

# Механизм действия хондроитина сульфата и глюкозамина сульфата на хондроциты человека: результаты фармакопротеомного исследования

**В последние годы в мире отмечается тенденция к повышению заболеваемости остеоартрозом (ОА), что отчасти можно объяснить старением населения и «эпидемией» ожирения. Потребность в средствах, применение которых позволило бы адекватно контролировать заболевание, снизить выраженность болевого синдрома и улучшить качество жизни пациентов, удовлетворена не в полной мере; при этом прием большинства препаратов для лечения ОА ассоциируется с различными побочными реакциями. Кроме того, до настоящего времени не разработана эффективная методика, лечение в соответствии с которой способствовало бы регенерации поврежденного хряща или замедлению дегенеративных изменений в последнем.**

Низкая эффективность стандартной терапии с включением анальгетиков и нестероидных противовоспалительных средств с учетом их частых побочных эффектов объясняет все более широкое использование так называемых симптомомодифицирующих препаратов замедленного действия (SYSADOA), к которым относятся глюкозамина сульфат (ГС) и хондроитин сульфат (ХС). Различные клинические исследования показали, что применение ХС и ГС эффективно в плане облегчения симптомов ОА, в первую очередь за счет их выраженных противовоспалительных свойств.

Относительно недавно были опубликованы результаты исследования GAIT (Glucosamine/chondroitin Arthritis Intervention Trial, 2006), которые показали, что в отличие от общей популяции пациентов у больных ОА коленного сустава с умеренным или выраженным болевым синдромом комбинация ГС и ХС обеспечивает статистически значимое облегчение боли по сравнению с плацебо. Это позволило предположить, что наиболее высокая эффективность комбинации ГС и ХС проявляется у пациентов с более тяжелым течением ОА, сопровождающимся значительным повышением уровня интерлейкина-1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ).

Несмотря на широкое использование в клинической практике, знаний об особенностях конкретных молекулярных механизмов действия ХС и ГС в настоящее время недостаточно. В большинстве профильных исследований оценивалось содержание каких-либо конкретных белков, а не состояние общего протеома хондроцитов, то есть совокупности всех его белков. Одновременно анализировать содержание множества белков стало возможным с введением протеомики.

Протеомика – мощный метод исследования экспрессии белков в биологических системах и их модификаций в ответ на раздражители или в особых физиологических и патофизиологических условиях. Этот вид исследования является методом выбора для изучения механизма действия препарата, его побочных эффектов и токсичности, а также представляет ценность с точки зрения открытия новых лекарственных средств. Протеомные исследования фармакологических аспектов действия препаратов получили название фармакопротеомики.

Данное исследование проводилось с целью изучения фармакологического действия ГС и ХС с точки зрения фармакопротеомики. Испанские ученые под руководством доктора Valentina Calamia попытались определить молекулы, принимающие участие в терапевтическом действии данных препаратов и их комбинации. Для этого провели анализ экспрессии протеома хондроцитов, которые подвергались экзогенному воздействию ХС и/или ГС.

## Материал и методы

Поскольку эффективность лечения ХС и ГС варьирует в зависимости от степени тяжести ОА, использовалась модель *in vitro* культуры нормальных человеческих хондроцитов, стимулируемых ИЛ-1 $\beta$  – провоспалительным цитокином, который выступает в качестве медиатора в патогенезе ОА.

Для проведения исследования были получены хондроциты от 3 здоровых доноров. Клетки обрабатывали ГС в дозе 10 ммоль/мл и/или ГС 200 мкг/мл, а затем стимулировали ИЛ-1 $\beta$  в дозе 10 нг/мл. Через 24 ч выделенные белки хондроцитов анализировались с помощью двухмерного электрофореза. Содержание белков определялось методом тандемной времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF/TOF). Для проверки полученных результатов использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и вестерн-блоттинг.

Чтобы оценить влияние ГС и ХС, сравнивалось содержание белков хондроцитов человека в 5 различных состояниях: до лечения (исходное); после введения ИЛ-1 $\beta$  (группа контроля); ИЛ-1 $\beta$  + ГС; ИЛ-1 $\beta$  + ХС; ИЛ-1 $\beta$  + ХС + ГС.

## Результаты

В общей сложности под воздействием ХС и/или ГС изменилось содержание более 30 различных белков. Что касается их биологической функции, то 35% белков, модулируемых ГС, участвовали в процессе внутриклеточной передачи сигнала, 15% – в окислительно-восстановительных и стрессовых реакциях и 25% – в синтезе белковых молекул. Интересно, что ХС влиял в основном на белки, участвующие в производстве энергии (31%) и метаболических процессах (13%).

Были определены 18 различных белков, экспрессия которых изменилась под воздействием ГС. Содержание трех из них менялось только при введении ГС, но не ХС: это пероксидазоксиин-1 (PRDX1 – фермент с пероксидазной активностью, защищающий клетку от окислительного стресса), HSPB1 (белок теплового шока, участвующий в стрессовых реакциях организма) и СО6А1 (белок, участвующий в процессе клеточной адгезии). Интересно, что под влиянием ГС снижалось содержание всех белков, функция которых связана с производством энергии.

ХС модулировал экспрессию 21 белка. Содержание 2 белков –  $\alpha$ -глюкозидазы (GANAB), которая участвует в метаболизме гликана, и регулятора клеточного цикла септина-2 (SEPT2) – менялось только под воздействием ХС.

При введении комбинации ХС и ГС преимущественно проявлялся синергический эффект. В целом эта комбинация модулировала экспрессию 29 различных белков, которые относились ко всем функциональным категориям, но большинство из них участвовали в производстве

энергии и синтезе белков. Важно и то, что экспрессия 4 белков модулировалась только на фоне комбинированного лечения ХС и ГС.

Следует отметить, что ГС и ХС оказывали значительное влияние на содержание 2 белков, которые однозначно участвуют в патогенезе ОА: GRP78 (78 kDa glucose-regulated protein precursor) из семейства белков теплового шока и митохондриальной супероксиддисмутазы-2 (СОД-2), относящейся к группе антиоксидантных ферментов.

Ранее уже сообщалось, что белок GRP78 связан с механизмом развития ОА (С. Ruiz-Romero et al., 2008). В данном исследовании было показано 8-кратное увеличение содержания этого белка под воздействием ГС по сравнению с контрольной группой. ПЦР в реальном времени подтвердила ГС-зависимое повышение экспрессии гена GRP78, показывая почти 30-кратное увеличение содержания этого белка в группе хондроцитов, подвергающихся действию ГС ( $p < 0,05$ ), и еще более высокий его уровень при введении комбинации ГС и ХС. Аналогичные результаты были получены при проведении вестерн-блоттинга в 4 независимых экспериментах.

В исследовании было отмечено, что содержание митохондриальной СОД-2 значительно уменьшилось на фоне терапии ГС и комбинацией ГС и ХС. Для проверки полученных результатов была проведена ПЦР в реальном времени на образцах

РНК в 4 независимых экспериментах. Результаты показали достоверное ( $p < 0,001$ ) повышение экспрессии генов СОД-2 в хондроцитах под влиянием ИЛ-1 $\beta$  и последующее 70-процентное снижение содержания данного белка в клетках, обработанных ГС и комбинацией ГС и ХС. Та же тенденция наблюдалась при проведении вестерн-блоттинга.

## Выводы

В данном исследовании было описано большое количество белков, содержание которых меняется под влиянием ГС и ХС, что позволяет глубже изучить механизм действия этих веществ. В частности, повышение содержания белка GRP78 при воздействии как ГС, так и его комбинации с ХС свидетельствует о предполагаемом механизме их противовоспалительного действия при ОА. Синергическое снижение уровня фермента СОД-2 под влиянием комбинации ХС и ГС подтверждает свойство последних уменьшать выраженность окислительного стресса, вызываемого введением ИЛ-1 $\beta$  в хондроциты человека.

Таким образом, ХС и ГС *in vitro* по-разному модулируют протеомный профиль хондроцитов человека, оказывая при этом комплексное действие в условиях имитации патологического процесса.

Calamia V., Ruiz-Romero C., Rocha B., Fernandez-Puente P., Mateos J., Montell E., Verges J., Blanco F.J. *Arthritis Res Ther.* 2010 Jul 13; 12 (4): R138

Подготовила **Ольга Татаренко**



# ТЕРАФЛЕКС

## ПОСЛІДОВНЕ ЛІКУВАННЯ ОСТЕОАРТРОЗУ

**ПОСИЛЕНИЙ ЗНЕБОЛЮВАЛЬНИЙ ЕФЕКТ**

Терафлекс Адванс

60 капсул = 30 доз

**2-й КРОК  
БАЗИСНА ТЕРАПІЯ  
І ПРОФІЛАКТИКА ЗАГОСТРЕНЬ  
(2-6 місяців та більше)**

- Терафлекс по 3 капсули на добу

**1-й КРОК  
ВПРОДОВЖ  
ПЕРІОДУ ЗАГОСТРЕННЯ**

- Терафлекс Адванс по 2 капсули 3 рази на добу після прийому їжі

**ПЕРШІ КОМБІНОВАНІ  
ХОНДРОПРОТЕКТОРИ  
З ДОВЕДЕНО ЕФЕКТИВНИМ  
СКЛАДОМ<sup>1,2</sup> ДЛЯ ПОСЛІДОВОГО  
ЛІКУВАННЯ ОСТЕОАРТРОЗУ**

<sup>1</sup> Olay O., Reda D., Harris C., et al. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N Engl J Med.* 2006; Feb 23; 354(8): 795-801.

<sup>2</sup> IS. Уманець, С.К. Біофармакологічне дослідження засвоєності ліків "Терафлекс Адванс" і "Терафлекс" у пацієнтів з остеоартрозом. *Стор. 2008; С70-71*

Регістраційне посвідчення МОЗ України № UA/7749/01/01 від 15.02.08, UA/4142/01/01. Реклама лікарського засобу.

ТОВ «Байер»:  
м. Київ, вул. Верхній Вал, 4-Б.  
Тел.: 8 (044) 220-33-00, факс: 8 (044) 220-33-01  
www.bayer.ua

Байер Хелс Кэр Консьюмер Кэр