

Молекулярные механизмы ингибирования активности расщепления коллагена деферриоксиамином в хряще больных остеоартритом

Четина Е.В.¹, Маркова Г.А.¹, Логунов А.Л.¹, Коломацкий В.В.¹, Нарышкин Е.А.¹, Макаров С.А.¹, Кузин А.Н.²

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва, Россия;
²ГБУЗ г. Москвы «Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения Москвы», Москва, Россия
¹115522 Москва, Каширское шоссе, 34А;
²115516 Москва, Тарный проезд, 3

¹V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia; ²Bureau of Forensic and Medical Examination, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia
¹34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522; ²3, Tarnyi Passage, Moscow 115516

Контакты: Елена Васильевна Четина;
etchetina@mail.ru

Contact:
Elena Chetina
etchetina@mail.ru

Поступила 19.05.15

Цель — изучить молекулярные механизмы, обуславливающие подавление коллагеназной активности в присутствии деферриоксиамина (ДФО) в эксплантатах суставного хряща больных остеоартритом (ОА).

Материал и методы. Исследовали хрящ коленных суставов 33 больных ОА (средний возраст $61,6 \pm 10,3$ года), полученный при эндопротезировании, и хрящ 25 человек, не страдавших ОА (средний возраст $40 \pm 6,1$ года), полученный при аутопсии. Хрящ культивировали в присутствии 10 мкМ ДФО. Экспрессию генов в эксплантатах хряща определяли посредством обратнo-транскриптазной и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты и обсуждение. Снижение коллагеназной активности в присутствии ДФО в эксплантатах суставного хряща больных ОА, которое было нами показано ранее, сопровождалось значительным ингибированием экспрессии матриксных металлопротеиназ 13 и 1, а также катепсина К, обладающих коллагеназной активностью, а также маркера гипертрофии хондроцитов коллагена X типа и провоспалительных цитокинов интерлейкина 1 β и фактора некроза опухоли α . ДФО не изменял уровни экспрессии генов фосфоглицераткиназы и пируваткиназы, отвечающих за продукцию аденозинтрифосфата (АТФ) в гликолизе, а также транспортера глюкозы Glut 1. Напротив, экспрессия генов, связанных с генерацией АТФ в цикле трикарбоновых кислот: изоцитратдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, α -кетоглутаратдегидрогеназы и малатдегидрогеназы, а также аденозинмонофосфат-активируемой протеинкиназы (АМПК), значительно повышалась. Экспрессия АМПК в суставном хряще больных ОА была значительно ниже, чем у здоровых лиц.

Заключение. Ингибирование расщепления коллагена в присутствии ДФО в эксплантатах суставного хряща больных ОА, которое сопровождалось значительным снижением экспрессии протеаз, ответственных за деструкцию внеклеточного матрикса, провоспалительных цитокинов и гипертрофии хондроцитов, обусловлено повышением активности митохондриального окислительного фосфорилирования в хондроцитах.

Ключевые слова: остеоартрит; экспрессия генов; эксплантаты суставного хряща; протеазы; коллаген X типа; провоспалительные цитокины; гликолиз; цикл трикарбоновых кислот.

Для ссылки: Четина ЕВ, Маркова ГА, Логунов АЛ и др. Молекулярные механизмы ингибирования активности расщепления коллагена деферриоксиамином в хряще больных остеоартритом. Научно-практическая ревматология. 2017;55(1):48-53.

MOLECULAR MECHANISMS OF INHIBITION OF COLLAGEN CLEAVAGE ACTIVITY BY DEFEROXAMINE IN THE CARTILAGE OF PATIENTS WITH OSTEOARTHRITIS

Chetina E.V.¹, Markova G.A.¹, Logunov A.L.¹, Kolomatsky V.V.¹, Naryshkin E.A.¹, Makarov S.A.¹, Kuzin A.N.²

Objective: to study the molecular mechanisms underlying the suppression of collagenase activity in the presence of deferoxamine (DFO) in articular cartilage explants from patients with osteoarthritis (OA).

Subjects and methods. The knee joint cartilage obtained during arthroplasty from 33 patients (mean age, 61.8 ± 10.3 years) with OA, and that derived at autopsy from 25 people (mean age 40 ± 6.1 years) without this disease were investigated. The cartilage was cultured in the presence of 10 μ M DFO. The gene expression in the cartilage explants was determined by real-time reverse transcriptase and polymerase chain reaction.

Results and discussion. The reduced collagenase activity in the presence of DFO in the articular cartilage explants from patients with OA, which had been shown earlier, was accompanied by the significantly inhibited expression of matrix metalloproteinases 1 and 13 and cathepsin K, which had collagenase activity, as well as the marker of hypertrophic chondrocytes, such as X type collagen, and the proinflammatory cytokines interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α . DFO did not change the expression levels of the phosphoglucomutase and pyruvate kinase genes responsible for the production of adenosine triphosphate (ATP) during glycolysis and the glucose transporter Glut 1. On the contrary, the expression of the genes associated with ATP generation in the tricarboxylic acid cycle: isocitrate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, α -ketoglutarate dehydrogenase, malate dehydrogenase, and adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) significantly increased. The expression of AMPK in the articular cartilage of patients with OA was significantly lower than that in healthy individuals.

Conclusion. Inhibition of collagen cleavage in the presence of DFO in the articular cartilage explants from OA patients, which was accompanied by a considerable decrease in the expression of the proteases responsible for degradation of the extracellular matrix, proinflammatory cytokines and chondrocytes hypertrophy, was due to the enhanced activity of mitochondrial oxidative phosphorylation in the chondrocytes.

Key words: osteoarthritis; gene expression; articular cartilage explants; proteases; X type collagen; proinflammatory cytokines; glycolysis; tricarboxylic acid cycle.

For reference: Chetina EV, Markova GA, Logunov AL, et al. Molecular mechanisms of inhibition of collagen cleavage activity by deferoxamine in the cartilage of patients with osteoarthritis. Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice. 2017;55(1):48-53 (In Russ.).

doi: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2017-48-53>

Остеоартрит (ОА) — это наиболее распространенное заболевание лиц пожилого возраста, при котором повреждается весь сустав. Оно связано с прогрессирующей потерей суставного хряща, склеротическими изменениями субхондральной кости и образованием остеофитов. Деструкция хряща обусловлена резорбцией внеклеточного матрикса (ВКМ), который состоит преимущественно из коллагена II типа и протеогликана агрекана [1, 2]. Избыточное расщепление коллагена II типа при ОА связано с повышением синтеза и активности коллагеназ, например матриксной металлопротеиназы 13 (ММП13), катепсина К, других ММП и экспрессией провоспалительных цитокинов интерлейкина 1 β (ИЛ1 β) и фактора некроза опухоли α (ФНО α) [3, 4].

Анаболические процессы, связанные с поддержанием и репарацией хрящевого матрикса, нуждаются в достаточном количестве энергии, поэтому скорость синтеза ВКМ тесно связана с доступностью АТФ в клетке [5–7]. Главным регулятором круговорота аденозинтрифосфата (АТФ) в клетке является аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа (АМПК), активность которой стимулируется при лимитировании внутриклеточного запаса АТФ [8]. Активность АМПК способствует поддержанию гомеостаза суставного хряща. Она конститутивно экспрессируется в здоровом хряще, но ее уровень снижается в хондроцитах и хряще при ОА, а также в здоровых хондроцитах в присутствии цитокинов ИЛ1 β или ФНО α [9].

Хондроциты нормального суставного хряща имеют относительно мало митохондрий по сравнению с большинством других типов клеток [10] и могут экспрессировать не все субъединицы митохондриальной цепи переноса электронов [11]. Более того, транспорт электронов ослаблен низкими уровнями кислорода в ВКМ хряща [5]. Вследствие этого только 10% общего клеточного АТФ производится в окислительном фосфорилировании, а остальной АТФ вырабатывается в гликолитическом пути Эмбдена–Мейергофа [7, 12, 13].

Выработка АТФ в гликолитическом пути связана с активностью двух ферментов — фосфоглицераткиназы и пируваткиназы, а также зависит от активности транспортеров глюкозы в клетку, белков семейства Glut [13]. В митохондриях АТФ генерируется в цепи переноса электронов при окислении восстановленных соединений (НАДН и ФАДН₂), которые образуются при окислении органических кислот — изоцитратдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, α -кетоглутаратдегидрогеназы и малатдегидрогеназы в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК). Помимо АТФ ЦТК является поставщиком органических кислот, необходимых для биосинтетической активности.

При низком парциальном давлении кислорода в хондроцитах гликолиз замедляется вследствие избыточной аккумуляции восстановленных метаболитов [14], а митохондриальная электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) служит источником оксидантов — свободных радикалов (СР) для поддержания окислительно-восстановительного баланса в восстановленном окружении здоровых хондроцитов [15]. В хондроцитах СР производятся главным образом в митохондриях [16–20], где 1–2% кислорода могут не полностью преобразовываться в Н₂О в процессе электронного транспорта, что приводит к формированию СР в виде супероксидного, гидроксильного анионов и пере-

киси водорода [21]. В здоровых хондроцитах СР в низкой концентрации могут также участвовать в регуляции гликолиза, активируя экспрессию глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФДГ) [22].

При ОА резорбция ВКМ сопровождается повышенной продукцией СР [23] вследствие колебаний парциального давления кислорода, ускорения тканевого метаболизма, постоянных избыточных нагрузок на сустав и повышенной продукции провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ1 β и ФНО α [23, 24]. Это приводит к индукции апоптоза [25], продукции ММП [26, 27] и гипертрофии хондроцитов, которая ассоциируется с экспрессией коллагена X типа [28]. Более того, СР способны индуцировать деплецию внутриклеточного АТФ вследствие инактивации ГАФДГ [29]. Так, протеомный анализ хондроцитов хряща больных ОА показал снижение внутриклеточной концентрации белков гликолиза — энлазы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и фруктозо-дифосфатредуктазы [30]. Генерация СР может также вызывать дисфункцию митохондрий [31, 32], которая проявляется в сниженной активности комплексов I, II и III [33], а также снижает продукцию антиоксидантов в хондроцитах при ОА [34]. Действительно, было показано, что повышенная потребность в АТФ при механическом повреждении хряща связана с синтезом ВКМ [35]. При этом повреждение и дисфункция митохондрий происходят как при первичном, так и при посттравматическом ОА [36–38]. Протеомные исследования митохондрий продемонстрировали значительное изменение экспрессии 23 белков у больных ОА. Эти белки отвечают за продукцию АТФ, чувствительность к окислительному стрессу, организацию митохондриальной мембраны и апоптоз хондроцитов [38].

Ранее мы показали, что скорость разрушения коллагена в эксплантатах суставного хряща больных ОА можно снизить при его культивировании в присутствии трансформирующего фактора роста β 2 (ТрФ β 2) или простагландина E₂ [39, 40]. Это сопровождалось снижением экспрессии протеаз, маркеров гипертрофии и провоспалительных цитокинов. Между тем молекулярные механизмы действия этих соединений не ясны. Поскольку недавно было показано, что факторы роста способны оказывать антиоксидантное действие [41], а СР могут нарушать регуляцию энергетических процессов в хондроцитах суставного хряща [38], мы предположили, что улучшение фенотипа хондроцитов в присутствии факторов роста могло быть связано с улучшением энергетического статуса клеток путем снижения избыточной концентрации СР.

Главными СР, продуцируемыми хондроцитами, являются окись азота и супероксидный анион [42]. Между тем супероксид способен освобождать ионы железа из ферритина, создавая источник железа для формирования гидроксильных радикалов в реакции Фентона [43]. Недавно мы также сообщали о возможности подавления деградации коллагена в эксплантатах хряща в присутствии хелатора железа — десферриоксамина (ДФО) [44]. Известно, что ДФО продуцируется *Streptomyces pilosus*, а его молекула состоит из одной молекулы ацетата, двух молекул сукцината и трех молекул α -амино-5-оксиаминопентана. В медицинской практике используется Десферал (коммерческое название метан-сульфоновой соли ДФО), который является эффективным терапевтическим сред-

ством при некоторых заболеваниях, сопровождающихся избыточным содержанием свободного железа, хронической анемии при ревматоидном артрите, остром отравлении железом, β -талассемии и некоторых видах онкологических заболеваний (нейробластоме, лейкемии и ряде других) [45].

В связи с этим в данном исследовании мы изучали влияние ДФО на экспрессию протеиназ и генов, кодирующих ферменты гликолиза и ЦТК в эксплантатах суставного хряща больных ОА.

Материал и методы

Пациенты. Исследовался хрящ коленных суставов 33 больных ОА, полученный при эндопротезировании (средний возраст больных $61,6 \pm 10,3$ года; от 40 до 79 лет), а также 25 человек, не страдавших ОА, полученный при аутопсии (средний возраст $40 \pm 6,1$ года; от 25 лет до 51 года). Диагноз ОА соответствовал критериям Американской коллегии ревматологов (ACR) [46]. Протокол исследования одобрен локальным комитетом по этике, информированное согласие получено от всех обследованных больных.

Подготовка суставного хряща больных остеоартритом. Суставной хрящ дистального отдела бедренной кости больных ОА получали после полного удаления коленного сустава при эндопротезировании. Хрящи готовили, как описано ранее [39]. Хрящи больных ОА трижды отмывали ДМЕМ-А (Дюльбекко модифицированной средой Игла А; Life Technologies), содержащей также 20 ммоль/л буфера HEPES, pH 7,4, 45 ммоль/л NaHCO_3 , 100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептомицина и 150 мкг/мл гентамицин сульфата. Суставной хрящ, срезанный с кости, разрезали на фрагменты размером 2×2 мм². Использовали весь материал суставного хряща каждого пациента (степень разрушения от 4 до 12 по шкале Манкина), как описано ранее [39]. Три кубика (20–30 мг) предварительно культивировали на планшетах (96 лунок от Costar 3548) в течение 48 ч при 37 °С в 1 мл ДМЕМ-А в атмосфере 95% воздуха и 5% CO_2 .

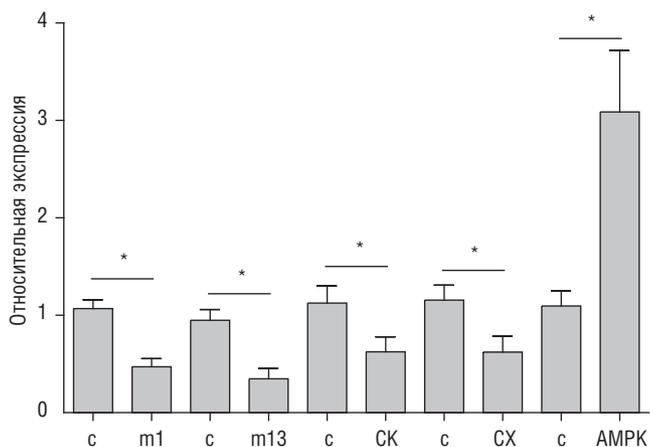


Рис. 1. Изменение экспрессии генов ММР1 (m1), ММР13 (m13), катепсина К (СК), коллагена X типа (сХ) и АМРК (АМРК) по сравнению с контролем (с) в эксплантатах суставного хряща (n=12) при культивировании в присутствии 10 мкМ ДФО. На рис. 1–3: статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с уровнем экспрессии гена в контроле обозначены звездочкой (*)

Культивирование хрящевых эксплантатов. Среду меняли через 48 ч (этот день, день 0, считали началом опыта). Свежеприготовленные растворы ДФО (Sigma) в конечной концентрации в 10 мкМ добавляли в среду ДМЕМ-А в опытные и контрольные образцы.

Хрящи (каждый контрольный и опытный вариант в трех повторностях) культивировали 48 ч. По окончании опыта из образцов хряща экстрагировали общую РНК.

Выделение РНК, реакция обратной транскрипции и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени. Из эксплантатов коленного хряща выделяли общую РНК, которую переводили в кДНК посредством обратной транскриптазной реакции, как описано ранее [40].

Посредством количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени в образцах хряща провели оценку уровней экспрессии генов, связанных с деструкцией ВКМ суставного хряща, и генов, ответственных за генерацию АТФ в гликолизе и ЦТК, как описано ранее [40]. Использовали готовые праймеры и зонды TaqMan (Applied Biosystems Int., США): ММР1 (Hs00233958_m1); ММР13 (Hs00233992_m1); CTSK (катепсин К) (Hs00166156_m1); COL10A1 (коллаген X типа) (Hs00166657_m1); Glut1 (транспортер глюкозы 1) (Hs00197884_m1); PGK1 (фосфоглицераткиназа) (Hs99999906_m1); PKM2 (пируваткиназа) (Hs00987255_m1); IDH3G (изоцитратдегидрогеназа) (Hs00188065_m1); SDH (сукцинатдегидрогеназа) (Hs01042482_m1); OGDH (α -кетоглутаратдегидрогеназа) (Hs01081865); MDH (малатдегидрогеназа) (Hs00938918_m1); АМРК (аденозинмонофосфаткиназа) (Hs00272166_m1); ФНО α (Hs00174128_m1); ИЛ1 β (Hs00174097_m1). β -Actin использовали в качестве гена домашнего хозяйства. Количественную оценку уровней мРНК проводили на приборе 7300 (Applied Biosystems Int., США), как описано ранее [40]. В системе ПЦР в режиме реального времени относительную экспрессию каждого гена рассчитывали по сравнению с контролем, который равен 1.

Статистический анализ. Данные количественных экспериментов представлены как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение. Анализы проводили в трех повторностях. Для статистической обработки результатов использовали непарный тест Стьюдента (t-тест). Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Ингибирование экспрессии генов, связанных с деструкцией внеклеточного матрикса, гипертрофией хондроцитов и провоспалительных цитокинов, в эксплантатах суставного хряща в присутствии деферриоксамина. При культивировании эксплантатов суставного хряща больных ОА в присутствии ДФО экспрессия протеаз, обладающих коллагенолитической активностью ММР1, ММР13 и катепсина К, значительно снижалась ($p < 0,05$; рис. 1). Это сопровождалось значительным снижением экспрессии коллагена X типа – индикатора гипертрофии суставных хондроцитов.

Экспрессия цитокинов ИЛ1 β и ФНО α полностью ингибировалась в присутствии ДФО в эксплантатах хряща всех обследованных больных ОА (данные не приводятся).

Оценка изменения экспрессии генов, связанных с продукцией АТФ в эксплантатах суставного хряща в присутствии деферриоксамина. Культивирование эксплантатов хря-

ща в присутствии ДФО не влияло на экспрессию генов гликолитического пути, которые связаны с генерацией АТФ (фосфоглицераткиназы и пируваткиназы) и транспортом глюкозы (Glut1; рис. 2). В то же время экспрессия генов ЦТК, участвующих в реакциях генерации АТФ (изоцитратдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, α -кетоглутаратдегидрогеназы и малатдегидрогеназы), значительно повышалась ($p < 0,05$; рис. 2). Важно отметить, что экспрессия АМПК также значительно увеличивалась.

Кроме того, было отмечено, что экспрессия гена АМПК в хряще больных ОА до культивирования была значительно ($p < 0,05$) ниже, чем у здоровых лиц (рис. 3).

Обсуждение

Недостаточная продукция АТФ может снижать репаративную активность хряща в процессе его деструкции [47, 48]. Между тем у обследованных больных ОА экспрессия АМПК – кумулятивного показателя присутствия АТФ в клетке – значительно ниже, чем в здоровом суставном хряще, что также ранее отмечалось в других исследованиях [9, 49, 50]. Поскольку активность АМПК снижается в присутствии высокой внутриклеточной концентрации АТФ и повышается при ее лимитировании [8], полученные результаты указывают на то, что в процессе разрушения хряща генерируется достаточно большое количество АТФ. При этом подавление расщепления коллагена, регистрируемое по снижению коллагеназной активности [44], и ингибирование экспрессии протеаз и провоспалительных цитокинов в присутствии ДФО не сопровождалось увеличением экспрессии генов, связанных с генерацией АТФ в гликолитическом пути (фосфоглицераткиназы и пируваткиназы), и активности транспорта глюкозы в клетке (Glut1).

Однако значительное повышение экспрессии генов ЦТК, связанных с генерацией АТФ (изоцитратдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, α -кетоглутаратдегидрогеназы и малатдегидрогеназы), может указывать на то, что ДФО, будучи хелатором железа, способствует удалению избыточного количества СР и, таким образом, нормализует функционирование митохондрий, а следовательно, снабжение хондроцитов энергетическими субстратами и органическими кислотами, которые являются структурными компонентами для регенерации ВКМ.

Это также подтверждается тем, что снижение коллагеназной активности в присутствии ДФО в эксплантатах суставного хряща больных ОА сопровождалось значительным повышением экспрессии АМПК, указывая на активный синтез АТФ и увеличение внутриклеточной потребности в энергии. Аналогичные наблюдения были сделаны при исследовании активаторов АМПК, которые оказались способны подавлять прокатаболическую активность цитокинов ИЛ1 β и ФНО α в хондроцитах хряща, а также ингибировать способность ФНО α и ИЛ8 индуцировать экспрессию коллагена X типа [8, 9, 50]. Повышение экспрессии АМПК также может косвенно свидетельствовать об активации процессов репарации, которые требуют значительного количества энергии в форме АТФ. Поэтому репаративные процессы при ОА, вероятно, нуждаются в функционировании митохондрий и зависят от активности ЦТК. Наши данные об увеличении зависимости хондроцитов больных ОА от митохондриального окислительного фосфорилирования подтверждаются также недавними исследованиями, показавшими снижение способности хондро-

цитов больных ОА функционировать при низком парциальном давлении кислорода (гипоксии) [51], а также исследованиями суставных хондроцитов *in vitro*, которые показали, что специфические ингибиторы митохондриальной дыхательной цепи подавляют синтез протеогликанов и коллагена [9, 52, 53].

Наши исследования не согласуются с мнением о том, что дисфункция митохондрий при ОА происходит вследствие мутационных изменений митохондриальной ДНК [54], поскольку в этом случае повышение экспрессии генов ЦТК, сопряженное со снижением коллагеназной активности, было бы невозможно. Вместе с тем наше предположение подтверждается результатами исследований на животных, показавших, что при развитии спонтанного ОА коленного сустава внутриклеточные уровни АТФ в хондроцитах снижались примерно на 50%, хотя никаких изменений ультраструктуры митохондрий не наблюдалось [7].

Следовательно, ингибирование расщепления коллагена в присутствии ДФО в эксплантатах суставного хряща больных ОА, которое сопровождалось снижением экспрессии протеаз, ответственных за деструкцию ВКМ, про-

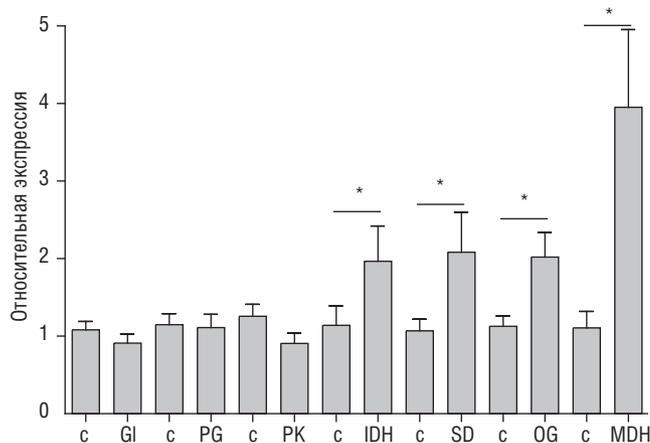


Рис. 2. Изменение экспрессии генов *Glut1* (GI), *фосфоглицераткиназы* (PG), *пируваткиназы* (PK), *изоцитратдегидрогеназы* (IDH), *сукцинатдегидрогеназы* (SD), *α -кетоглутаратдегидрогеназы* (OG) и *малатдегидрогеназы* (MDH) по сравнению с контролем (с) в эксплантатах суставного хряща (n=12) при культивировании в присутствии 10 мкМ ДФО

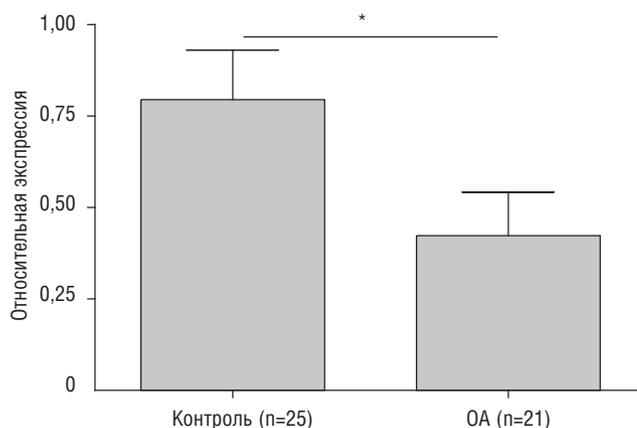


Рис. 3. Относительная экспрессия гена АМПК в хряще больных ОА по сравнению со здоровыми лицами

воспалительных цитокинов и гипертрофию хондроцитов, не влияет на активность транспорта глюкозы и гликолиза. При этом повышается экспрессия генов АМПК и митохондриальных АТФ-генерирующих ферментов ЦТК, участвующих в окислительном фосфорилировании. Поскольку дисфункция митохондрий может быть ответственна за некоторые проявления ОА, улучшение митохондриальной активности может быть терапевтической альтернативой для больных ОА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tchetina EV. Developmental mechanisms in articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Arthritis*. 2011;2011:683970. doi: 10.1155/2011/683970. Epub 2010 Dec 29.
2. Poole AR. Cartilage in Health and Disease. In: Koopman W, editor. *Arthritis and Allied Conditions*. 15th ed. Chapter 11. Philadelphia, PA, USA: Lippincott, Williams and Wilkins; 2005. P. 223-69.
3. Dahlberg L, Billingham RC, Manner P, et al. Selective enhancement of collagenase-mediated cleavage of resident type II collagen in cultured osteoarthritic cartilage and arrest with a synthetic inhibitor that's spers collagenase (matrix metalloproteinase). *Arthritis Rheum*. 2000 Mar;43(3):673-82. doi: 10.1002/1529-0131(200003)43:3<673::AID-ANR25>3.0.CO;2-8
4. Poole AR, Howell DS. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Moskowitz RW, Howell DS, Altman RD, Buckwalter JA, Goldberg VM, editors. *Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co.; 2001. P. 29-47.
5. Lee RB, Urban JP. Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. *Biochem J*. 1997 Jan 1;321(Pt 1):95-102. doi: 10.1042/bj3210095
6. Johnson K, Jung A, Murphy A, et al. Mitochondrial oxidative phosphorylation is a downstream regulator of nitric oxide effects on chondrocyte matrix synthesis and mineralization. *Arthritis Rheum*. 2000 Jul;43(7):1560-70. doi: 10.1002/1529-0131(200007)43:7<1560::AID-ANR21>3.0.CO;2-S
7. Johnson K, Svensson CI, Etten DV, et al. Mediation of spontaneous knee osteoarthritis by progressive chondrocyte ATP depletion in Hartley guinea pigs. *Arthritis Rheum*. 2004 Apr;50(4):1216-25. doi: 10.1002/art.20149
8. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*. 2005 Jan;1(1):15-25. doi: 10.1016/j.cmet.2004.12.003
9. Terkeltaub R, Yang B, Lotz M, Liu-Bryan R. Chondrocyte AMP-activated protein kinase activity suppresses matrix degradation responses to proinflammatory cytokines interleukin-1 β and tumor necrosis factor α . *Arthritis Rheum*. 2011 Jul;63(7):1928-37. doi: 10.1002/art.30333
10. Stockwell RA. Morphometry of cytoplasmic components of mammalian articular chondrocytes and corneal keratocytes: species and zonal variations of mitochondria in relation to nutrition. *J Anat*. 1991 Apr;175:251-61.
11. Mignotte F, Champagne AM, Froger-Gaillard B, et al. Mitochondrial biogenesis in rabbit articular chondrocytes transferred to culture. *Biol Cell*. 1991;71(1-2):67-72. doi: 10.1016/0248-4900(91)90052-0
12. Otte P. Basic cell metabolism of articular cartilage. Manometric studies. *Z Rheumatol*. 1991 Sep-Oct;50(5):304-12.
13. Mobasheri A, Vannucci SJ, Bondy CA, et al. Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis. *Histol Histopathol*. 2002 Oct;17(4):1239-67.
14. Brucker PU, Izzo NJ, Chu CR. Tonic activation of hypoxia-inducible factor 1alpha in avascular articular cartilage and implications for metabolic homeostasis. *Arthritis Rheum*. 2005 Oct;52(10):3181-91. doi: 10.1002/art.21346
15. Martin JA, Martini A, Molinari A, et al. Mitochondrial electron transport and glycolysis are coupled in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012 Apr;20(4):323-9. doi: 10.1016/j.joca.2012.01.003. Epub 2012 Jan 16.
16. Sauter E, Buckwalter JA, McKinley TO, Martin JA. Cytoskeletal dissolution blocks oxidant release and cell death in injured cartilage. *J Orthop Res*. 2012 Apr;30(4):593-8. doi: 10.1002/jor.21552. Epub 2011 Sep 16.
17. Goodwin W, McCabe D, Sauter E, et al. Rotenone prevents impact-induced chondrocyte death. *J Orthop Res*. 2010 Aug;28(8):1057-63. doi: 10.1002/jor.21091
18. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009 Jan 1;417(1):1-13. doi: 10.1042/BJ20081386
19. Milner PI, Wilkins RJ, Gibson JS. The role of mitochondrial reactive oxygen species in pH regulation in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007 Jul;15(7):735-42. doi: 10.1016/j.joca.2007.01.008. Epub 2007 Feb 15.
20. Loeser RF. Aging and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011 Sep;23(5):492-6. doi: 10.1097/BOR.0b013e3283494005
21. Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep*. 1997 Feb;17(1):3-8. doi: 10.1023/A:1027374931887
22. Ramakrishnan P, Hecht BA, Pedersen DR, et al. Oxidant conditioning protects cartilage from mechanically induced damage. *J Orthop Res*. 2010 Jul;28(7):914-20. doi: 10.1002/jor.21072
23. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003 Oct;11(10):747-55. doi: 10.1016/S1063-4584(03)00150-X
24. Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, et al. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*. 2005 Jan;52(1):128-35. doi: 10.1002/art.20776
25. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz RL, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol*. 1995 Jan;146(1):75-85.
26. Ahmad R, Sylvester J, Ahmad M, Zafarullah M. Involvement of H-Ras and reactive oxygen species in proinflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase-13 expression in human articular chondrocytes. *Arch Biochem Biophys*. 2011 Mar 15;507(2):350-5. doi: 10.1016/j.abb.2010.12.032. Epub 2011 Jan 3.
27. Del Carlo M, Schwartz D, Erickson EA, Loeser RF. Endogenous production of reactive oxygen species is required for stimulation of human articular chondrocyte matrix metalloproteinase production by fibronectin fragments. *Free Radic Biol Med*. 2007 May 1;42(9):1350-8. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.035. Epub 2007 Jan 24.
28. Kishimoto H, Akagi M, Zushi S, et al. Induction of hypertrophic chondrocyte-like phenotypes by oxidized LDL in cultured bovine articular chondrocytes through increase in oxidative stress. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Oct;18(10):1284-90. doi: 10.1016/j.joca.2010.05.021. Epub 2010 Jul 13.
29. Baker MS, Feigan J, Lowther DA. The mechanism of chondrocyte hydrogen peroxide damage. Depletion of intracellular ATP due to suppression of glycolysis caused by oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Rheumatol*. 1989 Jan;16(1):7-14.

Прозрачность исследования

Работа осуществлена при финансовой поддержке РФФИ (проект №12-04-00038а).

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

30. Ruiz-Romero C, Carreira V, Rego I, et al. Proteomic analysis of human osteoarthritic chondrocytes reveals protein changes in stress and glycolysis. *Proteomics*. 2008 Feb;8(3):495-507. doi: 10.1002/pmic.200700249
31. Grishko VI, Ho R, Wilson GL, Pearsall AW 4th. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Jan;17(1):107-13. doi: 10.1016/j.joca.2008.05.009. Epub 2008 Jun 18.
32. Mathy-Hartert M, Hogge L, Sanchez C, et al. Interleukin-1beta and interleukin-6 disturb the antioxidant enzyme system in bovine chondrocytes: a possible explanation for oxidative stress generation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008 Jul;16(7):756-63. doi: 10.1016/j.joca.2007.10.009. Epub 2008 Mar 4.
33. Maneiro E, Martin MA, de Andres MC, et al. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2003 Mar;48(3):700-8. doi: 10.1002/art.10837
34. Regan EA, Bowler RP, Crapo JD. Joint fluid antioxidants are decreased in osteoarthritic joints compared to joints with macroscopically intact cartilage and subacute injury. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008 Apr;16(4):515-21. doi: 10.1016/j.joca.2007.09.001. Epub 2008 Jan 18.
35. Fukui N, Purple CR, Sandell LJ. Cell biology of osteoarthritis: the chondrocyte's response to injury. *Curr Rheumatol Rep*. 2001 Dec;3(6):496-505. doi: 10.1007/s11926-001-0064-8
36. Huser CA, Davies ME. Calcium signaling leads to mitochondrial depolarization in impact-induced chondrocyte death in equine articular cartilage explants. *Arthritis Rheum*. 2007 Jul;56(7):2322-34. doi: 10.1002/art.22717
37. Kim J, Xu M, Xo R, et al. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by proinflammatory cytokines in human OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Mar;18(3):424-32. doi: 10.1016/j.joca.2009.09.008. Epub 2009 Oct 1.
38. Ruiz-Romero C, Calamia V, Mateos J, et al. Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. *Mol Cell Proteomics*. 2009 Jan;8(1):172-89. doi: 10.1074/mcp.M800292-MCP200. Epub 2008 Sep 9.
39. Tchertina EV, Antoniou J, Tanzer M, et al. TGFbeta2 suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic cartilage, reduces expression of genes associated with chondrocyte hypertrophy and degradation, and increases prostaglandin E2 production. *Am J Pathol*. 2006 Jan;168(1):131-40. doi: 10.2353/ajpath.2006.050369
40. Tchertina EV, Di Battista JA, Zukor DL, Poole AR. Prostaglandin E2 suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic cartilage, involves a reduction in expression of proinflammatory cytokines and those associated with chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(4):R75. doi: 10.1186/ar2273
41. Jallali N, Ridha H, Thrasivoulou C, et al. Modulation of intracellular reactive oxygen species level in chondrocytes by IGF-1, FGF, and TGF-beta1. *Connect Tissue Res*. 2007 48(3):149-58. doi: 10.1080/03008200701331516
42. Hiran TS, Moulton PJ, Hancock JT. Detection of superoxide and NADPH oxidase in porcine articular chondrocytes. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(5):736-43. doi: 10.1016/S0891-5849(97)00054-3
43. Biemond P, Swaak AJ, van Eijk HG, Koster JF. Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med*. 1988 4(3):185-98. doi: 10.1016/0891-5849(88)90026-3
44. Четина ЕВ. Ингибирование активности расщепления коллагена в хряще больных остеоартрозом при активации гликолиза. Остеопороз и остеопатии. 2011;(1):8-12 [Chetina EV. Inhibition of collagen cleavage in cartilage of patients with osteoarthritis at the activation of glycolysis. *Osteoporoz i Osteopatii*. 2011;(1):8-12 (In Russ.)].
45. Chua AC, Ingram HA, Raymond KN, Baker E. Multidentate pyridinones inhibit the metabolism of nontransferrin-bound iron by hepatocytes and hepatoma cells. *Eur J Biochem*. 2003 Apr;270(8):1689-98. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03525.x
46. Altman R, Asch E, Bloch D, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum*. 1986 Aug;29(8):1039-49. doi: 10.1002/art.1780290816
47. Buckwalter JA, Brown TD. Joint injury, repair, and remodeling: roles in posttraumatic osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 2004 Jun;(423):7-16. doi: 10.1097/01.blo.0000131638.81519.de
48. Martin JA, Scherb MB, Lembke LA, et al. Damage control mechanisms in articular cartilage: the role of the insulin-like growth factor I axis. *Iowa Orthop J*. 2000;20:1-10.
49. Petursson F, Husa M, June R, et al. Linked decreases in liver kinase B1 and AMP-activated protein kinase activity modulate matrix catabolic responses to biomechanical injury in chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2013 Jul 25;15(4):R77. doi: 10.1186/ar4254
50. Husa M, Petursson F, Lotz M, et al. C/EBP homologous protein drives pro-catabolic responses in chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(6):R218. doi: 10.1186/ar4415
51. Ruiz-Romero C, Calamia V, Rocha B, et al. Hypoxia conditions differentially modulate human normal and osteoarthritic chondrocyte proteomes. *Proteome Res*. 2010 Jun 4;9(6):3035-45. doi: 10.1021/pr901209s
52. Tomita M, Sato EF, Nishikawa M, et al. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and functions of articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2001 Jan;44(1):96-104. doi: 10.1002/1529-0131(200101)44:1<96::AID-ANR13>3.0.CO;2-#
53. Lopez-Armada MJ, Carames B, Martin MA, et al. Mitochondrial activity is modulated by TNFalpha and IL-1beta in normal human chondrocyte cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006 Oct;14(10):1011-22. doi: 10.1016/j.joca.2006.03.008. Epub 2006 May 5.
54. Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011 Mar;7(3):161-9. doi: 10.1038/nrrheum.2010.213. Epub 2011 Jan 4.