

Лила А.М.¹, Громова О.А.², Торшин И.Ю.³, Назаренко А.Г.⁴, Гоголев А.Ю.²

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия», Иваново, Россия;

³ФГБУ «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» РАН, Москва, Россия;

⁴ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, Москва, Россия

¹115522 Москва, Каширское шоссе, 34А; ²153000, Иваново, Шереметевский пр., 8; ³119333, Москва, ул. Вавилова, 40;

⁴125047, Москва, ул. 4-я Тверская-Ямская, 16

Молекулярные эффекты хондрогарда при остеоартрите и грыжах межпозвоночного диска

Хондроитина сульфаты (ХС) являются «строительным материалом» хряща, оказывают противовоспалительный и антиоксидантный эффект. Приведены результаты анализа фармакологического состава препарата хондрогард и его фармацевтической субстанции CS-BIOACTIVE©Биоиберики С.А.У (Испания). Обсуждаются молекулярно-физиологические механизмы действия ХС при экструзиях и протрузиях межпозвоночных дисков.

Ключевые слова: остеоартрит; грыжи межпозвоночного диска; хондроитина сульфаты; таргетные белки; молекулярные механизмы; паравертебральное внутримышечное введение; хондрогард.

Контакты: Александр Михайлович Лила; amlila@mail.ru

Для ссылки: Лила АМ, Громова ОА, Торшин ИЮ и др. Молекулярные эффекты хондрогарда при остеоартрите и грыжах межпозвоночного диска. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2017;9(3):88–97.

Molecular effects of chondroguard in osteoarthritis and herniated discs

Lila A.M.¹, Gromova O.A.², Torshin I.Yu.³, Nazarenko A.G.⁴, Gogolev A.Yu.²

¹V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia; ²Ivanovo State Medical Academy, Ivanovo, Russia;

³Federal Research Center «Informatics and Control», Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; ⁴Acad. N.I. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

¹34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522; ²8, Sheremetevsky Pr., Ivanovo 153000; ³40, Vavilov St., Moscow 119333;

⁴16, Fourth Tverskaya-Yamskaya St., Moscow 125047

Chondroitin sulfates (CS) are a building material for the cartilage and have anti-inflammatory and antioxidant effects. The paper gives the results of analyzing the pharmaceutical composition of chondroguard and its pharmaceutical substance CS-BIOACTIVE (CS-BIOACTIVE©Bioiberika S.A.U., Spain). It discusses the molecular-physiological mechanisms of action of CS in intervertebral disc extrusions and protrusions.

Keywords: osteoarthritis; herniated discs; chondroitin sulfates; target proteins; molecular mechanisms; paravertebral intramuscular injection; chondroguard.

Contact: Aleksandr Mikhailovich Lila; amlila@mail.ru

For reference: Lila AM, Gromova OA, Torshin IYu, et al. Molecular effects of chondroguard in osteoarthritis and herniated discs. Nevrologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics. 2017;9(3):88–97.

DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/2074-2711-2017-3-88-97>

Основу гомеостаза межпозвоночного диска составляет баланс образующих его компонентов. Нарушения кровоснабжения, повышенная интенсивность системного воспаления, дефицит гиалуроновой кислоты, глюкозамина сульфата (ГС) и хондроитина сульфата (ХС) приводят к дегенеративным изменениям позвоночника [1]. Формирование грыжи межпозвоночного диска сопровождается резким болевым синдромом, стойкими неврологическим выпадениями двигательных и чувствительных функций. Операции по удалению грыжи не останавливают дегенеративный процесс и не исключают образования повторных грыж. В качестве консервативной терапии грыж межпозвоночного диска обсуждается поддержка метаболизма соединительной ткани хряща (хондропротекция) с использованием таких молекулярных компонентов соединительной ткани, как ХС. Последние вырабатываются хондроцитами и являются центральным компонентом «гелевой основы» хряща, связок,

мышц, кости, синовиальной жидкости. Молекулы ХС представляют собой полимеры, состоящие из длинных полисахаридов, содержащих повторяющиеся дисахаридные единицы (рис. 1, а). Каждая из таких единиц включает N-ацетилглюкозамин и D-глюкуроновую кислоту и может сульфатироваться (образовывать сложный эфир с анионом серной кислоты). ХС отличаются по длине, характеризуются числом полимеризации (n, число повторов дисахаридных единиц: n=20–200) и степени сульфатирования, что обуславливает различия в молекулярной массе ХС. Поэтому более уместно говорить о *хондроитина сульфатах*. С фармакологической точки зрения, ХС являются хондропротекторами и способствуют активной регенерации хряща; ХС повышают эластичность и механическую прочность хряща, сухожилий, обеспечивают гидратацию и накопление гиалуроновой кислоты и противовоспалительных цитокинов в хряще и синовии [2–7].

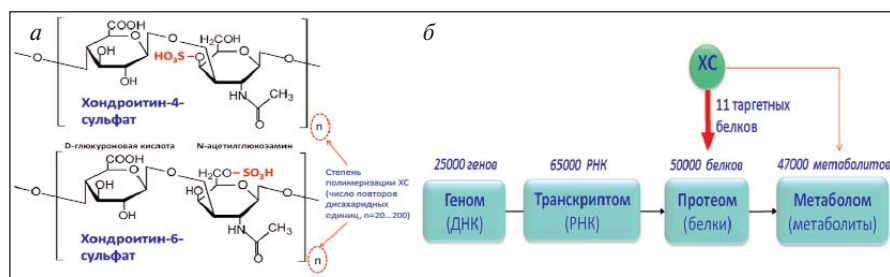


Рис. 1. Химическая структура (а) и биологические эффекты ХС в постгеномной перспективе (б)

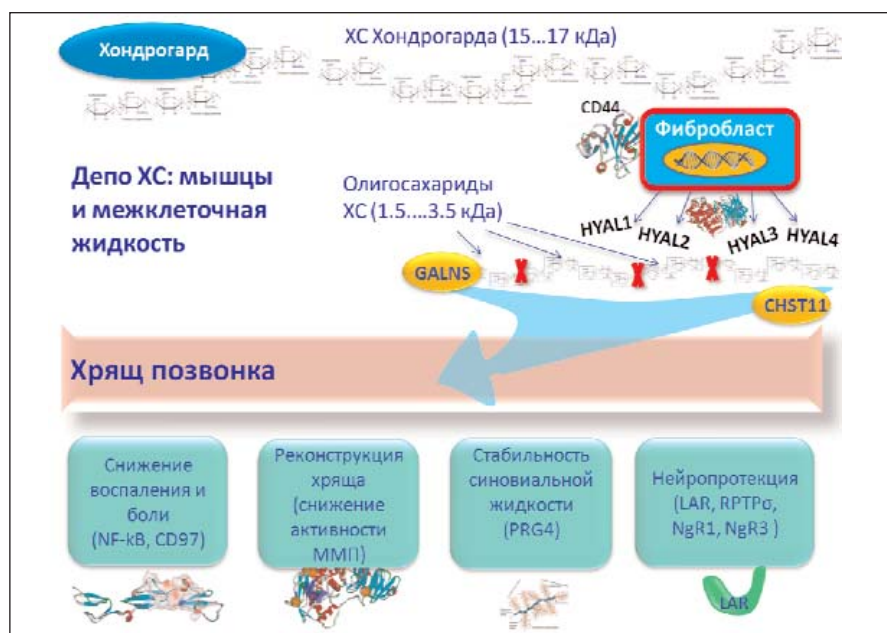


Рис. 2. Действие препарата хондрогард при грыжах и протрузиях межпозвоночного диска

Результаты метаанализов клинических исследований указали на высокую эффективность ХС в лечении заболеваний, при которых поражается хрящ [2].

В настоящей работе представлены результаты систематического анализа молекулярных механизмов действия ХС, в том числе биоинформационного анализа генома, фармакопротеомных исследований эффектов ХС, данные о противовоспалительном, противовоспалительном действии ХС, фармакокинетике и фармакологической безопасности ХС различного происхождения и состава. Приведены также результаты анализа фармакологического состава препарата хондрогард и механизмов его действия на мышечную и соединительную ткань, состав синовиальной и спинномозговой жидкости (СМЖ), а также маркеры воспаления.

Биоинформационный анализ генома и протеома человека и механизмы действия ХС

Для детального описания механизмов биологических и фармакологических эффектов ХС проанализированы их возможные взаимодействия с белками протеома человека. Оценить реальный масштаб действия ХС на организм человека позволяет изучение их эффектов в постгеномной перспективе (рис. 1, б), т. е. воздействия на

геном (совокупность всех генов организма), транскриптом (совокупность всех РНК), протеом (совокупность всех белков) и метаболом (совокупность всех метаболитов).

Поиск по базам данных NCBI PROTEIN, EMBL, UNIPROT, Human Proteome Map (HPM), BIOCYS-HUMAN и др. показал, что в протеоме человека существует по меньшей мере 120 белков, активность которых связана с ХС, из них методом функционального связывания [3] было выделено 11 целевых белков для ХС (табл. 1).

Активация под влиянием ХС рецептора CD44 снижает избыточную активность матричных металлопротеиназ (MMP) за счет регулирования транскрипции генов [5], способствует повышению активности хондроитинсульфатных гликозилтрансфераз CHPF, CSGALNACT1, CSGALNACT2 (реконструкция соединительной ткани) [6], снижению активации NF-κB провоспалительных цитокинов интерлейкина (ИЛ) 1, 6, фактора некроза опухолей α (ФНОα) и СРБ [7–13].

В целом основной механизм фармакологического действия ХС можно представить следующим образом (рис. 2). Так как ХС — это молекулы с высокой молекулярной массой (>10 кДа), они оказывают эффект посредством взаимодействия с белками-рецепторами CD44, TLR4 и ICAM1 [14] на поверхности хондроцитов. Связываясь с рецептором

CD44, ХС снижают транскрипцию провоспалительного сигнального фактора NF-κB, блокируя провоспалительные сигнальные пути с участием белков ADAMTS, MMP, ИЛ1β и др. [15]. ХС также могут взаимодействовать с провоспалительными рецепторами: 4TLR4, цитозольным адаптерным белком MyD88, участвующим в передаче сигнала от толл-подобных рецепторов, а также рецептором ФНОα на поверхности лимфоцитов [16].

Согласно данным [17], ХС ингибируют синтез простагландина E и MMP при стимуляции клеток ИЛ1β. При воздействии ИЛ1β установлена повышенная экспрессия провоспалительных белков, вовлеченных в синтез простагландинов (COX2, mPGES1), MMP3, MMP13, RANKL (активация остеокластов). Показано, что ХС подавляет ИЛ1β-индуцированную экспрессию COX2 (-62%; p<0,001), mPGES1 (-63%; p<0,001), MMP3 (-39%; p=0,08), MMP13 (-60%; p<0,001) и RANKL (-84%; p<0,001) [17–18].

Для исследования всего комплекса действия ХС на клетки и ткани организма были проведены фармакопротеомные исследования [7, 8, 19–23], в которых изучалось влияние ХС на уровень экспрессии всех известных белков протеома человека. Фармакопротеомное исследование эффектов ХС у здоровых добровольцев позволило установить

Таблица 1. *Результаты биоинформационного анализа генома и протеома человека, при котором установлены наиболее вероятные таргетные белки фармакологического действия ХС*

Ген	Белок	Функция белка	Роль ХС в белке
GALNS	N-ацетилгалактозамин 6-сульфатаза (хондроитиназа)	Гидролиз 6-сульфатных групп ХС, кофактор ионов кальция	Субстрат хондроитиназы
CHST11	Карбогидрат-сульфотрансфераза 11	Сульфатирование 4-й позиции N-ацетилглюкозамина ХС	Субстрат сульфотрансферазы
CD44	Рецептор CD44	Рецептор ХС/гиалуриновой кислоты, деградация ХС и гиалуронана	Активация рецептора CD44
HYAL1, HYAL2	Гиалурунидаза 1, 2	Деградация ХС и гиалуронана	Субстрат гиалурунидазы
MMP1, MMP3	ММП 1, 3	Деградация соединительнотканной основы хряща и связок	Ингибитор MMP1, 3
MMP16	ММП 16	Деградация коллагена III, взаимодействие с ХС	Ингибитор MMP16
MMP24	ММП 24	Медиатор воспалительной гипералгезии	Ингибитор MMP24
CD97	Рецептор CD97	Активация лейкоцитов, изоформа 1 взаимодействует с ХС	Ингибитор CD97
PRG4	Протеогликан 4 (лубрицин)	Предотвращение отложения белков из синонии на хрящ	Компонент для синтеза лубрицина

оптимальную экспрессию 31 белка, в том числе повышение уровня белков энергетического метаболизма (31%) и биосинтеза (13%), а также многочисленных сигнальных белков (54%) [19].

В фармакопротеомном исследовании у здоровых добровольцев, принимавших ХС (1200 мг/сут) и ГС (1500 мг/сут), установлено *снижение активности цитокиновых сигнальных путей* [8]. Показано, что прием ХС предотвращает деградацию субъединицы Iκ-Bα, ингибирующей провоспалительный сигнальный белок NF-κB. Взаимодействуя с регулятором Iκ-Bα, NF-κB теряет способность перемещаться в клеточное ядро и активировать экспрессию генов, участвующих в воспалительной реакции. В этом исследовании были изучены сигнальные пути, которые активируются под влиянием ХС и воздействуют на процессы воспаления: 1) JAK/STAT (сигнальный путь для осуществления эффектов широкого диапазона цитокинов и факторов роста); 2) синтез IgA в кишечнике (повышение барьерного иммунитета); 3) регуляция трансэндотелиальной миграции лейкоцитов; 4) связывание рецепторов гематопэтина/интерферонов. Среди наиболее значимых белков, уровень которых существенно изменяется под действием ХС + ГС, были белки клеточной адгезии THBS4, ITGA и ITGB, поддерживающие структуру соединительной ткани [8].

В другом фармакопротеомном исследовании хондроцитов, полученных у пациентов с остеоартритом (ОА) [20], показано, что обработка хондроцитов ХС повышала секрецию компонентов внеклеточного матрикса соединительной ткани (коллаген, аннексин, тенасцин, агрекан), факторов роста соединительной ткани (PENK, CTGF) и снижала уровень протеаз, с которыми связана деградация соединительной ткани (SERPINA3, SERPIN1). Таким образом, ХС не только являются «строительным материалом» хряща, но и потенцируют синтез компонентов хрящевой ткани, снижают активность про-

цессов деградации этой вновь образованной ткани. Стимулирование клеток ИЛ1β после обработки хондроцитов ХС уменьшало провоспалительный отклик хондроцитов на данный цитокин за счет снижения активации MMP1 и MMP3 [21].

При обработке клеток ХС было установлено также выраженное повышение уровня тромбоспондина 1 (TSP1), многофункционального гликопротеина суставного хряща [22] и ингибитора ангиогенеза [23]. Ангиогенез играет ключевую роль в патофизиологии ОА [24]. Повышенная экспрессия TSP1 уменьшает выраженность воспалительных реакций и образование новых сосудов при этом заболевании [25]. Повышение экспрессии белка TSP1 под действием ХС является важным молекулярным звеном антиартритического действия ХС.

Молекулярные механизмы действия ХС при ОА

ХС поддерживают регенерацию соединительной ткани. Механизмы противоартритического действия ХС в хондроцитах сустава и фибробластах синонии в концентрации 1–100 мкг/мл включают подавление экспрессии агреканазы 1/A (разрушает протеогликан агрекан – важный структурный компонент хряща), MMP13 (уровень которых повышается при воздействии ИЛ1β) и усиливают выработку тканевого ингибитора ММП типа ТИМП3 [4, 5]. При ОА коленного сустава снижены как средняя концентрация ХС (12,04 мкг/мл, норма – 14,84 мкг/мл; $p=0,021$), так и молекулярная масса, отражающая среднюю длину цепей ХС (5,36 кДа, норма – 6,19 кДа; $p=0,026$). В очаге поражения установлен сниженный уровень экспрессии генов, кодирующих хондроитинсульфатные гликозилтрансферазы CHPF, CSGALNACT1, CSGALNACT2 (способствующие реконструкции соединительной ткани), и повышена активность оказывающих деструктивное воздействие на хрящ ММП [6].

Молекулярные механизмы противовоспалительного эффекта ХС

ХС снижают активацию NF-κB и биомаркеров воспаления ИЛ1, ИЛ6 и СРБ [7]. Прием ХС (1200 мг/сут) и ГС (1500 мг/сут), согласно данным исследования группы здоровых добровольцев с повышенным индексом массы тела (25–32 кг/м², n=18, 20–55 лет), в течение 28 дней приводил к снижению содержания СРБ на 23% по сравнению с плацебо (p=0,048) [8], а по данным другого исследования [9], — на 28–36% (n=220). В исследовании, включавшем 10 000 взрослых здоровых добровольцев, регулярное использование ХС + ГС было связано с уменьшением уровня СРБ (на 20%) [10]. В эксперименте показано, что ХС дозозависимо снижают избыточный синтез провоспалительного ИЛ1β (p=0,003) и ФНО (p=0,02) в модели воспаления, вызванной кристаллами уратов [12].

Основной молекулярный механизм противовоспалительного действия ХС — *ингибирование транслокации внутрь ядра транскрипционного фактора NF-κB, одного из центральных медиаторов воспаления*. В норме NF-κB практически не связывается с ДНК хондроцитов. В модели коллаген-индуцированного артрита связывание NF-κB с ДНК значительно увеличивалось [13]. Введение ХС приводило к значительному ингибированию связывания NF-κB с ДНК хондроцитов.

Молекулярные механизмы нейропротективного действия ХС

Хондроитинсульфатные протеогликаны — важные модуляторы в ЦНС: они *влияют на направление роста нейрональных конусов (за счет обеспечения механического каркаса в межнейрональном пространстве), способствуют созреванию синапсов, а также регулируют синаптическую пластичность*. После повреждения нейронов (черепно-мозговая травма, травма спинного мозга и др.) синтез ХС в глии резко повышается с последующим образованием глиального рубца вокруг места поражения. Эффекты ХС в ЦНС осуществляются, в частности, за счет взаимодействия с нейрональными рецепторами тирозинфосфатазы σ (RPTPσ, участвуют в синаптогенезе) и ретикулон-рецепторами NgR1 и NgR3 (регенерация аксона) [26]. ХС необходимы для регулирования дифференцировки нейрональных клеток-предшественников. Недостаточность ХС в нервной пластинке эмбриона приводит к снижению экспрессии SOX2 [27].

ХС проявляют антиоксидантные и нейропротективные свойства за счет активации сигнального пути PKC/PI3K/Akt, вследствие чего происходят повышение уровня антиоксидантного фермента гемоксигеназы 1 и подавление активации каспазы 3. Нейропротективными свойствами обладают и дисахариды N-ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты, образующиеся при метаболизме ХС [28, 29].

Нейропротективное действие ХС на нейроны в области проекции грыжи способствует *постепенному снижению уровня провоспалительных цитокинов в СМЖ* (постепенно, так как полное обновление СМЖ занимает до 7 сут). При остеохондрозе позвоночника и грыжах межпозвоночного диска может отмечаться повышение давления СМЖ на нервную ткань. Если соединительная ткань в регионе грыжевого поражения ослаблена, то происходит растяжение соединительнотканых оболочек спинного мозга, что увеличивает секрецию провоспалительных цитокинов и усугубляет болевой синдром. У пациента могут отмечаться не только

боль в спине, связанная с повышением давления в позвоночном канале, но и парестезии, гиперестезии в зоне компрессии спинномозговых нервов.

Спинномозговой нерв состоит из двух корешков: переднего (двигательного) и заднего (чувствительного). Корешки соединяются в межпозвоночном отверстии, т. е. в непосредственной близости от грыжи. Кроме того, при выходе из межпозвоночного отверстия грыжа сдавливает не только корешки, но и так называемую оболочечную ветвь, идущую к соединительнотканым оболочкам спинного мозга. При сдавливании грыжей корешков и оболочечной ветви болевая симптоматика нарастает не только сегментарно, в области грыжи, но и вдоль всего позвоночника. В результате ухудшаются аксональный транспорт, синаптогенез, отмечается провоспалительный сдвиг цитокинового профиля СМЖ в сторону воспаления.

Противовоспалительное действие ХС, оказываемое посредством ингибирования транслокации внутрь ядра транскрипционного фактора NF-κB, существенно снижает синтез провоспалительных цитокинов. Способность ХС оказывать нейропротективные эффекты через поддержку функции ретикулон-рецепторов NgR1 и NgR3 создает условия для регенерации аксонов спинномозговых корешков и оболочечной ветви [26]. Поступая внутрь оболочечной ветви, ХС купируют провоспалительные реакции. Кроме того, в СМЖ поступают дисахариды N-ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты, образующиеся при метаболизме ХС, которые также оказывают нейропротективное действие [29].

Препараты на основе ХС

Имеющиеся данные фундаментальных и клинических исследований указывают на *существенные различия в эффективности и безопасности различных препаратов ХС* [30–38]. Фармакологическое качество ХС очень важно, так как прием больших доз недостаточно очищенного ХС может способствовать развитию нежелательных явлений (повышение уровня трансаминаз, острое повреждение печени по механизму аутоиммунного гепатита [39], изменение уровня провоспалительных факторов [30] и др.).

Проведено сравнительное фармакопротеомное исследование трех различных препаратов ХС (ХС 1, ХС 2 и ХС 3) в одинаковой дозе (200 мкг/мл), которыми обрабатывали хондроциты, полученные у больных ОА [30]. Препарат ХС 1 (получен из хряща свиньи, степень очистки — 90,4%) увеличивал уровень митохондриальной супероксиддисмутазы, белков внеклеточного матрикса хряща, олигомерные матрицы белка, но в то же время и концентрацию некоторых провоспалительных факторов (стромелизин 1). Более безопасными оказались препараты ХС 2 (получен из трахеи быка, степень очистки — 96,2%) и ХС 3 (получен из трахеи быка, степень очистки — 99,9%, на основе этой субстанции изготавливается препарат Хондрогад®), которые также увеличивали количество структурных белков матрикса соединительной ткани и факторов роста, но *не повышали уровень провоспалительных белков* [30].

Различия в свойствах препаратов на основе ХС обусловлены и степенью очистки, и различиями в химическом составе экстрактов ХС. Комплексы ХС извлекаются из хрящей животных и рыб, поэтому, как и многие другие экстракты природного происхождения, имеют широкий диапазон

молекулярной массы, различные количество и форму сульфатирования цепей ХС. В разных образцах препаратов общее содержание ХС составляет 90–99%, хондроитин-4-сульфата – 62–78%, хондроитин-6-сульфата – 15–31%.

Для лечения пациентов с ОА следует использовать только фармацевтические субстанции ХС – высокая степень очистки и стандартизации по сульфатированию позволяет избежать провоспалительных реакций, обусловленных примесями в природном экстракте [31]. Наоборот, качество субстанции ХС для нутрицевтических нужд (для приема внутрь) может быть весьма низким [32, 33]. Например, анализ ряда биологически активных добавок, представленных на рынке ЕС, показал, что заявленное содержание ХС соблюдалось только в 4 из 10 образцов. В 4 БАД содержание ХС реально составило 0–1%, в то время как на этикетке было указано 47, 17, 12 и 6%. В одном образце найдено всего 30–45% заявленного содержания ХС, и только в трех образцах оно соответствовало указанному на этикетке [32]. Таким образом, *препараты на основе ХС должны проходить жесткий контроль на стандартизацию субстанции ХС.*

Определить происхождение ХС позволяет также исследование дисахаридов, входящих в состав препаратов ХС. Отличия между ХС различного происхождения наглядно проявляются на хроматограммах: они имеют разную плотность заряда (число сульфатных групп на 1 дисахаридный фрагмент) и соотношение 4-сульфатированного/6-сульфатированного ХС (соотношение между количествами сульфатированных групп, расположенных в положении 4 и 6 на ХС). Молекулярная масса ХС важна для фармакологической активности, поскольку чересчур фрагментированный ХС ($n=1, 2$) может не обладать желаемыми биологическими эффектами [31, 32].

Биодоступность ХС различного происхождения в большой степени зависит от их молекулярной массы, плотности заряда и сульфатирования. Фармакокинетическое исследование показало, что при пероральном приеме ХС отмечается уменьшение относительного количества несulfатированных дисахаридов ХС. В то же время уровень 4-сульфатированного дисахарида увеличивается до максимума ($52 \pm 25\%$) через 6 ч, а 6-сульфатированных и дисульфатированных дисахаридов – через 10 ч. Установлено, что 4-сульфатированный ХС начинает всасываться раньше, чем 6-сульфатированный ХС [34]. Сцинтиграфический анализ показал, что у ХС отмечается тропизм к хрящевым тканям, а в крови появляются олигосахариды, получаемые в результате ферментативного гидролиза ХС [35–38]. ХС высокой очистки *не оказывают побочного действия на желудочно-кишечный тракт, тромбообразование и функцию почек* [40].

Ключевые молекулярные механизмы действия препаратов на основе ХС: 1) ХС взаимодействуют с рецепторами CD44, TLR4 и ICAM1 на поверхности хондроцитов и затем ингибируют NF- κ B; 2) ХС влияют на цитокиновый сигнальный путь JAK/STAT, синтез IgA в кишечнике, регулируют миграцию лейкоцитов и активность рецепторов гематопоетина/интерферонов, т. е. оказывают разностороннее противовоспалительное действие. Таким образом, ХС – не просто «строительный материал» хряща: ХС улучшают синтез компонентов соединительной ткани хряща,

снижая активность процессов деградации этой вновь образованной ткани. Высокоочищенные и стандартизированные по сульфатированию фармацевтические ХС не только эффективны, но и лишены побочных эффектов.

Фармакологический анализ состава Хондрогарда®

Хондрогард предназначен для внутримышечного (в/м) введения с целью лечения артритов и остеохондроза. В качестве активного действующего начала он содержит 100 мг высокоочищенной фармацевтической субстанции ХС из трахеи быка (степень очистки – 99,9%) в виде натриевой соли. Субстанция ХС стабилизирована с использованием стандартных компонентов – бензилового спирта (9 мг) и антиоксиданта метабисульфита натрия (1 мг). В процессе производства pH раствора препарата доводится до значений, близких к нейтральным (6,0–7,5), для чего используется раствор щелочи (гидроксид натрия).

Бензиловый спирт служит стабилизатором многочисленных инъекционных препаратов [41]. LD₅₀ бензилового спирта в тесте на острую токсичность у крыс составляет 1200 мг/кг, что соответствует III классу токсичности («умеренно опасные» вещества по ГОСТу «12.1.007-76 Вредные вещества»). Бензиловый спирт быстро метаболизируется в еще менее токсичную бензойную кислоту (LD₅₀ 1700–3700 мг/кг), затем конъюгируется с глицином в печени и выводится в виде гиппуровой кислоты [42]. Таким образом, раствор хондрогарда не содержит токсичных компонентов, а включает только вещества, обеспечивающие сохранность активного компонента – ХС. Важно отметить, что в качестве стабилизатора в хондрогарде не используется аминокислота L-пролин, парентеральное введение которой может вызывать нежелательные реакции со стороны ЦНС (нарушения памяти [43], когнитивный дефицит [44], изменения нейромедиаторного баланса [45, 46]).

Действующим началом хондрогарда является высокоочищенная субстанция ХС CS-BIOACTIVE® Биоберика С.А.У. (Испания)¹, полученная из трахеи быка, соответствующая требованиям европейской фармакопеи. Эффективность и безопасность препаратов на основе данной субстанции была подтверждена в 25 международных клинических исследованиях с участием более 5000 пациентов. Данная субстанция обладает рядом характерных особенностей, весьма важных для осуществления хондропротективных и других эффектов ХС.

Экстракт ХС из трахеи быка отличается узким диапазоном молекулярной массы (14–26 кДа) и в среднем содержит около 60% хондроитин-4-сульфата и 30% хондроитин-6-сульфата [31, 47]. Такие жесткие показатели состава природного экстракта ХС из трахеи быков позволяют существенно повысить качество стандартизации получаемой фармацевтической субстанции ХС, характеризующейся средней молекулярной массой в 15–17 кДа (что соответствует $n=29–35$; см. рис. 1) в составе хондрогарда.

Механизмы действия субстанции CS-BIOACTIVE® Биоберика С.А.У. (Испания)

При лечении межпозвоночных грыж имеется положительный опыт паравертебрального введения хондрогарда, т. е. непосредственно в зону проекции межпозвоночного диска,

¹Сертификат Ph. Eur.

пораженного грыжей [48]. При в/м введении максимальная концентрация ХС в плазме крови достигается через 1 ч, затем постепенно снижается в течение 48 ч. В эксперименте показано, что через 15 мин после в/м инъекции ХС обнаруживаются в синовиальной жидкости, после чего поступают в хрящ, где максимальная концентрация препарата отмечается через 48 ч [48].

Описанные особенности фармацевтической субстанции CS-BIOACTIVE©Биоиберики С.А.У. (Испания) способствуют формированию более стабильного депо ХС в зоне поражения позвонка. Как отмечено выше, в норме молекулярная масса ХС хряща составляет в среднем 6,19 кДа ($n \sim 12$) и уменьшается при его патологических изменениях (например, при ОА до 5,36 кДа, $n \sim 10$) [6]. В то же время при введении хондрогада в мышцу поступают более длинные цепи ХС (15–17 кДа, $n=29-35$), которые из-за большого размера не способны проникать через клеточную мембрану и образуют депо в межклеточной жидкости мышцы. Затем эти длинные цепи ХС под действием особых ферментов конвертируются в более короткие цепи (олигосахариды), которые могут проникать внутрь хондроцитов в области грыжи. Они служат «строительным материалом» для реконструкции хряща и связок, проявляя противовоспалительные свойства, поступая в синовиальную жидкость позвоночного сустава, СМЖ и др. Как известно, из-за отсутствия кровоснабжения питание межпозвоночных дисков происходит благодаря диффузии питательных веществ из межклеточной жидкости. Приведенные выше результаты биоинформационного анализа генома и протеома человека (см. табл. 1) позволяют детализировать эти механизмы фармакологического действия ХС на уровне специфических целевых белков.

Располагаясь во внеклеточной жидкости мышцы, длинные цепи ХС активируют рецептор CD44 на мембране хондроцитов, так как белок CD44 является рецептором для ХС и для короткоцепочечных олигосахаридов ХС [49]. При взаимодействии ХС с рецептором CD44 активируются процессы деградации олигосахаридных цепей в депо ХС и процессы реконструкции хряща [49, 50], а в результате ингибирования провоспалительного сигнального пути NF- κ B уменьшается хроническое воспаление.

Связывание ХС рецептором CD44 повышает активность прежде всего гиалуронидаз (HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4), которые и обеспечивают переработку цепей ХС в мышечном депо в более короткие олигосахариды [51]. Несмотря на свое название, ферменты гиалуронидазы осуществляют гидролиз не только гиалуроновой кислоты, но и ХС. Гидролиз длинных цепей ХС происходит в случайных позициях полимерной цепи (химические связи 1→4 между N-ацетилглюкозаминном и D-глюкуроновой кислотой, активность ЕС 3.2.1.35 по Международной классификации ферментов, с образованием более коротких олигосахаридов, оканчивающихся на остатке N-ацетилглюкозамина). Затем олигосахариды распадаются на еще более мелкие фрагменты, вплоть до отдельных молекул N-ацетилглюкозамина и D-глюкуроновой кислоты [51]. В целом гиалуронидазы снижают вязкость водного раствора ХС в депо и увеличивают количество олигосахаридных цепей ХС, поступающих внутрь хондроцитов [52].

Для гидролиза длинных цепей ХС гиалуронидазами очень важны особенности сульфатирования ХС. Во-первых, гиалуронидазы гидролизуют преимущественно хондроитин-4-сульфат [53], содержание которого в субстанции CS-BIOACTIVE©Биоиберики С.А.У. (Испания) составляет 60%. Во-вторых, хондроитин-6-сульфат (30% состава субстанции) способствует диверсификации олигосахаридных цепей, образующихся при воздействии гиалуронидаз на ХС. Например, гиалуронидазы превращают хондроитин-4-сульфат в смесь три- и пентасахаридов, а хондроитин-6-сульфат — в смесь пента- и гептасахаридов [54]. Кроме того, всасывание хондроитин-4-сульфата происходит быстрее, а хондроитин-6-сульфата — медленнее [34]. Поэтому использование такой пропорции хондроитин-4-сульфат/хондроитин-6-сульфат, как 60/30%, позволяет регулировать содержание ХС в крови, поддерживая нужную концентрацию длительное время (более 10 ч).

Другие целевые белки протеома человека также имеют важное значение для переработки мышечного депо ХС (табл. 2). Так, хондроитиназа GALNS (N-ацетилгалактозамин-6-сульфатаза) удаляет сульфатные группы хондроитин-6-сульфата, тем самым делая ХС более восприимчивым для последующей деградации гиалуронидазами [49].

Таблица 2. Параметры молекулярной массы ХС, по данным разных источников [34–36]

Параметр	Бычий ХС	Свиной ХС	Куриный ХС	ХС акулы	ХС из рыб
Молекулярная масса, кДа:					
Mn	10,0–15,0	9,0–13,0	7,8–12,8	20,5–26,0	27,0–34,0
Mw	20,0–26,0	13,7–18,7	15,6–20,6	64,2–70,2	50,0–60,0
дисперсия (Mn/Mw)	1,80–2,20	1,35–1,65	1,60–2,00	2,50–3,10	1,50–2,50
Дисахариды:					
Δ Di–0s	6,0	6,0	8,0	3,0	3,0
Δ Di–6s	33,0	14,0	20,0	50,0	39,0
Δ Di–4s	61,0	80,0	72,0	29,0	43,0
Δ Di–2,6 dis	Н. д.	Н. д.	Н. д.	15,0	13,0
Δ Di–4,6 dis	Н. д.	Н. д.	Н. д.	2,0	1,0
Δ Di–2,4 dis	Н. д.	Н. д.	Н. д.	1,0	1,0
R	0,90–0,96	0,92–0,96	0,90–0,94	1,10–1,20	1,08–1,16
4s : 6s	1,50–2,00	4,50–7,00	3,00–4,00	0,45–0,70	1,00–1,40

Примечание. Mn — средняя молекулярная масса в соответствии с числом дисахаридных единиц (n); Mw — средняя молекулярная масса; Δ Di–0s — процент несulfатированных дисахаридов; Δ Di–6s — процент 6-сульфатированных дисахаридов; Δ Di–4s — процент 4-сульфатированных дисахаридов и т. д.; R — плотность заряда (число сульфатных групп на дисахаридную единицу); 4s : 6s — соотношение между 6-сульфатированными и 4-сульфатированными дисахаридами; н. д. — нет данных.

Карбогидрат-сульфотрансфераза CHST11, наоборот, сульфатирует ХС с образованием хондроитин-4-сульфата.

Образующиеся под действием гиалуронидаз олигосахариды ХС диффундируют в межклеточной жидкости в зону грыжевого повреждения и ингибируют MMP1, MMP3 (избыточная активность которых деградирует соединительнотканную основу хряща), MMP16 (деградирует коллаген 3-го типа) и MMP24 (медиатор воспалительной гипералгезии) и др.

Активность ММП различных типов фрагментируют большинство компонентов внеклеточной матрицы [55, 56]. В геноме человека присутствуют не менее 25 генов ММП. Избыточная активность ММП ассоциирована с хроническим воспалением (артрит, атеросклероз, опухолевые заболевания и др.) [57]. Практически все ММП характеризуются весьма схожей полноатомной структурой индивидуальных молекул белка; каждая молекула фермента включает четыре обязательных иона кальция и два иона цинка. Заметим, что снижение активности MMP1, MMP3, которое наблюдалось в фармакопротеомных исследованиях ХС [21], соответствует противоопухолевому эффекту ХС, установленному в крупномасштабных клинико-эпидемиологических исследованиях [58].

Кроме того, олигосахариды ХС взаимодействуют с рецептором CD97, что препятствует избыточной активации лейкоцитов в хряще, мышцах и синовиальной жидкости. Олигосахариды ХС также необходимы для синтеза PRG4, который предотвращает патологическое осаждение белков из синовиальной жидкости на поверхность хряща, т. е. стабилизирует состояние синовиальной жидкости.

Важной анатомической особенностью межпозвоночных грыж является их непосредственная близость к спинному мозгу. Как следствие — ущемление спинномозговых нервов грыжевым выпячиванием приводит к выраженному болевому синдрому. Образующиеся из ХС олигосахариды, диффундирующие в межклеточной жидкости, достигают болевых окончаний ущемленного грыжей позвоночного нерва. Всасываясь внутрь нейронов, олигосахариды ХС оказывают противовоспалительное и анальгетическое действие, а воздействуя на нейрональные рецепторы RPTP α (участвуют в синаптогенезе) и ретикулон-рецепторы NgR1 и NgR3 (регенерация аксона) [26], осуществляют нейропротекцию ущемленного спинномозгового нерва.

Подчеркнем еще раз важность оптимальной длины цепей ХС, входящих в состав субстанции CS-BIOACTIVE©Биоиберики С.А.У. (Испания). Если бы цепи ХС были слишком короткими (как в случае свиного ХС, см. табл. 2 [34–36]), то депо ХС в межклеточной жидкости расходовалось бы слишком быстро, и это приводило бы к рассеиванию олигосахаридов и отсутствию должного воздействия на хондроциты. При слишком длинных цепях ХС (как в случае куриного или рыбьего ХС) вводимый раствор ХС был бы слишком вязким, что не только замедляло бы переработку ХС на олигосахариды, но и стимулировало бы многочисленные нежелательные эффекты еще на этапе его в/м введения.

Фармакопротеомное исследование субстанции CS-BIOACTIVE©Биоиберики С.А.У. (Испания) показало, что ХС вызывает изменения секреции более 36 из 186 белков протеома внеклеточной матрицы хряща, включая повышение уровня белка TSP1, который поддерживает структуру суставного хряща [20]. Подтверждено, что ХС в составе субстанции ингибируют активность NF-kB при активации мак-

рофагов в культуре посредством липополисахаридов бактерий [59, 60], снижают синтез MMP3 и MMP1 [61]. Также ХС субстанции воздействуют на АМРА- и каинатные рецепторы нейронов гиппокампа, вызывая деполяризацию клеток, сигнальные внутриклеточные «волны» ионов кальция и обезболивающий эффект [62].

Результаты экспериментальных и клинических исследований субстанции CS-BIOACTIVE©Биоиберики С.А.У. (Испания)

Наиболее активно субстанция CS-BIOACTIVE©Биоиберики С.А.У. (Испания) исследовалась в моделях ОА у пациентов с ОА. В модели ОА коленного сустава у крыс добавление ХС (140 мг/кг ХС, 175 мг/кг ГС) снижало деградацию хряща и уменьшало уровень провоспалительных маркеров ИЛ1 β и ФНО α , сывороточных биомаркеров воспаления, MMP3, С-телопептида коллагена 2-го типа и NF-kB [63].

Был проведен ряд клинических исследований препаратов на основе субстанции CS-BIOACTIVE©Биоиберики С.А.У. (Испания) [64–66]. Показано, что при приеме внутрь (1200 мг/сут, внутрь, 24 мес) эффективность лечения пациентов с ОА коленных суставов была сравнимой с таковой при использовании нестероидного противовоспалительного препарата целекоксиба (200 мг/сут, n=62). Действие субстанции CS-BIOACTIVE©Биоиберики С.А.У. (Испания) сопровождалось снижением активности ММП1 и ММП3 [64], уровня биомаркера воспаления (растворимого коллагена 2-го типа, Coll2-1) в сыворотке крови [65]. Кроме того, показана перспективность применения субстанции CS-BIOACTIVE©Биоиберики С.А.У. (Испания) при различных воспалительных процессах, которые коморбидны заболеваниям, сопровождающимся поражением хрящевой ткани [67–71].

Отечественными исследователями проведен ряд работ, в которых отмечены эффективность и безопасность в/м применения препарата хондрогард. Исследование эффективности хондрогарда у пациентов с ОА коленных суставов (n=422, II–III стадия по Kallgren–Lawrence) при в/м введении в течение 2 лет продемонстрировало достоверную динамику по таким показателям эффективности, как шкала WOMAC и время ходьбы на расстояние 15 м [72]. Достоверно наблюдаемые клинические эффекты хондрогарда могут развиваться и за более короткий срок (1–2 мес) [73]. При в/м введении препаратов ХС результаты лечения имеют более долговременный характер, чем при пероральном приеме [74].

Применение Хондрогарда® при экструзиях и протрузиях межпозвоночных дисков

Перспективным направлением применения препаратов на основе субстанции CS-BIOACTIVE©Биоиберики С.А.У. (Испания) является терапия грыж и протрузий дисков позвоночника, включающая как паравертебральное введение [48], так и пероральный прием [75].

В исследовании О.Г. Гутянского и А.А. Честнова [48] показано, что при дорсалгии инъекции ХС в виде паравертебральных блокад уже на 3–4-й день приводят к уменьшению болезненности паравертебральных точек при пальпации, расширению двигательного режима, снижению выраженности симптомов натяжения. На 20–21-й день отмечаются достоверная нормализация мышечного тонуса, значительное увеличение объема движений в пояснично-крестцовом от-

деле и практически полный регресс симптомов натяжения [48]. При паравертебральном введении ХС зарегистрирован не только более выраженный регресс болевого синдрома, но и достоверные структурные изменения в межпозвоночном диске (по результатам магнитно-резонансной томографии): у 67% пациентов отмечено уменьшение размеров грыжи на 0,5–2 мм, протрузии межпозвоночного диска на 1–2 мм, у 71% пациентов достигнуто достоверное увеличение высоты диска [48].

Заключение

В результате анализа таргетных хондроактивных белков протеома человека сформулирована молекулярно-фармакологическая концепция действия препарата ХС хондрогарда при ОА, грыжах, а также и протрузиях межпозвоночного диска. Паравертебральное введение хондрогарда обеспечивает депо ХС в межклеточном пространстве мышцы в непосредственной близости от очага поражения соединительной ткани позвоночного сустава. Цепи ХС взаимодействуют с рецептором CD44 на поверхности фибробластов мышц, что, с одной стороны, тормозит воспаление за счет инактивации провоспалительного фактора NF- κ B, а с другой — способствует повышению активности ферментов гиалуронидаз, которые расщепляют цепи ХС на более короткие олигосахаридные фрагменты. Оптимальная длина цепей ХС в фармацевтической субстанции хондрогарда CS-BIOACTIVE©Биоиберики С.А.У. (Испания) обеспечивает медленное высвобождение коротких олигосахаридов, проявляющих хондропротективную активность.

Короткие олигосахаридные фрагменты распространяются по межклеточной жидкости мышцы и поступают в связки, очаг повреждения хряща и синовиальную жидкость. Олигосахариды достигают хондроцитов, на поверхности которых

также активируют рецептор CD44 с последующей инактивацией провоспалительного фактора NF- κ B уже в ткани хряща и запуском программы реконструкции соединительной ткани. При этом хондроциты начинают использовать олигосахариды ХС и как «строительный материал» для синтеза гелевой основы соединительной ткани хряща. Кроме того, олигосахариды ингибируют MMP1, MMP3 (их избыточная активность разрушает соединительнотканную основу хряща), MMP16 (вызывает деградацию коллагена 3-го типа) и MMP24 (медиатор воспалительной гипералгезии).

Также олигосахариды ХС взаимодействуют с рецептором CD97 (что препятствует избыточной активации лейкоцитов в хряще, мышцах и синовиальной жидкости). Олигосахариды ХС необходимы и для синтеза PRG4, который стабилизирует состояние синовиальной жидкости. Затем образующиеся из ХС олигосахариды, диффундирующие в межклеточной жидкости, достигают болевых окончаний ущемленного грыжей позвоночного нерва. Всасываясь из межклеточной жидкости внутрь нейронов позвоночных нервов, олигосахариды ХС оказывают противовоспалительное, анальгетическое действие и обеспечивают нейрорепарацию (за счет влияния на нейрональные рецепторы LAR, RPT σ , NgR1 и NgR3).

Таким образом, олигосахариды, образующиеся в процессе биотрансформации ХС из хондрогарда, при парентеральном, в том числе паравертебральном, введении воздействуют на воспаление, регенерацию соединительной ткани, состав синовиальной жидкости, а также обеспечивают нейрорепарацию позвоночных нервов. Эти эффекты хондрогарда способствуют не только уменьшению симптоматики ОА, но и морфологическому восстановлению очага повреждения при грыже.

ЛИТЕРАТУРА

1. Юдина НВ, Громова ОА, Торшин ИЮ и др. Дегенеративные заболевания межпозвоночных дисков как проявление дисплазии соединительной ткани: исследование микроэлементного состава грыж межпозвоночных дисков и терапевтических эффектов препарата Магнерот®. Фарматека. 2010;(1):112-8. [Yudina NV, Gromova OA, Torshin IYu, et al. Degenerative diseases of the intervertebral disc as a manifestation of connective tissue dysplasia: study of microelement composition of herniated discs and therapeutic effects of the drug Magnerot®. *Farmateka*. 2010;(1):112-8. (In Russ.)].
2. Fardellone P, Zaim M, Saurel AS, Maheu E. Comparative efficacy and safety study of two chondroitin sulfate preparations from different origin (avian and bovine) in symptomatic osteoarthritis of the knee. *Open Rheumatol J*. 2013;7:1-12. doi:10.2174/1874312901307010001. Epub 2013 Feb 8.
3. Torshin IYu. Sensing the change from molecular genetics to personalized medicine. New-York: Nova Biomedical Books; 2009.
4. Imada K, Oka H, Kawasaki D, et al. Anti-arthritis action mechanisms of natural chondroitin sulfate in human articular chondrocytes and synovial fibroblasts. *Biol Pharm Bull*. 2010;33(3):410-4.
5. Campo GM, Avenoso A, Campo S, et al. Purified human chondroitin-4-sulfate reduced MMP/TIMP imbalance induced by iron plus ascorbate in human fibroblast cultures. *Cell Biol Int*. 2006;30(1):21-30. Epub 2005 Nov.
6. Ishimaru D, Sugiura N, Akiyama H, et al. Alterations in the chondroitin sulfate chain in human osteoarthritic cartilage of the knee. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014 Feb;22(2):250-8. doi: 10.1016/j.joca.2013.11.010. Epub 2013 Nov 23.
7. Volpi N. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulphate: new functions from an old natural macromolecule. *Inflammopharmacology*. 2011 Dec;19(6):299-306. doi: 10.1007/s10787-011-0098-0. Epub 2011 Nov 1.
8. Navarro SL, White E, Kantor ED, et al. Randomized trial of glucosamine and chondroitin supplementation on inflammation and oxidative stress biomarkers and plasma proteomics profiles in healthy humans. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117534.
9. Kantor ED, Lampe JW, Navarro SL, et al. Associations between glucosamine and chondroitin supplement use and biomarkers of systemic inflammation. *J Altern Complement Med*. 2014 Jun;20(6):479-85. doi: 10.1089/acm.2013.0323. Epub 2014 Apr 16.
10. Kantor ED, Lampe JW, Vaughan TL, et al. Association between use of specific dietary supplements and C-reactive protein concentrations. *Am J Epidemiol*. 2012 Dec 1;176(11):1002-13. doi: 10.1093/aje/kws186. Epub 2012 Nov 8.
11. Kim MM, Mendis E, Rajapakse N, Kim SK. Glucosamine sulfate promotes osteoblastic differentiation of MG-63 cells via anti-inflammatory effect. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007 Apr 1;17(7):1938-42. Epub 2007 Jan 19.
12. Orłowski EW, Stabler TV, Montell E, et al. Monosodium urate crystal induced macrophage inflammation is attenuated by chondroitin sulphate: pre-clinical model for gout prophylaxis? *BMC Musculoskelet Disord*. 2014 Sep 27;15:318. doi: 10.1186/1471-2474-15-318.
13. Campo GM, Avenoso A, Campo S, et al. Chondroitin-4-sulphate inhibits NF- κ B translocation and caspase activation in collagen-induced arthritis in mice. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008 Dec;16(12):1474-83. doi: 10.1016/j.joca.2008.04.002. Epub 2008 May 23.
14. Lo YL, Sung KH, Chiu CC, Wang LF. Chemically conjugating polyethylenimine with chondroitin sulfate to promote CD44-mediated endocytosis for gene delivery. *Mol Pharm*. 2013

- Feb 4;10(2):664–76. doi: 10.1021/mp300432s. Epub 2013 Jan 14.
15. Legendre F, Bauge C, Roche R, et al. Chondroitin sulfate modulation of matrix and inflammatory gene expression in IL-1 β -stimulated chondrocytes – study in hypoxic alginate bead cultures. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008 Jan;16(1):105–14. Epub 2007 Jul 12.
 16. Campo GM, Avenoso A, Campo S, et al. Glycosaminoglycans reduced inflammatory response by modulating toll-like receptor-4 in LPS-stimulated chondrocytes. *Arch Biochem Biophys*. 2009 Nov;491(1–2):7–15. doi: 10.1016/j.abb.2009.09.017. Epub 2009 Oct 1.
 17. Pecchi E, Priam S, Mladenovic Z, et al. A potential role of chondroitin sulfate on bone in osteoarthritis: inhibition of prostaglandin E(2) and matrix metalloproteinases synthesis in interleukin-1 β -stimulated osteoblasts. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012 Feb;20(2):127–35. doi: 10.1016/j.joca.2011.12.002. Epub 2011 Dec 11.
 18. Rovati LC, Girolami F, Persiani S. Crystalline glucosamine sulfate in the management of knee osteoarthritis: efficacy, safety, and pharmacokinetic properties. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2012 Jun;4(3):167–80. doi: 10.1177/1759720X12437753.
 19. Calamia V, Ruiz-Romero C, Rocha B, et al. Pharmacoproteomic study of the effects of chondroitin and glucosamine sulfate on human articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12(4):R138. doi: 10.1186/ar3077. Epub 2010 Jul 13.
 20. Calamia V, Mateos J, Fernandez-Puente P, et al. A pharmacoproteomic study confirms the synergistic effect of chondroitin sulfate and glucosamine. *Sci Rep*. 2014 Jun 10;4:5069. doi: 10.1038/srep05069.
 21. Calamia V, Lourido L, Fernandez-Puente P, et al. Secretome analysis of chondroitin sulfate-treated chondrocytes reveals anti-angiogenic, anti-inflammatory and anti-catabolic properties. *Arthritis Res Ther*. 2012 Oct 2;14(5):R202. doi: 10.1186/ar4040.
 22. Miller RR, McDevitt CA. Thrombospondin is present in articular cartilage and is synthesized by articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988 Jun 16;153(2):708–14.
 23. Bornstein P. Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *J Cell Commun Signal*. 2009 Dec;3(3–4):189–200. doi: 10.1007/s12079-009-0060-8. Epub 2009 Oct 2.
 24. Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, et al. Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2003 Aug;48(8):2173–7.
 25. Hsieh JL, Shen PC, Shiau AL, et al. Intraarticular gene transfer of thrombospondin-1 suppresses the disease progression of experimental osteoarthritis. *J Orthop Res*. 2010 Oct;28(10):1300–6. doi: 10.1002/jor.21134.
 26. Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Chondroitin sulfate proteoglycans: Key modulators in the developing and pathologic central nervous system. *Exp Neurol*. 2015 Jul;269:169–87. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.04.006. Epub 2015 Apr 18.
 27. Canning DR, Brelsford NR, Lovett NW. Chondroitin sulfate effects on neural stem cell differentiation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2016 Jan;52(1):35–44. doi: 10.1007/s11626-015-9941-8. Epub 2015 Aug 19.
 28. Egea J, Garcia AG, Verges J, et al. Antioxidant, antiinflammatory and neuroprotective actions of chondroitin sulfate and proteoglycans. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Jun;18 Suppl 1:S24–7. doi: 10.1016/j.joca.2010.01.016. Epub 2010 Apr 24.
 29. Canas N, Gorina R, Planas AM, et al. Chondroitin sulfate inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in rat astrocytes by preventing nuclear factor kappa B activation. *Neuroscience*. 2010 May 19;167(3):872–9. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.02.069. Epub 2010 Mar 3.
 30. Calamia V, Fernandez-Puente P, Mateos J, et al. Pharmacoproteomic study of three different chondroitin sulfate compounds on intracellular and extracellular human chondrocyte proteomes. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Jun;11(6):M111.013417. doi: 10.1074/mcp.M111.013417. Epub 2011 Dec 27.
 31. Martel-Pelletier J, Farran A, Montell E, et al. Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate. *Molecules*. 2015 Mar 6;20(3):4277–89. doi: 10.3390/molecules20034277.
 32. Volpi N. Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity. *J Pharm Pharmacol*. 2009 Oct; 61(10):1271–80. doi: 10.1211/jpp/61.10.0002.
 33. Rainsford KD. Importance of pharmaceutical composition and evidence from clinical trials and pharmacological studies in determining effectiveness of chondroitin sulphate and other glycosaminoglycans: a critique. *J Pharm Pharmacol*. 2009 Oct;61(10):1263–70. doi: 10.1211/jpp/61.10.0001.
 34. Volpi N. Oral absorption and bioavailability of ichthyic origin chondroitin sulfate in healthy male volunteers. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003 Jun;11(6):433–41.
 35. Sobal G, Dorotka R, Menzel J, Sinzinger H. Uptake studies with chondrotropic ^{99m}Tc-chondroitin sulfate in articular cartilage. Implications for imaging osteoarthritis in the knee. *Nucl Med Biol*. 2013 Nov;40(8):1013–7. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2013.07.007. Epub 2013 Sep 5.
 36. Volpi N. Oral bioavailability of chondroitin sulfate (Condrosulf) and its constituents in healthy male volunteers. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002 Oct;10(10):768–77.
 37. Persiani S, Roda E, Rovati LC, et al. Glucosamine oral bioavailability and plasma pharmacokinetics after increasing doses of crystalline glucosamine sulfate in man. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005 Dec;13(12):1041–9. Epub 2005 Sep 13.
 38. Craciunescu O, Moldovan L, Moisei M, Trif M. Liposomal formulation of chondroitin sulfate enhances its antioxidant and anti-inflammatory potential in L929 fibroblast cell line. *J Liposome Res*. 2013 Jun;23(2):145–53. doi: 10.3109/08982104.2013.770016. Epub 2013 Apr 16.
 39. von Felden J, Montani M, Kessebohm K, Stickel F. Drug-induced acute liver injury mimicking autoimmune hepatitis after intake of dietary supplements containing glucosamine and chondroitin sulfate. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2013 Mar;51(3):219–23. doi: 10.5414/CP201835.
 40. Ronca F, Palmieri L, Panicucci P, Ronca G. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998 May;6 Suppl A:14–21.
 41. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals (11th ed.). Merck; 1989. 1138 p.
 42. Brü hne F. Wright laine. Benzyl Alcohol. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (7th ed.). Wiley; 2007. P. 7–8.
 43. Cherkin A, Eckardt MJ, Gerbrandt LK. Memory: proline induces retrograde amnesia in chicks. *Science*. 1976 Jul 16;193(4249):242–4.
 44. Nadler JV, Wang A, Hakim A. Toxicity of L-proline toward rat hippocampal neurons. *Brain Res*. 1988 Jul 19;456(1):168–72.
 45. Volk DW, Gonzalez-Burgos G, Lewis DA. Proline, GABA Synthesis and Gamma Oscillations in Schizophrenia. *Trends Neurosci*. 2016 Dec;39(12):797–8.
 46. Zipp GG, Barbosa J, Green MA, et al. Novel inhibitors of the high-affinity L-proline transporter as potential therapeutic agents for the treatment of cognitive disorders. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014 Aug 15;24(16):3886–90.
 47. Burns DT, Walker MJ, Mussell C. Chondroitin Sulfate: A Critical Review of Generic and Specific Problems in Its Characterization and Determination—An Exemplar of a Material with an Unknown or Variable Composition (UVCB). *J AOAC Int*. 2017 Aug 29. doi: 10.5740/jaoacint.17-0115.
 48. Гутянский ОГ, Честнов АА. Опыт применения комплексного лечения дискогенных радикулопатий у спортсменов. Медицинский Совет. 2017;(11):28–34. [Gutyanskii OG, Chestnov AA. Experience of application of complex treatment of discogenic radiculopathy in athletes. *Meditsinskii Sovet*. 2017;(11):28–34. (In Russ.)].
 49. Fujimoto T, Kawashima H, Tanaka T, et al. CD44 binds a chondroitin sulfate proteoglycan, aggrecan. *Int Immunol*. 2001 Mar;13(3):359–66.
 50. Atarashi K, Kawashima H, Hirata T, Miyasaka M. Chondroitin sulfate proteoglycan, common ligand of L-selectin and CD44. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 2002 Dec;47(16 Suppl):2214–20.
 51. Harada H, Takahashi M. CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. *J Biol Chem*. 2007 Feb 23;282(8):5597–607.
 52. Meyer K, Hoffman P, Linker A. Hyaluronidases. In: Boyer PD, Lardy H, Myrback K, editors. *The Enzymes*. 2nd ed. Vol. 4. New York: Academic Press; 1960.
 53. Silva C, Novoa-Carballal R, Reis RL,

- Pashkuleva I. Following the enzymatic digestion of chondroitin sulfate by a simple GPC analysis. *Anal Chim Acta*. 2015 Jul 23;885:207-13. doi: 10.1016/j.aca.2015.05.034. PMID: 26231907
54. Knudson W, Gundlach MW, Schmid TM, Conrad HE. Selective hydrolysis of chondroitin sulfates by hyaluronidase. *Biochemistry*. 1984 Jan 17;23(2):368-75.
55. Cauwe B, Van den Steen PE, Opdenakker G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2007 May-Jun;42(3):113-85.
56. Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci*. 2006 May 1;11:1696-701.
57. Shingleton WD, Hodges DJ, Brick P, Cawston TE. Collagenase: a key enzyme in collagen turnover. *Biochem Cell Biol*. 1996;74(6):759-75.
58. Kantor ED, Lampe JW, Peters U, et al. Use of glucosamine and chondroitin supplements and risk of colorectal cancer. *Cancer Causes Control*. 2013 Jun; 24(6): 1137-46. doi: 10.1007/s10552-013-0192-2.
59. Tan GK, Tabata Y. Chondroitin-6-sulfate attenuates inflammatory responses in murine macrophages via suppression of NF- κ B nuclear translocation. *Acta Biomater*. 2014 Jun;10(6):2684-92. doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.025.
60. Stabler TV, Huang Z, Montell E, et al. Chondroitin sulphate inhibits NF- κ B activity induced by interaction of pathogenic and damage associated molecules. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017 Jan;25(1):166-74. doi: 10.1016/j.joca.2016.08.012.
61. Monfort J, Nacher M, Montell E, et al. Chondroitin sulfate and hyaluronic acid (500-730 kDa) inhibit stromelysin-1 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes. *Drugs Exp Clin Res*. 2005;31(2):71-6.
62. Maroto M, Fernandez-Morales JC, Padin JF, et al. Chondroitin sulfate, a major component of the perineuronal net, elicits inward currents, cell depolarization, and calcium transients by acting on AMPA and kainate receptors of hippocampal neurons. *J Neurochem*. 2013 Apr;125(2):205-13. doi:10.1111/jnc.12159.
63. Terencio MC, Ferrandiz ML, Carceller MC, et al. Chondroprotective effects of the combination chondroitin sulfate-glucosamine in a model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament transection in ovariectomized rats. *Biomed Pharmacother*. 2016 Apr;79:120-8. doi: 10.1016/j.biopha.2016.02.005.
64. Pelletier JP, Raynaud JP, Beaulieu AD, et al. Chondroitin sulfate efficacy versus celecoxib on knee osteoarthritis structural changes using magnetic resonance imaging: a 2-year multicentre exploratory study. *Arthritis Res Ther*. 2016 Nov 3;18(1):256.
65. Möller I, Gharbi M, Martinez Serrano H, et al. Effect of chondroitin sulfate on soluble biomarkers of osteoarthritis: a method to analyze and interpret the results from an open-label trial in unilateral knee osteoarthritis patients. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016 Oct 6;17(1):416.
66. Monfort J, Pujol J, Contreras-Rodriguez O, et al. Effects of chondroitin sulfate on brain response to painful stimulation in knee osteoarthritis patients. A randomized, double-blind, placebo-controlled functional magnetic resonance imaging study. *Med Clin (Barc)*. 2017 Jun 21;148(12):539-47. doi: 10.1016/j.medcli.2016.12.036.
67. Segarra S, Martinez-Subiela S, Cerda-Cuellar M, et al. Oral chondroitin sulfate and prebiotics for the treatment of canine Inflammatory Bowel Disease: a randomized, controlled clinical trial. *BMC Vet Res*. 2016 Mar 10;12:49. doi: 10.1186/s12917-016-0676-x.
68. Linares PM, Chaparro M, Algaba A, et al. Effect of Chondroitin Sulphate on Pro-Inflammatory Mediators and Disease Activity in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Digestion*. 2015;92(4):203-10. doi: 10.1159/000439522.
69. Melgar-Lesmes P, Garcia-Polite F, Del-Rey-Puech P, et al. Treatment with chondroitin sulfate to modulate inflammation and atherogenesis in obesity. *Atherosclerosis*. 2016 Feb;245:82-7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.12.016.
70. Albinana E, Gutierrez-Luengo J, Hernandez-Juarez N, et al. Chondroitin Sulfate Induces Depression of Synaptic Transmission and Modulation of Neuronal Plasticity in Rat Hippocampal Slices. *Neural Plast*. 2015;2015:463854. doi: 10.1155/2015/463854.
71. Verges J, Montell E, Herrero M, et al. Clinical and histopathological improvement of psoriasis with oral chondroitin sulfate: a serendipitous finding. *Dermatol Online J*. 2005 Mar 1;11(1):31.
72. Волошин ВП, Еремин АВ, Санкаранараян СА и др. Исследование эффективности препарата Хондрогард (хондроитина сульфат) у пациентов с остеоартрозом. *Русский медицинский журнал*. 2015;(10):575-8. [Voloshin VP, Eremin AV, Sankaranarayanan SA, et al. Study of the efficacy of Chondrogard (chondroitin sulphate) in patients with osteoarthritis. *Russkii meditsinskii zhurnal*. 2015;(10):575-8. (In Russ.)].
73. Шарапова ЕП, Кашеварова НГ, Таскина ЕА и др. Исследование эффективности, переносимости и безопасности препарата Хондрогард у пациентов с остеоартрозом коленных суставов и коморбидностью. *Фарматека*. 2017;(7):46-51. [Sharapova EP, Kashevarova NG, Taskina EA, et al. Study of the efficacy, tolerability and safety of Chondrogard in patients with osteoarthritis of the knee joints and comorbidity. *Farmateka*. 2017;(7):46-51. (In Russ.)].
74. Удовика МИ. Сравнительная эффективность инъекционных и пероральных симптоматических препаратов медленного действия в терапии первичного и посттравматического остеоартроза коленных суставов. *Русский медицинский журнал*. 2017;(7):446-50. [Udovika MI. Comparative effectiveness of injectable and oral symptomatic slow action drugs in the treatment of primary and posttraumatic osteoarthritis of the knee joints. *Russkii meditsinskii zhurnal*. 2017;(7):446-50. (In Russ.)].
75. Singh G, Alekseeva L, Alekseev V, et al. Combination treatment with glucosamine-chondroitin sulfate reduces pain, disability and NSAID consumption in patients with chronic low back pain: final results from a large, community based, pilot, open prospective interventional study. *Scientific Abstracts*. 12 June 2014. P. 300. THU0341

Поступила 10.09.2017

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Исследование проведено при поддержке ООО «Сотекс». 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.