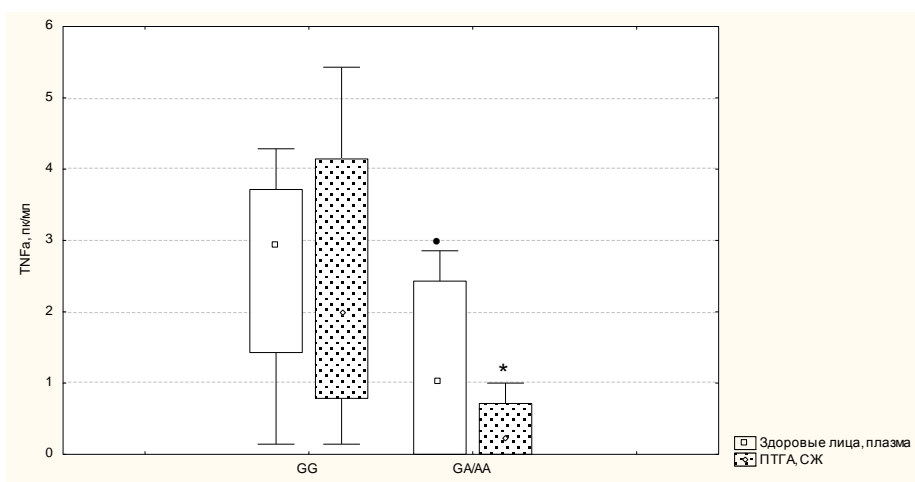


Рис. 12. Содержание цитокина TNF α в плазме крови и синовиальной жидкости у здоровых лиц и при ПТГА. * - достоверные различия относительно генотипа GG; • - тенденция к достоверным различиям относительно GG.

Увеличение содержания IL-1 β в СЖ пациентов с первичным ГА (на 77%, $p=0,012$) также значительнее, 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 IL-1 β более выражена, чем при ПТГА.

Проведенное исследование продемонстрировало, что содержание TNF α в плазме крови и СЖ пациентов с ПТГА не отличается от нормы в плазме (соответственно, $p=0,281$; $p=0,894$) (рис. 11). В результате множественного регрессионного анализа в уравнение регрессии ($R=0,543$, $p=0,08$) для зависимой переменной содержания TNF α в плазме у здоровых лиц включен один статистически значимый предиктор, а именно генотип полиморфизма *G-308A* ($p=0,032$), при этом мутантный аллель *-308A* связан со снижением содержания цитокина TNF α в плазме здоровых лиц (рис. 12). В уравнение регрессии ($R=0,613$, $p=0,09$) для концентрации TNF α в СЖ больных ПТГА включен генотип полиморфизма *G-308A* ($p=0,198$). При делении больных ПТГА на две группы – *308GG* и *-308GA/AA* (носители мутантного аллеля) – установлено, что концентрация TNF α 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. Корреляционный анализ двух переменных – уровня TNF α в СЖ и генотипа *G-308A* гена *TNF α* – у больных ПТГА показал значимую отрицательную корреляцию между этими показателями ($R=-0,538$, $p=0,032$): *GG* – 0, *GA* – 1, *AA* – 2.

АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПТГА С РАЗЛИЧНЫМИ ГЕНОТИПАМИ ЛОКУСОВ *G7958A SOD1*, *Ile58Thr SOD2*, *C-262T CAT*, *Ile105Val GSTP1*

С использованием множественной регрессии мы установили, что изученные полиморфные локусы генов *SOD1* и *SOD2* не являются значимыми предикторами общей активности супероксиддисмутазы (все изоформы) в плазме, синовиальной жидкости, мононуклеарной фракции и эритроцитах. Результаты регрессионного моделирования свидетельствуют о том, что генотип полиморфизма *C-262T CAT* статистически достоверно связан с активностью каталазы в мононуклеарной фракции ($B=0,509$, $p=0,0036$) и эритроцитах крови ($B=0,244$, $p=0,037$); причем аллель *-262T* ассоциирован с увеличенной активностью каталазы. Установлено, что при наличии гетерозиготной мутации (генотип *-262CT*) у пациентов с посттравматическим гонартрозом активность каталазы в

моноклеарных клетках более чем в 2 раза выше по сравнению с больными, имеющими нормальный генотип *CC* ($p=0,0076$), и на 56% выше показателя здоровых лиц ($p=0,022$).

Аллель *105Val* локуса *Ile105Val GSTP1* ($B=0,457$, $p=0,0156$) ассоциирован с более низкой активностью глутатион-S-трансферазы в эритроцитах крови. При сравнении активности GST в эритроцитах двух групп пациентов с различными генотипами - *IleIle* - 5,53 (4,03-9,12) ME/г Hb и *IleVal+ValVal* - 3,40 (2,19-4,64) ME/г Hb - наблюдается уменьшение на 39% активности GST у пациентов-носителей мутантного аллеля относительно значения у пациентов с нормальным генотипом *IleIle* ($p=0,038$).

Из всех переменных в уравнение регрессии ($R=0,567$; $p=0,014$) для содержания нитритов/нитратов NO_x^- в синовиальной жидкости включены два предиктора: $y = 2,5 - 0,199x_1 + 0,023x_2$, где x_1 – генотип локуса $-786T>C$ *eNOS* ($p=0,049$): *TT*– 0, *TC* – 1, *CC* – 2, x_2 – индекс массы тела пациента ($p=0,08$). Результаты данного математического моделирования свидетельствуют о том, что варианты $-786T>C$ гена *eNOS* статистически достоверно связаны с концентрацией нитритов/нитратов в СЖ при посттравматическом гонартрозе. Сравнив уровни содержания NO_x^- в СЖ трех групп пациентов с различными генотипами ($-786TT$, *TC*, *CC*), обнаружена тенденция к различию этих трех групп ($N=5,9$, $p=0,0523$).

ПОИСК SNP-МАРКЕРОВ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ПТГА

Среди исследованных генов локусами-маркерами повышенного риска развития ПТГА, как показал генетический скрининг пациентов с ПТГА и здоровых людей, являются следующие полиморфные локусы: *A-82G MMP-12* и *G-84A NOS1* в общих выборках; -1607 *1G/2G MMP-1* у женщин. Так, аллель $-82G$ в промоторе гена *MMP-12* ассоциирован с ПТГА, поскольку наличие данного аллеля увеличивает в 1,90 раза риск развития патологии в общей выборке: $OR=1,90$ (CI 1,11-3,25), $\chi^2=5,58$, $p=0,02$. Аллель $-82A$ может иметь «протективное» значение. Показанная нами ассоциация генотипа *2G/2G MMP1* с риском развития ПТГА у женщин ($OR=3,07$ (CI 1,24-7,62), $\chi^2=7,38$, $p=0,03$) может быть связана с увеличением продукции MMP-1 (Rutter J.L. et al., 1998). Аллель *A* полиморфизма $-84G>A$ гена *nNOS*, согласно результатам исследования, встречается в группе пациентов с ПТГА в 2,02 раза чаще по сравнению со здоровыми людьми ($OR=2,02$ (CI 1,08-3,76), $\chi^2=7,41$, $p=0,02$).

Наиболее значимыми среди всех возможных моделей межгенных взаимодействий между типированными SNP-локусами являются: 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*. Последняя модель характеризуется наиболее оптимальными показателями опытной взвешенной точности (Training Balanced Accuracy, 0,7447), значимостью ($p=0,001$), воспроизводимостью (Cross-validation consistency, 10/10). Полученные результаты свидетельствуют о том, что ключевая роль в детерминации предрасположенности к посттравматическому гонартрозу принадлежит полиморфным локусам генов NO-синтаз (*NOS1*, *NOS3*), каталазы (*CAT*), матриксной металлопротеиназы-12 (*MMP-12*) и интерлейкина-1 β (*IL-1b*).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

АКМ в синовиальной среде сустава играют значительную роль в развитии воспалительного ответа, липопероксидации и старении клеток суставного хряща - хондроцитов. 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).

Согласно результатам исследований нашей группы, 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 и повышенной продукции высокотоксичного гидроксильного радикала (Внуков В.В., Гуценко О.И. и др., 2015). В мононуклеарных клетках при первичном ГА наблюдается одновременная активация СОД и каталазы (при II-IV стадиях), а при посттравматическом ГА – повышение активности СОД только при поздней стадии и значительная активация глутатионпероксидазы. При этом в мононуклеарных клетках при гонартрозе как первичной, так и посттравматической природы 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. Сдвиг редокс-статуса мононуклеарных клеток способен индуцировать их гибель путем апоптоза, что и наблюдалось для первичного и посттравматического ГА.

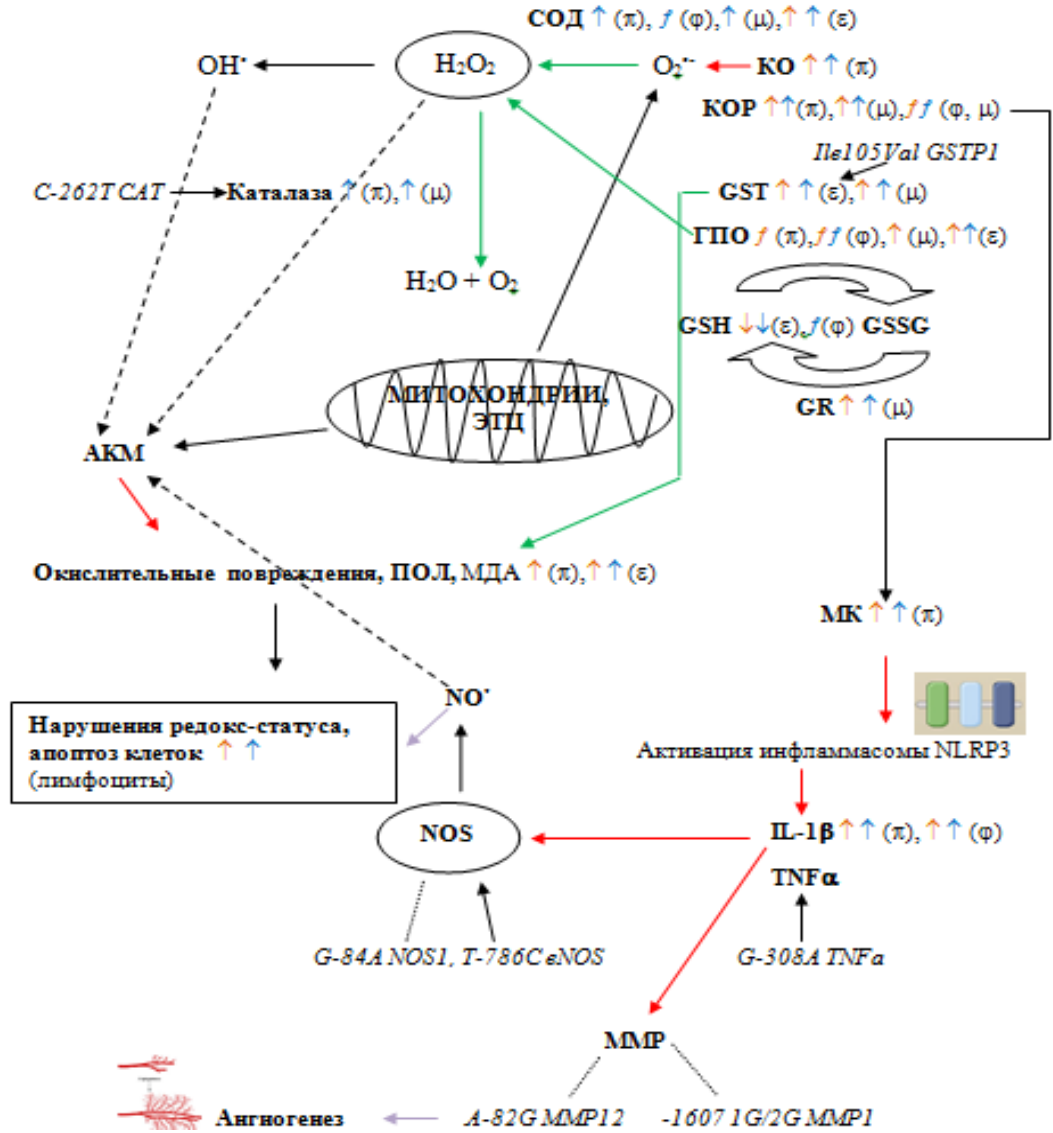


Рис. 13. Гипотетическая схема, отражающая роль антиоксидантных, прооксидантных ферментов, провоспалительных цитокинов в патогенезе гонартроза.

Условные обозначения: ↑, ↓ - изменения при первичном гонартрозе, ↑, ↓ - 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; → - антиоксидантный эффект; → - прооксидантный (провоспалительный) эффект, - полиморфный локус, ассоциированный с развитием ПТГА в изучаемой популяции; → - регуляция процесса.

В настоящей работе доказано, что активность ксантиноксидоредуктазы в синовиальной жидкости, плазме и мононуклеарной фракции крови является маркером

стадии первичного/посттравматического гонартроза, а уровень мочевой кислоты в плазме крови – 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 тяжести и клинико-рентгенологической стадии гонартроза. Установлено, что активность ксантиноксидазы в синовиальной жидкости положительно коррелирует с продукцией активных форм кислорода, азота у пациентов с травмой сустава (Stabler T. et al., 2015). У пациентов с первичным ГА всех стадий и посттравматическим ГА II-III стадий наблюдалось значительное увеличение содержания мочевой кислоты в плазме крови; известно, что мочевая кислота является провоспалительным сигналом и дистресс-ассоциированным молекулярным паттерном (DAMP), участвующим в активации молекулярной платформы NALP3 инфламмосомы (NLRP3) с последующей продукцией активных форм цитокинов IL-18 и IL-1 β (Denoble A.D. et al., 2011). В настоящей работе установлено, что достоверное увеличение содержания IL-1 β в плазме и СЖ наблюдалось как при первичном, так и при посттравматическом ГА.

В данной работе установлено, что активность ряда антиоксидантных ферментов (каталаза, глутатион-S-трансфераза), а также содержание цитокина TNF α и уровень нитритов/нитратов в СЖ зависит 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, 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, NO-синтаза, выделенная из хряща с признаками выраженного артроза, сходна с pNOS и служит источником оксида азота, вносящего вклад в воспаление и деструкцию хряща (Amin A.R. et al., 1995). Иммуногистохимические исследования хряща и субхондральной кости пациентов с артрозом показывают, что MMP-12 экспрессируется при артрозе, чего не наблюдается в норме (Kaspiris A. et al., 2015). Кроме

того, ММР-12 экспрессируется хондроцитами *in vivo*; активно обсуждается роль ММР-12 как негативного регулятора процесса ангиогенеза (Kerkela E. et al., 2001).

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 \times MMP-12 A-82G \times NOS1 G-84A \times IL1 β T-31C \times NOS3 T-786C*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Панина С.Б. Влияние SkQ1 на экспрессию гена фактора транскрипции *Nrf2*, ARE-контролируемых генов антиоксидантных ферментов и их активность в лейкоцитах крови крыс / Внуков В.В., Гуценко О.И., Милютин Н.П., Ананян А.А., Даниленко А.О., Панина С.Б., Корниенко И.В. // Биохимия. - 2015. - Т. 80, вып. 4. - С. 694-701.
2. Панина С.Б. Влияние SkQ1 на экспрессию гена *Nrf2*, ARE-контролируемых генов антиоксидантных ферментов и их активность в лейкоцитах крови крыс при окислительном стрессе / Внуков В.В., Гуценко О.И., Милютин Н.П., Корниенко И.В., Ананян А.А., Даниленко А.О., Панина С.Б., Плотников А.А., Макаренко М.С. // Биохимия. - 2015. - Т. 80, вып. 12. - С. 1861-1870.
3. Панина С.Б. Особенности окислительного стресса в крови и синовиальной жидкости при гонартрозе / Внуков В.В., Панина С.Б., Кролевец И.В., Милютин Н.П., Ананян А.А., Забродин М.А., Плотников А.А. // Успехи геронтологии. - 2015. - № 2. - С. 284-290.

4. Панина С.Б. Исследование взаимосвязи между полиморфизмами генов антиоксидантных ферментов и их активностью при посттравматическом остеоартрозе коленного сустава / Внуков В.В., Панина С.Б., Милютина Н.П., Кролевец И.В., Забродин М.А. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2016. – Т. 161. - № 1. – С. 88-92.
5. Панина С.Б. Ассоциация генетических вариантов генов NO-синтаз с развитием посттравматического гонартроза у жителей Ростовской области / Внуков В.В., Кролевец И.В., Панина С.Б., Милютина Н.П., Ананян А.А., Забродин М.А., Плотников А.А. // Экологическая генетика. - 2015. – Т. 13, № 3. - С. 15-22.
6. Панина С.Б. Полиморфизм генов провоспалительных цитокинов и их содержание в плазме крови и синовиальной жидкости у больных посттравматическим гонартрозом / Внуков В.В., Кролевец И.В., Панина С.Б., Милютина Н.П., Ананян А.А., Сагакянц А.Б., Забродин М.А. // Успехи геронтологии. – 2016. - № 29-1. – С. 52-58.
7. Панина С.Б. Свободнорадикальное окисление в синовиальной жидкости и апоптоз хондроцитов при гонартрозе / Внуков В.В., Кролевец И.В., Милютина Н.П., Гуценко О.И., Забродин М.А., Панина С.Б., Гвалдин Д.Ю., Плотников А.А., Шевякова Е.А., Бражников Ю.И. // Валеология. - 2012. - № 4. - С. 38-44.
8. Панина С.Б. Окислительный стресс в механизмах остеоартроза / Внуков В.В., Кролевец И.В., Панина С.Б., Ананян А.А., Милютина Н.П. // Валеология. - 2013. - № 3. - С. 45-53.
9. Panina S.B. Oxidative stress and neuronal synthase gene polymorphism in the development of knee osteoarthritis / Vnukov V.V., Krolevets I.V., Milutina N.P., Panina S.B., Zabrodin M.A., Sheviakova E.A., Plotnikov A.A., Gvaldin D.Y. // Scientific and practical journal of health and life sciences. - 2013. – No. 4. - P. 57-65.
10. Панина С.Б. Корреляционные связи между показателями системы прооксиданты-антиоксиданты крови и синовиальной жидкости и рентгенологической стадией гонартроза // Известия Северо-Кавказского научного центра. - 2014. - № 3. - С. 81-86.
11. Панина С.Б. Полиморфизмы генов как фактор риска развития остеоартроза// Медицинский вестник Юга России. - 2014. - № 2. - С. 13-20.

Статьи № 1-11 опубликованы в печатных изданиях, состоящих в списке журналов, рекомендованных ВАК РФ.