Хемотранскриптомный анализ молекулы глюкозамина сульфата в контексте постгеномной фармакологии

К.ф.-м.н. И.Ю. Торшин[1,2], профессор О.А. Громова[1,2], профессор А.В. Наумов[3], профессор А.М. Лила[4]

[1] ФГУ ФИЦ ИУ РАН, Москва
[2] МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
[3] ОСП ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России «РГНКЦ», Москва
[4] ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой, Москва

РЕЗЮМЕ

Цель: *изучить влияние молекулы глюкозамина сульфата (ГС) на транскрипцию в фибробластах человека линии FIBRNPC.*

Материал и методы: *проведен хемотранскриптомный анализ влияния молекулы ГС на транскрипцию в фибробластах человека линии FIBRNPC при инкубации клеток с ГС в течение 24 ч.*

Результаты исследования: *достоверные дозозависимые эффекты влияния ГС на транскрипцию (в среднем 5% и более изменений транскрипции на 1 мкмоль ГС) показаны для 4431 из 12 700 аннотированных генов человека. Анализы с использованием функциональной аннотации генов показали, что ГС в существенной мере снижал экспрессию генов, кодирующих факторы воспаления (100 генов), и генов, вовлеченных в деление клетки (66 генов). Уменьшение экспрессии этих групп генов соответствует подготовке клетки к снижению воспаления и переходу в состояние энергосбережения. ГС модулировал экспрессию генов, вовлеченных в восстановление хряща и кости (снижена экспрессия 133 генов и повышена экспрессия 188 генов). ГС способствовал преимущественному повышению транскрипции групп генов, вовлеченных в поддержание кардиопротекции (134 гена), нейропротекции (110 генов), процессов детоксикации (91 ген) и антибактериального/антивирусного иммунитета (58 генов).*

Заключение: *ГС достоверно снижал экспрессию провоспалительных генов, способствовал переходу клетки в состояние энергосбережения, увеличивал экспрессию генов, вовлеченных в восстановление хряща и кости, и в целом повышал выживаемость фибробластов. Полученные оценки изменений транскрипции генов соответствуют повышению эффективности действия ГС и указывают на перспективы использования его у пациентов, страдающих одновременно и патологией хряща, и другими коморбидными заболеваниями (ишемическая болезнь сердца, аритмии, цереброваскулярная патология, инфекционные заболевания, заболевания печени и почек и др.).*

Ключевые слова: *хемотранскриптомика, хемотранскриптомный анализ, глюкозамина сульфат, Сустагард Артро, интеллектуальный анализ данных, молекулярная фармакология, коморбидность, хрящевая ткань, хондроциты, хондропротекция.*

Для цитирования: *Торшин И.Ю., Громова О.А., Наумов А.В., Лила А.М. Хемотранскриптомный анализ молекулы глюкозамина сульфата в контексте постгеномной фармакологии. РМЖ. 2019;1(*):1–8.*

ABSTRACT

Chemical transcriptome analysis of glucosamine sulfate molecule in the context of post-genomic pharmacology

I.Yu. Torshin[1,2], O.A. Gromova[1,2], A.V. Naumov[3], A.M. Lila[4]

[1]FRC CSC RAS, Moscow
[2]Lomonosov Moscow State University
[3]Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow
[4]Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow

Aim: *to study a glucosamine sulfate (GS) molecule effect on transcription in human fibroblasts of the FIBRNPC line.*

Patients and Methods: *chemotranscriptome analysis of the GS molecule effect on transcription in human fibroblasts of the FIBRNPC line was conducted during incubation of cells with GS for 24 hours.*

Results: *reliable dose-dependent effects of GS impact on transcription (on average, 5% or more changes in transcription per 1 μmol of GS) were shown for 4,431 of the 12,700 human genome annotation. Analyzes using functional genome annotation showed that GS substantially reduced the gene expression encoding inflammatory factors (100 genes) and genes involved in cell division (66 genes). Reducing the gene expression of these groups corresponds to the cell preparation to reduce inflammation and transition to a state of energy saving. GS modulated the gene expression involved in the restoration of cartilage and bone (reduced expression of 133 genes and increased expression of 188 genes). GS contributed to a predominant increase in the transcription of gene groups involved in maintaining cardioprotection (134 genes), neuroprotection (110 genes), detoxification processes (91 genes), and antiviral/antibacterial immunity (58 genes).*

Conclusion: *GS significantly reduced the pro-inflammatory gene expression, contributed to the cell transition to a state of energy saving, increased gene expression involved in the restoration of cartilage and bone, and, in general, increased fibroblast survival. Estimates of gene transcription changes correspond to an increase in the effectiveness of GS and indicate the prospects for using GS in patients suffering from both cartilage pathology and other comorbid diseases (coronary heart disease, arrhythmias, cerebrovascular pathology, infectious, liver and kidney diseases, and others).*

Keywords: *chemical transcriptomics, chemical transcriptome analysis, glucosamine sulfate, Sustaguard Artro, data mining, molecular pharmacology, comorbidity, cartilage, chondrocytes, chondroprotection.*

For citation: *Torshin I.Yu., Gromova O.A., Naumov A.V., Lila A.M. Chemical transcriptome analysis of glucosamine sulfate molecule in the context of post-genomic pharmacology. RMJ. 2019;1(*):1–8.*

Введение

Для получения полной информации о механизме действия изучаемой молекулы важно рассматривать влияние этой молекулы на геном, транскриптом, протеом, метаболом и реактом [1–3].

Воздействия лекарственных средств на геном, транскриптом, протеом и метаболом изучаются постгеномной фармакологией. Большинство лекарств, как правило, воздействуют на активность тех или иных белков протеома, что, в свою очередь, оказывает воздействие на метаболом, реактом и, наконец, состояние генома.

Поиск в базе данных транскриптомных исследований GEO [4] показал, что всего представлено 2721 исследование эффектов 725 лекарств и потенциальных лекарств для тех или иных видов клеток. В то же время известно более 9335 лекарств [5], а число видов клеток в организме человека превышает 200. Таким образом, данные о транскриптоме доступны менее чем для 10% лекарств.

В наших предыдущих работах был проведен протеомный [1] и хемореактомный [2] анализ эффектов молекулы кристаллической субстанции глюкозамина сульфата (ГС), препарата Сустагард® Артро (производства компании «Биоиберика, С.А.У.» Испания). Протеомный анализ молекулярных механизмов действия ГС — действующего вещества препарата Сустагард® Артро — показал, что ГС взаимодействует с рецепторами CD44, TLR4 и ICAM1 на поверхности хондроцитов, ингибирует провоспалительный транскрипционный ядерный фактор «каппа-би» (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB), цитокиновый сигнальный путь JAK/STAT, регулирует синтез иммуноглобулина А в кишечнике, миграцию лейкоцитов, активность рецепторов гематопоэтина и интерферонов. Дифференциальный хемореактомный анализ ГС и ряда нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) показал, что декскетопрофен и, в меньшей степени, кеторолак наиболее эффективно дополняют противовоспалительные свойства ГС [1, 2].

В постгеномной парадигме большинство лекарств являются ингибиторами белков и оказывают непосредственное (как правило, достаточно быстрое), «тактическое» действие (минуты-часы) именно за счет модуляции активности тех или иных конкретных белков протеома. Например, ацетилсалициловая кислота и НПВП ингибируют фермент циклооксигеназу-2 (ЦОГ-2), что снижает синтез провоспалительных простагландинов. В то же время белки синтезируются на основе информации, закодированной в геномной ДНК. Первым шагом в синтезе любого белка является транскрипция соответствующего гена, т. е. синтез матричной РНК, соответствующей гену. После транскрипции гена образованная матричная РНК транслируется рибосомами, т. е. осуществляется собственно синтез белка. Таким образом, воздействие лекарства на транскрипцию генов обусловливает более долговременные эффекты этого лекарства (часы-дни). Соответственно, воздействие лекарств на транскрипцию как бы подготавливает клетку к последующей активности посредством привнесения определенных «стратегических» изменений в транскрипции всего генома [6, 7].

Накопленный фармакологический опыт показывает, что далеко не для всякого лекарства характерна синергия в том смысле, что молекула этого лекарства оказывает надлежащее «тактическое» воздействие на протеом и соответствующее «стратегическое» действие на транскриптом. Например, некоторые противоопухолевые средства ингибируют транскрипцию генов, ассоциированных с ростом опухолей (что и обусловливает основное фармакологическое действие молекул). Вместе с тем те же самые молекулы ингибируют многочисленные белки протеома (что приводит к тяжелым побочным эффектам). Поэтому в современной биомедицине важно учитывать воздействие исследуемого лекарства и на протеом, и на транскриптом.

В базе данных GEO [4] накоплены результаты более чем 160 тыс. транскриптомных исследований (всего более 50 тыс. терабайт данных). С использованием новейших методов искусственного интеллекта для анализа «сверхбольших данных» (big data) в Институте фармакоинформатики при ФИЦ ИУ РАН был разработан метод хемотранскриптомного анализа эффектов молекул, основанный на современных методах машинного обучения [8–14].

Цель данного исследования — проведение хемотранскриптомного анализа дозозависимых эффектов воздействия ГС на транскрипцию 12 700 аннотированных генов человека в фибробластах линии FIBRNPC, стимуляция клеток ГС в 6 различных концентрациях в течение 24 ч.

Материал и методы

Методики культивирования фибробластов приведены в работе A. Subramanian et al. (2017) [15]. Результаты транскриптомных экспериментов в базе данных GEO представлены в виде таблиц, столбцам которых соответствуют гены, а строкам — соответствующие воздействия на клетку (например, те или иные молекулы). Элементами таблиц являются изменения экспрессии гена при соответствующем воздействии. Каждой такой таблице транскриптомного эксперимента соответствуют: 1) тип клеток, для которых изучались изменения экспрессии; 2) интенсивность воздействия (прежде всего, концентрации воздействующих молекул); 3) время воздействия (6, 12, 24 ч и т. д.). Изменения экспрессии оцениваются относительно контрольных образцов (как правило, содержащих диметилсульфоксид) [15].

При задании (1) типа клеток (например, фибробласты), (2) концентрации и (3) времени воздействия каждый столбец такой таблицы соответствует химической реакции «Ген$_i$ → мРНК$_i$», в результате которой осуществляется синтез i-й молекулы мРНК$_i$, соответствующей i-му гену (Ген$_i$). Данные, содержащиеся в таком столбце таблицы 1 транскриптомного эксперимента, включающей информацию об изменении экспрессии N генов при воздействии n молекул, могут рассматриваться как описание определенного элемента реактома (совокупности всех химических реакций). Соответственно, становится возможным применение теории хемографов [8, 9], методологии хемоинформационного [10] и хемореактомного анализа [11–14] для осуществления хемотранскриптомного моделирования.

Хемотранскриптомный анализ

Данный анализ осуществляется методами, основанными на комбинаторной теории разрешимости [7–9, 14, 16]. Решаются задачи распознавания изменений экспрессии различных констант (оцениваемых в количественных значениях математического ожидания и дисперсии функции распределения). На третьем этапе анализа для исследуемой молекулы для каждого гена

Таблица 1. Категории международной номенклатуры GO, частота встречаемости которых достоверно отличалась между двумя списками (гены со сниженной экспрессией и гены с повышенной экспрессией при воздействии ГС)

n-	n+	Категория GO	Описание категории GO	P
Факторы воспаления				
6	0	[GO:0002437]	Воспалительный ответ на антиген	0,014233
5	0	[GO:2000406]	Усиление миграции Т-клеток	0,025256
18	5	[GO:0038061]	Передача сигналов через NF-κB	0,006558
16	6	[GO:0019221]	Сигнальный путь цитокинов	0,032525
25	10	[GO:0008360]	Регулирование формы клетки	0,010877
27	11	[GO:0033209]	Сигнальный путь ФНО-α	0,009108
3	14	[GO:0042102]	Повышение деления Т-клеток	0,007505
Восстановление хряща и кости				
132	167	[GO:0005615]	Внеклеточное пространство	0,035354
1	7	[GO:0030282]	Минерализация кости	0,033717
0	7	[GO:0071383]	Клеточный ответ на стероиды	0,008095
Деление клеток				
40	3	[GO:0000278]	Клеточный цикл	$1{,}4 \cdot 10^{-8}$
12	4	[GO:0045840]	Усиление клеточного деления	0,045069
13	5	[GO:0045727]	Усиление синтеза белков	0,058775
1	6	[GO:0071850]	Остановка клеточного цикла	0,058561
Антибактериальный/антивирусный иммунитет				
13	5	[GO:0075733]	Внутриклеточный перенос вируса	0,058775
2	8	[GO:0050853]	Передача сигналов от В-клеточного рецептора	0,057467
4	16	[GO:0030183]	Дифференциация В-клеток	0,007145
1	11	[GO:0006956]	Активация комплемента	0,003839
0	11	[GO:0030890]	Усиление деления В-клеток	0,000896
0	7	[GO:0006957]	Активация комплемента, альтернативный путь	0,008095
Детоксикация				
14	33	[GO:0005764]	Лизосома	0,005306
10	29	[GO:0020037]	Связывание гема	0,002233
3	10	[GO:0005776]	Аутофагосома	0,051822
2	8	[GO:0008757]	S-аденозилметионин метилтрансфераза	0,057467
Нейропротекция				
19	33	[GO:0043005]	Рост нейритов	0,050678
22	39	[GO:0030424]	Аксон	0,028277
2	9	[GO:0050885]	Нервно-мышечный баланс	0,034559
2	11	[GO:0030170]	Связывание пиридоксальфосфата	0,012412
0	7	[GO:0004709]	Активность киназы MAP3K	0,008095
0	6	[GO:0042423]	Биосинтез катехоламинов	0,014233
0	5	[GO:0048011]	Сигнальный путь trc-рецептора нейротрофинов	0,025256
Кардиопротекция				
17	6	[GO:0006695]	Биосинтез холестерина	0,021432
3	10	[GO:0032868]	Ответ на инсулин	0,051822
3	10	[GO:0002027]	Регулирование частоты сердечных сокращений	0,051822
3	15	[GO:0042632]	Гомеостаз холестерина	0,004585
1	6	[GO:0008016]	Регуляция сокращения сердца	0,058561
0	6	[GO:0086091]	Регуляция сердечного ритма	0,014233
1	7	[GO:0005242]	Выпрямительный калиевый канал	0,033717
0	12	[GO:0017080]	Активность регулятора натриевого канала	0,000522
0	7	[GO:0086002]	Потенциал действия кардиомиоцитов	0,008095
0	11	[GO:0003091]	Гомеостаз воды в почках	0,000896
1	8	[GO:0008392]	Активность эпоксигеназы арахидоновой кислоты	0,019493
1	9	[GO:0097755]	Вазодилатация	0,011309
1	12	[GO:0042149]	Клеточный ответ на дефицит глюкозы	0,002244
0	5	[GO:0034364]	Липопротеины высокой плотности	0,025256
0	5	[GO:0000038]	Метаболизм длинноцепочечных жирных кислот	0,025256
0	5	[GO:0042573]	Метаболизм ретиноевой кислоты	0,025256

Примечание. *«n-» – число генов со сниженной экспрессией при воздействии глюкозамина сульфата; «n+» – число генов с повышенной экспрессией при воздействии глюкозамина сульфата; P – статистическая достоверность различий по критерию χ^2; NF-κB – ядерный фактор «каппа-би» (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells); ФНО-α – фактор некроза опухолей α.*

вычислялись оценки активации или депривации при различных концентрациях исследуемой молекулы. Методами регрессионного анализа анализировались достоверные дозозависимые изменения экспрессии в диапазоне исследуемых концентраций (0,01–10 мкмоль/л). Для каждого из отобранных трендов устанавливался знак изменения экспрессии *i*-го гена («+»-тренд — достоверное повышение экспрессии при увеличении концентрации ГС, «-»-тренд — достоверное снижение экспрессии *i*-го гена при увеличении концентрации ГС, действующего начала препарата Сустагард® Артро) и соответствующие трендам гены подразделялись на список генов, для которых показано повышение экспрессии («Список+») и снижение экспрессии («Список-»).

Системно-биологический анализ

Списки генов с достоверным повышением или снижением экспрессии генов, которые были получены в результате применения описанного выше хемотранскриптомного подхода, анализировались посредством метода функционального связывания [3]. Анализ проводился с использованием международной номенклатуры Gene Ontology (GO), описывающей физиологические функции генов и соответствующих белков. Данный метод основан на системном рассмотрении органов, тканей, клеток и их мельчайших компонентов (белков, ДНК, метаболитов) в рамках фундаментальных основ молекулярной биологии и биохимии. Так, на основе информации определенной геномной ДНК синтезируется соответствующий белок, вы-

полняющий строго очерченный круг специфических функций. Как мутации гена, так и дефициты кофакторов белка (ионов металлов — кальция, магния, цинка; витаминов группы В и др.) будут приводить к падению активности тех или иных белков и проявлению той или иной специфической клинической симптоматики [3].

Метод анализа функциональных взаимосвязей, соединяя данные различных уровней (данные о моногенных заболеваниях, биохимические данные о кофакторах белков, данные о клеточной роли белков, симптоматику и критерии диагностики заболеваний и т. д.), позволяет систематически рассмотреть все возможные функциональные эффекты воздействия ГС на транскрипцию каждого из генов. В целом при использовании метода анализа функциональных взаимосвязей для каждого гена человека составляется аннотированная таблица изменений экспрессии генов, включающая следующие описания:

- соответствующий гену белок;
- список биохимически необходимых эссенциальных кофакторов белка (в т. ч. с указанием потребности ионов кальция для активности рассматриваемого белка);
- список моногенных заболеваний, связанных с полной или частичной потерей активности этого белка;
- список клеточных функций белка (по номенклатуре GO и др.);
- список отдельных симптомов заболеваний, список диагнозов по МКБ-10 и другую информацию из баз данных.

Далее в полученной таблице выделяются гены, частота встречаемости функциональных описаний которых существенно отличается при достоверном повышении экспрессии по сравнению с достоверным снижением экспрессии, и проводится последующий анализ их функций на основании статистических критериев. Для статистической обработки результатов исследования используются методы математической статистики, включающие расчет числовых характеристик случайных величин, проверку статистических гипотез с использованием параметрических и непараметрических критериев, корреляционного и дисперсионного анализа. Сравнение прогнозируемых и наблюдаемых частот встречаемости исследуемых признаков проводится с помощью критерия χ^2, Т-критерия Вилкоксона — Манна — Уитни и теста Стьюдента.

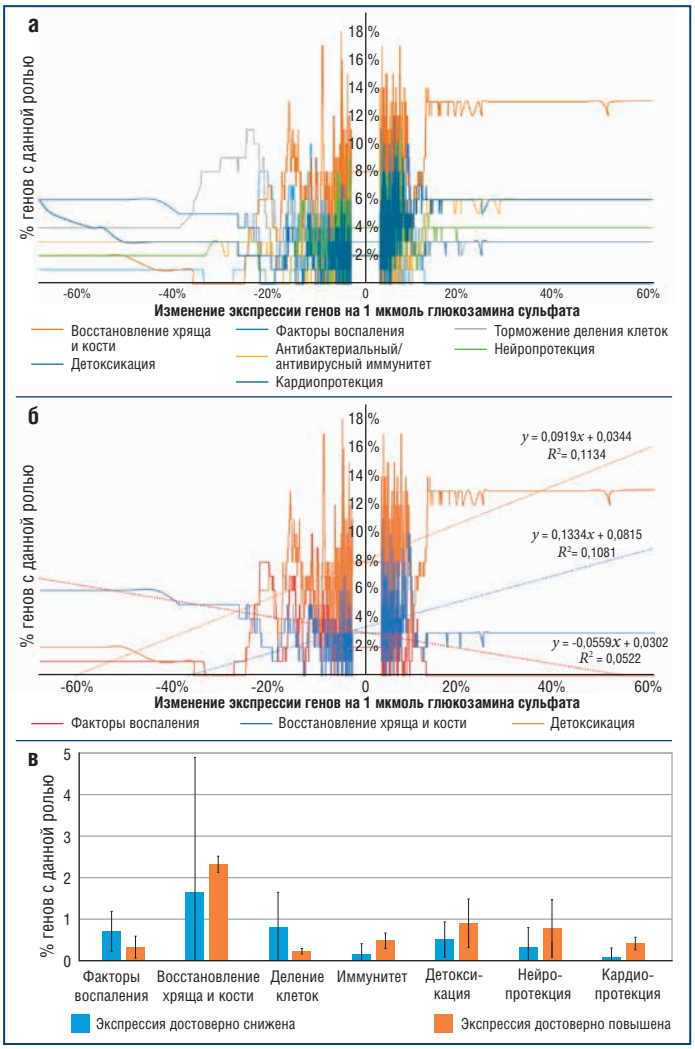

Рис. 1. Частоты встречаемости генов каждой из 7 функциональных групп, экспрессия которых дозозависимо изменяется при воздействии ГС на фибробласты (по результатам хемотранскриптомного анализа): **а** – профили частоты встречаемости генов 7 функциональных групп; **б** – линейные аппроксимации профилей частот для наиболее выраженных зависимостей; **в** – попарное сравнение частот встречаемости генов 7 групп.

Примечание. *Очевидно, что экспрессия генов в группах «Факторы воспаления» и «Деление клеток» преимущественно снижается, а в группах «Восстановление хряща и кости», «Иммунитет», «Детоксикация», «Нейропротекция», «Кардиопротекция» — преимущественно повышается.*

Результаты

Хемотранскриптомный анализ эффектов молекулы ГС на транскриптом фибробластов линии FIBRNPC (инкубация в течение 24 ч) показал достоверные дозозависимые эффекты ГС в отношении транскрипции 6535 из 12 700 аннотированных генов человека. Достоверные изменения транскрипции ($P<0,05$ по t-тесту, коэффициент корреляции более 0,50, изменение транскрипции более 5% на 1 мкмоль ГС) были показаны для 4431 гена: экспрессия 2634 генов снизилась («Список-»), а экспрессия 1797 генов повысилась («Список+»).

В ходе проведения системно-биологического анализа этих двух списков генов («Список-» и «Список+») были выявлены: различия в частоте встречаемости ключевых слов в описаниях генов (данные UNIPROT), функциональных категорий генов/белков по номенклатуре GO (Gene Ontology), встречаемости различных кофакторов, встречаемости экспрессии генов в различных видах тканей; ассоциированные с генами заболевания и элементы реактома человека. Для установления детальных закономерностей в группах генов, экспрессия которых дозозависимо повышалась или снижалась при моделировании воздействия ГС, был проведен сравнительный системно-биологический анализ двух списков генов («Список-» и «Список+»). С использованием категорий международной номенклатуры GO, описывающей функции генов и соответствующих белков, было выявлено по меньшей мере 47 категорий GO, частота встречаемости которых достоверно отличается между двумя списками.

Экспертный анализ, основанный на результатах анализа ключевых слов, позволил рубрицировать эти 47 категорий в 7 функциональных групп генов, для которых отмечены выраженные отличия в частоте встречаемости: «Факторы воспаления», «Восстановление хряща и кости», «Деление клеток», «Антибактериальный/антивирусный иммунитет», «Детоксикация», «Нейропротекция» и «Кардиопротекция» (табл. 1). На рисунке 1а отражены профили частот встреча-

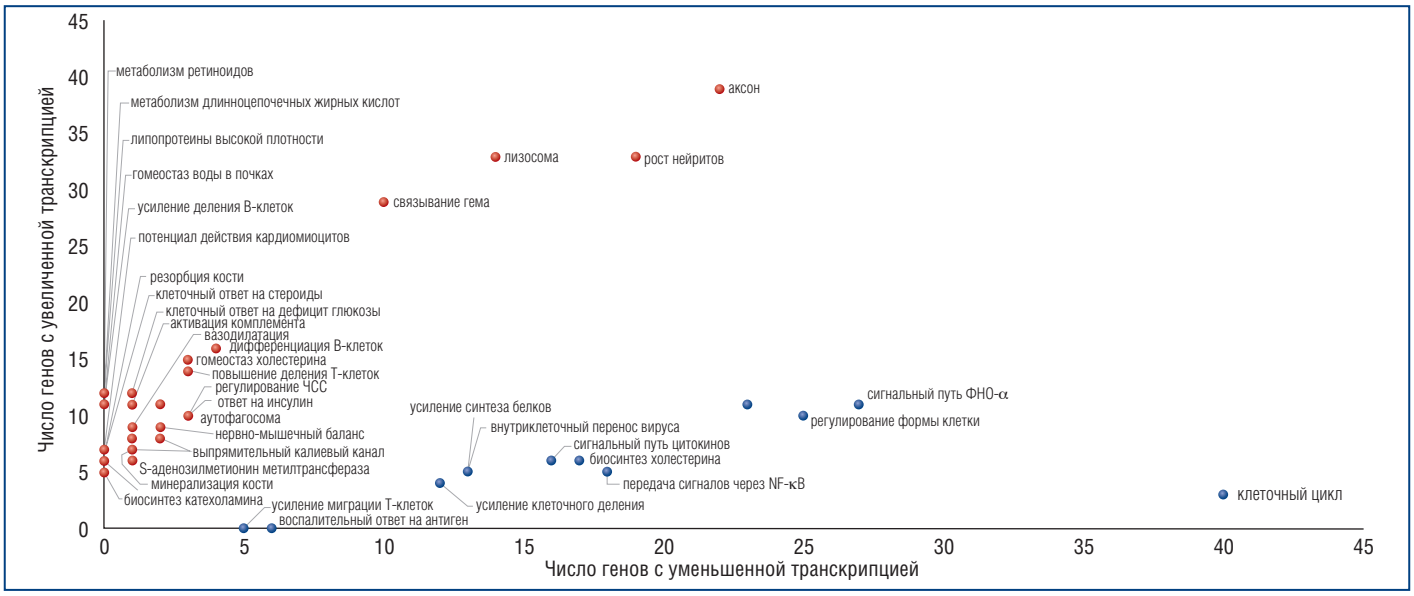

Рис. 2. Функциональные аннотации по номенклатуре Gene Ontology (GO) и изменения экспрессии генов, вызываемые глюкозамина сульфатом (по результатам хемотранскриптомного анализа)

Примечание. *Красным цветом обозначены группы генов по аннотации GO, экспрессия которых преимущественно повышалась. Синим цветом обозначены группы генов, экспрессия которых преимущественно снижалась. NF-κB – ядерный фактор «каппа-би» (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells); ФНО-α – фактор некроза опухолей α.*

емости генов этих 7 функциональных групп в зависимости от количественного изменения экспрессии (на 1 мкмоль ГС).

На рисунке 2 отражены числа генов «n-» и «n+», соответствующие функциональным категориям генов, перечисленным в таблице 1. Анализ линейных аппроксимаций профилей частот встречаемости генов 7 функциональных групп (рис. 1б) и данных рисунка 2 позволяет утверждать очевидное систематическое снижение экспрессии генов из групп «Факторы воспаления» и «Деление клеток». В то же время экспрессия генов из групп «Антибактериальный/антивирусный иммунитет», «Детоксикация», «Нейропротекция» и «Кардиопротекция» систематически возрастает.

Таким образом, гены, экспрессия которых дозозависимо повышается при воздействии ГС, существенно отличаются по своим биологическим функциям от генов, экспрессия которых дозозависимо понижается (рис. 1, 3, табл. 1). На наш взгляд, установленные изменения транскрипции имеют важную физиологическую интерпретацию.

Нами были применены и прочие подходы к системно-биологическому анализу двух полученных списков генов («Список-» и «Список+»), которые подтвердили приведенные выше выводы об общем направлении транскриптомного действия ГС. Например, анализ встречаемости белковых кофакторов показал, что ГС способствовал преимущественному повышению экспрессии генов, которые кодируют белки с такими кофакторами, как гем (64 гена, $P=5{,}58\times10^{-5}$), флавинадениндинуклеотид (69 генов, P=0,005949) и ион Mg^{2+} (232 гена, P=0,046239). Все перечисленные кофакторы играют важную роль в поддержании клеточного дыхания и энергетического метаболизма фибробластов и других видов клеток.

Фибробласты синтезируют соединительнотканную основу различных тканей и, следовательно, представлены практически во всех тканях. Анализ встречаемости экспрессии генов в различных видах тканей подтверждает, что ГС способствует поддержанию метаболизма «энергоемких» тканей. Проведенный нами анализ показал, что ГС

Рис. 3. Процентные соотношения встречаемости функциональных групп генов со сниженной и повышенной экспрессией при воздействии глюкозамина сульфата на клетки фибробластов линии FIBRNPC, 24 ч (по результатам хемотранскриптомного анализа)

способствовал преимущественному повышению экспрессии генов в головном мозге (458 генов, $P=3{,}04\times10^{-5}$), печени (345 генов, P=0,00259), почках (363 гена, $P=1{,}35\times10^{-5}$), мышцах (314 генов, P=0,054343), надпочечниках (45 генов, P=0,00177) и сетчатке глаза (45 генов, P=0,000231), в т. ч. в клетках-фоторецепторах (9 генов, P=0,00267).

Также мы провели анализ полученных списков генов с точки зрения отношения соответствующих этим генам белков к различным каскадам реактома человека. Анализ показал, что ГС приводит к достоверным изменениям экспрессии генов, кодирующих белки 229 каскадов реактома человека. Детальный анализ списка этих 229 каскадов подтвердил, что ГС приводит к снижению экспрессии генов, участвующих в процессах деления клетки и транскрипции ДНК («Разматывание ДНК», «Конденсация прометафазных хромосом», «Устранение некомплементарности в ДНК посредством MSH2: MSH3», «Коррекция D-петлевых структур в РНК», «Инициирование репликации ДНК», «PTK6 регули-

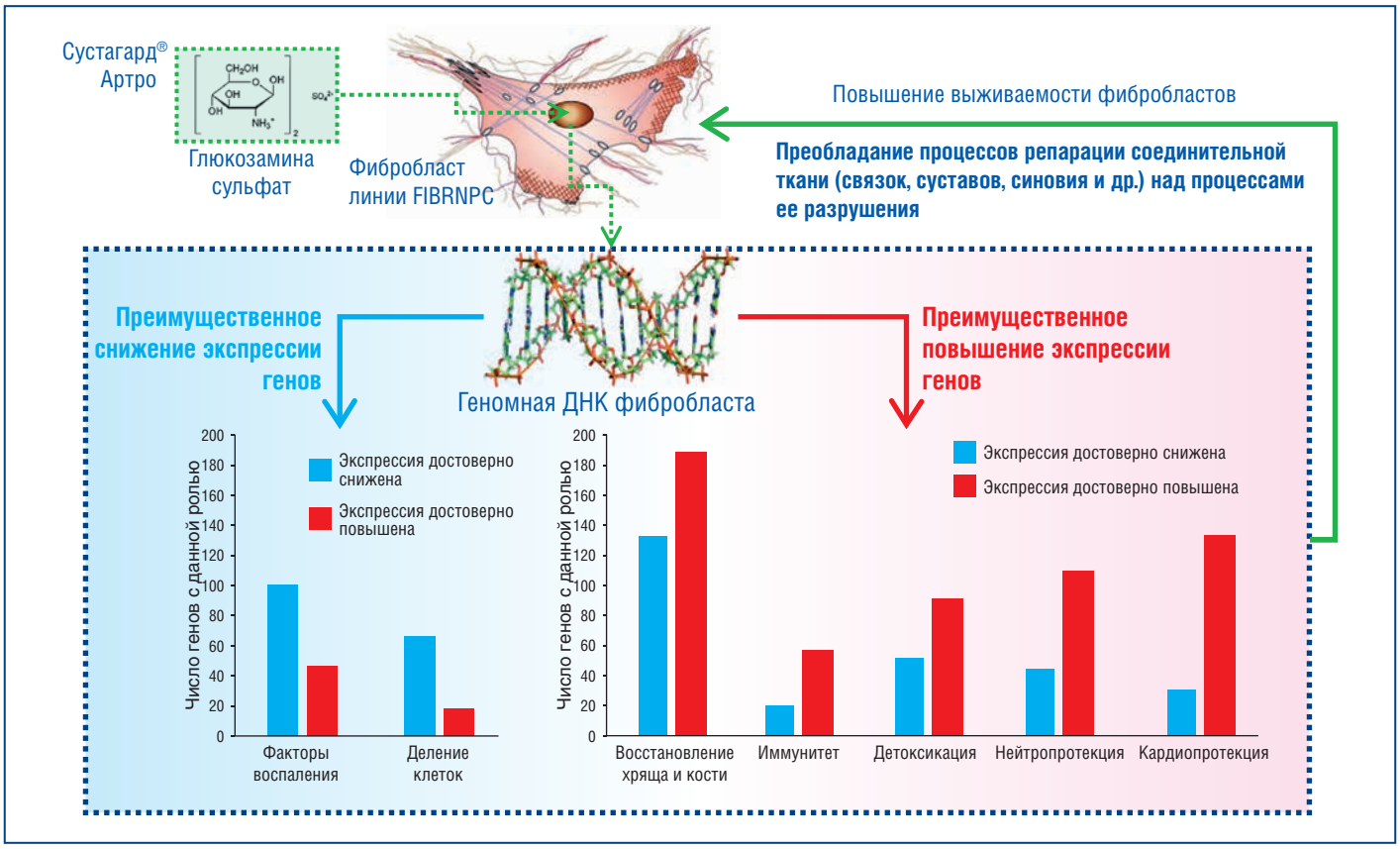

Рис. 4. Усиление процессов репарации в соединительной ткани под воздействием глюкозамина сульфата

рует клеточный цикл» и др.), нейропротекцией («RUNX3 регулирует сигнализацию WNT», «Катаболизм фенилаланина и тирозина», «Передача сигналов MAPK6/MAPK4», «Кислородозависимое пролин-гидроксилирование фактора, индуцируемого гипоксией», «NRAGE сигнализирует об апоптозе через JNK», «Цикл высвобождения нейротрансмиттера серотонина», «Цикл высвобождения ацетилхолина», «Цикл высвобождения норадреналина» и др.), противовоспалительным действием (снижение экспрессии генов в элементах транскриптома «Dectin-1 опосредованная неканоническая передача сигналов NF-kB», «NIK — неканоническая передача сигналов NF-kB», «FCERI опосредовал активацию NF-kB», «Хемокиновые рецепторы связывают хемокины», «Передача сигналов от рецептора TCR» и др.).

Обсуждение результатов

Описанные выше результаты позволяют сделать несколько важных выводов о транскриптомных эффектах ГС. Во-первых, ГС может способствовать снижению транскрипции генов из функциональных групп «Факторы воспаления» и «Деление клеток». Снижение экспрессии генов, вовлеченных в поддержку факторов воспаления, очевидным образом синергидно с описанным ранее противовоспалительным действием ГС на протеом [1, 2]. Снижение экспрессии группы генов под рубрикой «Деление клеток» соответствует переходу клетки в состояние энергосбережения (т. к. процессы деления клеток весьма энергоемки и на их поддержание расходуется бóльшая часть синтезируемого в клетке АТФ). Очевидно, что режим экономии АТФ способствует повышению энергообеспеченности фибробластов в условиях воспалительного или оксидативного стресса. Иначе говоря, ГС способствует переходу клеток в состояние своего рода «стазиса», при котором выживаемость фибробластов повышается.

Во-вторых, ГС преимущественно повышает экспрессию генов, вовлеченных в синтез компонентов внеклеточного матрикса (повышается экспрессия 167 генов, снижается экспрессия 132 генов). Кроме того, ГС способствует повышению экспрессии генов, вовлеченных в минерализацию кости (P=0,033717) и клеточный ответ на стероиды (P=0,008095). Перечисленные изменения экспрессии генов способствуют восстановлению хряща и кости.

В-третьих, ГС способствует повышению экспрессии генов из функциональных групп «Антибактериальный/антивирусный иммунитет», «Детоксикация», «Нейропротекция» и «Кардиопротекция». Повышение экспрессии этих групп генов соответствует желательным дополнительным эффектам ГС, которые могут быть весьма полезны в терапии коморбидных патологий (данный вопрос более подробно рассматривается в отдельной статье [17]).

Таким образом, хемотранскриптомный анализ эффектов ГС в отношении фибробластов указал на характерные изменения транскрипции генов, способствующие энергосбережению, противовоспалительному действию и кардиопротекции. Важным отличием настоящего исследования от опубликованных ранее транскриптомных исследований производных глюкозамина, например, работы J.N. Gouze et al. (2006) [18], является условие использования фибробластов без какой-либо внешней стимуляции (интерлейкин-1 и т. п.) при разных концентрациях исследуемого вещества. В настоящем исследовании ГС достоверно снижал экспрессию провоспалительных генов, способствовал переходу клетки в состояние энергосбережения, повышал экспрессию генов, вовлеченных в восстановление хряща и кости, и в целом повышал выживаемость фибробластов (рис. 4).

ХОНДРОГАРД® и СУСТАГАРД® АРТРО

СТАРТ-терапия остеоартрита и остеохондроза

- **СТАРТ-терапия[1,2,3,4]:**
  схема чередования парентеральных форм хондроитина сульфата и глюкозамина сульфата
- **Базисная терапия[5]:**
  пероральный глюкозамина сульфат в виде саше СУСТАГАРД® АРТРО

Реклама

ХОНДРОГАРД®

ХОНДРОИТИНА СУЛЬФАТ

Раствор для внутримышечного и внутрисуставного введения

1 мл №10, 2 мл №10, 2 мл №25

ЛСР-005817/09

СУСТАГАРД® АРТРО

ГЛЮКОЗАМИН

Концентрат для приготовления раствора для внутримышечного введения 200 мг/мл в комплекте с растворителем №5 (5 ампул А по 2 мл, 5 ампул Б по 1 мл)

Порошок для приготовления раствора для приема внутрь 1,5 г №20

ЛСР-009268/09, ЛП-003149

СОТЕКС

1. М.И.Удовика, «Сравнительная эффективность инъекционных и пероральных симптоматических препаратов медленного действия в терапии первичного и посттравматического остеоартроза коленных суставов». РМЖ Ревматология №7, 2017
2. А.В.Наумов, М.Н.Шаров, Н.О.Ховасова, Ю.С.Прокофьева, «Результаты применения интермиттирующей схемы парентерального введения хондроитина сульфата и глюкозамина сульфата в старт-терапии хронической боли в суставах и спине у коморбидных пациентов». РМЖ Неврология №11, 2018
3. А.В. Наумов, О.Н. Ткачева, Н.О. Ховасова, «Обострения хронической боли в спине у коморбидных больных: терапия на перспективу». РМЖ Ревматология №5, 2018
4. Л.В.Васильева, А.В.Никитин, Е.Ф.Евстратова, Н.С. Бурдина, «Опыт сочетанного парентерального применения глюкозаминсульфата и хондроитинсульфата у больных с остеоартритом», Сборник тезисов:/ Под редакцией: Академика РАН Мазурова В.И., доцента Трофимовой Е.А., Спб.: Изд-во «Человек и его здоровье», 2018
5. В.В. Бадокин, «Сустагард Артро - новый препарат глюкозамина сульфата в терапии остеоартроза», ФАРМАТЕКА, 2016, №19

В заключение следует обратить внимание на один важный момент. Как известно, профиль (паттерн) экспрессии генов транскриптома отражает состояние фибробласта в целом. Действительно, процессы транскрипции и сигнальные процессы внутри любой клетки взаимосвязаны. С одной стороны, изменения активности внутриклеточных сигнальных каскадов приводят к изменениям в транскрипции. С другой стороны, изменения в транскрипции стимулируют изменения активности сигнальных каскадов [15].

Что же может являться физическими причинами изменений в транскриптоме, которые были установлены в результате проведения хемотранскриптомного анализа молекулы ГС? Являются ли описанные изменения результатом воздействия ГС на некоторые, еще неизвестные, таргетные белки, которые выступают факторами транскрипции? Или же изменения транскрипции под воздействием ГС отражают изменение состояния фибробластов, обусловленное действием ГС на описанные ранее таргетные белки (рецептор CD44, ингибирование ЦОГ-2 и 5-липоксигеназы, ингибирование ФНО-α, NF-κB и др. [1])? Данный комплекс вопросов весьма сложен и не может быть однозначно разрешен в рамках настоящей статьи.

Заключение

Результаты проведенного нами хемотранскриптомного анализа молекулы ГС (являющейся действующим началом препарата Сустагард® Артро из субстанции компании «Биоиберика С.А.У.», Испания) в отношении экспрессии генов в фибробластах человека (линия FIBRNPC) указали на несколько важных особенностей транскриптомного действия изучаемой молекулы. ГС достоверно снижал экспрессию провоспалительных генов, способствовал переходу клетки в состояние энергосбережения за счет снижения экспрессии генов, участвующих в клеточном делении (митозе), что удлиняло жизненный цикл фибробластов. Также ГС повышал экспрессию генов, вовлеченных в восстановление хряща и кости, и способствовал преимущественному повышению транскрипции групп генов, вовлеченных в кардиопротекцию (134 гена), нейропротекцию (110 генов), детоксикацию (91 ген) и поддержание антивирусного и антибактериального иммунитета (58 генов).

Установленные особенности действия молекулы ГС на транскриптом фибробластов важны для понимания как основного (хондропротекторного) действия ГС, так и для обоснования целесообразности использования ГС у пациентов, страдающих одновременно и патологией хряща, и другими коморбидными заболеваниями (ИБС, аритмии, цереброваскулярная патология, инфекционные заболевания, заболевания печени и почек и др.). Данные свойства ГС имеют большое клиническое значение, поскольку у большинства пациентов с остеоартрозом присутствуют различные коморбидные состояния, влияющие на течение патологического процесса в суставе и возможности терапии [19].

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-07-01419

Литература

1. Громова О.А., Торшин И.Ю., Лила А.М., Громов А.Н. Молекулярные механизмы глюкозамина сульфата при лечении дегенеративно-дистрофических заболеваний суставов и позвоночника: результаты протеомного анализа. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2018;10(2):38–44. [Gromova O.A., Torshin I. Yu., Leela A.M., Gromov A.N. Molecular mechanisms of glucosamine sulfate in the treatment of degenerative-dystrophic diseases of the joints and spine: the results of proteomic analysis. Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics. 2018;10(2):38–44 (in Russ.)]. DOI: 10.14412/2074-2711-2018-2-38-44.
2. Громова О.А., Торшин И.Ю., Лила А.М., Наумов А.В., Рейер И.А., Каратеев А.Е. Дифференциальный хемореактомный анализ глюкозамина сульфата и нестероидных противовоспалительных препаратов: перспективные синергичные комбинации. Современная ревматология. 2018;12(2):36–43. [Gromova O.A., Torshin I.Yu., Leela A.M., Naumov A.V., Reier I.A., Karateev A.E. Differential chemoreactomy analysis of glucosamine sulfate and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: promising synergistic combinations. Modern rheumatology. 2018;12(2):36–43 (in Russ.)]. DOI: 10/14412/1996-7012-2018-2-36-43.
3. Torshin I.Yu. Sensing the change from molecular genetics to personalized medicine. NY: Nova Biomedical Books; 2009.
4. Gene Omnibus Express (GEO) database. (Электронный ресурс). URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ (дата обращения: 30.01.2019).
5. DrugBank database. (Электронный ресурс). URL: https://www.drugbank.ca (дата обращения: 30.01.2019).
6. Громова О.А., Торшин И.Ю. Магний и «болезни цивилизации». М.: ГЭОТАР-Медиа; 2018. [Gromova O.A., Torshin I.Yu. Magnesium and «diseases of civilization». M.: GEOTAR-Media; 2018 (in Russ.)].
7. Громова О.А., Торшин И. Ю. Витамин D. Смена парадигмы. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017. [Gromova O.A., Torshin I.Yu. Vitamin D. Paradigm change. M.: GEOTAR-Media; 2017 (in Russ.)].
8. Torshin I.Y., Rudakov K.V. On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs. part 1: fundamentals of modern chemical bonding theory and the concept of the chemograph. Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications). 2014;24(1):11–23.
9. Torshin I.Y., Rudakov K.V. On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs: part 2. local completeness of invariants of chemographs in view of the combinatorial theory of solvability. Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications). 2014;24(2):196–208.
10. Торшин И.Ю., Громова О.А., Федотова Л.Э. и соавт. Хемоинформационный анализ молекулы оротовой кислоты указывает на противовоспалительные, нейропротекторные и кардиопротекторные свойства лиганда магния. Фарматека. 2013;13(266):95–104. [Torshin I.Yu., Gromova O.A., Fedotova L.E. et al. Chemoinformation analysis of the orotic acid molecule indicates the anti-inflammatory, neuroprotective and cardioprotective properties of magnesium ligand. Farmateka. 2013;13(266):95–104 (in Russ.)].
11. Торшин И.Ю., Громова О.А., Сардарян И.С., Федотова Л.Э. Сравнительный хемореактомный анализ мексидола. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2017;117(1–2):75–83. [Torshin I.Yu., Gromova O.A., Sardaryan I.S., Fedotova L.E. Comparative chemoreactomy analysis of mexidol. Journal of Neurology and Psychiatry n.a. S.S. Korsakov. 2017;117(1–2):75–83 (in Russ.)].
12. Громова О.А., Торшин И.Ю., Федотова Л.Э., Громов А.Н. Хемореактомный анализ сукцината этилметилгидроксипиридина. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2016;3:53–60. [Torshin I.Yu., Gromova O.A., Sardaryan I.S., Fedotova L.E. Comparative chemoreactomy analysis of ethylmethylhydroxypyridine succinate. Journal of Neurology and Psychiatry n.a. S.S. Korsakov. 2016;3:53–60 (in Russ.)].
13. Громова О.А., Торшин И.Ю., Федотова Л.Э. Геронтоинформационный анализ свойств молекулы мексидола. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2017;9(4):46–54. [Gromova O.A, Torshin I.Yu., Fedotova L.E. Gerontoinformati onal analysis of the properties of the Mexidol molecule. Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics. 2017;9(4):46–54 (in Russ.)].
14. Torshin I.Y. The study of the solvability of the genome annotation problem on sets of elementary motifs. Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications). 2011;21(4):652–662.
15. Subramanian A., Narayan R., Corsello S.M. et al. A Next Generation Connectivity Map: L1000 Platform and the First 1,000,000 Profiles. Cell. 2017;30(171(6)):1437–1452. e17. DOI: 10.1016/j.cell.2017.10.049.
16. Torshin I.Y., Rudakov K.V. Combinatorial analysis of the solvability properties of the problems of recognition and completeness of algorithmic models. part 1: factorization approach. Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications). 2017; 27(1):16–28.
17. Торшин И.Ю., Громова О.А., Лила А.М. и др. Результаты постгеномного анализа молекулы глюкозамина сульфата указывают на перспективы лечения коморбидных заболеваний. Современная ревматология. 2018;12(4):129–136. [Torshin I.Yu., Gromova O.A., Leela A.M. The results of the post-genomic analysis of the glucosamine sulfate molecule indicate the prospects for the treatment of comorbid diseases. Modern rheumatology. 2018;12(4):129–136 (in Russ.)].
18. Gouze J.N., Gouze E., Popp M.P. et al. Exogenous glucosamine globally protects chondrocytes from the arthritogenic effects of IL-1beta. Arthritis Res Ther. 2006;8(6):R173. PubMed PMID: 17109745; PubMed Central PMCID: PMC1794517.
19. Буряк И.С., Волков К.Ю. Остеоартроз как комплексная проблема: взгляд практикующего ревматолога. РМЖ. 2015;25:1487–1490 [Buryak I.S., Volkov K. Yu. Osteoarthritis as a complex problem: a view from a practicing rheumatologist. RMJ. 2015; 25:. 1487–1490 (in Russ.)].