

На правах рукописи

Шодиев Дмитрий Рахимович

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

1.5.4. Биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Рязань – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент **Звягина Валентина Ивановна**

Официальные оппоненты:

Камилов Феликс Хусаинович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры биологической химии

Бутолин Евгений Германович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, и.о. заведующего кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики ФПК и ПП

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2025 г. в ___ на заседании диссертационного совета 21.2.060.02, созданного на базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России по адресу: 390026 г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, д. 34, корп. 2) и на сайте www.rzgmu.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент

Короткова Н.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Остеоартроз (ОА) – основная причина боли и временной нетрудоспособности у взрослого дееспособного населения и пожилых людей (J.Hubertsson et al., 2013). Распространенность клинически выявленного ОА с преимущественным вовлечением в процесс коленных и тазобедренных суставов на территории Российской Федерации составляет 13% (Галушко Е.А. и др., 2018, Turkiewicz A. et al., 2014), а рост заболеваемости ОА ставит проблему своевременной диагностики и лечения заболевания актуальной.

Важной особенностью ОА является вариабельность клинических и структурных проявлений, которая может быть одним из основных факторов, связанных с трудностями определения универсальных терапевтических стратегий (Emami A. et al., 2023). Ввиду этого на основе факторов риска выделяют характерные фенотипы заболевания, а сочетание нарушений, составляющих метаболический синдром, позволяет выделить метаболический фенотип ОА как самостоятельное и недостаточно исследованное заболевание (Sampath S.J.P. et al., 2023). Ожирение, являясь основным компонентом метаболического синдрома, активирует множество каскадов патофизиологических и воспалительных изменений в суставе (A. Koskinen et al., 2011), однако наряду с уже известными механизмами возникновения и прогрессирования ОА все больший интерес представляет изучение потенциально новых путей патогенеза ОА.

Сукцинат-рецепторное взаимодействие является физиологическим сенсором внеклеточных концентраций сукцината, что позволяет реагировать на метаболические потребности клетки путем активации специфического рецептора SUCNR1, тем самым влияя на различные клеточные функции (Tian Q. et al., 2024). В настоящее время в научной литературе имеются данные, которые подтверждают потенциальную взаимосвязь между промежуточными продуктами цикла трикарбоновых кислот и прогрессированием ОА, однако,

результаты таких исследований требуют более глубокого изучения (Mehta O. et al., 2023).

Связь между ожирением и патологией суставов довольно сложна и многогранна, в результате чего возникает необходимость в исследовании факторов, регулирующих обмен жировой, хрящевой и костной ткани (Цветкова Е.С. et al., 2021). Такой перспективной молекулой является гормон шишковидной железы – мелатонин, поскольку нарастающие знания о роли мелатонина в регулировании костно-хрящевого метаболизма позволяют предположить о дисрегуляции гормона как о факторе, способствующем прогрессированию дегенеративных процессов костно-хрящевой ткани (Hong Y. et al., 2014). Наряду с этим перспективы клинического применения мелатонина становятся все более обоснованными (Михеев Р.К. и др., 2021; Бабков Д.А. и др., 2024; Разикова И.С. и др., 2023).

Таким образом, изучение метаболизма костно-хрящевой ткани при метаболическом фенотипе ОА, а также оценка возможности его коррекции мелатонином является актуальной.

Степень разработанности проблемы

Данные об особенностях костно-хрящевого метаболизма при метаболическом фенотипе ОА в литературе ограничены. Метаболические эффекты сукцинат-рецепторной системы при большинстве патологий остаются не изученными, однако имеющиеся данные позволяют рассматривать рецептор как часть сигнального пути в патогенезе ОА, объясняющего воспаление и нарушения энергетического метаболизма (Murillo-Saich J.D., et al., 2022). Особенности распределения сукцинат-рецепторной системы костно-хрящевой ткани при метаболическом фенотипе остеоартроза до настоящего времени не освещались. Влияние мелатонина на клинико-биохимические показатели при метаболическом фенотипе ОА и сукцинат-рецепторную систему хондроцитов метаболического фенотипа ОА в условиях окислительного стресса *in vitro* не исследовалось. Вследствие чего, изучение и понимание механизмов нарушения костно-хрящевого метаболизма при метаболическом фенотипе ОА и их связь с

повреждением тканей суставов необходимо для разработки новых терапевтических подходов к профилактике и лечению заболевания.

Цель исследования

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

Задачи исследования

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

2. Проанализировать изменения показателей окислительного стресса в сыворотке крови и костно-хрящевой ткани у пациентов с метаболическим фенотипом остеоартроза.

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

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

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

Научная новизна

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

сыворотки крови и костно-хрящевой ткани. Исходные показатели ОМБ пациентов с метаболическим фенотипом ОА характеризовались повышением первичных маркеров фрагментации, которое сопровождалось снижением активности ферментативного звена антиоксидантной защиты и сниженной активностью СОД сыворотки крови. Впервые обнаружено, что у пациентов с метаболическим фенотипом ОА наблюдается высокий уровень SUCNR1 и его лиганда сукцината в тканях сустава с преимущественным увеличением количества SUCNR1 в субхондральной зоне кости. Добавление в схему лечения метаболического фенотипа ОА препарата мелатонин было связано с уменьшением уровня маркеров костного ремоделирования – снижением уровня КЩФ, активности КФ и повышением уровня Ca^{2+} в сыворотке крови, в сравнении с исходными показателями. На фоне лечения пациентами отмечалось улучшение качества сна по шкалам субъективной оценки качества и количества сна и положительная динамика клинического течения ОА.

На первичных культурах хондроцитов впервые представлено, что окислительный стресс, моделируемый путем добавления H_2O_2 в конечной концентрации 200 мкМ, приводил к увеличению уровня SUCNR1 и его лиганда сукцината. Выявлено, что предварительная инкубация клеток хондроцитов метаболического фенотипа ОА человека с мелатонином в дозировках в 100 и 500 мкМ ограничивала перекисно-индуцированное накопление сукцината и снижала уровни SUCNR1 в клетках.

Теоретическая и практическая значимость

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

Влияние мелатонина как компонента консервативного лечения метаболического фенотипа ОА на процессы костного ремоделирования и

показатели метаболического синдрома демонстрируют остеогенную и метаболическую активность препарата.

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

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

Методология и методы исследования

Клиническое исследование включало 95 участников, экспериментальная часть работы выполнена на клеточной культуре хондроцитов метаболического фенотипа ОА. Материалом исследования служила сыворотка крови, гомогенаты костно-хрящевой ткани и лизаты клеток хондроцитов метаболического фенотипа ОА. В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) определяли хрящевой олиgomатриксный пептид (СОМР), костный изофермент щелочной фосфатазы (КЩФ), спектрофотометрическим методом оценивалась активность кислой фосфатазы (КФ), уровень кальция (Ca^{2+}), концентрация общего холестерина (ОХ), холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), триглицеридов (ТГ), активность супероксиддисмутазы (СОД) и окислительная модификация белков (ОМБ). В гомогенатах костно-хрящевой ткани методом ИФА измеряли уровень SUCNR1, спектрофотометрическим методом определяли уровень сукцината, активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и окислительную модификацию белков. В

лизатах клеток методом ИФА измеряли уровень сукцината и SUCNR1, кроме того в исследуемой культуре клеток выполняли визуализацию SUCNR1 иммуоцитохимическим методом. Измерение концентрации белка в гомогенатах костно-хрящевой ткани осуществлялось биуретовым методом, а в клеточных лизатах измерение уровня белка проводили методом Бредфорда.

Положения, выносимые на защиту

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

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

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

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

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием адекватных и современных методов исследования с последующей систематизацией и статистической обработкой. Основные положения диссертации представлены, обсуждены и опубликованы в материалах конференций: Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика

РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2022); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные подходы в лечении травм и заболеваний опорно-двигательного аппарата» (Рязань, 2022); XXIX Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2023», Первый Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. акад. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2023); IV Конгрессе Ортобиология 2023 «Patient cases – от теории к практике» (Москва, 2023); «Зубаировские чтения: новое в коагулологии», Российской научно-практической конференции «Медицинская биохимия: достижения и перспективы», Казанский государственный медицинский университет (Казань, 2023); «Вреденовские игры 2024», Всероссийская конференция молодых ученых, НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена (Санкт-Петербург, 2024); XV Российская (итоговая) научно-практическая конкурс-конференция с международным участием студентов и молодых ученых «АВИЦЕННА – 2024» (Новосибирск, 2024).

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты диссертационной работы успешно внедрены и используются в учебном процессе при обучении студентов и клинических ординаторов на кафедре биологической химии, кафедре общей хирургии, травматологии и ортопедии; в деятельности центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России и ортопедического отделения Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областная клиническая больница».

Личный вклад автора

Автор самостоятельно подготовил обзор литературы по направлению темы диссертационной работы; провел клиническую и экспериментальную часть экспериментов *in vitro*; выполнил биохимические исследования; обработал и интерпретировал полученные результаты; подготовил печатные работы по изучаемой проблематике. Соавторами публикаций являются Звягина В.И., Рябова М.Н., Дмитриева М.Н., Марсянова Ю.А.

Сведения о публикациях по теме диссертации

По результатам диссертационной работы опубликовано 6 печатных работ: 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, в том числе 2 статьи индексируются в международной цитатно-аналитической базе данных Scopus.

Структура и объем диссертации

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Клиническая и экспериментальная части исследования выполнялись в рамках научного плана ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол ЛЭК № 4 от 09.11.2021). Клиническое исследование включало 95 участников. Объектом исследования явились пациенты с метаболическим фенотипом ОА, пациенты с переломом шейки бедренной кости без признаков ОА. Контрольную группу составили здоровые добровольцы без клинических признаков ОА (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Дизайн исследования

Пациентам было предложено ответить на вопросы клинических шкал по оценке функционального состояния суставов (шкала KOOS, ВАШ, Лекен), качества сна (шкала Левина, Эпворт, PSQI) и качества жизни (SF-36).

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

Пациенты 2 группы были разделены на две подгруппы (М и Б) по схемам консервативного лечения: Б (n=12) и М (n=13). Пациенты подгруппы 2Б (n=12) получали базовое консервативное лечение, которое включало в себя медикаментозную терапию (витамины группы В не более 10 дней), нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) по потребности, пентоксифиллин (4 недели), мидокалм (не более 10 дней), физиотерапевтические процедуры, массаж нижних конечностей, лечебная гимнастика по методике ОА. Пациентам подгруппы 2М (n=13) в схему консервативного лечения включали препарат мелатонин (Мелаксен®) в дозировке 3 мг 30 дней.

Материалом исследования служила сыворотка крови, гомогенаты костно-хрящевой ткани и лизаты клеток хондроцитов. Гомогенаты костно-хрящевой ткани 3 и 4 групп получали из интраоперационных хирургических опилов методом дифференциального центрифугирования. Уровень СОМР в сыворотке крови измеряли методом ИФА с помощью набора СОМР ЕІА (Immunodiagnostic systems (IDS), Maryland, U.S.A). Содержание КЩФ определяли методом ИФА с помощью набора Ostase ВАР ЕІА (Immunodiagnostic systems (IDS), Maryland, U.S.A). Активность КФ определяли унифицированным методом по конечной точке с использованием набора реагентов (Витал Диагностикс, Россия). Уровень сывороточного Ca^{2+} измеряли спектрофотометрическим методом с использованием набора реагентов для определения кальция в биологических жидкостях с о-крезолфталеин комплексом (Агат, Россия). Концентрацию общего ОХ, ЛПВП, ЛПНП и ТГ

определяли с использованием коммерческих наборов (Ольвекс диагностикум, Россия). Активность СОД измеряли по торможению реакции окисления кверцетина. Уровень SUCNR1 в гомогенатах костно-хрящевой ткани и лизатах хондроцитов измеряли методом ИФА с помощью набора SUCNR1 EIA (BlueGene, China). Для оценки локализации SUCNR1 в клетках выполняли иммуноцитохимическое исследование с использованием поликлональных антител к SUCNR1 (DF6478 Polyclonal NR1I2 Antibody, «Cloud-Clone Corp», КНР). Активность СДГ определяли спектрофотометрическим методом, содержание сукцината определяли колориметрическим методом с помощью набора Succinate Assay Kit (Abcam, United Kingdom). Определение окислительной модификации белков проводили по методу R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой. Для оценки устойчивости системы к окислительному воздействию проводили анализ резервно-адаптационного потенциала (РАП) белков как доля в % суммарной площади под спектром абсорбции света спонтанной ОМБ к площади ОМБ, индуцированной с помощью реакции Фентона (последняя принималась за 100%). Чем ниже доля продуктов спонтанного окисления, тем выше резервно-адаптационный потенциал. Измерение концентрации белка в гомогенатах костно-хрящевой ткани осуществлялось биуретовым методом с использованием коммерческих наборов производства фирмы «Агат» (Россия). Измерение концентрации белка в клеточных лизатах проводили методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus («Bradford») Assay Kit, «ThermoFisher», США). Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Statsoft Statistica 12.0. Построение графических рисунков с помощью программы GraphPad Prism 12. Соответствие выборок нормальному распределению проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. При распределении величин отличном от нормального использовали критерий множественного сравнения Краскела, Уилкоксона и тест Фридмана. При нормально распределенных величинах использовали t-критерий Стьюдента и дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Тьюки.

Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента Спирмена. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У пациентов с метаболическим фенотипом ОА в сравнении с группой здоровых пациентов наблюдалось статистически значимое повышение активности КФ, уровня КЩФ и снижение содержания Ca^{2+} сыворотки крови (Таблица 1).

Таблица 1 – Активность ферментов и уровень метаболитов костно-хрящевого обмена в сыворотке крови у пациентов исследуемых групп

	СОМР, нг/мл	КФ, нмоль/(с*л)	КЩФ, ммоль/л	Ca^{2+} , ммоль/л
Здоровые пациенты (группа 1)	1065,88 [695,30;1347,81]	333,58 [291,54; 398,37]	16,18 [14,42; 20,96]	2,08 [2,00; 2,27]
Пациенты с МетОА (группа 2)	1056 [883,33;1278,88]	607,89 [512,78;664,41]* \uparrow $p_{1-2}=0,001$	24,81 [23,51;26,36]* \uparrow $p_{1-2}=0,0005$	1,49 [1,29; 1,60]* \downarrow $p_{1-2}=0,002$
Примечание – * – статистически значимые различия между значениями, $p < 0,05$				

В подтверждение факта воздействия компонентов метаболического синдрома на клиническое течение ОА выявлены прямые корреляционные связи между компонентами липидного спектра сыворотки крови и клиническими симптомами по шкалам боли ВАШ и Лекена (Рисунок 2).

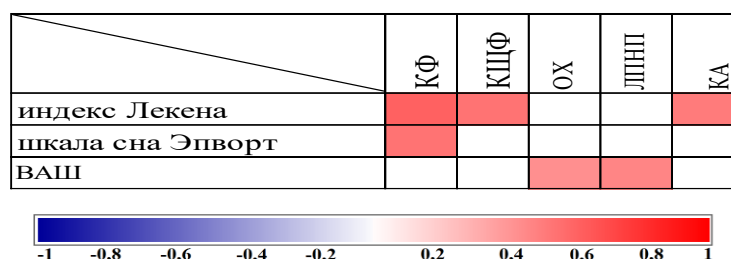
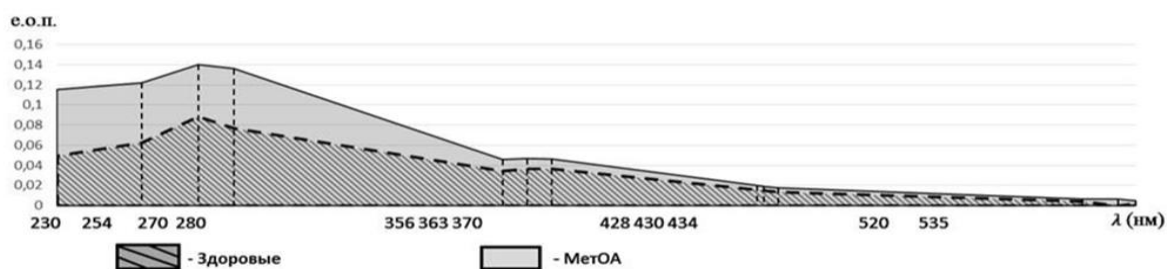


Рисунок 2 – Корреляционный анализ клинико-биохимических показателей

Также обнаружены прямые корреляционные связи между активностью КФ, уровнем КЩФ и тяжестью ОА по клинической шкале Лекена и качеством

сна по шкале Эпворт. Определяемый нами уровень ОМБ сыворотки крови, показал повышение общей площади под кривой спонтанной ОМБ в группах метаболического фенотипа ОА в основном за счет нейтральной фракции альдегид-динитрофенилгидразонов (АДНФГ), что продемонстрировано на Рисунке 3.



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

Рисунок 3 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов и их компонентов спонтанной ОМБ сыворотки крови

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

Нами было отмечено снижение резервно-адаптационного потенциала (РАП) у пациентов с метаболическим фенотипом ОА как для АДНФГ нейтрального ($p=0,0001$), так и для и кетон-динитрофенилгидразонов (КДНФГ) основного характера ($p=0,027$). Полученные результаты истощения РАП ОМБ могут свидетельствовать о недостаточной активности антиоксидантной системы, снижении возможности обновления белков и накопления поврежденных протеинов со слабой функциональной активностью при метаболическом фенотипе ОА. Активизация процессов ОМБ может стать одной из причин ингибирования активности ферментативного звена антиоксидантной защиты и усиления выраженности ОС, что в наших результатах отразилось в снижении активности СОД у пациентов с ОА (3,5 [2,5; 4,3] у.е.а., $p < 0,001$) относительно здоровых пациентов (7,4 [5,3; 8,4] у.е.а.). Выявлена обратная

корреляция металл-зависимого звена ОМБ с уровнем боли (NormP) шкалы KOOS, где более низкие показатели NormP демонстрируют выраженный болевой компонент, и прямая корреляционная связь показателя со шкалой Лекена, где высокий балл отражает сильный болевой синдром, что говорит о высоких уровнях развития ОС у пациентов с более выраженными клиническими симптомами ОА (Таблица 2).

Таблица 2 – Корреляционный анализ между биохимическими и клиническими показателями пациентов групп метаболического фенотипа ОА

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

В гомогенатах костно-хрящевой ткани группы 3 нами выявлено увеличение общей площади под кривой спонтанной ОМБ в субхондральных отделах кости и нагружаемой зоне хряща в сравнении с группой 4. Кроме того, в группе 3 выявлены более высокие уровни спонтанной ОМБ в субхондральной зоне кости в сравнении с ненагружаемой зоной (Таблица 3).

Таблица 3 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной ОМБ костно-хрящевой ткани

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

В гомогенатах хирургических опилов различных зон сустава пациентов с метаболическим фенотипом ОА (3-я группа) выявлено увеличение уровня

SUCNR1 и его лиганда сукцината во всех исследуемых зонах сустава в сравнении с группой 4 (Рисунок 4).

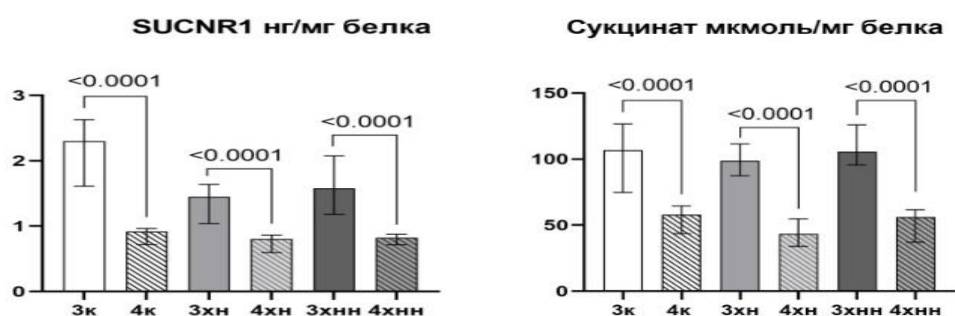


Рисунок 4 – Количество SUCNR1 в гомогенатах костно-хрящевой ткани у пациентов 3 и 4 группы

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

Последующий внутригрупповой анализ гомогенатов костно-хрящевой ткани пациентов с метаболическим фенотипом ОА выявил более высокий уровень SUCNR1 в области субхондральной кости по сравнению с хрящевыми зонами сустава (Рисунок 5).

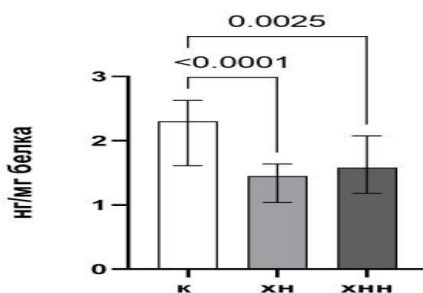


Рисунок 5 – Количество сукцинатного рецептора SUCNR1 в гомогенатах костно-хрящевой ткани у пациентов с метаболическим фенотипом ОА (группа 3)

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

В 4 группе исследуемые зоны сустава не отличались по количеству SUCNR1 и уровню сукцината между собой, имея неспецифический характер распределения. Нами не обнаружены изменения в активности СДГ митохондрий в большинстве зон сустава обеих исследуемых групп. Однако

выявлено некоторое увеличение активности фермента митохондрий субхондральной кости в группе метаболического фенотипа ОА относительно других исследуемых зон сустава (Таблица 4).

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

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

По результатам обследования на выявление сомнологических нарушений у пациентов с метаболическим фенотипом ОА отмечались статистически значимые нарушения сна в сравнении с группой здоровых пациентов по всем шкалам оценки качества и количества сна (Таблица 5).

Таблица 5 – Инсомнологические показатели шкал субъективной оценки количества и качества сна (баллы) у пациентов с метаболическим фенотипом ОА

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

Кроме того, по результатам обследования было выявлено, что у пациентов с метаболическим фенотипом ОА наблюдается снижение ночной секреции гормона шишковидной железы мелатонина (77,88 [58,88-99,25] нмоль/л) в сравнении с пациентами группы 1 (128,61 [88,68-148,47] нмоль/л, р=0,0005).

В подгруппе 2М, получавшей в качестве дополнения к базовому лечению

препарат мелатонин в дозе 3 мг/сут., по прошествии 1 месяца замечено статистически значимое снижение показателей липидного спектра сыворотки крови (Таблица 6).

Таблица 6 – Липидные фракции крови подгрупп 2М и 2Б до и после лечения

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

Примечание – * – статистически значимые различия между значениями, $p < 0,05$, ммоль/л

Отмечена определенная динамика маркеров костной резорбции у пациентов подгруппы 2М после лечения, которая проявлялась повышением уровня Ca^{2+} ($p < 0,0001$) в сравнении с исходными показателями, снижением содержания КЩФ ($p = 0,01$) и уровня активности КФ ($p < 0,0001$) в сыворотке крови (Рисунок 6).

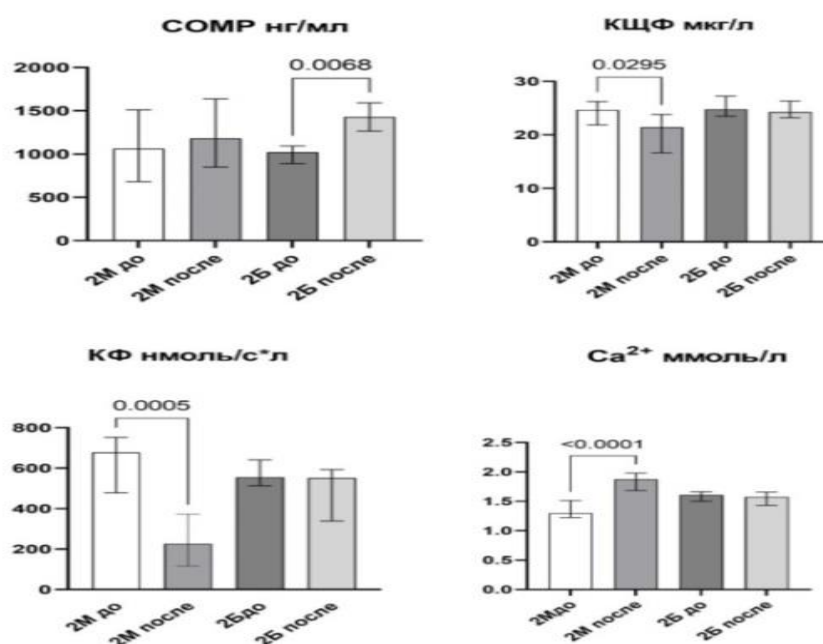


Рисунок 6 – Динамика изменения костно-хрящевых метаболитов у пациентов подгрупп 2М и 2Б

Показатели шкалы субъективной оценки функционального состояния коленных суставов Лекена в подгруппе 2М снизились после лечения с 12 [12; 13] до 10 [8,75; 10,25] баллов ($p < 0,03$), а среди пациентов подгруппы 2Б оставались без существенной динамики (10,5 [10; 11,75] и 10 [10; 19,25] баллов до и после лечения соответственно). Положительная динамика результатов шкалы ВАШ наблюдалась в обеих подгруппах, однако в подгруппе 2М снижение болевого синдрома ($p = 0,005$) было эффективнее с 4,5 [3,75; 5] до 2,5 [2; 3,25] мм против 4,5 [4; 5] и 3,5 [3; 4] мм в подгруппе 2Б ($p = 0,01$). У пациентов 2М подгруппы отмечалось снижение тяжести клинического течения ОА (повышение баллов по критериям шкалы) по шкале KOOS в виде уменьшения боли (P) и симптомов (S) с увеличением уровня повседневной активности (A) и суммарного показателя качества жизни (Sum) после лечения ($p < 0,05$). В 2Б подгруппе только симптомы (S) шкалы KOOS показали умеренное снижение ($p = 0,04$), тогда как изменения остальных показателей, в том числе суммарного (NormSum), не были статистически значимыми. Сомнологические нарушения по результатам лечения нормализовались в 2М подгруппе, принимавшей препарат мелатонин по всем шкалам нарушения сна (Таблица 7).

Таблица 7 – Инсомнологические показатели шкал субъективной оценки количества и качества сна (баллы) 2 группы после лечения

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

На первом этапе эксперимента *in vitro* было выявлено, что инкубация клеток с H_2O_2 в дозе 200 мкМ приводила к кратному увеличению уровня

сукцината и SUCNR1 в клетках хондроцитов (Рисунок 7).

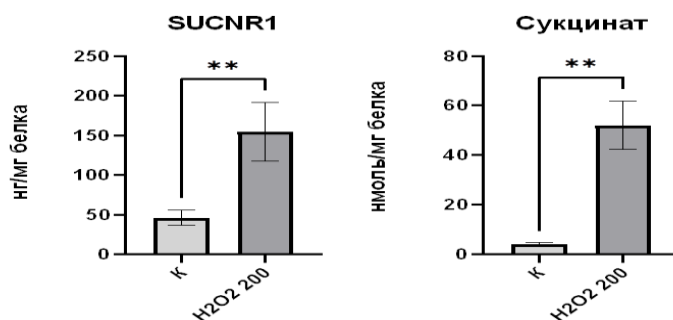


Рисунок 7 – Количество SUCNR1 и сукцината в клетках линии хондроцитов после воздействия H₂O₂ 200 мкМ в течение 12 часов

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

Добавление раствора мелатонина в питательную среду хондроцитов не приводило к статистически значимым изменениям количества SUCNR1 и уровня сукцината как лиганда SUCNR1 в исследуемых дозах.

Предварительная инкубация с мелатонином клеток хондроцитов в концентрации 100 мкМ и 500 мкМ с последующим моделированием окислительного стресса H₂O₂ 200 мкМ характеризовалась снижением уровня компонентов сукцинат-рецепторной системы (Рисунок 8).

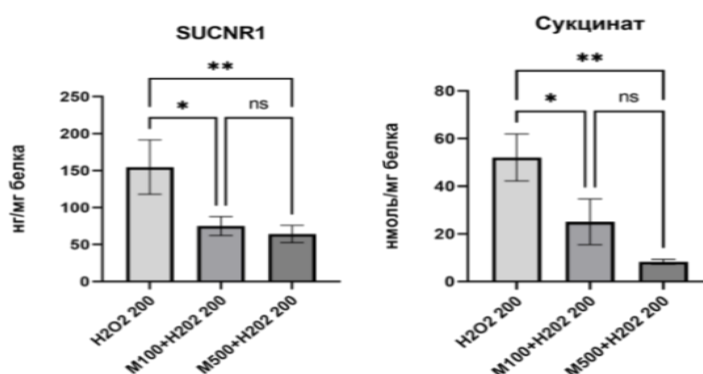


Рисунок 8 – Количество SUCNR1 и сукцината в клетках линии хондроцитов после воздействия H₂O₂ 200 мкМ течение 12 часов на предварительно обработанные мелатонином клетки

Примечание – ns – статистически не значимые различия, p≥0,05; * – p<0,05; ** – p<0,01

Нами обнаружено, что предварительное добавление в питательную среду

хондроцитов мелатонина в концентрации 100 мкМ и 500 мкМ с последующим моделированием окислительного стресса H_2O_2 200 мкМ приводит к снижению содержания компонентов сукцинат-рецепторной системы, при этом снижение уровня сукцината носило дозозависимый характер (Рисунок 9).

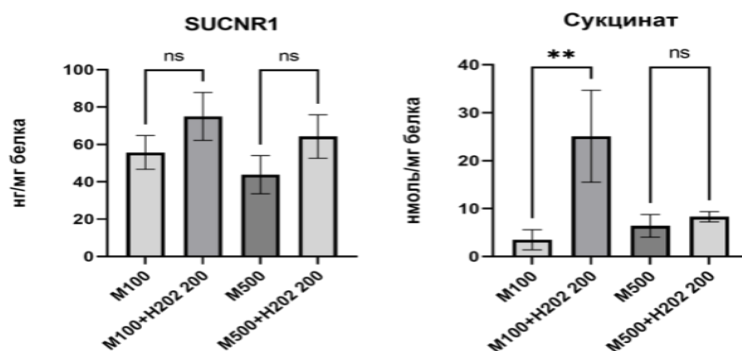


Рисунок 9 – Количество SUCNR1 и сукцината в клетках линии хондроцитов после воздействия H_2O_2 200 мкМ течение 12 часов на предварительно обработанные мелатонином клетки в сравнении с исходными показателями

Примечание – ns – статистически не значимые различия, $p \geq 0,05$; ** – статистически значимые различия, $p < 0,01$.

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали, что воздействие мелатонина в дозе 100 мкМ и 500 мкМ создает условия для эффективного снижения эффектов H_2O_2 и препятствует развитию окислительного стресса.

Поскольку в настоящее время имеется ограниченная информация об экспрессии SUCNR1 в хондроцитах человека, нами было проведено иммуноцитохимическое исследование для оценки наличия SUCNR1 в хондроцитах метаболического фенотипа ОА. В качестве положительного контроля использовали клетки мышечных миобластов C2C12, экспрессирующие SUCNR1. Выявлена выраженная иммунопозитивная реакция с мембранами и цитоплазмой клеток C2C12, что подтверждает наличие в них SUCNR1. В хондроцитах метаболического фенотипа ОА так же отмечалась иммунопозитивная реакция с мембранами клеток, но более слабая (Рисунок 10).

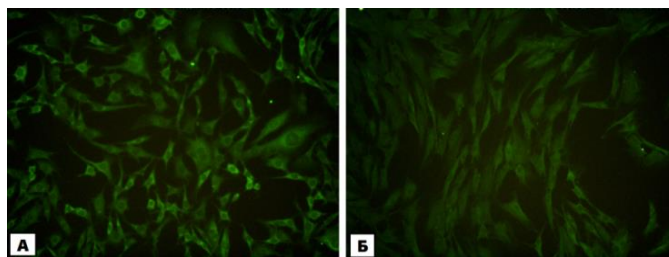


Рисунок 10 – Иммуноцитохимическое окрашивание клеток линии C2C12 (А) и хондроцитов метаболического фенотипа ОА (Б) с использованием антител к SUCNR1, вторичных антител S0018 Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Fluor488-conjugated, Affinity Biosciences, КРН, увеличение $\times 400$ раз

Полученные результаты, свидетельствуют о наличии данных рецепторов в изучаемых клетках, однако их роль и функционирование требуют дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

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

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

3. У пациентов с метаболическим фенотипом остеоартроза отмечается увеличение уровня сукцинатного рецептора в костно-хрящевой ткани, которое носит тканеспецифичный характер с преимущественным увеличением

количества рецептора в субхондральных отделах кости. При этом повышенное содержание сукцината фиксируется в субхондральных отделах кости и в нагружаемой зоне хряща сустава.

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

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

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

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

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

научной информативности о значении сукцинат-рецепторной системы в прогрессировании заболевания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шодиев Д.Р., Звягина В.И., Рябова М.Н., Дмитриева М.Н. Влияние мелатонина на фактор дислипидемии при метаболическом фенотипе остеоартроза // Гений ортопедии. — 2022. — Т. 28, № 2. — С.43-49.
2. Шодиев Д.Р., Звягина В.И., Рябова М.Н., Дмитриева М.Н. Клинико-биохимические изменения и их коррекция у больных с метаболическим фенотипом остеоартроза и инсомнией // Ожирение и метаболизм. — 2023. — Т20, №2. — С.104-114.
3. Шодиев Д.Р., Звягина В.И., Рябова М.Н., Дмитриева М.Н. Окислительная модификация белка и резервно-адаптационный потенциал у больных с метаболическим фенотипом остеоартрита // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. — 2023. — Т.26, №6. — С.38-44.
4. Изучение метаболизма костно-хрящевой ткани у больных метаболическим фенотипом остеоартроза / Шодиев Д.Р., Рябова М.Н. — Текст: непосредственный // Актуальные проблемы биомедицины — 2023: сборник материалов XXIX Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием. — Санкт-Петербург, 2023. — С. 204
5. Шодиев Д.Р., Звягина В.И., Рябова М.Н., Марсянова Ю.А. Сукцинат-рецепторная система костно-хрящевой ткани у пациентов с метаболическим фенотипом остеоартрита // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. — 2024. — Т. 27, №4. — С.42-49.
6. Шодиев Д.Р., Звягина В.И., Рябова М.Н., Марсянова Ю.А. Влияние мелатонина на сукцинат-рецепторную систему хондроцитов остеоартрита в условиях окислительного стресса *in vitro* // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии — 2024. — №4. — С.41-49.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- Ca²⁺ – кальций
COMP – cartilage oligomeric matrix protein, хрящевой олигоматриксный пептид
SUCNR1 – succinate receptor 1, сукцинатный рецептор
S_{аднфг} – площадь под кривой спектра поглощения альдеги-динитрофенилгидразонов
S_{кднфг} – площадь под кривой спектра поглощения кетон-динитрофенилгидразонов
S_{омб} – суммарная площадь под кривой спектра поглощения окислительной модификации белков
КА – коэффициент атерогенности
КФ – кислая фосфатаза
КЩФ – костный изофермент щелочной фосфатазы
ЛПВП – липопротеины высокой плотности
ЛПНП – липопротеины низкой плотности
НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты
ОА – остеоартроз
ОМБ – окислительная модификация белков
ОС – окислительный стресс
ОХ – общий холестерин
РАП ОМБ – резервно-адаптационный потенциал окислительной модификации белков
СДГ – сукцинатдегидрогеназа
СОД – супероксиддисмутаза
ЩФ – щелочная фосфатаза