

© ГЛАДКОВА Е.В., УЛЬЯНОВ В.Ю., 2024

Гладкова Е.В., Ульянов В.Ю.

ПРИМЕНЕНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ В РАЗРАБОТКЕ МЕТОДОВ ПРЕДИКТИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАННИХ СТАДИЙ ПЕРВИЧНОГО ГОНАРТРОЗА

Научно-исследовательский институт травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ, 410002, Саратов, Россия

Актуальность. Разработка лабораторных предикторов, позволяющих объективизировать различные аспекты процессов ремоделирования опорных соединительных тканей при ранних проявлениях остеоартроза, является активно развивающимся направлением научно-практического поиска. При создании диагностических алгоритмов, учитывающих метаболические и клеточные изменения как отражение основных патогенетических аспектов в дебюте первичного остеоартроза коленных суставов, перспективным направлением могут стать технологии математического моделирования.

Цель исследования – разработать математическую модель лабораторных предикторов ремоделирования субхондральной кости у пациентов с ранними проявлениями первичного остеоартроза коленных суставов.

Материал и методы. У 200 пациентов с ранними проявлениями первичного остеоартроза коленных суставов и 100 здоровых лиц в возрасте 42,4 (35,64; 49,10) лет изучены популяции лимфоцитов в крови, концентрации белков системы комплемента и цитокинов в сыворотке крови.

Результаты. Методом пошаговой упорядоченной логистической регрессии выведена формула изменений биомаркеров, ассоциированных с процессами субхондрального ремоделирования у пациентов с ранними проявлениями первичного остеоартроза: $X=6,37-(0,005*\text{Содержание в крови } CD3+, \text{ cells}/\mu\text{l})-(0,006*\text{Содержание в крови } CD3+ CD8+, \text{ cells}/\mu\text{l})-(0,062*\text{Концентрация в сыворотке крови } C3, \text{ г/л})+(0,25*\text{Концентрация в сыворотке крови } C4, \text{ г/л})+(0,36*\text{Концентрация в сыворотке крови } \text{ФНО-альфа}, \text{ пг/мл})+(0,44*\text{Концентрация в сыворотке крови } \text{ИЛ-4}, \text{ пг/мл})-(0,38*\text{Концентрация в сыворотке крови } \text{ИЛ-1 бета}, \text{ пг/мл})$, прогностические критерии которой составили: чувствительность – 75,4%; специфичность – 85,7%; точность – 80,9%.

Заключение. Вычислена математическая модель соотношений количественных изменений $CD3+$ и $CD3+CD8+$, $C3$ и $C4$ компонентов комплемента, ФНО-альфа, ИЛ-4 и ИЛ-1 бета у пациентов с ранними проявлениями первичного гонартроза в зависимости от выраженности процессов субхондрального ремоделирования.

Ключевые слова: первичный гонартроз; ранняя диагностика; предиктивная математическая модель; субпопуляции лимфоцитов; белки комплемента $C3$ и $C4$; интерлейкин-1 бета; интерлейкин-10; фактор некроза опухоли-альфа

Для цитирования: Гладкова Е.В., Ульянов В.Ю. Применение математического моделирования в разработке методов предиктивной диагностики ранних стадий первичного гонартроза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (11): 601-609.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-601-609>

Для корреспонденции: Гладкова Екатерина Вячеславовна, канд. биол. наук, начальник отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований; e-mail: gladckova.katya@yandex.ru

Финансирование. Исследование выполнено в рамках НИР «Разработка цифровой персонализированной интеллектуальной системы объективизации субхондрального ремоделирования для ранней диагностики остеоартроза на основе математической модели прогнозирования прогрессирования воспалительно-дегенеративных изменений в опорных соединительных тканях», номер государственной регистрации НИОКТР 122022700115-5.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.05.2024

Принята к печати 17.09.2024

Опубликовано 25.10.2024

Gladkova E.V., Ulyanov V.Yu.

MATHEMATICAL SIMULATION FOR THE DEVELOPMENT OF DIAGNOSIS METHODS IN USED TO PREDICT EARLY PRIMARY GONARTHROSIS

Scientific Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education V.I. Razumovsky Saratov State Medical University, the Russian Federation Ministry of Healthcare, Saratov, Russia

Relevance. The development of the laboratory predictors ensuring objectification of various aspects of supporting connective tissues remodeling in early osteoarthritis manifestations is an actively developing area of the scientific and applied research. Mathematical simulations might present a promising trend in creating diagnostic algorithms that account metabolic and cellular changes as a reflection of the main pathogenetic aspects in the onset of primary knee osteoarthritis.

The objective of this research is designing a mathematical simulation of laboratory predictors for subchondral bone remodeling in patients with early manifestations of primary knee osteoarthritis.

Material and methods. We studied blood lymphocyte populations, complement protein concentrations and serum cytokines in 200 patients with early manifestations of primary knee osteoarthritis as well as 100 healthy individuals aged 42,4 (35,64; 49,10) years.

Results. We used the step-by-step ordered logit regression model to develop a formula for changes in biomarkers associated with subchondral remodeling in patients with early manifestations of primary osteoarthritis: $X=6.37-(0.005*\text{blood } CD3+, \text{ cells}/\mu\text{l})-(0.006*\text{blood } CD3+ CD8+, \text{ cells}/\mu\text{l})-(0.062*\text{serum } C3, \text{ g/l})+(0.25*\text{serum } C4, \text{ g/l})+(0.36*\text{serum } \text{TNF-alpha}, \text{ pg/ml})+(0.44*\text{serum } \text{IL-4}, \text{ pg/ml})-(0.38*\text{serum } \text{IL-1 beta}, \text{ pg/ml})$ with the prognostic criteria of sensitivity 75.4%; specificity 85.7%; accuracy 80.9%.

Conclusion. We calculated the mathematical simulation to define the correlation between quantitative changes in $CD3+$ and $CD3+CD8+$, $C3$ and $C4$ complement components, TNF-alpha, IL-4 and IL-1 beta in patients with early manifestations of primary

gonarthrosis depending on the severity of subchondral remodeling.

Key words: primary gonarthrosis; early diagnosis; predictive mathematical simulation; lymphocyte subpopulations; C3 and C4 complement proteins; IL-1beta; IL-10; TNF-alpha

For citation: Gladkova E.V., Ulyanov V.Yu. Mathematical simulation for the development of diagnosis methods in used to predict early primary gonarthrosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (11): 601-609 (in Russ.).

DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-601-609

For correspondence: Gladkova E.V., Cand. Biol. Sci. (PhD), Head of the Fundamental, Clinical and Experimental Research Dept., e-mail: gladckowa.katya@yandex.ru

Information about authors:

Gladkova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-6207-2275>;

Ulyanov V.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-9466-8348>.

Funding. This study is a part part of the research project *Designing the digital personalized intelligent system for objectifying subchondral remodeling and early osteoarthritis diagnosis based on a mathematical model of predicting inflammation and degeneration progress in supporting connective tissues*, R&D state registration No. 122022700115-5.

Conflict of interests. The authors declare absents of conflict of interests.

Received 16.05.2024

Accepted 17.09.2024

Published 25.10.2024

Введение. Остеоартроз (ОА) относят к наиболее значимым заболеваниям опорно-двигательной системы, охватывающим крупные суставы, который на сегодняшний день выявлен более чем у 500 миллионов человек в мире [1]. В силу биомеханических особенностей распределения осевой нагрузки в теле человека, наиболее подвержены данному заболеванию коленные суставы, на долю которых приходится порядка 260 миллионов случаев прогрессирующих форм ОА. Согласно общемировым статистическим данным, прирост заболеваемости ОА коленных суставов или гонартроза (ГА) за тридцатилетний период, предшествовавший в 2017 году, составил более 9% [2]. Причины столь негативных тенденций многообразны вследствие полиэтиологического характера данного заболевания и существования значительного числа модифицируемых и немодифицируемых факторов риска, среди которых ведущее значение принадлежит особенностям возрастной структуры человеческой популяции с преобладанием лиц пожилого и старческого возраста, малоподвижному образу жизни, увеличению доли лиц с избыточной массой тела, накоплению генетических факторов и т.п. Немаловажным аспектом, влияющим на распространенность ГА, является также его низкая выявляемость на ранних стадиях заболевания, что обусловлено скудной клинической симптоматикой и недостаточной разработкой существующих диагностических стратегий.

На сегодняшний день «золотым стандартом» диагностики ГА остается выполнение стандартной рентгенографии коленных суставов и оценка полученных изображений по шкале J.N. Kellgren, J.S. Lawrence [3], позволяющим определять стадию заболевания на основании таких признаков, как сужение суставной щели вследствие истончения субхондральной кости (СХК), наличие остеофитов и появление участков остеосклероза как отражения процессов аномального ремоделирования костной ткани [3].

Однако большинство исследователей склоняются к мнению о возможности использования данного способа оценки состояния суставных структур преимущественно у пациентов с прогрессирующими стадия-

ми ГА, характеризующимися развитием выраженных структурных нарушений в системе СХК. Известно, что при начальных же стадиях заболевания чувствительность данного диагностического подхода остается низкой, что требует разработки дополнительных методологических подходов, в том числе к анализу полученных цифровых изображений [4].

Установлено, что в реализацию патогенетических событий при ГА вовлечены все суставные компоненты, включая суставной гиалиновый хрящ (СГХ), костные структуры, связочный аппарат, а также окружающие мышечные ткани. Вместе с тем, большинство исследователей придерживаются мнения о первостепенной роли структурно-метаболических нарушений в системе СХК как основного инициирующего механизма возникновения и прогрессирования ГА вследствие возникновения микропереломов под воздействием хронических механических нагрузок избыточной силы [5]. Аберрантное субхондральное ремоделирование и ангиогенез, сопровождающиеся патологической иннервацией, способствуют воспалительно-дегенеративным изменениям СГХ с утратой им ключевых высокомолекулярных компонентов, одновременными фенотипическими изменениями хондроцитов и формированием у пациентов стойкого болевого синдрома [6].

Процессы субхондрального ремоделирования при рентгеннегативном ГА могут быть визуализированы более чем у половины пациентов с бессимптомными ранними проявлениями заболевания при помощи Т2-взвешенных МРТ изображений, позволяющих выявлять признаки поражения костного мозга в виде аномалий некистозного характера с высоким уровнем МРТ-сигнала и расположенных в зонах, прилегающих к кальцинированному СГХ [7]. Данный способ оценки состояния суставных структур обладает достаточно высокой информативностью и биологической безопасностью, обеспечиваемой использованием магнитного излучения радиочастотных волн, не оказывающих инвазивного воздействия на живые объекты, однако он остается относительно малодоступным.

Кроме того, до настоящего времени протоколы МРТ-исследований не стандартизованы применительно

но к начальным проявлениям воспалительно-дегенеративных заболеваний суставов [8].

Достаточно широко используются исследования изменений показателей биохимического состава биологических жидкостей как предикторов развития ОА. На основании многочисленных исследований, проведенных как за рубежом, так и в России, были определены группы биохимических маркеров, отражающих те или иные патогенетические аспекты прогрессирования ОА различной локализации, что позволило сформировать систему «Бремя заболеваний, исследовательские, прогностические показатели, эффективность вмешательства и диагностика» (Burden of Disease, Investigative, Prognostic, Efficacy of Intervention and Diagnostic/ VIPED) [9]. Применение тестов, объединенных в данную систему, позволяет осуществить оценку обменных процессов в коллагеновых структурах, оценить уровень деструкции СГХ на основании уровня накопления в биологических жидкостях молекул агрекана и гиалуронана, компонентов неколлагеновых белков, формирующих экстрацеллюлярный матрикс опорных соединительных тканей. Научно-практическим сообществом рекомендовано также изучение ряда сигнальных молекул и медиаторов, отражающих основные патогенетические механизмы прогрессирования ОА: цитокинов, хемокинов, белков системы комплемента, показателей окислительного и нитрозативного стресса, факторов роста, отдельных показателей метаболизма СГХ и СХК, и целого ряда других параметров [10]. Вместе с тем, несмотря на наличие глубокого систематизированного подхода при создании данной диагностической системы, в настоящее время вопросы верификации полученных в клинике лабораторных данных, остаются зачастую нерешенными.

Известно, что действие цитокинов при ГА осуществляется как системно, так и короткодистантно, что обеспечивает иммунный ответ как совокупный результат неспецифических и специфических реакций, неотъемлемым участником которых являются лимфоциты, циркулирующие в системном кровотоке, а также мигрирующие в очаг воспалительной деструкции. С изменением уровней цитокинов, факторов комплемента и нарастанием концентраций молекулярных паттернов, связанных с повреждением соединительнотканых структур при ГА, связана активация врожденных иммунных реакций с участием нейтрофилов и макрофагов с вовлечением Toll-подобных рецепторов. Количественные изменения в пулах Т- и В-лимфоцитов, сопровождающих воспалительно-дегенеративные заболевания крупных суставов, обусловлены необходимостью осуществления адаптивного иммунного ответа [11]. Вместе с тем, сведения, касающиеся дебюта ГА, размещенные в доступных реферативных базах, носят достаточно противоречивый характер, что ставит под сомнение возможность применения данных маркеров в клинической практике для верификации диагноза и требует осуществления ранжирования референсных значений в зависимости от возрастной принадлежности пациентов [12]. Таким образом, создание новых диагностических подходов, основанных на применении лабораторных технологий, позволяющих оценить особенности отдельных звеньев патогенеза ранних стадий первичного ГА, является приоритетным направлением

исследований.

Цель исследования – разработка математической модели лабораторных предикторов ремоделирования субхондральной кости у пациентов с ранними проявлениями первичного остеоартроза коленных суставов.

Материал и методы. Исследование было проведено на базе клинко-диагностического отделения, отделения лучевой диагностики, клинко-диагностической лаборатории и отдела фундаментальных и клинко-экспериментальных исследований НИИТОН "СГМУ им. В.И. Разумовского" Минздрава России. В состав основной группы были включены 100 мужчин и 100 женщин, у которых, по данным клинко-лабораторных исследований, УЗИ, МРТ и КТ-визуализации компонентов коленных суставов, были выявлены признаки начальных проявлений первичного ГА. В зависимости от наличия инструментальных признаков структурных изменений в СХК пациенты были разделены две подгруппы: подгруппа 1 – с признаками нарушения микроархитектоники костной ткани и подгруппа 2 – без таковых. Контрольную группу составили 100 лиц без признаков заболеваний опорно-двигательной системы. Средний возраст пациентов составил 42,4 (35,64; 49,10) года. Соотношение мужчин и женщин в каждой из групп соответствовало 50:50%.

Критерии включения: соответствие параметрам отбора в каждую из групп и информированное письменное добровольное согласие.

Критерии исключения: наличие травм коленных суставов в анамнезе, семейные случаи заболевания ГА, что могло свидетельствовать о наличии его наследственных детерминант, прием НПВС, иммунодепрессантов, а также других препаратов, способных оказать влияние на уровни исследуемых параметров, данные об иммунодефицитных состояниях, недавних хирургических вмешательствах (в течение ближайших 6 месяцев), состоянии менопаузы у женщин, а также наличие соматической патологии, затрагивающей особенности клеточного и биохимического состава крови.

Оценка ортопедического статуса пациентов и верификация диагноза были осуществлены тремя независимыми травматологами-ортопедами на основании клинко-анамнестического исследования, результатов лабораторных и лучевых методов обследования. При рассмотрении результатов диагностических процедур применяли действующие на территории РФ клинические рекомендации «Гонартроз» в редакции 2021-2023 гг. Кроме того, принимали во внимание обновленные критерии Международного общества исследований остеоартрита OARSI [13].

Стандартная рентгенография коленных суставов была выполнена при помощи рентгеноскопического комплекса OPERA Swing (GMM S.P.A., Италия). Стадирование полученных цифровых изображений проводили по шкале J.H. Kellgren, J.S. Lawrence [3]. УЗИ мягкотканых компонентов коленных суставов выполняли датчиком с частотой 7 МГц на аппарате ACUSON S2000 (Siemens Medical Solutions USA, Inc., США). О начальных дегенеративных изменениях мягких тканей свидетельствовали изменения параметров сигнала, поступающего от СГХ, менисков, связок и мышечных тканей. Учитывали также выраженность синовита как признака локальной воспалительной активности патологического процесса.

Для выполнения МРТ применяли магнитно-резонансный томограф ECHELON 1.5T, (Hitachi Medical Corp., Япония). Были выполнены импульсные последовательности T1, T2 и Pd в режиме сатурации жировой ткани (FSE) в трех проекциях: фронтальной, саггитальной и аксиальной пошагово с толщиной среза 3 мм. Помимо оценки состояния СГХ, в том числе при помощи проведения его T2-релаксометрии, обращали внимание на такие структурные признаки субхондрального ремоделирования, как истончение или уплотнение участков костной ткани, признаки наличия остеофитов, просматривая 14 условных областей в соответствии со стандартными рекомендациями. Кроме того, учитывали наличие признаков отека костного мозга. Наличие остеофитов, краевых заострений СХК и участков остеосклероза осуществляли также при помощи томографа Aquilion (Toshiba Medical Systems, Япония).

Лабораторные методы включали в себя изучение количественного состава основных фенотипов лимфоцитов в образцах стабилизированной антикоагулянт литиевым гепарином крови на цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson, США) по проточной технологии производителя. Дифференциация клеток проводилась при помощи флуоресцентных красителей FITS, PE, APC, PerCP, представленных в готовом наборе Multitest 6-Color TNBK (Becton Dickinson, США). Обработку полученных количественных результатов осуществляли в клинической программе BD FACSDiva 8.0.

С целью изучения состояния гуморального звена врожденного иммунитета в условиях ранних проявлений первичного ГА в сыворотке крови участников исследования учитывали концентрации компонентов системы комплемента C3 и C4 методом иммунотурбидиметрии на автоматическом биохимическом анализаторе Sapphire 400 (Hirose Electronic System Co., Ltd., Япония).

Концентрации в образцах сыворотки крови члена суперсемейства фактора некроза опухоли-альфа (ФНО-альфа) и интерлейкинов: ИЛ-1 бета, ИЛ-4, -6 и -10 были определены методом твердофазного ИФА на анализаторе Stat Fax 4200 (Awareness Technology Inc., США). В работе были использованы готовые наборы реактивов производства АО «Вектор Бест» (Россия).

Статистическая обработка проведена при помощи прикладного пакета программ Statistica-10, SPSS-6 и Gretl. Поскольку распределение данных было отличным от нормального по результатам вычисления критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилкса, в данном исследовании использовали непараметрические методы. Результаты представляли в виде медианы (Me) и квартилей 25% и 75%. Для попарного сравнения групп был применен критерий Манна-Уитни. Уровень статистически значимых различий составил $p < 0,05$. Диагностическая значимость разработанного лабораторного алгоритма оценивалась на основании определения чувствительности, специфичности, площади под характеристической кривой AUC. Для разработки математической модели соотношения лабораторных параметров, отражающих процессы ремоделирования СХК, применяли уравнение упорядоченной логистической регрессии. В отношении предложенного способа диагностики провели процедуру внутренней валидации на тренировочной выборке из 100 пациентов и внешней cross-валидации с разделением модели на

блоки в процессе машинного обучения.

Уровень статистической значимости различий составил $p < 0,05$, что соответствует требованиям, предъявляемым к медико-биологическим исследованиям.

Результаты. При проведении обследования обращало на себя внимание наличие лишь скудной клинической симптоматики у пациентов основной группы, проявлявшейся единичными жалобами на состояние дискомфорта в области коленных суставов при повышенных физических нагрузках. У большинства пациентов врачом-травматологом-ортопедом были выявлены отдельные признаки функциональной недостаточности коленных суставов в виде небольшого ограничения подвижности и крепитации в коленных суставах. Признаков болезненности при пальпации и повышения локальной температуры не отмечали. Никаких изменений качества жизни, связанных с начальными проявлениями ГА, пациенты не отмечали.

Рентгенография коленных суставов пациентов основной группы была малоинформативной, что соответствовало 0-I стадиям заболевания. УЗИ-визуализация продемонстрировала начальные признаки дегенеративных изменений СХК, менисков, компонентов связочного аппарата. Следует отметить, что у 11 пациентов основной группы (подгруппа 1) при выполнении УЗИ были выявлены единичные остеофиты.

По данным МРТ у пациентов основной группы отмечали гипергидратацию хрящевого матрикса вследствие дегенеративных изменений коллагенового каркаса, что сопровождалось увеличением параметров его T2 релаксации. На КТ у ряда пациентов основной подгруппы 1 также выявляли те или иные структурные изменения СХК в виде субхондральных кист, костномозгового отека и наличия единичных заострений костных поверхностей.

Начальные изменения опорных соединительных тканей коленных суставов у пациентов основных подгрупп сопровождались изменениями ряда изученных показателей (табл. 1).

Ранние стадии ГА сопровождались повышением концентрации белков системы комплемента, поступающих в сыворотку крови 1 и 2 подгрупп основной группы (на 23 и 26%, соответственно) (см. табл. 1). У пациентов с ранними стадиями ОА отмечали уменьшение количества Т-лимфоцитов преимущественно за счет уменьшения численности цитотоксических клеток с фенотипом CD3+CD8+. Статистически значимые различия параметров в основной группе затрагивали популяцию CD3+CD4+, снижение численности которой в подгруппе 2 превышало аналогичные значения в подгруппе 1 на 15%. В то же время, число клеток, несущих кластеры дифференцировки CD3+CD8+, у пациентов в основной подгруппе 2 было ниже, чем в основной подгруппе 1 на 23,3%.

Обращали на себя внимание также более высокие значения циркулирующих в крови Т-хелперов у пациентов основной подгруппы 1. У пациентов обеих основных групп было выявлено повышение концентрации в сыворотке крови C3 и C4 белков системы комплемента, составившее 17% и 31,5% в основной подгруппе 1 и 28% и 21% в основной подгруппе 2, соответственно. Различия между основными подгруппами по данным показателям составили порядка 9 и 8%.

Таблица 1

Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов крови, концентраций С3 и С4 компонентов системы комплемента и цитокинов в сыворотке крови у пациентов с начальными проявлениями первичного ГА в зависимости от наличия структурных изменений в субхондральной кости

Параметры / Группа	Контрольная группа 0, n=100	Основная подгруппа 1, n=100	Основная подгруппа 2, n=100	p
Содержание в крови CD3+, cells/ μ l	1596,0 (1468; 638,5)	1226 (1179; 1275)	1179 (1094,86; 1254)	* p_{0-1} <0,0001 p_{1-2} =0,0667 * p_{0-2} <0,0001
Содержание в крови CD3+ CD4+, cells/ μ l	709 (658,5; 752,5)	755 (715; 791)	643,6 (598,68; 713)	p_{0-1} =0,1931 * p_{1-2} =0,000276 * p_{0-2} =0,042486
Содержание в крови CD3+ CD8+, cells/ μ l	904 (807,5; 973,5)	456,5 (412,7; 502,86)	595 (311,19; 652,24)	p_{0-1} <0,0001 * p_{1-2} =0,01471044 p_{0-2} <0,0001
Концентрация в сыворотке крови С3, г/л	113 (101,5; 117)	132 (127; 140)	144,5 (139; 152)	* p_{0-1} <0,0001 * p_{1-2} =0,00041 * p_{0-2} <0,0001
Концентрация в сыворотке крови С4, г/л	19 (17; 21)	25 (24; 27)	23 (20; 27)	* p_{0-1} <0,0001 * p_{1-2} =0,0202785 * p_{0-2} =0,0004138
Концентрация в сыворотке крови ФНО-альфа, пг/мл	3,24 (2,625; 3,395)	6,36 (5,99; 7,13)	5,32 (4,73; 6,860)	* p_{0-1} <0,0001 * p_{1-2} =0,0107626 * p_{0-2} <0,0001
Концентрация в сыворотке крови ИЛ-4, пг/мл	5,0 (4,75; 5,25)	4,4 (4,1; 4,8)	3,95 (3,7; 4,31)	p_{0-1} =0,000042 * p_{1-2} =0,0098834 p_{0-2} <0,0001
Концентрация в сыворотке крови ИЛ-10, пг/мл	6,83 (5,07; 7,22)	9,31 (8,91; 10,11)	8,34 (7,78; 9,08)	p_{0-1} <0,0001 * p_{1-2} =0,00003 p_{0-2} =0,358267786
Концентрация в сыворотке крови ИЛ-6, пг/мл	2,75 (2,25; 2,94)	2,77 (2,61; 3,11)	2,88 (2,66; 3,07)	p_{0-1} =0,788741 p_{1-2} =0,636149 p_{0-2} =0,358268
Концентрация в сыворотке крови ИЛ-1 бета, пг/мл	2,78 (2,485; 3,3)	6,1 (5,18; 6,64)	5,13 (4,13; 6,36)	p_{0-1} <0,0001 * p_{1-2} =0,033258 p_{0-2} <0,0001

Примечание: * - Статистически значимая разница показателей при попарном сравнении с использованием критерия Манна-Уитни между: p_{0-1} – контрольной группой и основной подгруппой 1; p_{1-2} – основными подгруппами 1 и 2; p_{0-2} – контрольной группой и основной подгруппой 2 при $p<0,05$.

Дебют ОА сопровождался дисбалансом цитокинов, циркулирующих в сыворотке крови, что нашло свое отражение в двухкратном повышении концентрации ИЛ-1 бета, увеличении значений ФНО-альфа на 95% в основной подгруппе 1, и на 64% в основной подгруппе 2. Нарастание содержания ИЛ-10 было менее выраженным, в обеих основных подгруппах оно составляло порядка 36,3%, что на 22% выше нормальных показателей. Концентрация же ИЛ-4, напротив, снижалась – на 14% и 26,5% соответственно по сравнению с результатами контрольных измерений.

С целью определения диагностической значимости отдельных лабораторных показателей, примененных в данной работе, с точки зрения ранжирования пациентов основной группы был выполнен ROC-анализ, результаты которого представлены в табл. 2. Учитывая отсутствие достоверных различий концентраций ИЛ-6 в сыворотке крови у пациентов всех групп, при проведении дальнейших вычислений данный параметр не рассматривали.

Согласно полученным результатам, все избранные переменные демонстрируют различные уровни чувствительности и специфичности. Исходя из значений AUC, все использованные в исследовании тесты демонстрируют наличие необходимого уровня классификационной способности, т. е. пригодность для решения поставленной задачи – разделения пациентов с ранними проявлениями первичного ГА в зависимости от наличия струк-

турных проявлений ремоделирования СХК.

С целью создания математической модели, основанной на изученных лабораторных переменных, отражающих наличие у пациентов признаков структурных проявлений вовлечения в патологический процесс СХК, было использовано уравнение пошаговой упорядоченной логистической регрессии. Данный методологический подход был основан на последовательном исключении переменных в соответствии с критериями значимости для модели в целом и для искомым коэффициентов. С помощью данного математического инструмента было определено наличие/отсутствие связей между исследованными бинарными и непрерывными переменными с уровнем значимости для каждого из компонентов ($p<0,05$).

Таким образом, для описания соотношения значений изученных лабораторных параметров у пациентов с инструментально подтвержденными структурными изменениями костной ткани было получено следующее выражение: $X=6,37-(0,005*\text{Содержание в крови CD3+, cells/}\mu\text{l})-(0,006*\text{Содержание в крови CD3+ CD8+, cells/}\mu\text{l})-(0,062*\text{Концентрация в сыворотке крови С3, г/л})+(0,25*\text{Концентрация в сыворотке крови С4, г/л})+(0,36*\text{Концентрация в сыворотке крови ФНО-альфа, пг/мл})+(0,44*\text{Концентрация в сыворотке крови ИЛ-4, пг/мл})-(0,38*\text{Концентрация в сыворотке крови ИЛ-1 бета, пг/мл})$.

Показатели диагностической ценности определения субпопуляционного состава лимфоцитов крови, концентраций С3 и С4 компонентов системы комплемента и цитокинов в сыворотке крови у пациентов с начальными проявлениями первичного ГА в зависимости от наличия признаков структурных изменений субхондральной кости

Параметры / критерии	Чувстви-тельность, %	Специ-фичность %	AUC, %	95СІ% нижний-верхний для AUC	p
Содержание в крови CD3+, cells/ μ l	76,6	56,7	0,638	0,500-0,778	p=0,0929
Содержание в крови CD3+ CD4+, cells/ μ l	83	73	0,773	0,654-0,893	*p=0,00235
Содержание в крови CD3+ CD8+, cells/ μ l	98	63,3	0,683	0,548-0,810	*p=0,0360
Концентрация в сыворотке кро-ви С3, г/л	63,3	86,7	0,808	0,697-0,919	*p=0,00053
Концентрация в сыворотке кро-ви С4, г/л	93,3	56,7	0,674	0,538-0,811	*p=0,0441
Концентрация в сыворотке кро-ви ФНО-альфа, пг/мл	90	63,3	0,692	0,558-0,826	*p=0,02956
Концентрация в сыворотке кро-ви ИЛ-4, пг/мл	56,7	73,3	0,694	0,560-0,827	*p=0,02799
Концентрация в сыворотке кро-ви ИЛ-10, пг/мл	60	95,75	0,814	0,704-0,923	*p=0,0004
Концентрация в сыворотке кро-ви ИЛ-1 бета, пг/мл	83,3	50	0,660	0,522-0,798	*p=0,05999

Примечание. AUC (Area Under Curve) – площадь под кривой, ограниченная ROC-кривой и осью доли положительных результатов; *p – статисти-чески значимая разница значений, достигнутая между основными подгруппами 1 и 2 (p<0,05).

На основании изучения уровней переменных, отме-ченных у пациентов основной группы, рассчитывали вероятность наличия структурных изменений СХК по следующей формуле:

$$p=1-1/(1+\exp(X)).$$

При полученном значении p<0,5 прогнозировали отсутствие структурных изменений СХК у пациентов с начальными проявлениями первичного ГА, при p \geq 0,5 – наличие.

Таким образом, о наличии структурных изменений СХК можно судить на основании совокупных измене-ний следующих лабораторных параметров: содержа-ние в крови CD3+, cells/ μ l; CD3+ CD4+, cells/ μ l; кон-центрация в сыворотке крови С3, г/л; С4 г/л; ИЛ-10 пг/мл; ИЛ-1 бета, пг/мл. Данное выражение характери-зует изменения изученных лабораторных параметров у пациентов с ранними проявлениями первичного ГА со структурными изменениями СХК (положительный результат) – в 81,7% случаев, и указывает на пациентов без инструментально подтвержденных структурных изменений костной ткани (отрицательный результат) – в 80,5% случаев.

При помощи уравнения логитрегрессии прове-дена оценка прогностической значимости выражения X, согласно которому:

$$\text{Чувствительность } Se = \frac{TP}{TP+FN} * 100\% = \frac{49}{49+16} * 100\% = 75,4\%;$$

$$\text{Специфичность } Sp = \frac{TN}{TN+FP} * 100\% = \frac{66}{66+11} * 100\% = 85,7\%;$$

$$\text{Точность } = 80,9\%. \text{ Acc} = \frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN} * 100\% = 80,9\%.$$

Прогностичность положительного результата

$$PVP = \frac{TP}{TP+FP} * 100\% = 81,7\%.$$

Прогностичность отрицательного результата

$$PVN = \frac{TN}{TN+FN} * 100\% = 80,5\%.$$

Была проведена внутренняя валидация вычислен-ной математической модели на случайной тренировоч-ной выборке (Tr), состоящей из 100 архивных историй болезни пациентов с ранними проявлениями первич-ного ГА, а также тестовой выборке (Tst). Чувствитель-ность, специфичность и точность Tr составила: 0,76; 0,84 и 0,79 соответственно. В выборке Tst данные пока-затели составили: 0,75; 0,85 и 0,80. Полученные резуль-таты свидетельствовали о стабильности вычисленной модели и возможности ее клинического использования для описания целевых объектов в соответствии с по-ставленными задачами, а именно – оценки особен-ностей изменений лабораторных параметров у пациен-тов с ранними проявлениями первичного ГА в зависимости от наличия инструментально подтверждаемых струк-турных изменений в системе субхондральной кости.

Таким образом, диагностическая и прогностическая значимость вычисленной математической модели яв-ляется удовлетворительной, и позволяет рассматривать ее в качестве диагностического инструмента, который дает возможность выявлять пациентов с начальными проявлениями первичного ГА, имеющих структурные проявления нарушений ремоделирования СХК.

Обсуждение. Раннее выявление начальных стадий первичного ГА является сложной задачей, поскольку клиническая симптоматика у данной категории паци-ентов практически не проявляет себя, а скрининговые исследования ограничиваются малоинформативной на данном этапе стандартной рентгенографией коленных суставов [14]. Поздняя обращаемость пациентов с сим-птоматическими формами ОА к специалистам травма-толого-ортопедического и ревматологического профи-лей существенно снижает эффективность проводимых

лечебных мероприятий, поскольку развернутые стадии заболевания являются скорее объектом паллиативной медицины, основной задачей которой является купирование выраженного болевого синдрома и обеспечение функциональности конечности, что достигается в результате полной замены пораженного сустава при проведении его первичной артропластики [15].

Возрастной спектр пациентов с более высокой вероятностью обнаружения ранних стадий ОА, по мнению большинства авторов, очерчен 50-летним возрастом, однако разработка скрининговых тестов для данной категории потенциальных пациентов остается дискуссионной задачей, во многом из-за отсутствия стандартизированных подходов [16]. По мнению R. Aggarwal и соавт. [17], существенным препятствием для разработки парадигмы патогенеза раннего ОА и подбора соответствующих лабораторных тестов, направленных на выявление начальных стадий заболевания, в настоящее время являются действующие классификационные критерии, разработанные для однородных групп пациентов без учета индивидуальных особенностей ремоделирования СГХ и СХК, и охватывающих лишь рентгенопозитивные стадии заболевания. Анализируя сложность разработки ранних диагностических критериев ОА, российские исследователи Л.И. Алексеева Л.И. и К.А. Тельшев [18] в 2020 году выделили такие причины сравнительно низкой их эффективности, как полиэтиологическая природа заболевания, несоответствие результатов диагностических исследований его клиническим проявлениям, а также отсутствие биохимических предикторов прогрессирования воспалительной деструкции опорных соединительных тканей, формирующих систему пораженного сустава.

Под эгидой экспертной группы CREDO представители различных стран ведут разработку CHECK – совокупности прогностических критериев ранней диагностики остеоартрита, применительно к когортам «коленный сустав» и «тазобедренный сустав». По итогам наблюдений созданы модели раннего ОА, основанные на: 1) совокупности данных анкетирования и физикальной оценки состояния суставов; 2) дополнительных рентгенологических критериев; 3) исследований уровней белка острой фазы воспаления - С-реактивного протеина. Как указывают результаты ретроспективного 10-летнего наблюдения, данная совокупность параметров демонстрирует наличие положительных корреляционных взаимосвязей с особенностями течения заболевания и имеет прогностическую значимость [19].

Предложенный итальянским Обществом ревматологов набор критериев выявления раннего ГА предназначен преимущественно для симптоматических форм заболевания, основан на опросе, осмотре и анкетировании пациентов без учета лабораторных данных, что существенно ограничивает сферу его применения [20]. Было установлено, что методы лучевой визуализации, такие как МРТ, КТ и УЗИ, значительно превосходят рентген для визуализации мягких тканей суставов и оценки состояния СХК [21]. Использование в нашем исследовании данных методов объективизации состояния суставных компонентов позволило осуществить отбор пациентов с начальными проявлениями ОА, и провести их последующее деление на группы в зависимости от наличия признаков структурных изменений

СХК. Таким образом, следует признать, что высокочувствительные методы лучевой диагностики ранних стадий заболевания позволяют выявлять структурные нарушения как в мягкотканых суставных компонентах, так и в костных структурах.

Вместе с тем, большинство исследователей сходятся во мнении относительно актуальности исследования нарушений метаболических процессов в опорных соединительных тканях как инициальных факторов развития данного вида суставной патологии. Известно, что парадигма патогенеза ранних стадий ОА претерпевает определенные изменения, что обусловлено новыми данными, свидетельствующими о процессах ремоделирования костной ткани под воздействием механической микротравматизации как наиболее ранних механизмов развития ОА [22]. Большинство исследователей считают, что данное обстоятельство обусловлено быстрой адаптацией процессов репарации СХК к меняющимся биомеханическим соотношениям в суставе, тогда как СГХ является более инертной тканью с низким уровнем восстановительных реакций. Рассогласование активности остеокластов и остеобластов при начальных стадиях ОА сопровождается нарушениями поступления в биологические среды соответствующих молекулярных маркеров, где они могут быть выявлены и количественно измерены [23].

Ведущее патогенетическое значение в формировании дисбаланса процессов субхондрального ремоделирования принадлежит остеобластам, функциональная активность которых находится под регуляторным воздействием цитокинов сыворотки крови. Известно, что под влиянием повышенной механической нагрузки в хондроцитах избыточно синтезируется ИЛ-1 бета, который способствует повышению экспрессии RANKL, что косвенно индуцирует образование остеокластов [24].

Полученные в результате проведенных нами исследований данные также свидетельствовали о нарастании уровней провоспалительных цитокинов как ИЛ-1 бета и ФНО- α , что носило наиболее выраженный характер у пациентов с ОА основной группы 1, и свидетельствовало о влиянии данных медиаторов на возникновение структурных изменений СХК. Большинство исследователей считают, что данные регуляторные молекулы способствуют усилению дифференцировки остеокластов посредством активации сигнальных путей NF- κ B и Jun-N-терминальных киназ (JNK), что сопровождается изменениями микроархитектоники СХК [25].

Поддержание хронических низкоуровневых воспалительных реакций в суставных тканях при ОА является результатом активации системы врожденного иммунитета, к которой относят и систему комплемента, участвующей в процессах фагоцитоза и лизиса поврежденных клеток, а также обеспечивающих хемотаксические реакции лейкоцитов [26]. При проведении иммуногистохимической оценки уровней синтеза белков системы комплемента под влиянием триггеров выявили значительное усиление выработки С3 и менее выраженное – С4 у пациентов с ОА. Данная группа авторов отметила, что наиболее значимые показатели экспрессии провоспалительных медиаторов отмечались в зонах отека костного мозга, что способствует поддержанию высокого уровня воспалительной активности [27]. В условиях эксперимента и при проведе-

нии клинических наблюдений было подтверждено, что именно в участках повреждения СХК отмечается не только усиление воспалительных реакций, но и сверхактивация костного ремоделирования [28]. Дисбаланс метаболических процессов в костной ткани в дебюте ОА во многом является результатом экспрессии стимулирующих остеокласты молекул, синтезируемых остеоклестами, расположенными в поврежденных участках СХК, отличающихся высоким уровнем апоптотических процессов [29].

Несмотря на то, что роль иммунной регуляции в процессах ремоделирования СХК при ОА не вызывает сомнений, многие авторы сходятся во мнении, что особенности состояния системы иммунитета в условиях воспалительно-дегенеративных изменений опорных соединительных тканей на сегодняшний день изучены недостаточно [30].

В частности, в доступной литературе нами не было встречено обобщенных математических моделей, отражающих взаимосвязь между ключевыми процессами иммунного регулирования и структурными нарушениями СХК в дебюте первичного ГА.

Использованные нами в процессе проведения исследования методы логистической регрессии позволили выявить соотношение ключевых параметров клеточного иммунитета, соотношения белков системы комплемента и цитокинов, содержащихся в сыворотке крови, взаимосвязанных с формированием структурных нарушений в системе СХК, что позволяет рассматривать данную математическую модель как один из способов малоинвазивной диагностики ранних проявлений первичного ГА, имеющий патогенетическое обоснование.

Выводы. Ранние проявления первичного ГА сопровождаются системными нарушениями количественных соотношений параметров субпопуляций лимфоцитов крови, активацией про- и противовоспалительного звена цитокинов сыворотки крови и системным повышением концентрации С3 и С4 компонентов системы комплемента.

Получена математическая формула соотношений количественных изменений CD3⁺ и CD3⁺CD8⁺ в крови, С3 и С4 компонентов комплемента, ФНО- α , ИЛ-4 и ИЛ-1 бета в сыворотке крови у пациентов с ранними проявлениями первичного гонартроза в зависимости от выраженности процессов субхондрального ремоделирования.

Выбор оптимальных лабораторных маркеров начальных стадий первичного гонартроза, основанный на использовании ROC-анализа данных и применения методологии логистической регрессии, позволяет существенно повысить прогностическую значимость разрабатываемых диагностических алгоритмов.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 1-3, 5-15, 17, 19-30 СМ. REFERENCES)

4. Кабалык М.А. Спектральные и текстурные характеристики субхондральной кости при гонартрозе. *Современные проблемы науки и образования*. 2016; (2):150.
18. Алексеева Л.И., Тельшев К.А. Ранний остеоартрит: разработка критериев диагностики. *Современная ревматология*. 2020; 14(3):140-5. DOI: 10.14412/1996-7012-2020-3-140-145.

REFERENCES

1. Hunter D.J., March L., Chew M. Osteoarthritis in 2020 and beyond: a Lancet Commission. *The Lancet*. 2020; 396(10264): 1711-2. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32230-3.
2. Safiri S., Kolahi A.A., Smith E., Hill C., Bettampadi D., Mansournia M.A. et al. Global, regional and national burden of osteoarthritis 1990-2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Ann. Rheum. Dis*. 2020; 79(6):819-28. DOI: 10.1136/annrheumdis-2019-216515.
3. Kellgren J.H., Lawrence J.S. Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis*. 1957; 16(4):494-502. DOI: 10.1136/ard.16.4.494.
4. Kabalyk M.A. Spectral and textural characteristics of subchondral bone in gonarthrosis. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016; (2):150. (in Russian)
5. Holzer L.A., Kraiger M., Talakic E., Fritz G.A., Avian A., Hofmeister A., Leithner A., Holzer G. Microstructural analysis of subchondral bone in knee osteoarthritis. *Osteoporos Int*. 2020; 31(10):2037-45. DOI: 10.1007/s00198-020-05461-6.
6. Su W., Liu G., Liu X., Zhou Y., Sun Q., Zhen G. et al. Angiogenesis stimulated by elevated PDGF-BB in subchondral bone contributes to osteoarthritis development. *JCI Insight*. 2020; 5(8):e135446. DOI: 10.1172/jci.insight.
7. Hu Y., Chen X., Wang S., Jing Y., Su J. Subchondral bone microenvironment in osteoarthritis and pain. *Bone Res*. 2021;9(1):20. DOI: 10.1038/s41413-021-00147-z.
8. Sifre V., Ten-Esteve A., Serra C.I., Soler C., Alberich-Bayarri A., Segarra S., Martí-Bonmatí L. Knee cartilage and subchondral bone evaluations by magnetic resonance imaging correlate with histological biomarkers in an osteoarthritis rabbit model. *Cartilage*. 2022; 13(3). DOI: 10.1177/19476035221118166.
9. Boffa A., Merli G., Andriolo L., Lattermann C., Salzmann G.M., Fialdo G. Synovial fluid biomarkers in knee osteoarthritis: a systematic review and quantitative evaluation using BIPEDs criteria. *Cartilage*. 2021; 13(Suppl. 1):82S-103S. DOI: 10.1177/1947603520942941.
10. Henrotin Y. Osteoarthritis in year 2021: biochemical markers. *Osteoarthritis Cartilage*. 2022; 30(2):237-48. DOI: 10.1016/j.joca.2021.11.001.
11. Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press; 2012:452-74.
12. Ponchel F., Burska A.N., Hensor E.M., Raja R., Campbell M., Emery P., Conaghan P.G. Changes in peripheral blood immune cell composition in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015; 23(11):1870-8. DOI: 10.1016/j.joca.2015.06.018.
13. Bannuru R.R., Osani M.C., Vaysbrot E.E., Arden N.K., Bennell K., Bierma-Zeinstra S.M.A. et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019; 27(11):1578-89. DOI: 10.1016/j.joca.2019.06.011.
14. Mahmoudian A., Van Assche D., Herzog W., Luyten F.P. Towards secondary prevention of early knee osteoarthritis. *RMD Open*. 2018; 4(2):e000468. DOI: 10.1136/rmdopen-2017-000468.
15. Emery C.A., Whittaker J.L., Mahmoudian A., Lohmander L.S., Roos E.M., Bennell K.L., et al. Establishing outcome measures in early knee osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol*. 2019; 15(7):438-48. DOI: 10.1038/s41584-019-0237-3.
16. Im G.I. The Concept of Early Osteoarthritis and Its Significance in Regenerative Medicine. *Tissue Eng. Regen. Med*. 2022; 19(3):431-6. DOI: 10.1007/s13770-022-00436-6.
17. Aggarwal R., Ringold S., Khanna D., Neogi T., Johnson S.R., Miller A., Brunner H.I., Ogawa R., Felson D., Ogdie A., Aletaha D., Feldman B.M. Distinctions between diagnostic and classification criteria? *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2015; 67(7):891-7. DOI: 10.1002/acr.
18. Alekseeva L.I., Telyshev K.A. Early osteoarthritis: development of diagnostic criteria. *Sovremennaya revmatologiya*. 2020; 14(3):140-5. DOI: 10.14412/1996-7012-2020-3-140-145. (in Russian)
19. Runhaar J., Kloppenburg M., Boers M., Bijlsma J.W.J., Bierma-Zeinstra S.M.A., the CREDO expert group. Towards developing diagnostic criteria for early knee osteoarthritis: data from the CHECK study. *Rheumatology(Oxford)*. 2021; 60(5):2448-55. DOI: 10.1093/rheumatology/keaa643.
20. Migliore A., Scirè C.A., Carmona L., Herrero-Beaumont G., Bizzi E., Branco J. et al. The challenge of the definition of early symptomatic knee

- osteoarthritis: a proposal of criteria and red flags from an international initiative promoted by the Italian Society for Rheumatology. *Rheumatol. Int.* 2017; 37(8):1227-36. DOI: 10.1007/s00296-017-3700-y.
21. Emanuel K.S., Kellner L.J., Peters M.J.M., Haartmans M.J.J., Hooijmans M.T., Emans P.J. The relation between the biochemical composition of knee articular cartilage and quantitative MRI: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2022; 30(5):650-62. DOI: 10.1016/j.joca.2021.10.016.
 22. Kim K.I., Lee M.C., Lee J.H., Moon Y.W., Lee W.S., Lee H.J., Hwang S.C., In Y., Shon O.J., Bae K.C., Song S.J., Park K.K., Kim J.H. Clinical Efficacy and Safety of the Intra-articular Injection of Autologous Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for Knee Osteoarthritis: A Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Am. J. Sports Med.* 2023; 51(9):2243-53. DOI: 10.1177/03635465231179223.
 23. Chu L., Liu X., He Z., Han X., Yan M., Qu X., Li X., Yu Z. Articular Cartilage Degradation and Aberrant Subchondral Bone Remodeling in Patients with Osteoarthritis and Osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* 2020; 35(3):505-15. DOI: 10.1002/jbmr.3909.
 24. Hu W., Chen Y., Dou C., Dong S. Microenvironment in subchondral bone: predominant regulator for the treatment of osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2021; 80(4):413-22. DOI: 10.1136/annrheumdis-2020-218089.
 25. Zhong L., Cao L., Song R., Yang X.F., Li J.L., Yang H.T., Zhou H.X., Fan H.T. Glutamine exerts a protective effect on osteoarthritis development by inhibiting the Jun N-terminal kinase and nuclear factor kappa-B signaling pathways. *Sci Rep.* 2022; 12(1):11957. DOI: 10.1038/s41598-022-16093-7.
 26. Sarma J.V., Ward P.A. The complement system. *Cell Tissue Res.* 2011; 343(1):227-235. DOI: 10.1007/s00441-010-1034-0.
 27. Assirelli E., Pulsatelli L., Dolzani P., Mariani E., Lisignoli G., Adimanda O., Meliconi R. Complement Expression and Activation in Osteoarthritis Joint Compartments. *Front Immunol.* 2020; 11:535010. DOI: 10.3389/fimmu.2020.535010.
 28. Lacourt M., Gao C., Li A., Girard C., Beauchamp G., Henderson J.E., Laverty S. Relationship between cartilage and subchondral bone lesions in repetitive impact trauma-induced equine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012; 20(6):572-83. DOI: 10.1016/j.joca.2012.02.004.
 29. Kennedy O.D., Laudier D.M., Majeska R.J., Sun H.B., Schaffler M.B. Osteocyte apoptosis is required for production of osteoclastogenic signals following bone fatigue in vivo. *Bone.* 2014; 64:132-7. DOI: 10.1016/j.bone.2014.03.049.
 30. Weber A., Chan P.M.B., Wen C. Do immune cells lead the way in subchondral bone disturbance in osteoarthritis? *Prog Biophys Mol Biol.* 2019; 148:21-31. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2017.12.00.