

Об антикоагулянтных и антиагрегантных свойствах молекулы глюкозамина сульфата

Торшин И.Ю.¹, Лиля А.М.^{2,3}, Громова О.А.¹, Наумов А.В.⁴, Громов А.Н.¹

¹Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» Российской академии наук, Институт фармакоинформатики, Москва, Россия; ²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва, Россия; ³кафедра ревматологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия; ⁴ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России – ОСП «Российский геронтологический научно-клинический центр», Москва, Россия
¹119333, Москва, Вавилова, 44, корп. 2; ²115522, Москва, Каширское шоссе, 34А; ³125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1; ⁴129226, Москва, ул. 1-я Леонова, 16

Глюкозамин – часть метаболома человека, необходимая для биосинтеза биополимерных глюкозаминогликанов соединительной ткани. Кроме того, молекула глюкозамина и сама по себе проявляет противовоспалительные и регенеративные свойства. В настоящей работе представлены результаты систематического анализа фундаментальных и клинических исследований, указывающие на антикоагулянтные и антиагрегантные эффекты высокоочищенной фармацевтической субстанции микрокристаллического глюкозамина сульфата (мГС). Основными молекулярными механизмами его антитромботических эффектов являются, по-видимому, мимикрия молекулой мГС активности гепарансульфатов, активация рецептора CD44 и инактивация сигнальных каскадов NF-κB тромбоцитов. Результаты количественного хемореактивного исследования показали, что в реактоме человека антитромботические эффекты мГС обусловлены ингибированием: 1) собственно агрегации тромбоцитов; 2) адгезии и рецепторов активации тромбоцитов; 3) эндогенного синтеза тромбоксанов; 4) коагуляции посредством снижения активности факторов свертывания крови.

Ключевые слова: микрокристаллический глюкозамина сульфат; антиагрегантный эффект; антикоагулянтный эффект.

Контакты: Ольга Алексеевна Громова; unesco.gromova@gmail.com

Для ссылки: Торшин ИЮ, Лиля АМ, Громова ОА и др. Об антикоагулянтных и антиагрегантных свойствах молекулы глюкозамина сульфата. Современная ревматология. 2019;13(3):135–141.

On the anticoagulant and antiaggregatory properties of a glucosamine sulfate molecule

Torshin I. Yu.¹, Lila A.M.^{2,3}, Gromova O.A.¹, Naumov A.V.⁴, Gromov A.N.¹

¹Institute of Pharmacoinformatics, Federal Research Center «Informatics and Management», Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; ²V.A. Nasonov Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia; ³Department of Rheumatology, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia; ⁴Russian Gerontology Research and Clinical Center, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia
¹44, Vavilov St., Build. 2, Moscow 119333; ²34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522; ³2/1, Barrikadnaya St., Build. 1, Moscow 125993; ⁴16, First Leonov St., Moscow 129226

Glucosamine is part of the human metabolome required for the biosynthesis of polymer glycosaminoglycans in connective tissue. In addition, the glucosamine molecule itself has anti-inflammatory and regenerative properties. This paper presents the results of a systematic analysis of fundamental and clinical studies, which indicate the anticoagulant and antiaggregatory effects of a highly purified pharmaceutical substance of microcrystalline glucosamine sulfate (mGS). The main molecular mechanisms of its antithrombotic effects are most probably the mGS molecular mimicry of heparan sulfate activity, the activation of CD44 receptor, and the inactivation of the NF-κB signaling pathways in platelets. A quantitative chemoreactome study has shown that the antithrombotic effects of mGS in the human reactome are due to the inhibition of: 1) proper platelet aggregation; 2) platelet adhesion and activation receptors; 3) endogenous synthesis of thromboxanes; 4) coagulation by reducing the activity of coagulation factors.

Keywords: microcrystalline glucosamine sulfate; antiaggregatory effect; anticoagulant effect.

Contact: Olga Alekseevna Gromova; unesco.gromova@gmail.com

For reference: Torshin IYu, Lila AM, Gromova OA, et al. On the anticoagulant and antiaggregatory properties of a glucosamine sulfate molecule. *Sovremennaya Revmatologiya=Modern Rheumatology Journal*; 2019;13(3):135–141.

DOI: 10/14412/1996-7012-2019-3-135-141

Хондроитина сульфат (ХС) и глюкозамин – вырабатываемые хондроцитами компоненты хряща и синовиальной жидкости. ХС является биополимерной молекулой с достаточно большой молекулярной массой (>5 кДа), состоящей из звеньев глюкозамина сульфата и других сахаров, а глюко-

замин с малой молекулярной массой (0,18 кДа) необходим для синтеза ХС. Хотя ХС и глюкозамин – эндогенные молекулы, поступая в организм в виде препаратов на основе ХС или микрокристаллического глюкозамина сульфата (мГС), они оказывают выраженное противовоспалительное дейст-

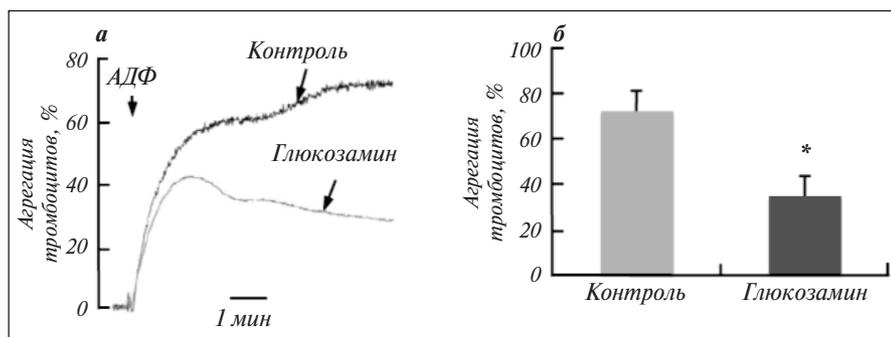


Рис. 1. Влияние перорального введения глюкозамина на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ, у морских свинок: а – тромбоциты предварительно инкубировали в течение 1 мин, а затем стимулировали 2,0 мкМ АДФ при 37 °С в течение 15 мин для мониторинга их агрегации с помощью агрегатора; б – степень агрегации тромбоцитов оценивали количественно по максимальной высоте кривой по сравнению с базовым уровнем; * – $p < 0,01$ [11]

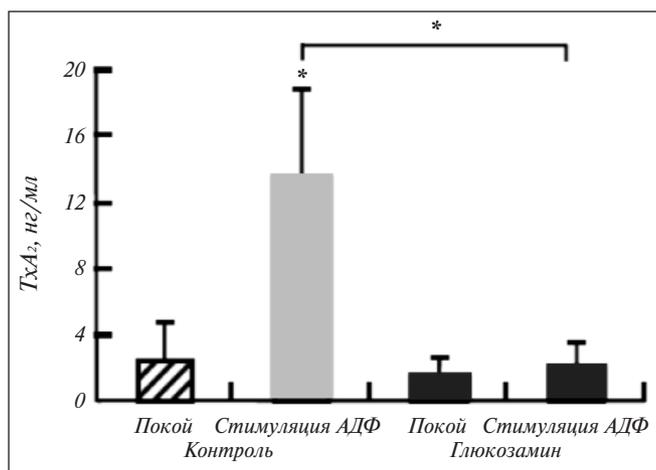


Рис. 2. Влияние перорального приема глюкозамина на выработку TxA_2 тромбоцитами у морских свинок; * – $p < 0,001$ [11]

вие. Систематический анализ клинических исследований ХС/МГС показал целесообразность их использования в терапии остеоартрита (ОА), цистита, гастроэзофагеальной рефлюксной болезни и др. [1]. Клиническая эффективность препаратов ХС и глюкозамина обусловлена не только тем, что эти соединения являются «строительным материалом» для синтеза глюкозаминогликанов хряща, но и тем, что они модулируют процессы воспаления [2].

В инструкциях по применению лекарственных препаратов на основе МГС часто указывается, что их следует «использовать с осторожностью» при риске тромботических осложнений. Однако МГС и ХС не усиливают и не ослабляют антикоагулянтную активность варфарина [3]. Более того, экспериментальные исследования показали возможность антиагрегантного действия МГС [4, 5], а долгосрочные клинические исследования демонстрируют, что в реальной практике МГС может не только подавлять симптомы ОА коленного сустава, но и сдерживать прогрессирование структурных изменений, особенно на ранних стадиях ОА [6]. Длительное применение МГС приводит к снижению общей и сердечно-сосудистой летальности [7], в том числе вследствие позитивного действия на эндотелиальную функцию сосудов [8]. В настоящей работе представлены результаты систематического анализа данной проблемы, обсуждаются

механизмы антиромботического действия МГС.

Экспериментальные и клинические исследования антиромботических эффектов МГС

В эксперименте показано, что аминоксахара глюкозамин, галактозамин и маннозамин (30 мМ) ингибируют агрегацию тромбоцитов человека или кролика, индуцированную аденозинфосфатом (АДФ), коллагеном, тромбином, фактором свертывания РАФ (фосфолипидный медиатор воспаления и тромбообразования) или высокими концентрациями арахидоната натрия [9]. Увеличение концентрации кальция до 5 мМ, которое должно было бы усилить свертывание крови, не предотвращало ингибирующего действия молекулы МГС на тромбоциты [9]. Агглютинин зародышей пшеницы (4 мкг/мл) индуцирует агрегацию тромбоцитов адреналином, коллагеном, арахидонатом и ионофором А23187. Первая волна агрегации прекращалась при добавлении N-ацетилглюкозамина, а ингибиторы циклооксигеназы (индометацин, ацетилсалициловая кислота, АСК) блокировали вторую волну [10].

Ингибирующее действие глюкозамина на активацию тромбоцитов изучалось у морских свинок, которые получали его перорально в течение 22 дней. Отмечалось подавление агрегации тромбоцитов в ответ на добавление АДФ к крови *in vitro* на 51%; $p < 0,01$ (рис. 1), а также индуцированного АДФ высвобождения аденозинтрифосфата (АТФ) и выработки тромбоксана A_2 (TxA_2) на 91 и 96% соответственно ($p < 0,001$; рис. 2) [11].

Тромбоциты контрольных животных продуцировали приблизительно 13 нг/мл TxA_2 в ответ на АДФ ($p < 0,001$). Однако тромбоциты животных, получавших глюкозамин, практически не вырабатывали TxA_2 при стимуляции АДФ ($p < 0,001$; см. рис. 2) [11].

Глюкозамин подавлял как начальную (на 17%), так и вторичную (на 28%) фазу АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (рис. 3). Таким образом, в данной серии экспериментов на морских свинках антиагрегантный эффект глюкозамина был более заметным во вторичную фазу агрегации [11].

Глюкозамин ($>0,01$ мМ) дозозависимо подавлял агрегацию тромбоцитов человека в ответ на стимуляцию посредством АДФ ($p < 0,05$), тогда как N-ацетилглюкозамин, галактозамин или N-ацетилгалактозамин (1 мМ) не оказывали на нее существенного влияния. Кроме того, глюкозамин ($>0,1$ мМ) ингибировал внеклеточное высвобождение содержимого гранул (АТФ и фактор тромбоцитов 4) и высвобождение TxA_2 из АДФ-стимулированных тромбоцитов ($p < 0,05$). Более того, глюкозамин ($>0,1$ мМ) значительно подавлял мобилизацию внутриклеточного кальция и стимулированное АДФ фосфорилирование Syk (при $>0,01$ мМ; $p < 0,05$). Глюкозамин ($>0,1$ мМ) также ингибировал связывание АДФ с его рецепторами ($p < 0,05$) [12].

Для определения влияния глюкозамина на агрегацию тромбоцитов *in vivo* оценивалась АДФ-агрегация тромбоцитов с использованием тромбоцитов добровольцев, получав-

ших глюкозамин (1,5 г/сут) в течение 1 нед. Пероральное введение глюкозамина уменьшало АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов на $29,21 \pm 6,18\%$ ($n=4$; $p<0,05$) по сравнению с началом исследования (рис. 4) [12]. В другой работе в группе здоровых добровольцев (мГС 1500 мг/сут, 14 дней) наблюдалось снижение агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ или арахидоновой кислотой, у 10 из 20 участников [13].

Мимикрия молекулой мГС активности гепарансульфатов

Одним из наиболее вероятных механизмов антитромботического действия мГС является абсолютная структурная схожесть этой молекулы с глюкозаминовыми фрагментами антитромботических глюкозаминогликанов гепаринов. Как известно, гепарины взаимодействуют с антитромбином, ингибитором протеазы, для регулирования свертывания крови. Даже ультранизкомолекулярные гепарины (2,5 кДа), состоящие из очень коротких полисахаридных цепочек ($n=3...5$), проявляют антикоагулянтные свойства, важные для профилактики и лечения тромботических расстройств [14].

Глюкозамин замедляет атерогенез, стимулируя эндотелиальное продуцирование протеогликанов гепарансульфата. Протеогликаны гепарансульфата, вырабатываемые сосудистым эндотелием, могут уменьшать миграцию, размножение и фенотипический переход сосудистых гладкомышечных клеток, а также поддерживать антикоагулянтную поверхность путем связывания и активации антитромбина III. Достаточное количество гепарансульфатных протеогликанов необходимо для профилактики и тромботических осложнений, и атеросклероза. Глюкозамин, предшественник биосинтеза всех мукополисахаридов, усиливает их образование при добавлении к культурам фибробластов или хондроцитов. Экзогенный глюкозамин также увеличивает синтез протеогликанов гепарансульфата клетками эндотелия сосудов, способствуя замедлению тромбоза и атерогенеза [15].

Основным «антикоагулянтным» структурным фрагментом молекул гепаринов являются 3-О-сульфатированные остатки глюкозамина. Молекулы мГС, поступая в организм в форме соли, также сульфатируются по атому 3-О посредством фермента гепарансульфат-3-О-сульфотрансферазы, участвующей в процессе биосинтеза эндогенных гепарансульфатов. Кристаллическая структура гепарансульфат-3-О-сульфотрансферазы I (которая выполняет важнейшую модификацию в биосинтезе антикоагулянтного гепарансульфата) подтверждает, что этот фермент переносит сульфогруппу в положение 3-ОН глюкозамина, тем самым формируя структурный мотив, критический для связывания гепарансульфата с антитромбином [16].

В составе гепарина 3-О-сульфогруппа в виде глюкозамина принципиально важна для антитромботической активности. Например, в отличие от сульфатированного пентасахарида, 3-О-десульфатированный пентасахарид гепарина характеризуется низким сродством к антитромбину III и практически полностью лишен антикоагулянтной активно-

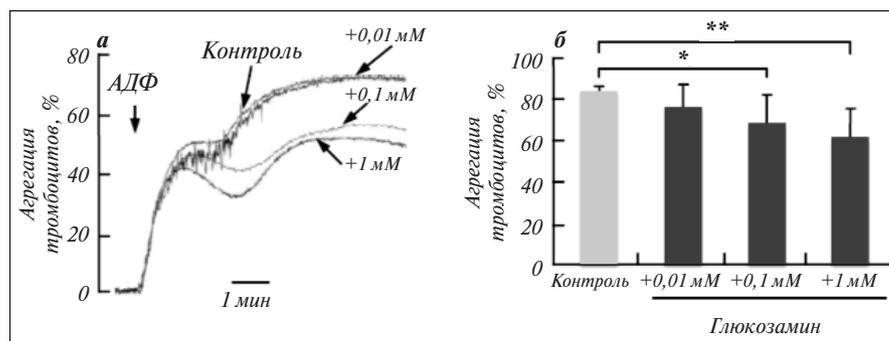


Рис. 3. Влияние глюкозамина *in vitro* на индуцированную АДФ агрегацию тромбоцитов у морских свинок: а – тромбоциты контрольных животных предварительно инкубировали в отсутствие глюкозамина (контроль) или с глюкозамин в течение 10 мин, а затем стимулировали 2 мкМ АДФ в агрегаторе; б – степень агрегации оценивали количественно; * – $p<0,05$, ** – $p<0,01$ [11]

сти против фактора Ха, характерной именно для 3-О-сульфатированных глюкозаминовых групп пентасахарида [17]. Синтетические соединения, несущие 3-О-сульфат на глюкозаминах, обладают более длительной антитромботической активностью, чем природные антитромбин III-связывающие пентасахариды. Такие структурные аналоги гепарина проявляют более длительную активность в отношении прокоагулянтного фактора Ха (период полувыведения, $T_{1/2}=9$ ч) по сравнению с природным пентасахаридом ($T_{1/2}=5$ ч) [18].

Инактивация сигнальных каскадов NF-κB тромбоцитов посредством мГС

Систематический анализ молекулярных механизмов действия мГС показал, что он взаимодействует с рецепторами CD44, TLR4 и ICAM1 на поверхности различных типов клеток. Связываясь с рецептором CD44, ХС и глюкозамин ингибируют провоспалительный транскрипционный фактор NF-κB. Это осуществляется за счет предотвращения деградации ингибирующей этот белок субъединицы IκB [1, 2]. Взаимодействуя с регулятором IκB, NF-κB не может перемещаться в клеточное ядро и активировать экспрессию генов, участвующих в воспалительной реакции.

Известно, что и белок NF-κB – потенциальная терапевтическая мишень и при атеросклерозе, и при тромбозе. В контексте атеросклероза существует ряд потенциальных стимулов, которые могут активировать NF-κB, включая традиционные факторы риска, инфекционные агенты, цитокины и др. NF-κB, в свою очередь, активирует синтез тканевого фактора коагуляции в субэндотелиальной ткани и лейкоцитах [19].

Ингибиторы NF-κB нарушают процесс активации тромбоцитов. Хотя тромбоциты представляют собой безъядерные клетки, они экспрессируют NF-κB, который осуществляет негеномные функции (в том числе регуляцию активации тромбоцитов). Помимо NF-κB, тромбоциты экспрессируют IκBa, и стимуляция тромбоцином вызывает фосфорилирование и деградацию IκBa. Два специфических ингибитора NF-κB – BAY 11-7082 и Ro 106-9920 – уменьшали связывание фибриногена с интегрином α (IIb) β_3 и снижали отклик (так называемое распластывание) тромбоцитов на действие фибриногена. Оба ингибитора нарушали агрегацию, опосредованную АДФ, адреналином, коллагеном или тромбином, но не арахидоновой кислотой. Выделение TxA₂,

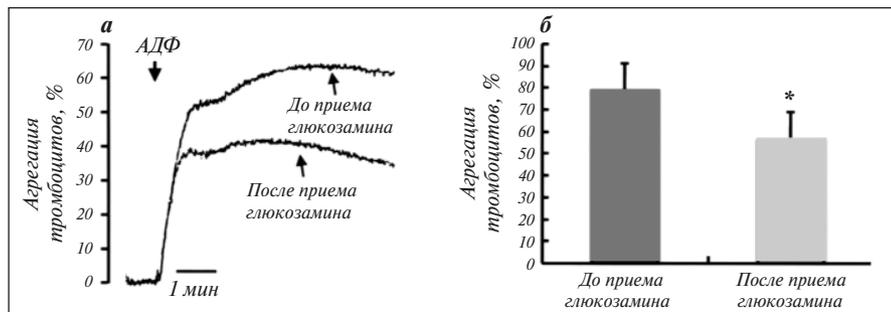


Рис. 4. Влияние перорального приема глюкозамина на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов у здоровых добровольцев: а — до и после перорального приема глюкозамина (1,5 г/сут в течение 1 нед); б — количественная оценка степени агрегации по максимальной высоте кривой; * — $p < 0,05$ [13]

экспрессия Р-селектина, фосфорилирование ERK и активность сPLA₂, стимулируемая тромбином, были снижены в тромбоцитах, обработанных ингибиторами. Таким образом, активная форма NF-κB является важным медиатором тромбоцитарных ответов на различные внешние стимулы [20], в том числе на фибриноген, коллаген, фактор, активирующий тромбоциты (PAF), фосфолипазу Сβ2, бактериальные липополисахариды (ЛПС) и др.

Ингибирование мГС активности NF-κB начинается с активации CD44 — основного рецептора, опосредующего противовоспалительные эффекты мГС и ХС. Дефицит активности рецептора CD44 (например, вследствие делеции гена) увеличивает активацию тромбоцитов. Тромбоциты мышей с делецией гена CD44 (cd44-/-) сравнивали с тромбоцитами мышей без делеции (cd44+/+). После стимуляции тромбином в тромбоцитах cd44-/- отмечалась более выраженная дегрануляция и активация интегрин α (IIb) β. Аггезия тромбоцитов и образование тромбов *in vitro* при высокой скорости движения крови в артериях вследствие их сужения были значительно увеличены у трансгенных мышей cd44-/- (рис. 5) [21].

Кроме того, проведенное ранее хемотранскриптомное исследование [19] показало многочисленные геномные эффекты мГС, связанные со снижением активности фактора NF-κB в клетках-предшественниках фибробластов. Отмечено снижение под влиянием мГС экспрессии самого фактора NF-κB (ген *NFKB2*), генов, вовлеченных в активацию NF-κB (белок, кодируемый геном *PYCARD*, рибосомальный белок S27a и др.), генов, участвующих в осуществлении биологических эффектов NF-κB (белок «фактор 2, связанный с рецептором фактора некроза опухоли, ФНО», ФНО-рецептор SF1B, ФНО лиганд SF12, активирующий NF-κB, белок «просома 26S», ускоряющий транспорт NF-κB в ядро, и др.), и генов, отвечающих за протеасомную деградацию белков и активацию NF-κB (убиквитин С, белок *BIRC2* и др.) [22, 23].

И геномное, и негеномное действие NF-κB связано с тем, что комплекс NF-κB/IκB регулирует не только воспаление и

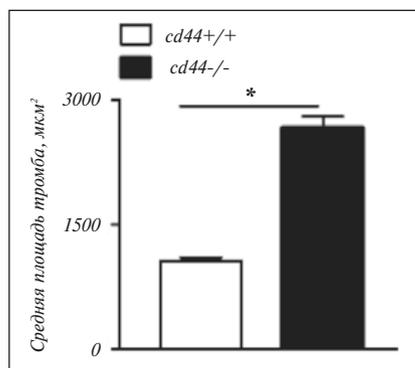


Рис. 5. CD44-зависимая адгезия тромбоцитов и образование тромбов *in vitro* при высокой скорости артериального кровотока у мышей. Средняя площадь тромба после перфузии цельной крови мышей cd44+/+ и мышей cd44-/- на поверхности с коллагеновым покрытием в течение 5 мин при высокой (1700 с⁻¹) скорости артериального сдвига; * — $p < 0,001$ (значимые различия тромбоцитов cd44+/+ и cd44-/-) [21]

апоптоз, но и активацию тромбоцитов. В тромбоцитах, несмотря на отсутствие ядра, имеется комплекс NF-κB/IκB и IκB-киназа (IKK), которая и фосфорилирует белок IκB во время активации тромбоцитов. При активации тромбоцитов, на фоне увеличения внутриклеточного потока Ca²⁺, происходит диссоциация NF-κB/IκB с протеолизом IκB и выделением активированного фактора NF-κB [24], важного для процессов воспаления и тромбообразования. Ингибируя диссоциацию комплекса NF-κB/IκB, мГС может предотвращать активацию тромбоцитов. Фактор, активирующий тромбоциты (PAF), индуцирует активацию NF-κB через G-белки. Индуцированная PAF активность NF-κB обнаруживается в течение 15 мин после стимуляции, достигает максимума в течение 30–40 мин и сохраняется до 2,5 ч. Молекула SR27417, специфический антагонист рецептора PAF, блокирует эффекты PAF на NF-κB [24]. Предотвращая образование активного PAF, мГС может уменьшать влияние PAF на активацию тромбоцитов.

NF-κB регулирует экспрессию фосфолипазы Сβ2 (PLCB₂) в клетках-предшественниках тромбоцитов. Фосфолипаза Сβ2 важна для активации тромбоцитов и формирования атеросклеротических бляшек [25], которые потенцируют тромбообразование, особенно при непосредственной близости или частичной деструкции бляшки. Ингибируя активность NF-κB, мГС может предотвращать избыточную экспрессию фосфолипазы Сβ2.

Снижение активности NF-κB специфическими ингибиторами приводит к подавлению активности протеасом и ослабляет коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Наличие открытых нитей коллагена является результатом повреждения ткани сосудистой стенки. Тромбоциты, контактируя с такими нитями коллагена, отвечают NF-κB-зависимой активацией протеасом. Ингибирование и протеасом, и эффектов NF-κB снижает индуцированную коллагеном активацию тромбоцитов: коллаген-индуцированная агрегация (1–2 мкг/мл) значительно снижалась после применения ингибитора протеасом эпоксомицина. Опосредованное эпоксомицином ингибирование агрегации тромбоцитов сохранялось и при подавлении высвобождения тромбоксана АСК. Однако ингибирование NF-κB посредством специфического антагониста Bay11-7082 уменьшало и агрегацию тромбоцитов, что указывает на важную роль NF-κB в активации тромбоцитов [26]. Кроме того, мГС предотвращает образование активной формы NF-κB, и это позволяет ожидать снижения активности протеасом в тромбоцитах.

Э К С П Е Р И М Е Н Т А Л Ь Н Ы Е И С С Л Е Д О В А Н И Я

Достоверные оценки хемопротеомных эффектов мГС и других молекул в отношении белков протеома человека, связанных со свертыванием крови

| Ошибка | Ген | Белок | мГС | АСК | ДКП | ДКФ | МКК |
|--------|-----------------|--|------|------|------|------|------|
| 0,19 | <i>ADORA2A</i> | Аденозиновый рецептор A _{2a} | 0,24 | 0,25 | 0,06 | 0,11 | 0 |
| 0,05 | <i>AT3</i> | Антитромбин III | 0,51 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,51 |
| 0,12 | <i>F12</i> | Коагуляционные факторы: XII III V IX | 0,47 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| 0,26 | <i>F3</i> | | 0,79 | 0,57 | 0,64 | 0,61 | 0,57 |
| 0,25 | <i>F5</i> | | 0,87 | 0,69 | 0,7 | 0,65 | 0,67 |
| 0,21 | <i>F9</i> | | 0,88 | 0,51 | 0,51 | 0,51 | 0,51 |
| 0,03 | <i>PLCG1</i> | Фосфолипаза С | 0,8 | 0,49 | 0,56 | 0,62 | 0,46 |
| 0,26 | <i>PPIA</i> | Пептидилпролил изомераза (циклофилин А) | 0,84 | 0,76 | 0,71 | 0,68 | 0,63 |
| 0,16 | <i>SELE</i> | Селектин Е | 0,83 | 0,39 | 0,74 | 0,84 | 0,69 |
| 0,02 | <i>SERPINE1</i> | Ингибитор активатора плазминогена 1 | 0,9 | 0,41 | 0,9 | 0,57 | 0,29 |
| 0,05 | <i>SOD1</i> | [Cu-Zn] Супероксиддисмутаза, активация | 0,29 | 0,58 | 0 | 0 | 0,65 |

Примечание. Приведены оценки вероятностей ингибирования белков (за исключением *SOD1*, для которого представлены вероятности активации).

Эксперименты показали, что *NF-kB* участвует в отклике тромбоцитов на лиганды *Toll*-подобных рецепторов 2 и 4. Стимуляция тромбоцитов агонистами *Toll*-рецепторов *Ram3CSK4* или ЛПС приводила к деградации *IкВa* и активации *NF-kB*. Эти реакции усиливались тромбином и подавлялись ингибиторами *NF-kB* (*BAY11-7082*, *Ro106-9920*) [27]. Активация *TLR4* посредством бактериальных ЛПС вызывает высвобождение фактора фон Виллебранда через *NF-kB*, интерлейкин 1 β , стимулирует АТФ-зависимую внутриклеточную мобилизацию Ca^{2+} , продуцирование *TxA₂*, пуриnergическую активацию рецепторов *P2Y1* и *P2Y12* и в целом потенцирует тромбин-зависимую агрегацию тромбоцитов [27]. Как было показано ранее [1], *Toll*-рецепторы относятся к числу медиаторов биологических эффектов мГС и негативное влияние их активации будет тормозиться при ингибировании мГС действия *NF-kB*.

В эксперименте активация пути *NF-kB* ухудшает механизм антикоагулянтного действия протеина С и способствует коагуляции крови. Протеин С — один из наиболее важных физиологических ингибиторов свертывания — проявляет антикоагулянтную активность, косвенно усиливая фибринолиз и ограничивая размеры тромба. В активной форме протеин С инактивирует факторы свертывания *VIIIa* и *Va*. Блокада *NF-kB* предотвращала повышение концентрации плазменных маркеров коагуляции и снижение уровня эндотелиальных рецепторов протеина С, вызываемых введением ЛПС. Блокада *NF-kB* также ингибировала эндотелиальную экспрессию тканевого фактора и фактора *VIII*. Таким образом, эндотелиальная сигнализация *NF-kB* играет ключевую роль в септической гиперкоагуляции и нарушает активность антикоагуляционного пути «тромбомодулин-протеин С» [28]. Ингибирование *NF-kB* посредством мГС будет оказывать схожее влияние на протеин С и септическую гиперкоагуляцию.

Хемореактомное исследование механизмов антитромботического действия мГС

С целью дальнейшего уточнения молекулярных механизмов антитромботического действия мГС нами было

проведено хемореактомное исследование его эффектов с использованием современных технологий интеллектуального анализа данных: комбинаторной теории разрешимости [29] в применении к хемограммам (χ -граммам) [30, 31] и метрических методов анализа данных [32–34], позволяющих вычислять «химическое расстояние» между молекулой мГС и любой другой молекулой, для которой известны те или иные антитромботические свойства.

В результате анализа были рассчитаны значения более 500 активностей в тромбоцитах и цельной крови человека. Оценка антитромботических эффектов мГС и различных нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) в тромбоцитах и цельной крови человека позволила установить различия в антитромботических эффектах исследованных молекул по отношению к ингибированию: 1) агрегации тромбоцитов; 2) адгезии и рецепторов активации тромбоцитов; 3) синтеза тромбоксанов; 4) коагуляции. В среднем по всем указанным антитромботическим активностям эффекты мГС были всего на 20–50% меньше, чем эффекты таких известных НПВП, как АСК, декскетопрофен (ДКП), диклофенак (ДКФ) и мелоксикам (МКК). Хемопротеомный анализ белков человека, с которыми могут взаимодействовать исследуемые молекулы (см. таблицу), подтвердил, что мГС (действующее вещество препарата Сустагарт Артро) и НПВП могут взаимодействовать с аденозиновым рецептором (что обуславливает влияние на АДФ-зависимую агрегацию тромбоцитов), с антитромбином и коагуляционными факторами XII, III, V, IX (что способствует ингибированию каскада коагуляции крови).

Результаты проведенного нами хемореактомного анализа позволяют утверждать, что, хотя антитромботические эффекты мГС в среднем в 1,5–3 раза слабее, чем эффекты исследованных НПВП, адьювантная терапия мГС+НПВП позволяет повысить эффективность антитромботического компонента лечения и снизить дозу НПВП. В исследованиях последних лет показано повышение риска кардиотоксичности при использовании НПВП. Поэтому подбор минимальной достаточной дозы НПВП — насущная проб-

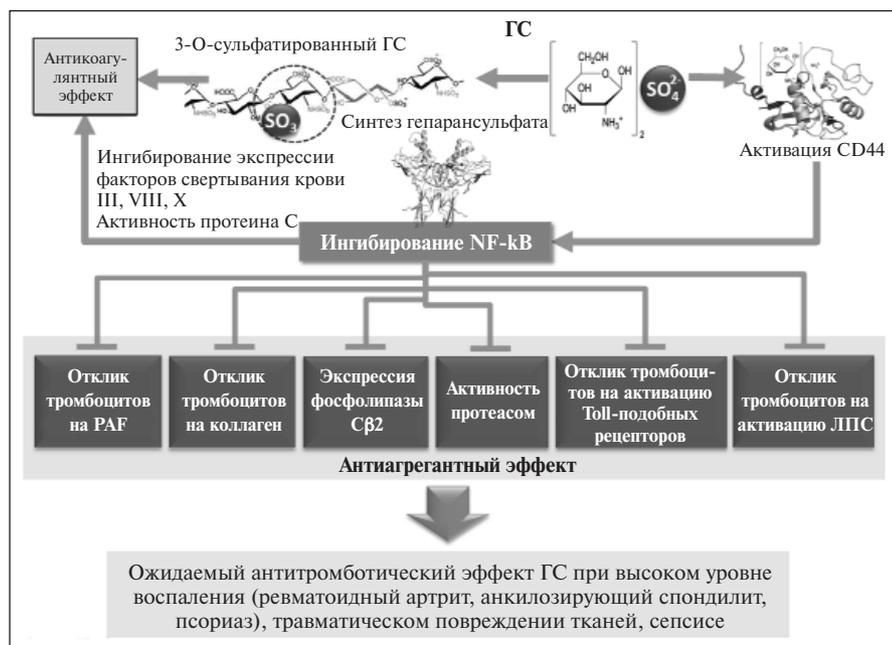


Рис. 6. Молекулярные механизмы антитромботических эффектов молекулы мГС (Сустагард Артро). ГС – глюкозамина сульфат

лянтными свойствами. Систематический анализ фундаментальных исследований позволил определить основные молекулярные механизмы антитромботических эффектов мГС. Во-первых, молекула мГС осуществляет своего рода мимикрию активности гепаринов. Во-вторых, она инактивирует сигнальные каскады NF-κB тромбоцитов. Основным «антикоагулянтным» структурным фрагментом молекул гепаринов является 3-О-сульфогруппа глюкозамина, принципиально важная для антитромботической активности. Такая сульфогруппа может образовываться при прохождении молекулой мГС биотрансформаций в организме. Инактивация NF-κB тромбоцитов посредством мГС осуществляется через активацию рецепторов CD44, которые способствуют диссоциации комплекса NF-κB/IκB с образованием активной формы NF-κB. Ингибирование NF-κB посредством мГС не

только регулирует воспаление и апоптоз, но и снижает активацию тромбоцитов. При этом уменьшаются: 1) отклик тромбоцитов на фактор, активирующий тромбоциты (PAF), и на коллаген; 2) экспрессия важной для активации тромбоцитов фосфолипазы C5b2 в клетках-предшественниках тромбоцитов; 3) активность протеасом; 4) отклик тромбоцитов на активацию лигандами Toll-подобных рецепторов и на активацию бактериальными ЛПС. Все эти молекулярные эффекты способствуют ослаблению агрегации тромбоцитов, индуцированной коллагеном, АДФ и другими факторами. Кроме того, блокада NF-κB молекулой мГС может давать и антикоагулянтный эффект посредством ингибирования эндотелиальной экспрессии факторов свертывания крови (тканевый фактор, или фактор III, фактор VIII, фактор X) и усиления антикоагулянтного действия протеина С (рис. 6).

лема при проведении длительной фармакотерапии. В соответствии с результатами настоящей работы наиболее подходящим синергистом мГС с точки зрения антитромботических эффектов является АСК, которая также применяется длительно (годами, десятилетиями). Поэтому комбинация мГС+АСК, при условии персонализированного подбора доз обоих препаратов, весьма перспективна и для терапии ОА, и для профилактики тромбообразования. Персонализированное назначение мГС и АСК должно осуществляться с учетом профиля коморбидных заболеваний, вариантов генетических полиморфизмов и микронутриентного статуса пациента.

Заключение

Экспериментальные и клинические исследования показали, что мГС обладает антиагрегантными и антикоагу-

ЛИТЕРАТУРА

1. Громова ОА, Торшин ИЮ, Лиля АМ, Громов АН. Молекулярные механизмы глюкозамина сульфата при лечении дегенеративно-дистрофических заболеваний суставов и позвоночника: результаты протеомного анализа. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2018;10(2):38–44. [Gromova OA, Torshin IYu, Lila AM, Gromov AN. Molecular mechanisms of action of glucosamine sulfate of action of degenerative-dystrophic diseases of the joints and spine: results of proteomic analysis. *Neurologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics*. 2018;10(2):38–44. (In Russ.)]. doi: 10.14412/2074-2711-2018-2-38-44.
2. Лиля АМ, Громова ОА, Торшин ИЮ и др. Молекулярные эффекты хондрогад при остеоартрите и грыжах межпозво-
- ночного диска. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2017;9(3):88–97. [Lila AM, Gromova OA, Torshin IYu, et al. Molecular effects of chondroguard in osteoarthritis and herniated discs. *Neurologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics*. 2017;9(3):88–97. (In Russ.)]. doi: 10.14412/2074-2711-2017-3-88-97.
3. Yokotani K, Nakanishi T, Chiba T, et al. Glucosamine and chondroitin sulfate do not enhance anticoagulation activity of warfarin in mice in vivo. *Shokuhin Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 2014;55(4):183–7. doi:10.3358/shokueishi.55.183
4. Bertram J, Ragatz BH, Baldwin W, Iatrides PG. The effects of glucosamine on platelet aggregation. *Thromb Res*. 1981 Aug 1; 23(3):301-7. doi: 10.1016/0049-3848(81)90019-0.
5. Legrand Y, Caen JP, Robert L. Effect of glucosamine on platelet-collagen reaction. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1968 Mar;127(3): 941-3. doi: 10.3181/00379727-127-32840.
6. Reginster J-YL, Arden NK, Haugen IK, et al. Guidelines for the conduct of pharmacological clinical trials in hand osteoarthritis: Consensus of a Working Group of the European Society on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO). *Semin Arthritis Rheum*. 2018 Aug;48(1):1-8. doi: 10.1016/j.semarthrit.
7. Pocobelli G, Kristal AR, Patterson RE, et al. Total mortality risk in relation to use of less-common dietary supplements. *Am J Clin Nutr*. 2010 Jun;91(6):1791-800. doi: 10.3945/ajcn.2009.28639. Epub 2010 Apr 21.

8. Katoh A, Kai H, Harada H, et al. Oral Administration of Glucosamine Improves Vascular Endothelial Function by Modulating Intracellular Redox State. *Int Heart J*. 2017 Dec 12;58(6):926-932. doi: 10.1536/ihj.16-534. Epub 2017 Nov 17.
9. Kinlough-Rathbone RL, Packham MA, Mustard JF. Effect of amino sugars on platelet aggregation and on fibrinogen binding. *Thromb Haemost*. 1984 Aug 31;52(1):75-80.
10. Tandon NN, Ordinas A, Jamieson GA. Effects of N-acetylglucosamine and platelet inhibitors on the synergistic interaction of platelets and aggregating agents in the presence of wheat germ agglutinin. *Biochim Biophys Acta*. 1982 Nov 24;719(2):388-95. doi:10.1016/0304-4165(82)90114-3
11. Lu-Suguro JF, Hua J, Sakamoto K, Nagaoka I. Inhibitory action of glucosamine on platelet activation in guinea pigs. *Inflamm Res*. 2005 Dec;54(12):493-9. doi: 10.1007/s00011-005-1384-3.
12. Hua J, Suguro S, Iwabuchi K, et al. Glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide, suppresses the АДФ-mediated platelet activation in humans. *Inflamm Res*. 2004 Dec;53(12):680-8. doi: 10.1007/s00011-004-1312-y.
13. Lin PC, Jones SO, McGlasson DL. Effects of glucosamine and Celadrin on platelet function. *Clin Lab Sci*. 2010 Winter;23(1):32-6.
14. Lima MA, Viskov C, Herman F, et al. Ultra-low-molecular-weight heparins: precise structural features impacting specific anticoagulant activities. *Thromb Haemost*. 2013 Mar;109(3):471-8. doi: 10.1160/TH12-11-0795. Epub 2013 Jan 17.
15. McCarty MF. Glucosamine may retard atherogenesis by promoting endothelial production of heparan sulfate proteoglycans. *Med Hypotheses*. 1997 Mar;48(3):245-51.
16. Edavettal SC, Lee KA, Negishi M, et al. Crystal structure and mutational analysis of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 1. *J Biol Chem*. 2004 Jun 11;279(24):25789-97. doi: 10.1074/jbc.M401089200. Epub 2004 Apr 1.
17. Walenga JM, Petitou M, Samama M, et al. Importance of a 3-O-sulfate group in a heparin pentasaccharide for antithrombotic activity. *Thromb Res*. 1988 Dec 15;52(6):553-63. doi:10.1016/0049-3848(88)90128-4.
18. Meuleman DG, Hobbelen PM, Van Dintner TG, et al. Antifactor Xa activity and antithrombotic activity in rats of structural analogues of the minimum antithrombin III binding sequence: discovery of compounds with a longer duration of action than of the natural pentasaccharide. *Semin Thromb Hemost*. 1991;17 Suppl 1:112-7.
19. Monaco C, Paleolog E. Nuclear factor kB: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Res*. 2004 Mar 1;61(4):671-82. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.11.038.
20. Malaver E, Romaniuk MA, D'Atri LP, et al. NF-kB inhibitors impair platelet activation responses. *J Thromb Haemost*. 2009;7:1333-43. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03492.x. Epub 2009 Jun 3.
21. Liu G, Liu G, Alzoubi K, et al. CD44 sensitivity of platelet activation, membrane scrambling and adhesion under high arterial shear rates. *Thromb Haemost*. 2016 Jan;115(1):99-108. doi: 10.1160/TH14-10-0847. Epub 2015 Sep 10.
22. Торшин ИЮ, Громова ОА, Лиля АМ и др. Результаты постгеномного анализа молекулы глюкозамина сульфата указывают на перспективы лечения коморбидных заболеваний. Современная ревматология. 2018;12(4):129–136. [Torshin IYu, Gromova OA, Lila AM, et al. The results of postgenomic analysis of a glucosamine sulfate molecule indicate the prospects of treatment for comorbidities. *Sovremennaya Revmatologiya=Modern Rheumatology Journal*. 2018;12(4):129–136. (In Russ.)]. doi: 10.14412/1996-7012-2018-4-129-136.
23. Торшин ИЮ, Громова ОА, Наумов АВ. и др. Хемотранскриптомный анализ молекулы глюкозамина сульфата в контексте постгеномной фармакологии. РМЖ. Клинические рекомендации и алгоритмы. 2019;1(1):2-9. [Torshin IYu, Gromova OA, Naumov AV, et al. Chemical transcriptome analysis of glucosamine sulfate molecule in the context of post-genomic pharmacology. *RMJ*. 2019;1(1):2-9. (In Russ.)].
24. Kravchenko VV, Pan Z, Han J, et al. Platelet-activating factor induces NF-kappa B activation through a G protein-coupled pathway. *J Biol Chem*. 1995 Jun 23;270(25):14928-34. doi: 10.1074/jbc.270.25.14928.
25. Mao G, Jin J, Kunapuli SP, Rao AK. Nuclear factor-kB regulates expression of platelet phospholipase C-beta2 (PLCB2). *Thromb Haemost*. 2016 Oct 28;116(5):931-940. doi: 10.1160/TH15-09-0749. Epub 2016 Jul 28.
26. Grundler K, Rotter R, Tilley S, et al. The proteasome regulates collagen-induced platelet aggregation via nuclear-factor-kappa-B (NFkB) activation. *Thromb Res*. 2016 Dec;148:15-22. doi: 10.1016/j.thromres.2016.10.009. Epub 2016 Oct 13.
27. Rivadeneira L, Carestia A, Etulain J, et al. Regulation of platelet responses triggered by Toll-like receptor 2 and 4 ligands is another non-genomic role of nuclear factor-kB. *Thromb Res*. 2014 Feb;133(2):235-43. doi: 10.1016/j.thromres.2013.11.028. Epub 2013 Dec 1.
28. Song D, Ye X, Xu H, Liu SF. Activation of endothelial intrinsic NF-kB pathway impairs protein C anticoagulation mechanism and promotes coagulation in endotoxemic mice. *Blood*. 2009 Sep 17;114(12):2521-9. doi: 10.1182/blood-2009-02-205914. Epub 2009 Jul 20.
29. Torshin I.Y. The study of the solvability of the genome annotation problem on sets of elementary motifs. *Pattern Recognition and Image Analysis*. 2011;21(4):652-62.
30. Torshin IY, Rudakov KV. 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*. 2014; 24(1):11-23.
31. Torshin IY, Rudakov KV. 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*. 2014;24(2):196-208.
32. Torshin IYu, Rudakov KV. On the theoretical basis of the metric analysis of poorly formalized problems of recognition and classification. *Pattern Recognition and Image Analysis*. 2015;25(4):577-87. doi: 10.1134/S1054661815040252
33. Torshin IY, Rudakov KV. On metric spaces arising during formalization of problems of recognition and classification. Part 1: properties of compactness. *Pattern Recognition and Image Analysis*. 2016;26(2):274-84. doi: 10.1134/S1054661816020255
34. Torshin IYu, Rudakov KV. On metric spaces arising during formalization of problems of recognition and classification. Part 2: density properties. *Pattern Recognition and Image Analysis*. 2016;26(3):483-96. doi: 10.1134/S1054661816030202

Поступила 20.04.2019

Исследование выполнено по гранту №17-07-01419 РФФИ.

Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

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 терапия⁵:**
пероральный глюкозамина сульфат
в виде саше СУСТАГАРД® АРТРО



• 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)

ЛСР-00926 8/09, ЛП-003149

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



РЕКЛАМА