Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота

на тему «**ПОРУШЕННЯ МЕТАБОЛІЗМУ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ ПРИ РОЗВИТКУ ОСТЕОАРТРОЗУ»**

Виконала: студентка 2-го року навчання
Галузь знань: 09 Біологія
Спеціальність: 091 Біологія
Освітньо-наукова програма: Лабораторна діагностика біологічних систем
Веребська Олександра Вадимівна

Керівники:
Магомедов О.М., професор,
доктор біологічних наук, завідувач лабораторії біохімії та клінічних аналізів ДУ ІТО НАМНУ;

Руссу І.З.,
Кандидат біологічних наук, доцент кафедри лабораторної діагностики біологічних систем НаУКМА

Рецензент:
Панченко Л.М., кандидат медичних наук, завідувач лабораторії імунології ДУ ІТО НАМНУ

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК
Пахаренко М. В.
«____» червня 20__ року

Київ – 2020

ЗМІСТ

	стр.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	3-4
ВСТУП	5-7
Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8- 20
1.1. Структура та особливості функціонування суглобів	8-11
1.2. Механізми розвитку остеоартрозу	11-16
1.3. Біохімічні показники патологічного процесу при остеоартрозі	16-20
Розділ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	21-32
2.1. Об'єкт дослідження	21
2.2. Список матеріалів та обладнання дослідження	21-23
2.3. Методи дослідження	23-32
2.3.1. Визначення колагенолітичної активності за Lindy	23-24
2.3.2. Визначення фракцій оксипроліну в сироватці крові за Stegeman	24-26
2.3.3. Визначення глікозаміногліканів орциновим методом	26-27
2.3.4. Визначення рівня загального кальцію, фосфору та лужної фосфатази за допомогою аналізатора Abx Horiba Pentra 400	28-31
2.3.5. Визначення рівня електролітів (Na, K, Ca) за допомогою аналізатора EasyLyte Calcium Medica	31-32
2.4. Статистична обробка результатів	32
Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	
3.1. Зміна колагеназної активності в сполучній тканині при остеоартрозі	33-36
3.2. Визначення кількості фракцій оксипроліну при остеоартрозі	36-38
3.3. Зміна рівня глікозаміногліканів при остеоартрозі	38-40
3.4. Зміна рівня загального Кальцію та Фосфору та активності лужної фосфатази	40-41
3.5. Зміна рівня електролітів при остеоартрозі	41-42
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	43-46
ВИСНОВКИ	47

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГАГ – глікозаміноглікани;

ГК – гіалуронова кислота;

ЛПВЩ – ліпопротеїни високої щільності;

ЛПНЩ – ліпопротеїни низької щільності;

ЛФ – лужна фосфатаза;

МКМ – маркери кісткового метаболізму;

ОА – остеоартроз;

ПГ – протеоглікан;

РА – ревматоїдний артрит;

AGE – кінцеві продукти вдосконаленої глікації (advanced glycation end-products);

AGN – агрекан;

BCP – basic calcium phosphate (BCP) crystals;

CCL3 – C-C motif chemokine ligand 3;

CML – карбоксиметиллізин;

Col2 – колаген II типу;

COMP – хрящовий олігомерний білок матриксу (cartilage oligomeric matrix protein);

Cox2 – циклооксигеназа 2;

CTX-II – поперечно зв’язаний телопептид колагену II типу;

ЕЦМ – екстрацелюлярний матрикс;

GWAS – genomewide association scans;

HIF-1α – Hypoxia-inducible factor 1-alpha;

IL-1 – інтерлейкін-1;

IL-6 – інтерлейкін-6;

MetS – метаболічний синдром;

MGP – матричний гамма-карбоксиглютаміновий білок;

Mmp13 – матрична металопептидаза-13;

NGF – нейральний фактор росту;

OARSI – міжнародне співтовариство з дослідження остеоартриту (International Osteoarthritis Research Society);

Runx2 – Runt-related transcription factor 2;

THR – повна заміна стегна (total hip replacement);

TJR – повна заміна суглоба (total joint replacement);

TKR – повна заміна коліна (total knee replacement);

TLR-4 – Toll-like receptor 4;

TNF-α – фактор некрозу пухлин- α;

ПМАБ – параметилбензальдегід.

ВСТУП

Остеоартроз (ОА) – найпоширеніша хвороба суглобів у світі, яка охоплює приблизно 10% чоловіків та 18% жінок старших за 60 років. У розвинених країнах соціально-економічне навантаження, що виникає внаслідок цього захворювання, є доволі значним і становить від 1,0% до 2,5% валового внутрішнього продукту [1].

Кількість людей, які страждають на симптоматичний ОА, ймовірно, збільшиться через старіння населення та велику кількість хворих на ожиріння. Через високу поширеність та часту втрату працездатності, яка супроводжує захворювання в основних суглобах, таких як колінний та тазостегновий, ОА спричиняє розлади у руховій функції нижніх кінцівок. ОА також є найпоширенішою причиною тотальної хірургічної заміни стегна та коліна [2]. ОА найбільше вражає такі суглоби, як колінний, ліктьовий, тазовостегновий, а також хребет, і є основною причиною порушення опорно-рухового апарату у літніх людей. Хоча було висунуто припущення про кілька факторів ризику, пов'язаних з ОА, включаючи генетичну схильність, старіння, ожиріння та неправильне вирівнювання суглобів, патогенез ОА залишається значною мірою незрозумілим. Оскільки точні молекулярні механізми, які беруть участь у деградації хрящової тканини та розвитку ОА, недостатньо вивчені, на даний час не існує ефективних втручань для уповільнення прогресування ОА або затримки незворотної деградації хряща, за винятком тотальної операції заміни суглоба [3].

Загальна замісна терапія суглобів (TJR) вважається найбільш ефективним методом лікування пацієнтів з ОА в кінцевій стадії, а більшість пацієнтів досягають симптоматичного поліпшення після TJR. Однак мета-аналіз, що включає 14 опублікованих досліджень, показав, що до 23% від загального обсягу пацієнтів із заміною стегна (THR) та 34% від загальної кількості пацієнтів із заміною коліна (TKR) повідомили про тривалий післяопераційний біль [4]. ОА стегна або коліна також лікують

анальгетиками та нестероїдними протизапальними препаратами, але ці препарати можуть спричинити серйозні побічні реакції з боку шлунково-кишкового тракту та серцево-судинної системи, особливо при тривалому застосуванні [5].

Незважаючи на те, що втрата суглобового хряща є чіткою ознакою ОА, нині вважається, що ОА вражає всі суглобові структури, включаючи субхондральну кістку, синовій, меніск в коліні, навколосуглобові зв'язки та жирову тканину, наприклад, інфрапателярне жирове тіло коліна. Структурні зміни цих тканин суглоба впливають на біомеханіку та гомеостаз синовіального суглоба, що призводить до порушення його функціональної цілісності. Як нещодавно визначило International Osteoarthritis Research Society (OARSI), ОА проявляється спочатку як аномальний метаболізм тканин суглоба з подальшими анатомічними та фізіологічними змінами тканин суглоба, що може стати причиною захворювання. Таким чином, розуміння біохімічних змін та зміни метаболізму при ОА має велике значення і сприятиме розробці нових методів цілеспрямованих втручань для зупинки або уповільнення прогресування захворювання [2].

Швидке зростання поширеності цього захворювання говорить про те, що ОА матиме прогресуючий вплив на охорону здоров'я та системи охорони здоров'я в майбутньому [3]. Вдосконалене розуміння патогенезу в поєднанні з покращеними методами аналізу активності захворювання сприяє переходу фокусу на профілактику та лікування раннього ОА. Крім того, виявлення різних фенотипів хвороби може забезпечити персоналізовану допомогу кожному пацієнту [1]. Питання ранньої діагностики та дослідження аспектів патогенезу артрозу вимагають проведення подальших інтенсивних досліджень. На сьогодні артрози є одними з найбільш значущих захворювань у сучасній ревматології [7].

Метою дипломної роботи є визначення метаболічних показників хрящової тканини хворих на остеоартроз.

Для досягнення мети було поставлено такі завдання:

1. Визначити активність колагенази у сироватці хворих на остеоартроз.

2. Виділити фракції гідроксипроліну та визначити їх кількість.

3. Визначити сумарний вміст глікозаміногліканів у сполучній тканині.

4. Визначити кількості загального кальцію, фосфору та лужної фосфатази за допомогою біохімічного аналізатора Horiba Abx Pentra 400.

5. Визначити рівень електролітів (Na, K, Ca) за допомогою приладу EasyLyte Analyzer.

Об’єктом дослідження роботи є зміни біохімічних маркерів функціонування сполучної тканини хворих на остеоартроз. Предметом дослідження є метаболічні показники сполучної тканини хворих на ОА.

Експериментальну частину роботи було виконано на базі лабораторії біохімії та клінічних аналізів ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМНУ».

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Структура та особливості функціонування суглобів

Синовіальні суглоби кінцівок – це структурно і біомеханічно складні та критично важливі структури опорно-рухового апарату. Вони складаються із суглобового хряща, який охоплює кожен кінець протилежних скелетних елементів, синовіальної рідини, яка забезпечує змащування та живлення тканин, зв'язок, які утримують скелетні елементи, та волокнистої капсули, яка обмежує та визначає суглоби від навколишніх тканин та навколишнього середовища. Суглобовий хрящ характеризується унікальним і щільним позаклітинним матриксом, наділеним значною біомеханічною стійкістю, доволі аваскулярний і здатний зберігатися протягом життя при порівняно незначному обороті його клітин і компонентів. Інтерес до синовіальних суглобів залишається незмінним протягом десятиліть, що відображає їх фундаментальне значення для функціонування організму та якості життя та сприйнятливості до різних набутих та вроджених станів, найчастіше остеоартриту (ОА) [8].

Гіаліновий хрящ – це найпоширеніший тип хрящів в організмі. Він відповідає за утворення кісток у ембріона (ендохондральне окостеніння), а у дорослих людей він може знаходитися в реберних хрящах, дихальній системі (трахеї), покриває кістково-суглобову поверхню (суглобовий хрящ) [9]. Суглобова капсула вистелена синовіальною оболонкою, яка поділяється на внутрішню і зовнішню частини. Зовнішній шар є волокнистою мембраною і складається з колагенових волокон. Цей шар оточує весь суглоб і міцно прикріплюється до окістя сусідніх кісток. Хоча він погано васкуляризований, суглобова капсула сильно іннервується різноманітними соматичними

сенсорними волокнами, що опосередковують відчуття болю, пропріоцепції, тиску та вібрації.

Більшість судин, як правило, з периартикулярних анастомотичних сплетень, проникають у капсулу, щоб перейти до синовіальної оболонки та епіфізів.

Внутрішній шар суглобової капсули – синовіальна оболонка. Він сильно васкуляризований, але погано іннервується. Суглобовий хрящ також не має іннервації. Таким чином, синовіальна оболонка і суглобовий хрящ нечутливі до болю [10].

Суглобовий хрящ умовно поділяється на три шари. У зовнішньому шарі колагенові волокна щільно розміщені та орієнтовані паралельно суглобовій поверхні, а вміст протеогліканів низький. У середньому шарі колаген розташований більш хаотично, а вміст протеогліканів – максимальний. У внутрішньому шарі волокон колагену більше і вони орієнтовані перпендикулярно до субхондральної кістки, вміст протеогліканів низький [11].

Суглобовий хрящ складається з клітинного і позаклітинного відділення [1]. Суглобовий хрящ, який знижує тертя синовіальних суглобів, складається з рідко розподіленої популяції вузькоспеціалізованих клітин, що називаються хондроцити, які вбудовані в матрицю і надають суглобовому хрящу якісні механічні властивості. Хондроцити утворюють макромолекулярний каркас тканинного матриксу з трьох класів молекул: колагенів, протеогліканів і неколагенних білків [12]. У нормальних умовах суглобові хондроцити затримуються на передгіпертрофічній стадії диференціювання, тим самим зберігається необхідна стадія протягом постнатального життя для підтримки нормальної структури суглобового хряща [3]

Екстрацелюлярний матрикс становить іншу частину суглобового хряща [13]. Суглобовий хрящ складається в основному з тканинної рідини, колагену II типу (Col2) та протеогліканів. З вологої маси 65–80% хрящів це тканинна рідина. Цей високий вміст рідини дозволяє поживним речовинам та кисню

дифундувати через хрящову матрицю до її клітин. Колаген II типу та протеоглікани складають відповідно 15–22% та 4–7% від мокрої маси хряща відповідно. Інші колагени та протеоглікани, такі як типи V, VI, IX, X, XI, XII, XIV-колагени та декорин, бігликан, фібромодулін, люмікан, епіфікан та перлекан, також становлять невелику частину (менше 5 %) від нормального складу хряща.

Позаклітинний матрикс суглобового хряща складається в основному з двох макромолекул колагену II типу та великого агрегаційного протеоглікану, агрегану. Колагеновий фібрил – це гетерополімер, що складається переважно з колагену типу II (понад 90%) з невеликими кількостями колагену типу IX та XI. [14]. Інші фіброзні тканини складаються з колагенових фібрил, утворених значною мірою з колагену I типу. Колагенові фібрили, що утворюються в основному з колагену I типу, незначно відрізняються за своєю структурою від структур, що утворюються головним чином від колагену II типу [13].

Агрекан зі своїми сильно негативно зарядженими глікозаміногліканами (ГАГ) може зв'язати до 50 разів більше своєї ваги з водою, що створює приплив води та тиск набухання, що, як правило, обмежене міцністю на розрив колагенової фібрилярної мережі [14]. Колаген є структурною основою позаклітинного матриксу, який забезпечує захист від розтягування та сприяє підтримці структурної цілісності. Взаємодія колагену та фібронектину допомагає підтримувати структуру позаклітинного матриксу та клітинні функції.

У хрящовій матриці плоду та дорослого колаген II типу становить 75%, а також понад 90% загального колагену. Складна структура колагену стійка до протеолітичних ферментів, крім специфічних матричних металопротеїназ [13].

Серед не колагенових білків, присутніх у хрящах, COMP (хрящовий олігомерний протеїн матриксу) є членом родини глікопротеїнів тромбоспондину, який зв’язує та стабілізує колагенові волокна II типу.

Синовіальні суглоби ссавців мають значну кількість чутливих нервових волокон, кінці яких експресують численні рецептори, які активуються при взаємодії з подразником. Чутливість цих рецепторів регулюється критичною взаємодією з місцевим мікросередовищем, а також чинниками, пов'язаними з самими подразниками. Клітинні механізми, за допомогою яких відбуваються ці зміни, передбачають ранні посттрансляційні зміни рецепторів іонних каналів і більш пізні, більш тривалі механізми, які залежать від транскрипції, що включають зміни фенотипу клітини [16].

1.2. Механізми розвитку остеоартрозу

Остеоартроз – хронічне прогресуюче дегенеративно-дистрофічне захворювання суглобів, що характеризується дегенерацією суглобового хряща, змінами субхондральної кістки; при цьому розвиваються крайові остеофіти, а також спостерігається явний або прихований синовіт. У патологічних процесах також залучені синовіальна оболонка, субхондральна кістка, капсула суглоба, внутрішньосуглобові та периартикулярні зв'язки, меніски (при захворюванні в колінному суглобі), навколосуглобові м’язи [17].

Остеофітоз – це розвиток кісткового відростка, покритого фіброзно-хрящовими кістками, на кордонах суглоба, що утворює так звані остеофіти. При ОА остеофіти зазвичай розвиваються на зовнішній стороні кіркової кістки суглоба і походять від окістя. Розвиток остеофіту викликається різними факторами, наприклад, механічними факторами, факторами росту та цитокінами, що стимулюють проліферацію мезенхімальних стовбурових клітин в окісті. Усередині остеофіту, що розвивається, клітини проходять хондрогенез, а зрілі гіпертрофічні хондроцити згодом замінюються остеобластами, що опосередковують кісткове утворення [18]. Описано значну кореляцію між медіальними остеофітами великогомілкової кістки та

болями в колінному суглобі у пацієнтів з ОА коліна [19], але це не підтверджено іншими дослідниками.

Дані останніх дослідників свідчать про те, що остеоартроз (ОА) слід розглядати не як дегенеративний процес, а як аномальне ремоделювання тканин суглобів, що визначаються прозапальними медіаторами. Під ремоделюванням тканини розуміється зміна їх геометричних та структурних властивостей [7].

Підкласифікація, що найчастіше використовується при ОА, поділяє хворобу на дві підгрупи: первинний або ідіопатичний ОА, в якому досі не відомі попередні події або захворювання, пов'язані з ОА; і вторинний, в яклму відома асоційована подія або захворювання, пов'язані з ОА. Первинний або ідіопатичний ОА додатково підрозділяється за анатомічним місцем розташування вогнища захворювання. Вторинний ОА підрозділяється за етіологією або пов'язаним з ним станом або захворюванням [20].

Суглобовий хрящ може бути пошкоджений при нормальному зношенні або таких патологічних процесах, як неправильне механічне навантаження або травми. Під час ранніх стадій ОА хрящова поверхня залишається неушкодженою. Молекулярний склад та організація позаклітинного матриксу спочатку змінюється. Суглобові хондроцити, які мають незначну регенеративну здатність і мають низьку метаболічну активність у нормальних суглобах, виявляють тимчасову проліферативну реакцію та посилений синтез матриксу (Col2, агрекан тощо), намагаючись ініціювати відновлення, викликане патологічною стимуляцією. Ця реакція характеризується клонуванням хондроцитів для утворення кластерів та гіпертрофічним диференціюванням, включаючи експресію гіпертрофічних маркерів, таких як Runx2, ColX та Mmp13.

Зміна складу та структури суглобового хряща додатково стимулює хондроцити виробляти більше катаболічних факторів, що беруть участь у деградації хряща. Цілісність хряща порушується. Потім суглобові хондроцити зазнають апоптозу, і суглобовий хрящ з часом буде повністю

втрачений. Скорочений простір суглоба внаслідок повної втрати хряща спричиняє тертя між кістками, що призводить до болю та обмеженої рухливості суглоба. З'являються також інші ознаки ОА, включаючи субхондральний склероз, утворення остеофітів, а також розслаблення та слабкість м’язів і сухожиль [3].

Пошкоджені хондроцити виділяють стресові катаболічні ферменти, що руйнують колаген (еластазу, колагеназу, пептидазу тощо) та протеоглікани (металопротеїназа, стромелізин, катепсин, інтерлейкіни (IL-1, IL-6), TNF-α, тощо). Зростання вироблення цитокінів, що сприяють проліферації синовіальних клітин, з одного боку, та інгібування синтезу колагену та протеогліканів за допомогою хондроцитів, з іншого боку, є значним. При ОА спостерігається активація циклооксигенази-2 хондроцитів (Cox2), що індукує синтез простагландинів, які беруть участь у розвитку запалення [21]. Сучасні результати досліджень показали, що ОА на ранній стадії насамперед характеризується змінами орієнтації колагену та кількості ПГ у поверхневому шарі, при цьому кількість колагену не змінюється, поки ОА не прогресує до пізньої стадії [22].

Велика кількість досліджень підтверджує зміни, пов'язані зі старінням, у екстрацелюлярному матриксі (ЕЦМ) і клітинах хряща. Зміни в цих двох компартментах, імовірно, посилюють одне одного, оскільки змінений ЕЦМ може призвести до посилення механічного навантаження на клітини, тоді як втрата або дисфункція клітин призводить до дефіциту синтезу ЕЦМ та збільшення деградації. Вікові патології походять від обмежень у механізмах збереження та відновлення ДНК, від аномалій механізмів антиоксидантів, що сприяють детоксикації реактивних видів активних форм кисню, або від аномалій у механізмах видалення аномальних білків та органел [23].

Фрагменти фібронектину можуть грати роль імуногенності, стимулюючи утворення цитокінів інших ферментів з хондроцитів, що сприяють пошкодженню хряща при остеоартрозі. Наявність антигенів проти колагену II типу в остеоартритному хрящі також говорить про роль

імунологічного механізму в розвитку остеоартриту. Клінічні особливості, такі як набряк та синовіальна ефузія, зміна синовіальної оболонки та наявність біомаркерів у синовіальній рідині, свідчать про роль запального процесу в патогенезі остеоартриту. При остеоартрозі роблять припущення про вагому роль клітинного, а також гуморального імунітету у його розвитку, а також хронічного запалення через вивільнення аутоантигенів, та розвиток аутоімунних реакцій, що спричиняє руйнування хряща [13].

Хондроцити, синовіальні клітини та інші клітини в суглобі можуть експресувати цитокіни і хемокіни та реагувати на них; ряд цитокінів може бути виявлений у синовіальній рідині хворих на ОА. Цитокіни, які можуть бути причетні до патогенезу ОА, включають TNF-α, інтерлейкіни IL-1, IL-6, інші поширені γ-ланцюгові цитокіни, такі як IL-2, IL-7, IL-15 і ІЛ-21 та хемокіни [24].

Велика кількість наукових праць присвячені дослідженню зв’язку між дисліпідемією, активацією вродженого імунного шляху та патофізіологією ОА. Активовані синовіальні макрофаги є в суглобах ОА, особливо у хворих на діабет. Одним з потенційних посередників активації макрофагів є холестерин ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ). ЛПНЩ підвищується при ожирінні і при окисленні стимулює вироблення прозапальних медіаторів, протеїназ, що руйнують матрикс, та факторів росту, що беруть участь у патогенезі ОА. Крім того, ожиріння та MetS (метаболічний синдром) також пригнічують вироблення холестерину ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ), який чинить протизапальну дію на макрофаги за допомогою пониження регуляції TLR-індукованих протизапальних цитокінів. Останні дані свідчать також про роль гомеостазу холестерину в гіпертрофії хондроцитів через регуляцію hedgehog-сигналінгу, що вказує на численні потенційні шляхи, які пов'язують дисліпідемію та патофізіологію ОА [25].

Будь-яка зміна концентрації глюкози та її розподіл між ЕЦМ та хондроцитами може впливати на підтримку та відновлення суглобових хрящів при ОА. Підвищена концентрація позаклітинної глюкози в ЕЦМ може

призвести до збільшення кількості кінцевих продуктів вдосконаленої гликації (advanced glycation end-products), що призводить до патологічного збільшення жорсткості хряща та ЕЦМ [24]. Дослідження колінних суглобів на діабетичних мишах виявило, що рівні карбоксиметиллізину (CML), одного з АГЕ, та металопротеїнази-1 матриці збільшуються, а експресія специфічних для хряща білків, включаючи колаген II типу (COL2), транскрипційний фактор SOX9 та агреган (AGN) була зменшена [4].

Проводиться все більше досліджень, пов’язаних із генетичними аспектами розвитку ОА. Нещодавно європейський GWAS (Genomewide association scans), використовуючи методи імпутації, виявив варіант гена *MCF2L* як істотно асоційований з великим спільним ОА. *MCF2L* бере участь у регульованій нейротрофіном регуляції клітинної рухливості в периферичній нервовій системі і, таким чином, потенційно залучається до ноцицепції в ОА [26].

Протягом останніх років у літературі накопичується все більша кількість свідчень про роль остеобластів у патогенезі остеоартриту. Аномальне вираження генів *OPG* та *RANKL* було описано в остеобластах при остеоартриті, який відповідає за аномальне ремоделювання кісток та зменшення мінералізації. Зміни в експресії генів пов'язані з порушенням функції остеобластів, реконструкцією кісток та мінералізацією, що призводить до розвитку остеоартриту. Крім того, остеобласти виробляють численні фактори транскрипції, фактори росту та інші молекули, які беруть участь у патогенезі остеоартриту [27].

Потенційні периферичні мішені для контролю болю при ОА, які зараз досліджуються, включають медіатори запалення та їх ключові рецептори, такі як простаноїди, кініни, цитокіни та хемокіни; натрієві та кальцієві іонні канали та фактори росту [9]. Прикладом останнього є фактор росту нервів (NGF), який виробляється різними типами клітин, включаючи фібробласти, кератиноцити, клітини Шванна та ряд імунних клітин. Діючи за допомогою нейронних рецепторів trkA, NGF сенсибілізує суглобові больові волокна та

змінює больові пороги. Показано, що блокуюча активність NGF нейтралізуючим гуманізованим моноклональним антитілом (танезумаб) зменшує біль у коліні ОА. Однак, у деяких пацієнтів повідомлялося про прискорене пошкодження суглобів, що було виявлено за допомогою рентгенологічних даних про некроз кісток, що у результаті призводить до заміни колінного суглоба. Причини прискореного пошкодження залишаються незрозумілими, що викликає надзвичайно важливі питання для розвитку майбутніх анальгетиків для ОА. Одне з пояснень дослідників було те, що відсутність болю в суглобах призводить до надмірного зношення суглобів. Однак, інші можливі механізми можуть включати перехресну реакцію між танземабом та іншими (судинними) рецепторами або ще невстановлену трофічну роль NGF у підтримці гомеостазу суглобів [28].

1.3. Біохімічні показники патологічного процесу при остеоартрозі

При ОА колінного суглоба прогресування захворювання пов'язане з деградацією матриксу та втратою молекул. Порушені властивості хряща, що слідують за деградацією молекул матриксу, можуть спричинити подальше пошкодження колагенової сітки та спроби відновити матрикс. Раніше було показано, що колінний хрящ ОА має збільшений пул колагену, що витягується, при лікуванні α-хімотрипсином, що говорить про патологічні зміни у колагеновій мережі [14]. У тваринних моделях порушення цілісності колагенової мережі II типу є дуже ранньою подією, що передує гістологічним ознакам втрати протеоглікану. Під час процесу синтезу та після секреції пропептиди N та C вивільняються стехіометрично з молекул проколагену типу II, що означає, що вимірювання пропептидів N та C відображає активність синтезу колагену. Отже, розробка колагенових маркерів типу II є раціональним підходом до оцінки хрящового обміну [15].

Гідроксипролін широко застосовується для визначення наявності та метаболічної активності колагену в сполучній тканині [14]. Гідроксипролін –

це незамінна амінокислота, яка міститься в колагені та кількох інших позаклітинних тваринних білках. Це дві ізомерні форми, транс-4-гідрокси-L-пролін та транс-3-гідрокси-L-пролін, які відіграють вирішальну роль у синтезі колагену та термодинамічній стабільності потрійної спіралі колагену [29].

Характерною ознакою деструкції хряща є втрата матриксом глікозаміногліканів (ГАГ): хондроїтинсульфату, кератансульфату, гіалуронової кислоти. Відмічається зменшення величини молекул протеогліканів, в результаті чого вони набувають здатності вийти за межі матриксу хряща [17]. Гістохімічні та біохімічні дослідження хряща з остеоартритних суглобів людини показали значне зниження вмісту ГАГ, пропорційне ступеню тяжкості захворювання. Так як це також було показано, що остеоартритний хрящ має підвищену швидкість синтезу білків і полісахаридів, було постульовано, що спостережувана активність є реакцією "зворотного зв'язку", пов'язаною з посиленою селективною ферментативною деградацією полісахаридів білка матриксу [30]. Втрата ГАГ призводить до надлишкової гідратації та розщеплення матриксу з подальшим його зневодненням і розривом колагенових волокон. Тому порушується основна функція хрящової тканини, яка забезпечує регулювання процесів деградації та синтезу в компонентах матричного хряща та функції амортизації суглоба, [31-33]

При дослідженні остеоартрозу стегнового суглоба відмічається підвищення активності ММР-2 та лужної фосфатази (ЛФ), що свідчить про посилення метаболізму колагену в субхондральному кістковому відділі стегон [34]. ЛФ людини має коротку сигнальну послідовність із 17–21 амінокислотних залишків та гідрофобний домен на карбоксильному кінці. У скелетній мінералізації ЛФ виконує роль транспортера фосфору і позаклітинного кальцій-зв'язуючого білка в плазматичній мембрані та може бути додатковим маркером хвороб опорно-рухового апарату, зокрема ОА. [35]. У хворих на артроз спостерігаються значні зміни в крові маркерів

кісткового метаболізму (МКМ), які проявляються дисбалансом остеоасоційованих макроелементів (кальцію, магнію, фосфору) з розвитком гіпокальціємії, яка реєструється відповідно в 98% випадків, високою активністю лужної фосфатази (в 47% випадків), ознаками гіперпаратиреоїдизму і гіперостеокальціємії [6].

Кальцій є одним з найважливіших іонів в організмі людини і відіграє вирішальну роль у певних фізіологічних функціях. Дослідження показали, що кальцій відіграє ключову роль у загибелі хондроцитів, накопичується у протеогліканах, а колаген також може зв'язувати іони кальцію. Іони кальцію можуть відігравати важливу роль у патогенезі остеоартриту на рівні тканини: збільшення жорсткості фібрил колагену II типу, на які впливають іони кальцію, призводить до втрати пластичності фібрил і таким чином знижує їх міцність. Зважаючи на це, фібрили колагену II типу мають більш високий ризик деградації, що є причиною остеоартриту. Більше того, дослідження дають вагомі докази того, що іони кальцію можуть впливати як на структурні, так і на механічні характеристики фібрил колагену II типу [36].

Кристали кальцію фосфату та кристали пірофосфату дигідрату кальцію можуть викликати запалення та артрит, і останні дослідження вказують на потенційну патогенну їх роль при ОА [37]. Мікроскопічні неорганічні кристали зазвичай спостерігаються в синовіальній рідині пацієнтів, які страждають артритними захворюваннями. Як відомо, основні кристали фосфату кальцію (BCP) зустрічаються досить часто в суглобі рідини хворих на остеоартрит (ОА) і нерозчинні при фізіологічному значенні pH [38].

Кальцифікація хрящів відіграє важливу роль у патогенезі ОА. Кальцифікація хрящової тканини пов'язана зі зниженою міцністю та посиленням тертя хряща. Кристали фосфату кальцію викликають проліферацію синовіальних фібробластів та збільшують експресію металопротеїнази-13 у хондроцитах. Таким чином, кальцифікація хряща в тандемі з посиленою експресією фактора некрозу пухлини-альфа та інтерлейкінів з макрофагів, викликаних зношеними частинками, може

призвести до подальшого руйнування хряща та ОА. Матричний гамма-карбоксиглютаміновий білок (MGP), що бере участь у кальцифікації, експресується в хондроцитах, тобто клітинах, що утворюють хрящі. У тварин з нокаутом MGP розвинулася спонтанна кальцифікація кровоносних судин, тоді як надекспресія MGP затримує мінералізацію кісток. MGP діє як інгібітор кальцифікації, опосередкованої морфогенетичним білком-2 кісткової тканини, а поліморфізм MGP асоціюється з ОА [39].

Також показано, що частинки BCP індукують вивільнення TNF-α через механізми, опосередковані TLR-4. Кристали BCP збільшують вироблення PGE2 за рахунок регуляції COX-1 та COX-2 в синовіальних фібробластах ОА [37].

Показана певна кореляція між рівнем вітаміну D та захворюваністю на ОА. Виявлено, що вітамін D в організмі людини впливає на хондроцити безпосередньо шляхом зв'язування з рецепторами-мішенями, що знаходяться в поверхневих областях хондроцитів на суглобовому хрящі. Низький рівень вітаміну D у сироватці крові збільшує остеобластичну активність та активує цикл формування та резорбції кісток [40]

Деякі молекули, що беруть участь у основних шляхах розвитку ОА, як HIF-1α або CCL3, були запропоновані в якості маркерів гомеостазу хондроцитів та ранньої дегенерації хряща. CTX-II, поперечно зв’язаний телопептид колагену II типу, утворюється завдяки переробці катепсину та металопротеїнази, і є параметром метаболізму хряща. CTX-II пригнічується протизапальним лікуванням. MMP-13 – це багатообіцяючий маркер, оскільки негативно співвідноситься з товщиною хряща [41].

Показано, що глюкозил-галактозил-піридинолін (Glu-Gal-PYD), глікозильований аналог піридиноліну, конкретно відображає деградацію синовіальної тканини. Ця посттрансляційна модифікація колагенів типу I та III типу не виявлена у значній кількості в кісткових тканинах та інших сполучних тканинах, таких як хрящ або сухожилля. Його можна виміряти в

сечі за допомогою рідинної хроматографії високого тиску, а її екскреція збільшується у пацієнтів з ОА.

Гіалуронова кислота (ГК) є складовою хряща та синовію. Вона широко поширена в різних тканинах організму, пояснюючи, що на рівень сироватки можуть впливати інші умови, окрім артриту, наприклад, захворювання печінки. У пацієнтів, які страждають на ОА, підвищений рівень ГК в сироватці крові.

Глікопротеїн-39 хряща людини (YKL-40) пов'язаний з білком хітинази і секретується хондроцитами та синовієм та кількома іншими тканинами (головним мозком, нирками та плацентою). У пацієнтів із вираженим ОА колінного суглоба було виявлено підвищення рівня YKL-40 зі значною кореляцією між синовіальною рідиною та сироваткою крові, що дозволяє припустити, що рівень сироватки в основному відображає внесок суглобів [15].

Іншими дослідженнями показано, що дефіцит магнію у хрящовій тканині призводить до ураження хондроцитів кристалами кальцію в хрящовій тканині. Крім того, іони магнію безпосередньо сприяють диференціюванню та життєздатності хондроцитів, однак механізм ще не вивчений. Ймовірно, іони магнію мають хондрогенний ефект, заснований на впливі іонів на клітинний енергетичний обмін, перестановку цитоскелету та деформацію інтегрину. Магній вже застосовувався для лікування ОА на тваринній моделі завдяки значному захисному впливу на хрящову тканину. У майбутніх дослідженнях вже планується клінічне введення магнію перорально чи шляхом місцевої інфільтрації, що може стати перспективною терапією для відновлення хрящової тканини при ОА [42].

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об'єкт дослідження

У ході даного дослідження було обстежено сироватку крові 47 хворих на остеоартроз колінного суглоба, із них 22 хворих з II стадією, 10 хворих з III стадією та 15 хворих з IV стадією захворювання через один рік після початку лікування. У сироватці крові цих хворих визначали наступні біохімічні показники: активність колагенази, фракції гідроксипроліну, загальний вміст глікозаміногліканів, загальну лужну фосфатазу, рівень загального кальцію та фосфору, а також електролітів (Na^+, K^+ і Ca^{2+}). Контролем виступала група з 15 здорових донорів і теоретичні дані щодо кожного показника.

Всі хворі проходили діагностику і лікування на базі Інституту травматології і ортопедії НАМНУ. Пацієнти підписували інформовану згоду на досліджування сироватки крові.

2.2 Матеріали і обладнання дослідження

2.2.1 Реактиви

- колаген (Sigma-Aldrich, США);
- Tris-HCl буфер (Charles River Laboratories, США);
- концентрована соляна кислота;
- хлорид кальцію (Україна);
- активоване вугілля (Борщагівський ХФЗ ЗАО НПЦ, Україна);
- 45 % NaOH;
- хлорамін Б;
- пропанол (Німеччина);

- ПМАБ (Азовхімсервіс, Україна);
- спирт етиловий 96^{o} (Біофарма ЛТД, Україна);
- натрій оцтовокислий;
- оцтова кислота;
- лимонна кислота;
- хлорна кислота $HClO_4$;
- оксипролін для приготування стандартного розчину;
- цитилпіридинію хлорид;
- орцин (Merck Німеччина);
- гліцерин;
- концентрована сірчана кислота;
- галактоза – для стандартного розчину гексоз;
- маноза – для стандартного розчину гексоз;
- ABX Pentra ALP CP (Horiba Abx Pentra, Франція);
- ABX Pentra Multical (Horiba Abx, Франція);
- ABX Pentra Control N (Horiba Abx, Франція);
- ABX Pentra ALP CP (Horiba Abx, Франція);
- ABX Pentra ALP CP (Horiba Abx, Франція);
- ABX Pentra Deproteinazer (Horiba Abx, Франція);
- EasyLyte Calcium Cleaning Enzyme Solution (США);
- тест-полоски pH (PHAN «Ерба -Лахема», Чехія)

2.2.2 Обладнання та лабораторний посуд

- Автоматичний гематологічний аналізатор Pentra 400 (Horiba Abx, Франція);
- Аналізатор електролітів EasyLyte Calcium (Medica, США);
- фотоколориметр КФК -3 (СРСР);
- pH-метр (Kelilong Electron, Китай);
- термостат;
- центрифуга СМ-6МТ (ELMI, Латвія);

- гідролізні пробірки;
- високі пробірки зі шліфами;
- центрифужні мірні пробірки;
- мірні колби.

2.3 Методи дослідження

2.3.1 Визначення колагенолітичної активності за методом Ліньді. Дослідження колагенолітичної активності (КЛА) в біологічних рідинах може використовуватись для оцінки метаболізму колагену в біологічних рідинах при захворюваннях, що супроводжуються деструктивними процесами в сполучній тканині, зокрема при остеоартрозі [43].

Визначення колагенолітичної активності сироватки крові проводили за Ліньді.

Перед початком дослідження готували окислювач і барвник. Для приготування окислювача на 10 проб змішували 107 мг хлораміну Б, 1 мл пропанолу, 8 мл робочого ацетатцитратного буферу, 1 мл води. Щоб приготувати ацетатно-цитратний буфер, змішували 30 грам оцтовокислого натрію, 8,5 грам NaOH, 12,5 грам лимонної кислоти та 3 мл льодяної оцтової кислоти, після чого доводили до 250 мл водою у мірній колбі. Далі вимірювали pH буфера, який має дорівнювати 6,0, та за необхідності корегували його. Зберігається окислювач в темній посудині один тиждень. Для приготування барвника змішували 1,5 г ПМАБ,10 мл 3,15 М $HClO_4$ і доводили до 20 мл пропанолом.

На перший день дослідження готували дослідну та контрольну пробу. Для цього в широкі гідролізні пробірки додавали по 15 мг колагену, 4 мл тріс-HCl буферу і 1 мл 0,03 М $CaCl_2$. У дослідну – 1 мл сироватки, а в контрольну – 1 мл дистильованої води. Інкубували 20 годин при 37 ^oC.

На другий день фільтрували вміст в гідролізні пробірки. До фільтрату додавали 5 мл концентрованої соляної кислоти і ставили на гідроліз при 110 °С.

Наступного дня випарювали вміст гідролізних пробірок без пробок досуха при 137 °С на гліцериновій бані. Потім проби охолоджували до кімнатної температури. Перевіряли pH (повинен бути 7), якщо pH занадто низький, то додавали 1H NaOH, якщо навпаки, то додавали 1H HCl і доводили дистильованою водою до 5 мл. Додавали активоване вугілля на кінчику скальпеля і через 15 хвилин фільтрували в мірні пробірки через малі фільтри, попередньо змочені дистильованою водою.

Далі брали 4 високі пробірки зі шліфами:

1. досліджувана проба;
2. контроль досліду;
3. стандарт;
4. загальний контроль.

В першу і другу пробірки відбирали по 1 мл фільтрату. У третю – 2 мл розведеного в 10 разів стандартного розчину оксипроліну, а в четверту – 2 мл дистильованої води. У всі пробірки додавали 1 мл окислювача, закривали пробками і залишали на 20 хвилин. Через 20 хвилин додавали 2 мл барвника і трохи струшували. Далі термостатували проби в ультратермостаті при 60 °С протягом 20 хвилин. Потім проби охолоджували протягом 5-7 хвилин у водопровідній воді. Спектрофотометрували на КФК- 3 при 555 нм. За даними екстинкції проводили розрахунки активності колагенази.

X = (Ед – Ек д) х 5000/ Ест х 131,44 = мкмоль/л х год

Норма: 3,14 ±0,036 мкмоль/ л х год

2.3.2 Визначення кількості вільного та протеїнзв'язаного оксипроліну. Оксипролін є специфічним показником при дослідженні колагенолітичної активності і складає 12-15 % його вмісту. Окрім колагену ця амінокислота міститься тільки в еластині (лише до 2%). В організмі людини і тварин білок міститься в вільній і протеїнзв'язаній формах.

Зважаючи на велику кількість заважаючих компонентів у сироватці крові, які можуть спотворювати результат дослідження, важливо правильно підбирати метод вимірювання кількості оксипроліну. Колориметричні методи визначення оксипроліну засновані на вимірюванні оптичної щільності червоного хромогену, що отримується в результаті окислення і декарбоксилювання вільної амінокислоти і конденсації продукту реакції з парадиметиламінобензальдегідом. Є два різновиди цих методів: з перекисом водню (за Нейманом і Логаном) і з хлораміном (за Стігеманом). За стабільністю кінцевого забарвлення та відтворюваністю результатів метод Стігемана вважається більш доцільним для дослідження рівня оксипроліну в сироватці крові людини [44].

У нашому дослідженні фракції гідроксипроліну виділяли за Фреєм, а визначали за Стігеманом.

Для отримання вільної фракції в пластмасову центрифужну пробірку наливали 1 мл сироватки та 4 мл 96-градусного етилового спирту і залишали на одну годину в холодильнику. Після цього центрифугували 15 хвилин при 6000 об/хв. Надосадову рідину фільтрували в гідролізну пробірку. Осад промивали двічі 1 мл спирту і повторно центрифугували 15 хвилин при 6000 об/хв. Надосадову рідину випарювали на гліцериновій бані з відкритими пробками.

Протеїнзв’язана фракція отримувалася шляхом кислотного гідролізу білків. Для цього до осаду білка додавали 4 мл концентрованої соляної кислоти (двічі по 2 мл) і кількісно переносили в гідролізні пробірки. Ставили на гідроліз на 16 годин при 120 ^{o}C, після чого випарювали на гліцериновій бані.

На другий день досліду сухий осад в обох фракціях розчиняли 4 мл дистильованої води і переносили у центрифужні мірні пробірки. Перевіряли pH (має дорівнювати 7,0) і доводили до 5 мл дистильованою водою; додавали активоване вугілля на кінчику скальпеля. Через 15 хвилин фільтрували. Переносили 2 мл фільтрату в колориметричні пробірки, в

контрольну пробірку додавали 2 мл дистильованої води. Додавали по 1 мл окислювача, а через 20 хвилин по 2 мл барвника (аналогічний тому, який використовували у визначенні колагеназної активності) і ставили на 20 хвилин на водяну баню при 60 °С. Охолоджували у холодній воді і вимірювали проти контролю на спектрофотометрі КФК-3 з довжиною хвилі 555 нм.

Розрахунок проводили за формулою:

$X = Едосл \times 10 \times 10 \times 0,05 \times 1000 / E_{ст} \times 131,44 = Едосл \times 5000 / E_{ст} \times 131,44$ (мкмоль/л), де

$E_{досл}$ – екстинкція дослідної проби;

$E_{ст}$ – екстинкція стандарту;

0,05 – кількість стандартного розчину (в мл);

10 – концентрація стандартного розчину (10 мг%);

10 – перерозрахунок на 1 літр;

1000 – перерозрахунок на мкмоль;

131,44 – молекулярна маса оксипроліну.

Норма:

Вільна фракція – 5,75 ± 0,21 мкмоль/л.

Протеїнзв’язана фракція – 11,9 ± 0,29 мкмоль/л.

2.3.3.Визначення глікозаміногліканів орциновим методом за Кляцкіним С.А. і Ліфшиць Р.І. Сумарний вміст ГАГ визначали за Кляцкіним С.А. і Ліфшиць Р.І. Принцип методу полягає в тому, що цетилпіридинію хлорид виділяє ГАГ з сироватки крові шляхом гідролізу. Вільні гексози взаємодіють з орциновим реактивом, надають розчину рожевого забарвлення. Збільшення оптичної щільності прямо пропорційне вмісту гексоз.

Перед початком досліду необхідно приготувати орциновий реактив. Для цього спочатку готували 57,5% розчин соляної кислоти по Савалю. Змішували 60 мл концентрованої соляної кислоти та 40 мл дистильованої

води. Також готували 20 мл 1,6%-ого розчину орцину. Далі змішували 7,5 частин 57,5% розчину соляної кислоти з 1 об'ємом 1,6%-ого розчину орцину.

В маленькі пластмасові пробірки вносили 0,1 мл досліджуваної сироватки крові, 0,1 мл 1% ЦПХ і 0,8 мл дистильованої води, перемішували скляною паличкою і центрифугували при 5000 об./хв. протягом 15 хвилин. Після центрифугування зливали надосадову рідину і фільтрували вміст пробірки протягом 30-60 секунд. До осаду додавали 1 мл 0,1 н NaOH, закривали парафіном і ставили на 30 хвилин на водяну баню при 37 ^{o}C до повного розчинення осаду (у термостат ставили склянку з водою). У цей час готували контрольну пробу та стандарт (калібрувальну пробу).

Для приготування контрольної проби змішували 0,25 мл 0,1 н NaOH і 2,125 мл орцинового реактиву. Для приготування калібрувальної проби змішували 0,025 мл калібрувального розчину гексоз (складається з галактози і манози 1:1), 0,225 мл 0,1 н NaOH і 2,125 мл орцинового реактиву. Проби виймали з водяної бані, перемішували і відбирали 0,25 мл досліджуваної проби. До досліджуваної проби доливали 2,125 мл орцинового реактиву, який готували перед початком досліду.

Всі проби закривали пробками і поміщували на водяну баню при 80 ^{o}C на 15 хвилин. Після цього охолоджували проби до кімнатної температури в склянці з холодною водою і одразу визначали оптичну щільність на спектрофотометрі КФК-3 при довжині хвилі 540 нм.

Розрахунок проводили за формулою:

$C_{досл} = (E_{проби} / E_{ст})$ x 0,1 (г/л), де

$C_{досл}$ – концентрація гексоз в досліджуваній сироватці крові;

$E_{проби}$ – екстинція досліджуваної проби;

$E_{ст}$ – екстинція стандартної проби;

0,1 – концентрація гексоз у стандартному розчині.

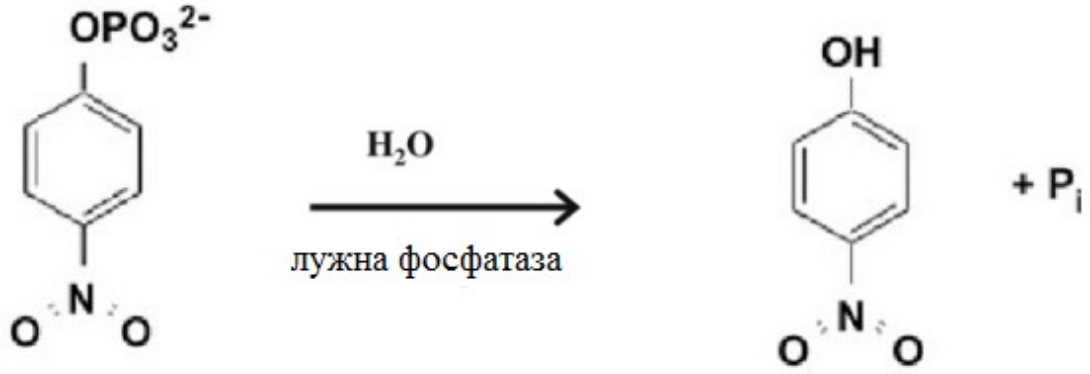
$X = C_{досл} / 180,16 = M$, де 180,16 – молекулярна маса гексози $C_6H_{12}O_6$.

Норма: 0,0309 ±0,0032 г/л.

0,06 ± 0,03 г/л.

2.3.4. Визначення рівня загального кальцію та фосфору та лужної фосфатази за допомогою аналізатора Horiba Abx Pentra 400. Лужна фосфатаза (ЛФ) – фермент, що належить до класу гідролаз і активізується при лужному pH. Має багато форм переважно кісткового та печінкового походження. Фермент також наявний в інших органах і тканинах, зокрема нирках, плаценті, кишечнику, яєчках, вилочковій залозі, легенях. Патологічне підвищення активності лужної фосфатази вказує на захворювання гепатобіліарної системи та кісток. Активність лужної фосфатази підвищується за рахунок збільшення активності остеобластів, що спостерігається, наприклад, при рахіті, метастазах в кістках, гіперпаратиреозі та інших захворюваннях кісток. Визначення активності лужної фосфатази або її ізоферментів допомагає в діагностиці та лікуванні хвороб печінки, кісток, паращитовидної залози і кишечника.

Визначення лужної фосфатази проводили на автоматичному аналізаторі Horiba ABX Pentra 400 методом колориметрії. Реагент ABX Pentra ALP CP призначений для діагностичного кількісного визначення *in vitro* лужної фосфатази в сироватці і плазмі крові людини методом кінетичної фотометрії з використанням n-нітрофенілфосфату.



ABX Pentra ALP CP має такий склад:

Реагент 1:

- 2-аміно-2-метил-1-пропанол, pH 10,4 440 ммоль / Л
- Сульфат магнію 2,0 ммоль / Л
- Сульфат цинку 1,25 ммоль / Л

- HEDTA 2,5 ммоль / Л
- Азид натрію <1 г / Л

Реагент 2:

- п-нітрофенілфосфат 80 ммоль / Л
- Азид натрію <1 г / Л

Для роботи з цим реагентом використовувався штатив, представлений на рис.2.1.

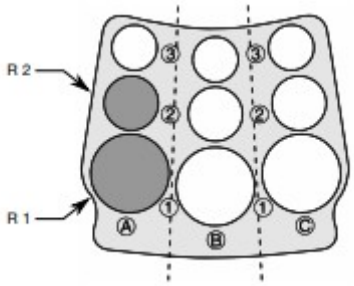


Рис. 2.1. Штатив для ABX Pentra ALP CP.

Реагенти 1 і 2 переливали у спеціальні флакони, які ставили до штативу в одному секторі. Штатив з реагентами поміщували в охолоджену камеру для реактивів аналізатору.

Реагент містить менше 0,1% азиду натрію в якості консерванту. Азид натрію може реагувати з міддю з утворенням вибухонебезпечних азидів металів.

В ході реакції утворюється n-нітрофенол, який є отруйним при вдиханні, ковтанні або всмоктуванні через шкіру. При попаданні реакційної суміші на шкіру або слизові оболонки їх слід ретельно промити водою.

Фосфор в організмі людини існує переважно в кістковій тканині у формі неорганічного фосфату. Фосфати відіграють важливу роль в зберіганні і розподілі енергії, необхідної для метаболізму клітин. Іони фосфату володіють буферними властивостями. Є декілька факторів, що впливають на концентрацію неорганічного фосфору в сироватці крові, а саме, харчування, всмоктування фосфору в кишечнику, його виведення нирками і реабсорбція в

ниркових канальцях, а також метаболізм кісткової тканини. На метаболізм фосфору впливають регуляторні гормони та концентрація кальцію (паратиреоїдний гормон (ПТГ), кальцитонін і вітамін D), тому концентрації фосфату в плазмі крові тісно пов'язані з регулюванням концентрації кальцію в плазмі крові. Коливання вмісту фосфату в крові (ПТГ стимулює нирки з метою виведення фосфату і затримки кальцію), що відбуваються в результаті порушення згаданих вище механізмів, часто мають напрямок, протилежний напрямку коливань вмісту кальцію в крові.

Визначення фосфору проводили на автоматичному аналізаторі Horiba ABX Pentra 400 методом колориметрії. Реагент ABX Pentra Phosphorus CP призначений для діагностичного кількісного визначення *in vitro* фосфору в сироватці крові, плазмі крові та сечі людини методом УФ-спектроскопії з використанням фосфомолібдату. Фосфат реагує в кислому середовищі з молібдатом амонію з утворенням фосфомолібдатного комплексу жовтого кольору.

Касета з реагентом ставилася в охолоджену камеру для реактивів в аналізаторі. Реагент має у своєму складі сірчану кислоту 210 ммоль / Л та молібдат амонію 650 мкмоль / Л. Для калібрування використовувався ABX Pentra Multical, 10 × 3 мл (ліофілізат). Для внутрішнього контролю якості використовувався ABX Pentra N Control, Після цього відбувалось вимірювання значень з проб пацієнтів (у двох-трьох повторах) і валідування результатів.

Кальцій відіграє важливу роль у багатьох функціях клітини, а саме, в мінералізації кісткової тканини, згортанні крові і передачі нервових імпульсів. Зниження рівнів загального кальцію може спостерігатися при захворюваннях кісток (головним чином при остеопорозі), захворюваннях нирок, порушеннях кишкового всмоктування. Підвищення рівня загального кальцію може свідчити про злоякісні новоутворення з метастазами і саркоїдоз.

У минулому використовувалося багато колориметричних методів для визначення кальцію. Коннерті і Бріггс описали методи з використанням алізарин-3-сульфонату і комплексону крезолфталеїну, а Гіндле і Кінг описали метод з використанням тимолу синього. В подальшому було розроблено багато модифікацій цих методів.

Застосовуваний тут метод заснований на використанні металохромогену арсеназо III. Іони кальцію (Ca^{2+}) реагують з арсеназо III (2,2'-[1,8-дигідрокси -3,6-дисульфонафтілен -2,7-бісазо]-бісбензенарсонова кислота) при pH 6,75 з утворенням хромофору інтенсивного фіолетового кольору. Оптична щільність для комплексу Са-арсеназо III вимірюється біхроматичним способом при довжині хвилі 660/700 нм (рис. 2.2).

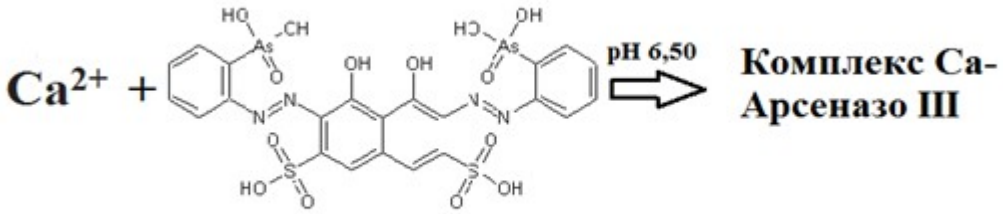


Рис. 2.2. Взаємодія кальцію з Арсеназо III.

Результуюче збільшення оптичної щільності реакційної суміші прямо пропорційне концентрації кальцію в зразку. Арсеназо III володіє високою спорідненістю ($K^\circ = 1 \times 10^{-7}$) до іонів кальцію, що виключає взаємодію з іншими катіонами сироватки крові або сечі.

2.3.5. Визначення рівня електролітів (Na, K, Ca) за допомогою аналізатора EasyLyte Analyzer Medica. Багато захворювань і прийом лікарських препаратів можуть призводити до змін електролітного балансу. Для успішного лікування хвороб опорно-рухового апарату, зокрема остеоартрозу, важливо спостерігати за зміною концентрацій іонізованих Na, K, Ca.

У нашому дослідженні визначення рівня електролітів проводилось за допомогою напівавтоматичного аналізатора EasyLyte Analyzer Medica.

Вимірювання проби здійснювалося іон-селективними електродами протягом 1 хвилини. Для проведення аналізу проби використовували 100 мкл сироватки крові, плазми чи крові. Калібрування приладу проводили автоматично за вимогою оператора. Результати виводились на дисплей і друкувалися автоматично. Для роботи з приладом відповідали на повідомлення, що з'являються на дисплеї, натисканням клавіш "YES" чи "NO". Після роботи з приладом промивали його розчином для промивки.

Аналізатор містить чутливу електроніку, тому важливе його правильне заземлення. Також важливо розташовувати прилад подалі від центрифуг, що містять колекторні електродвигуни, флуоресцентних ламп і обладнання, що виробляє тепло, оскільки ці аспекти можуть призвести до недостовірних результатів.

2.4. Статистична обробка результатів

Статистичну обробку проводили за допомогою коефіцієнта Стьюдента, який, на нашу думку, доцільний при оцінці відхилень досліджуваного показника від нормальних значень.

Для оцінки проміжної прецезійності до дослідження відбирались проби людей однієї вікової групи, без супутніх захворювань, щоб не спотворювати точність результатів. Було встановлено, що різні дні проведення дослідження різних проб не спотворювали результати.

Для оцінки повторюваності методу кожну пробу оцінювали в трьох повторностях. При дослідженні кожного показника використовувалась контрольна та стандартна проба.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Зміна колагеназної активності в сполучній тканині при остеоартрозі

У роботі досліджували зміну активності колагенази (рис. 3.1.) як маркера руйнування колагену, основної складової суглобів. Колагеназа використовується при оцінці запального процесу багатьох захворювань опорно-рухового апарату.

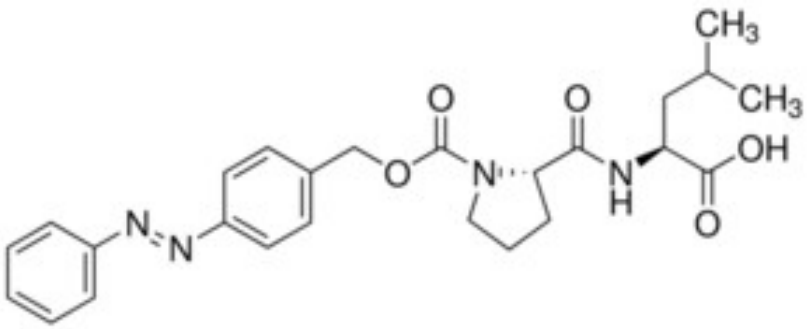


Рис. 3.1. Структура колагенази [45].

Оцінку колагенолітичної активності проводили за Lindy [46]. Замість синовіальної рідини досліджували сироватку крові. Сироватку крові зручніше багаторазово досліджувати для контролю патогенезу захворювання та ефективності лікування, що важче здійснити при заборі синовіальної рідини.

За допомогою цього методу визначали кількість гідроксипроліну, відщепленого від субстрату під дією колагенази сироватки крові. Інкубацію проводили при t+37 ºС в присутності іонів кальцію. Інкубація проводилась протягом 20 годин.

Кількість відщепленого оксипроліну визначали спектрофотометрично на фотоколориметрі КФК-3 при довжині хвилі 555 нм. За даними екстинкції визначали кількість відщепленого оксипроліну, що відображає колагенолітичну активність досліджуваної сироватки крові хворого на ОА.

Оскільки метою роботи є пошук діагностичних критеріїв для більш ранньої діагностики остеоартрозу, найбільш ретельно оцінювали хворих з II стадією захворювання. На першій стадії захворювань не виявляються статистично значимі результати відхилень біохімічних діагностичних критеріїв захворювання та не спостерігається характерної клінічної картини. Також через відсутність симптоматики захворювання, не спостерігається хворих з госпіталізацією на I стадії. Через це перша стадія ОА не враховується в нашому дослідженні.

Отримані дані при дослідженні сироватки крові у хворих на II стадію захворювання виявили підвищену активність колагенази, одного із ключових ферментів у метаболізмі основного білка сполучної тканини – колагену, яка сягала 5,48±0,24 мкмоль/л·год (174,5 %) (рис.3.2.).

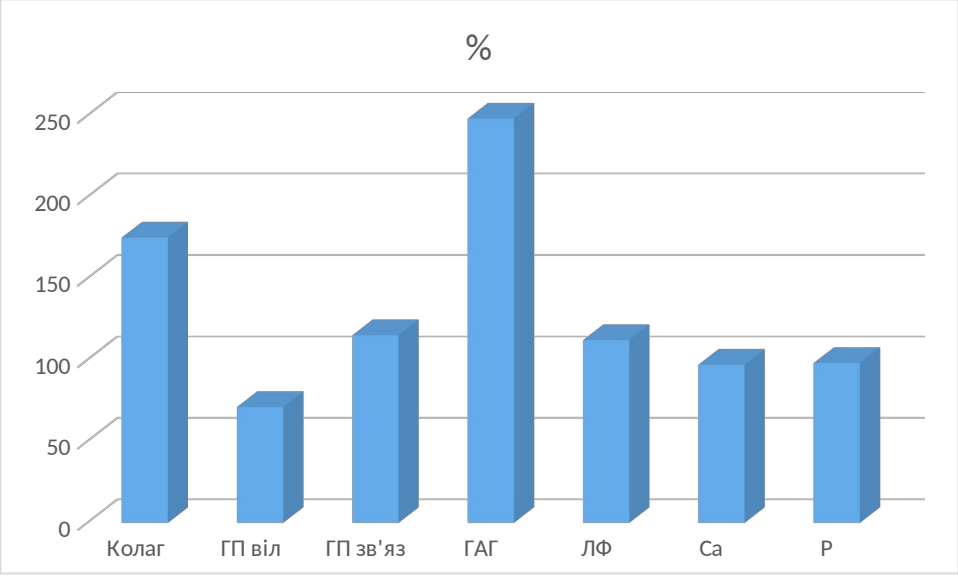


Рис. 3.2. Біохімічні показники сироватки крові у хворих на остеоартроз колінного суглоба II стадії.

У хворих III і IV стадій колагенолітична активність посилювалась і становила 6,55±0,15 (209%) і 8,72±0,14 (278%) відповідно (табл. 3.1).

Табл. 3.1.

Колагенолітична активність у хворих на ОА II-IV стадій в порівнянні з нормою

Стадія захворювання	Колагеназа, мкмоль/л·год
II	5,48±0,24
III	6,55±0,15
IY	8,72±0,14
Норма	3,14±0,04

Підвищена активність колагенази описується для багатьох захворювань, що характеризуються запальними та деструктивними процесами хрящової тканини суглобів, зокрема, при ревматоїдному артриті, коксартрозі, остеоартрозі та ін.

При захворюваннях суглобів, зокрема ревматоїдному артриті та остеоартриті, структурна цілісність колагену може бути порушена, що призведе до втрати функції суглоба [47].

Активна колагеназа ідентифікується також в синовіальній рідині та в екстрактах тканин пацієнтів з артритом. Розуміння клітинного джерела колагеназ може допомогти орієнтуватися на конкретні захворювання і обирати лікування типоспецифічними інгібіторами колагенази [48].

Колагенолітична активність виявляється в основному при середній чи тяжкій стадії захворювання, але не при легкій або кінцевій стадії ОА. Попередні дослідження в цій лабораторії показали прямий кореляційний зв'язок ДНК, глікозаміноглікану та синтезу колагену та концентрації гідролітичних ферментів з прогресуванням ступеня тяжкості остеоартриту [49].

Таким чином результати нашого дослідження колагенолітичної активності збігаються з даними робіт інших дослідників, що свідчить про високу достовірність результатів. Отримані біохімічні дані відображають деструктивні зміни в тканинах суглоба у обстежених хворих.

3.2. Визначення кількості фракцій гідрооксипроліну при остеоартрозі

Гідроксипролін (похідне проліну) – одна з основних амінокислот колагену, є маркером його катаболізму (рис. 3.3.). Близько 20% гідроксипролінвмісних білків, які вивільняються з колагену, виводиться з сечею. Тільки 1% оксипролину сечі знаходиться у вільному вигляді, решта 99% є протеїн-зв’язаними. При порушеннях синтезу колагену зменшуються поперечні зв'язки в фібрилах колагену, що призводить до збільшення вмісту легкорозчинного колагену [51].

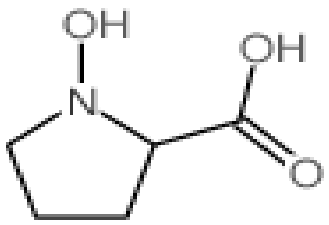


Рис. 3.3. Структура гідроксипроліну [50].

Фракції гідроксипроліну виділяли за методом Frey S., а визначали їх за Stegemann H.J. Метод оснований на визначенні оптичної щільності червоного хромогену в результаті окислення і декарбоксилювання вільної амінокислоти і конденсації продуктів окислення парадиметиламінобензальдегідом (ПМАБ). Гідроксипролін окисляли хлораміном Б. Концентрацію виражали в мкмоль/л.

У хворих на ОА II стадії виявлена підвищена концентрація вільної фракції гідроксипроліну 6,63±0,14 мкмоль/л (115 %) – біохімічного маркеру резорбції кісткової тканини, що супроводжується зниженням вмісту протеїнзв'язаного гідроксипроліну 8,46±0,17 (71 %) – біохімічного маркера синтезу білка колагену (табл. 3.2).

Табл. 3.2.

Кількість гідроксипроліну у хворих на ОА II-IV стадій в порівнянні з нормою

Стадія захворювання	Фракції ГП, мкмоль/л	
	вільна	протеїн-зв'язана
II	6,62±0,14	8,46±0,17
III	7,19±0,12	7,83±0,19
IY	9,87±0,11	7,25±0,15
Норма	5,75±0,21	11,90±0,29

У хворих на ОА III стадії (рис. 3.4.) збільшувалась кількість вільного гідроксипроліну і вже становила 7,19±0,12 (125%), та відповідно зменшувалась кількість протеїн-зв'язаної фракції – 7,83±0,19 (66%).

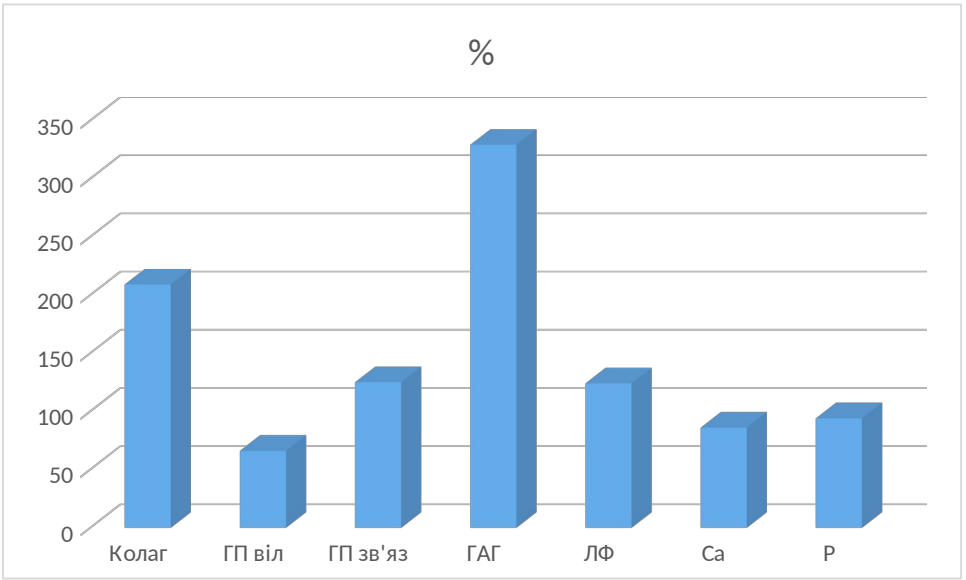


Рис. 3.4. Біохімічні показники сироватки крові у хворих на остеоартроз колінного суглоба III стадії.

У хворих з ОА на IV стадії відзначалось ще більш значне відхилення від норми вільного і протеїн-зв’язаного гідроксипроліну – 9,87±0,11 (172%) і 7,25±0,15 (61%), відповідно (рис.3.5.).

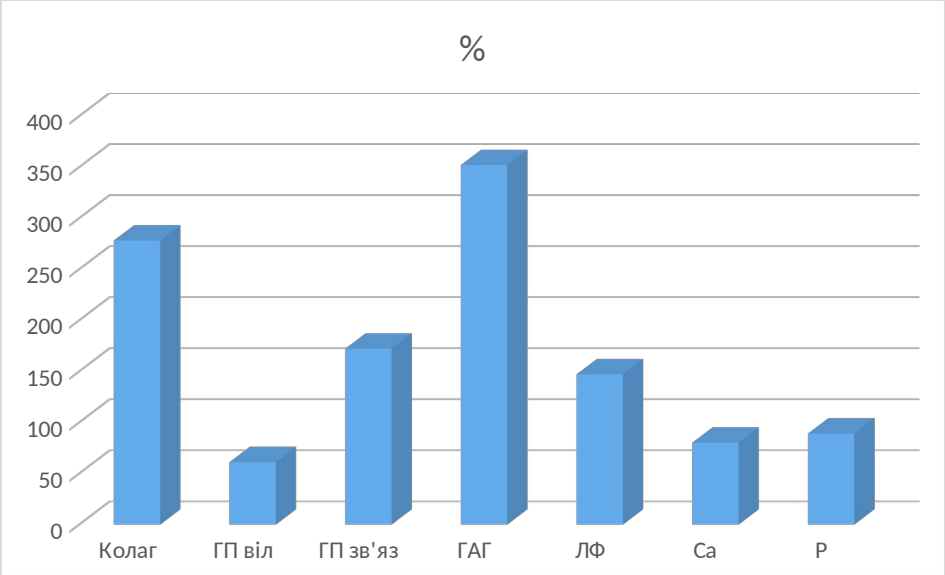


Рис. 3.5. Біохімічні показники сироватки крові у хворих на остеоартроз колінного суглоба IV стадії.

Загалом, спостерігається переважання кількості вільної фракції над протеїнзв’язаною, що свідчить про переважання процесу резорбції кісткової тканини над процесом синтезу колагену.

3.3. Зміна рівня глікозаміногліканів при остеоартрозі

Сумарний вміст ГАГ визначали за Кляцкіним С.А. і Ліфшиць Р.І. (1989). Принцип методу полягає в тому, що ГАГ виділяють з сироватки крові цетилпіридинію хлоридом. Звільнені в результаті гідролізу гексози, взаємодіють з орциновим реактивом, забарвлюють розчин в рожеве забарвлення. Зміна оптичної щільності прямо пропорційна вмісту гексоз.

Зміну інтенсивності забарвлення реакційної суміші оцінювали на фотоколориметрі КФК-3.

У хворих на II стадії остеоартрозу вміст глікозаміногліканів (ГАГ), які визначають фізіологічні і біомеханічні властивості хрящової тканини, сягає 0,077± 0,001 г/л (248 %) по відношенню до норми.

У хворих на III стадії остеоартрозу вміст глікозаміногліканів сягає 0,102± 0,002 г/л (329 %) по відношенню до норми (рис. 3.4.).

У хворих на IV стадії остеоартрозу вміст глікозаміногліканів сягає 0,109± 0,004 г/л (352 %) по відношенню до норми (табл. 3.3).

Табл. 3.3.

Кількість ГАГ у хворих на ОА II-IV стадій

в порівнянні з нормою

Стадія захворювання	ГАГ, г/л	Норма
II	0,077±0,001	0,031±0,003
III	0,102±0,002	
IY	0,109±0,004	

Для порівняння у дослідженні Priya Kulkarni et al відмічено значне зростання ГАГ у хворих на ОА II та III стадій, порівнюючи з пацієнтами I стадії, що свідчить про посилення деструкції хряща. У пацієнтів з IV стадією виявили подальше зростання рівня ГАГ, що відображало більшу втрату хряща [32].

Таким чином, спостерігається значна втрата суглобами глюкозаміногліканів, що підвищує їх вміст у сироватці крові. Цей процес значно погіршує властивості хрящової тканини та зумовлює руйнування її структури, сприяючи симптоматиці захворювання.

3.3 Зміна рівня загального кальцію та фосфору та активності лужної фосфатази

Одним із загальноприйнятих біохімічних маркерів, які характеризують активність остеобластів кісткової тканини, є активність лужної фосфатази (ЛФ).

Лужну фосфатазу, кальцій та фосфор визначали з допомогою автоматичного біохімічного аналізатора Horiba Abx Pentra 400 з використанням специфічного набору реактивів (ABX Pentra Calcium CP, ABX Pentra Phosphorus CP та ABX Pentra ALP CP).

У хворих на II стадії ОА спостерігалось збільшення активності лужної фосфатази, яка сягала 73,53±0,68 (112%). У хворих з III і IV стадією остеоартрозу спостерігалось подальше підвищення активності лужної фосфатази, яка становила вже 81,32±0,87 (124%) і 96,44±0,93 (147%), відповідно (табл. 3.4).

Табл. 3.4.

Кількість загального Са, Р та лужної фосфатази у хворих на ОА II-IV стадій у порівнянні з нормою

Стадія захворювання	Загальний кальцій, ммоль/л	Загальний фосфор, ммоль/л	Лужна фосфатаза, од./л
II	2,29±0,11	1,13±0,09	73,53±0,68
III	2,05±0,09	1,09±0,11	81,32±0,87
IV	1,89±0,15	1,02±0,15	96,44±0,93
Норма	2,37±0,25	1,15±0,21	65,60±5,20

За рахунок утворення кристалів фосфату кальцію зменшується кількість загального кальцію і фосфору в сироватці крові.

У хворих на II стадії остеоартрозу спостерігалося зменшення кальцію до 2,29±0,11 (97%), а фосфору – до 1,13±0,09 (98%).

Подальше протікання захворювання і посилення клінічної картини збігалось з подальшим зниженням загального кальцію та фосфору. У хворих на III стадії остеоартрозу кількість кальцію вже становила 2,55±0,09 (86%), а фосфору – 1,09±0,11 (94%). У свою чергу у хворих на IV стадії остеоартрозу кількість кальцію дорівнювала 1,89±0,15 (80%), фосфору – 1,02±0,15 (89%).

У дослідженні лужної фосфатази у хворих на РА та ОА показало підвищення її активності як при РА, так і при ОА. Гіперфосфатасемія становила 28% при РА і 7,1% в ОА. При цьому у 39% досліджених пацієнтів переважаючою фракцією ЛФ була печінкова фракція, а в 22% – кісткова [52].

Внутрішньосуглобові кристали фосфату кальцію (BCP) присутні у більшості випадків ОА і пов'язані з вираженою дегенерацією суглобів. Відомо, що вони активують макрофаги, синовіальні фібробласти та суглобові хондроцити, що призводить до посилення проліферації клітин та виділення прозапальних цитокінів та матричних металопротеаз (MMP) [53].

Активація остеокластів та реконструкція субхондральної кістки є головною гістологічною особливістю остеоартриту на ранній стадії і супроводжується підвищенням рівня кальцію та фосфатів у субхондральному середовищі. Враховуючи, що суглобовий хрящ здебільшого живиться дифузно від субхондральної кістки, такі зміни у мікрооточенні субхондральної кістки можуть впливати на фізіологію суглобових хондроцитів [54].

3.5. Зміна рівня електролітів при остеоартрозі

Для більш глибокого розуміння патогенезу захворювання та його зв’язку з порушеннями мінерального обміну було запропоновано дослідження іонізованих Na^+, K^+ та Ca^{2+}.

Досліджували рівень електролітів за допомогою напівавтоматичного аналізатора EasyLyte Analyzer Medica. Вимірювання проби здійснюється іон-

селективними електродами. Дані виводяться на дисплей автоматично за вимогою оператора.

Згідно з нашим дослідженням, у хворих на II стадії ОА спостерігалось незначне зменшення кількості іонізованого кальцію, який становив 1,14±0,07 (93%). З прогресуванням захворювання відмічалось подальше зменшення кількості Ca^{++}.

У хворих з III стадією захворювання рівень Ca^{++} вже становив 1,05±0,08 (86%), у хворих з IV стадією – 0,98±0,11 (80%) (табл. 3.5). Це можна пояснити тим, що Ca^{++} накопичується в сполучній тканині у складі кристалів фосфату кальцію, відповідно зменшуючись кількісно у сироватці крові хворих.

Табл. 3.5.

Рівень електролітів при II-IV стадії ОА в порівнянні з нормою

Стадія	Na^+, ммоль/л	K^+, ммоль/л	Ca^{++}, ммоль/л
II	Дані були в межах норми або мали незначні статистично незначущі відхилення		1,14±0,07
III			1,05±0,08
IV			0,98±0,11
Норма	142,00±4,00	4,50±0,80	1,22±0,10

Ізраїльськими дослідниками було досліджено співвідношення Na/K як показника функції альдостерону. Ці дані досліджували при РА та ОА порівняно зі здоровими контрольними групами. Стрес через такі хвороби, як РА і ОА, спричиняє гіперактивацію системи ренін-ангіотензин-альдостерон. Окрім цього, пряма активація прозапальних цитокінів альдостероном може бути пов'язана з патогенезом запалення РА та ОА, а її гальмування може мати терапевтичне значення [55].

Доведено, що кілька захворювань людини пов'язані з порушенням рівня кальцію, наприклад, остеоартрит, зупинка серця, зупинка дихання, катаракта та астероїдний гіалоз. Згідно з композиційним аналізом, Jubeck et al. встановили, що аномальне збільшення кальцію було характерне для 60% суглобових хрящів хворих на ОА [36].

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Остеоартроз – хронічне прогресуюче дегенеративно-дистрофічне захворювання суглобів, що характеризується дегенерацією суглобового хряща, змінами субхондральної кістки, при ньому розвиваються крайові остеофіти, а також спостерігаються явний або прихований синовіт. У патологічних процесах також залучені синовіальна оболонка, субхондральна кістка, капсула суглоба, внутрішньосуглобові та периартикулярні зв'язки, меніски (при захворюванні в колінному суглобі), навколосуглобові м’язи.

Остеоартроз є найпоширенішою хворобою суглобів і вражає велику кількість людей у всьому світі. До того ж ця патологія призводить до інвалідності і втрати працездатності, що накладає велике економічне навантаження на суспільство. З початком XXI століття кількість хворих зросла майже в половину і спостерігається захворюваність серед осіб більш молодшої вікової групи.

Серед ймовірних факторів ризику виділяють вік (більше 60 років), стать (з невідомих причин жінки страждають на ОА частіше), ожиріння, травми суглобів, генетичну схильність, ендокринні захворювання, деформації кісток. ОА найбільше вражає такі суглоби, як колінний, ліктьовий, тазовостегновий та хребет.

Дані останніх дослідників свідчать про те, що остеоартроз (ОА) слід розглядати, не як дегенеративний процес, а як аномальне ремоделювання тканин суглобів, що визначаються прозапальними медіаторами. Під ремоделюванням тканини розуміється зміна їх геометричних та структурних властивостей

Хоча патологія відома доволі довгий час, але, на жаль, на сьогодні невідомі точні механізми патогенезу захворювання, а тому не існує доцільних підходів до діагностики і, відповідно, лікування остеоартрозу. Одним з підходів до лікування є хірургічна заміна суглоба, але мета-аналіз наукових праць показав, що значна кількість хворих страждають на сильний

больовий синдром після оперативних втручань. Остеоартроз стегна або коліна також лікують анальгетиками та нестероїдними протизапальними препаратами, але ці препарати можуть спричинити серйозні побічні реакції з боку шлунково-кишкового тракту та серцево-судинної системи, особливо при тривалому застосуванні.

Наше дослідження є підходом до розробки ранньої діагностики ОА. У ході даного дослідження було обстежено сироватку крові 47 хворих на остеоартроз колінного суглоба, із них 22 хворих з II стадією, 10 хворих з III стадією та 15 хворих з IV стадією захворювання. У сироватці крові цих хворих визначали наступні біохімічні показники: активність колагенази, фракції гідроксипроліну, загальний вміст глікозаміногліканів, загальну лужну фосфатазу, рівень загального кальцію та фосфору, а також електролітів (Na+, K+ і Ca2+). Контролем виступала група з 15 здорових донорів і теоретичні дані щодо кожного показника. Всі хворі проходили діагностику і лікування на базі Інституту травматології і ортопедії НАМНУ. Пацієнти підписували інформовану згоду на досліджування сироватки крові.

Активність колагенази визначали за методом Lindy S., Halme J.. Принцип методу полягає у визначенні кількості оксипроліну, що відщеплюється під впливом колагенази сироватки крові від субстрату. Колаген є основним білком сполучної тканини, тому дослідження його руйнування є важливим для розуміння патогенезу ОА. Колагеназа використовується при оцінці запального процесу багатьох захворювань опорно-рухового апарату.

Фракції гідроксипроліну виділяли за методом Frey S. [14], а визначали їх за Stegemann H.J.. Метод оснований на визначенні оптичної щільності червоного хромогену в результаті окислення і декарбоксилювання вільної амінокислоти і конденсації продуктів окислення парадиметиламіно-бензальдегідом. За стабільністю кінцевого забарвлення та відтворюваністю результатів метод Стігемана з використанням хлораміну Б вважається більш доцільним для дослідження рівня оксипроліну в сироватці крові людини, ніж

метод Неймана і Логана з використанням перекису водню. Сумарний вміст ГАГ визначали за Кляцкіним С.А. і Ліфшиць Р.І. ГАГ виділяли з сироватки крові цетилпіридинію хлоридом. Звільнені в результаті гідролізу гексози взаємодіяли з орциновим реактивом і забарвлювали розчин.

Електроліти визначали з допомогою автоматичного аналізатора електролітів Easylyte (Medica, США) Na/K/Ca/pH, а рівень загального кальцію, фосфору та лужної фосфатази за допомогою аналізатора ABX Horiba Pentra 400.

Результати дослідження показали підвищену активність колагенази, яка у хворих з II стадією захворювання становила 5,48±0,24 мкмоль/л·год (174,5 %), з III – 6,55±0,15 (209%) , а з IV – 8,72±0,14 (278%). Посилене руйнування колагену, у свою чергу, призводить до поступової втрати пластичності і рухливості суглобів. Гідроксипролін наявний лише у складі колагену і в незначній мірі у еластині, що робить його специфічним маркером оцінки метаболізму колагену. Спостерігається переважання кількості вільної фракції над протеїн-зв’язаною, що свідчить про переважання процесу резорбції кісткової тканини над процесом синтезу колагену. Переважання вільної фракції зумовлено руйнуванням поперечних зв’язків у фібрилах колагену.

Спостерігається значна втрата суглобами глюкозаміногліканів, що підвищує їх вміст у сироватці крові. Цей процес значно погіршує властивості структури хрящової тканини, сприяючи симптоматиці захворювання.

Одним із загальноприйнятих біохімічних маркерів, які характеризують активність остеобластів кісткової тканини, є активність лужної фосфатази (ЛФ).

У хворих на II стадії ОА спостерігалось збільшення активності лужної фосфатази, яка сягала 73,53±0,68 (112%). У хворих з III і IV стадією остеоартрозу спостерігалось подальше підвищення активності лужної фосфатази, яка становила вже 81,32±0,87 (124%) і 96,44±0,93 (147%) відповідно.

За рахунок утворення кристалів фосфату кальцію зменшується кількість загального кальцію і фосфору в сироватці крові. Також іншими дослідниками було показано, що іони кальцію можуть впливати на руйнування фібрил колагену II типу та накопичуватись в ПГ, що знижує пружність і рухливість суглобів.

При дослідженні рівня електролітів показники Na^+ і K^+ були в межах норми чи мали статистично незначимі результати, а рівень Ca^{++} знижувався з прогресуванням захворювання.

Отже, наше дослідження було підходом для розробки доцільних діагностичних критеріїв для діагностики ОА. На сьогодні відсутні чіткі критерії для ранньої діагностики остеоартрозу. Виявлення діагностичних критеріїв для ранніх стадій остеоартрозу може стати підставою для початку більш ранньої та більш ефективної терапії. Результати дослідження можуть бути підґрунтям при розробці новітніх методів лікування, що мінімізують побічні ефекти для осіб похилого віку.

ВИСНОВКИ

1. У сироватці крові хворих на остеоартроз виявлено підвищену активність колагенази, яка у хворих з кінцевою IV стадією захворювання становила8,72±0,14 (278% від норми) .
2. Спостерігалося збільшення кількості вільної фракції гідроксипроліну та зменшення протеїн-зв’язаної.
3. При дослідженні сумарного вмісту глізозаміногліканів виявлено значне збільшення їх кількості. Рівень ГАГ у хворих на остеоартроз. у хворих з кінцевою IV стадією захворювання становив 0,109± 0,004 г/л (352 % по відношенню до норми)
4. У сироватці хворих на остеоартроз спостерігалася підвищена активність лужної фосфатази з незначним зниженням кількості загального Кальцію та Фосфору.
5. Дослідження вмісту катіонів у крові хворих на остеоартроз показало зменшення у них кількості іонізованого Ca^{2+}, яка на кінцевій IVстадії становила 0,98±0,11 (80%) при нормальних значеннях вмісту Na^{+} та K^{+} .

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Glyn-Jones S, Palmer A, Agricola R, Price A, Vincent T, Weinans H et al. Osteoarthritis. The Lancet. 2015;386(9991):376-387.
2. Zhang Y, Jordan J. Epidemiology of Osteoarthritis. Clinics in Geriatric Medicine. 2010;26(3):355-369.
3. Xia B, Di Chen, Zhang J, Hu S, Jin H, Tong P. Osteoarthritis Pathogenesis: A Review of Molecular Mechanisms. Calcified Tissue International. 2014;95(6):495-505.
4. Zhai G. Alteration of Metabolic Pathways in Osteoarthritis. Metabolites. 2019;9(1):11.
5. Wandel S, Juni P, Tendal B, Nuesch E, Villiger P, Welton N et al. Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo in patients with osteoarthritis of hip or knee: network meta-analysis. BMJ. 2010;341(sep16 2):c4675-c4675.
6. Синяченко О.В., Ермолаева М.В., Гейко И.А., Такташов Г.С., Ютовец Т.С. Роль костного метаболизма в патогенезе гонартроза. . Оригинальные исследования. 2016; том 17
7. Дубиков А.И. Остеоартроз: старая болезнь, новые подходы. Современная ревматология. 2013; том 1: 82-86
8. Pacifici, M. Development of articular cartilage. Osteoarthritis and Cartilage, 2013; S2–S3. doi:10.1016/j.joca.2013.02.015
9. Carballo, C. B., Nakagawa, Y., Sekiya, I., & Rodeo, S. A. Basic Science of Articular Cartilage. Clinics in Sports Medicine. 2017; 36(3), 413–425. doi:10.1016/j.csm.2017.02.001
10. Barbe, M. F., Driban, J., Barr, A. E., Popoff, S. N., & Safadi, F. F. (2009). Structure and Function of Joints. Bone Pathology. 2009; 51–60. doi:10.1007/978-1-59745-347-9_2
11. Setton L, Elliott D, Mow V. Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. Osteoarthritis and Cartilage. 1999;7(1):2-14.

12. Buckwalter J.A. Mankin H.J. Grodzinsky A.J. Articular cartilage and osteoarthritis. Instr Course Lect. 2005;54:465-80.

13. Ram Prabhoo, Gauri Billa. Prabhoo R et al. Undenatured collagen type II for the treatment of osteoarthritis: a review. Int J Res Orthop. 2018; 4(5):684-689

14. Hosseininia S, Lindberg LR, Dahlberg LE. Cartilage collagen damage in hip osteoarthritis similar to that seen in knee osteoarthritis; a case-control study of relationship between collagen, glycosaminoglycan and cartilage swelling. BMC musculoskeletal disorders. BioMed Central; 2013

15. Rousseau, J. C., & Garnero, P. Biological markers in osteoarthritis. Bone. 2012; 51(2), 265–277. doi:10.1016/j.bone.2012.04.001

16. Bruce Kidd. Mechanisms of Pain in Osteoarthritis. HSS J. 2012; Feb; 8(1): 26–28

17. Митрофанов В.А. Жадёнов И.И. Пачиньян Д.М.. Остеоартроз: факторы риска, патогенез и современная терапия. Саратовский научно-медицинский Журнал. 2008; №2 (20)

18. Junker, S. Krumbholz, G., Frommer, K. W. Et al. Differentiation of osteophyte types in osteoarthritis – proposal of a histological classification. Joint Bone Spine. 2016; 83(1), 63–67. doi:10.1016/j.jbspin.2015.04.008

19. Peter M. van der Kraan, Wim B. van den Berg. Osteophytes: relevance and biology. OsteoArthritis and Cartilage. 2007; 15, 237-244

20. Roy D. Altman. Classification of Disease: Osteoarthritis. *By Seminars in Arthtitis end Rheumatism*, 1991; Vol20, No 6, pp 40-47

21. M.Ya. Sukhorebska R.I. Yatsyshyn Yu.V. Delva Ya.V. Sandurska O.I. Oliynyk. Osteoarthritis and metabolic syndrome. Current view on the problem. *Ukrainian rheumatological journal*; 2013 (1) 43-52

22. Saarakkala S, Julkunen P, Kiviranta P, Mäkitalo J, Jurvelin J, Korhonen R. Depth-wise progression of osteoarthritis in human articular cartilage: investigation of composition, structure and biomechanics. Osteoarthritis and Cartilage. 2010;18(1):73-81.

23. Lotz, M., & Loeser, R. F. (2012). Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone*, 51(2), 241–248. doi:10.1016/j.bone.2012.03.023

24. Miller R, Miller R, Malfait A. Osteoarthritis joint pain: The cytokine connection. *Cytokine*. 2014;70(2):185-193

25. Berenbaum F, Griffin T, Liu-Bryan R. Review: Metabolic Regulation of Inflammation in Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 2016;69(1):9-21

26. Chapman, K., & Valdes, A. M. (2012). Genetic factors in OA pathogenesis. *Bone*, 51(2), 258–264. doi:10.1016/j.bone.2011.11.026

27. Maruotti N, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast role in osteoarthritis pathogenesis. *J Cell Physiol*. 2017; 232:2957–2963. https://doi.org/10.1002/jcp.25969

28. Bruce Kidd, Mechanisms of Pain in Osteoarthritis. HSS J. 2012 Feb; 8(1): 26–28

29. Kumar Srivastava, A., Khare, P., Kumar Nagar, H., Raghuwanshi, N., & Srivastava, R. Hydroxyproline: A Potential Biochemical Marker and Its Role in the Pathogenesis of Different Diseases. *Current Protein & Peptide Science,* 2016; 17(6), 596–602.

30. The Glycosaminoglycans of Normal and Arthritic Cartilage HENRY J. MANKIN and Louis LIPPiELLO The Journal of Clinical Investigation Volume 50 1971 1712-1719 стр

31. Henrotin Y, Lambert C, Richette P. Importance of synovitis in osteoarthritis: evidence for the use of glycosaminoglycans against synovial inflammation. *Semin Arthritis Rheum*. 2014;43(5):579-587. doi:10.1016/j.semarthrit.2013.10.005

32. Priya Kulkarni, Shantanu Deshpande,b Soumya Koppikar, Sanjay Patil, Dhanashri Ingale, Abhay Harsulkara. Glycosaminoglycan measured from synovial fluid serves as a useful indicator for progression of Osteoarthritis and complements Kellgren–Lawrence Score. *BBA Clin*. 2016; 6: 1–4.

33. Venkatesan N, Barré L, Bourhim M, Magdalou J, Mainard D, et al.. Xylosyltransferase-I Regulates Glycosaminoglycan Synthesis during the

Pathogenic Process of Human Osteoarthritis. *PLOS ONE*. 2012; 7(3): e34020. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034020

34. Mansell, J. P., Tarlton, J. F., & Bailey, A. J. Biochemical evidence for altered subchondral bone collagen metabolism in osteoarthritis of the hip. *Rheumatology*. 1997; 36(1), 16–19.
35. Whyte, M. P. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010; 1192(1), 190–200. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05387.x
36. Xiangchao Pang, Lijun Lin, Bin Tang. Unraveling the role of Calcium ions in the mechanical properties of individual collagen fibrils. Sci Rep. 2017;
37. Conway, R., & McCarthy, G. M. Calcium-Containing Crystals and Osteoarthritis: an Unhealthy Alliance. *Current Rheumatology Reports*. 2018; 20(3). doi:10.1007/s11926-018-0721-9
38. Yavorskyy A, Hernandez-Santana A, Shortt B, McCarthy G, McMahon G. Determination of calcium in synovial fluid samples as an aid to diagnosing osteoarthritis. Bioanalysis. 2010;2(2):189-195. doi:10.4155/bio.09.163
39. Chin K.Y. The Relationship between Vitamin K and Osteoarthritis: A Review of Current Evidence. *Nutrients*. 2020;25;12(5).
40. Alkan, G., & Akgol, G. Do vitamin D levels affect the clinical prognoses of patients with knee osteoarthritis? *Journal of Back and Musculoskeletal Rehabilitation*, 2017;30(4), 897–901. doi:10.3233/bmr-160589
41. Előd Ernő Nagy, Csilla Nagy-Finna, Horaţiu Popoviciu,and Béla Kovács. Soluble Biomarkers of Osteoporosis and Osteoarthritis, from Pathway Mapping to Clinical Trials: An Update. *Clin Interv Aging*. 2020; 15: 501–518.
42. Zhang, Yifeng & Xu, Jiankun & Qin, Ling & Zhang, Phoenix. Magnesium and osteoarthritis: from a new perspective. *Annals of Joint*. 2016; 29-29. 10.21037/aoj.2016.11.04.

43. Шараев П.Н. Пишков В.Н. Зворыгина Н. Г. Шинкарева Л.Ф. Определение колагенолитической активности плазмы крови. Лаб.дело. 1987; (1) 60-62 стр.

44. Крель А.А. Фурцева Л.Н. Методы определения оксипролина в биологических жидкостях и их применение в клинической практике. *Вопросы мед.химии*. 1968; Том 14.

45. Collagenase Chromophore Substrate Test Substance. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/27668?lang=en®ion=UA

46. Lindy S., Halme J. Collagenolytic activity in rheumatoid synovial tissue. *Clin. Chim. Acta*. 1973; 153 – 157.

47. Edward D. Harris, Jr, John M. Evanson et al. Collagenase and Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 1970; Vol. 13, No. 1

48. Sorsa, T., Konttinen, Y., Lindy, O., Ritchlin, C., Saari, H., Suomalainen, K., … Santavirta, S. Collagenase in synovitis of rheumatoid arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 1992;22(1), 44–53. doi:10.1016/0049-0172(92)90048-i

49. Michael G. Ehrlich, Patricia A. Houle, Gloria Vigliani et. al. Correlation between articular cartilage collagenase activity and osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 1978; Vol. 21, No. 7

50. *Hydroxyproline*. https://www.chemsrc.com/en/searchResult/hydroxyproline/

51. А.В. Чурилина, О.Н. Москалюк. НАРУШЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ НЕКОТОРЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ У ДЕТЕЙ. http://www.mif-ua.com/archive/article/240

52. Cimmino MA1, Buffrini L, Barisone G, Bruzzone M, Accardo S.Alkaline phosphatase activity in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol*. 1990 May-Jun;49(3):143-6.

53. Emma M. Corr, Clare C. Cunningham, Laura Helbert, Geraldine M. McCarthy, and Aisling Dunne. Osteoarthritis-associated basic calcium phosphate crystals activate membrane proximal kinases in human innate immune cells. *Arthritis Res Ther*. 2017;

54. Jung, Y., Han, M., Park, H. et al. Calcium-phosphate complex increased during subchondral bone remodeling affects earlystage osteoarthritis. *Sci Rep 8*. 2018; https://doi.org/10.1038/s41598-017-18946-y

55. Rozin, A. P., Pruzansky, J., Edoute, Y., & Balbir-Gurman, A. Serum sodium/potassium ratio in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatology Reports*. 2010; 2(1), 5. doi:10.4081/rr.2010.e5.