

Функции сигнального пути mTOR в здоровых хондроцитах суставного хряща и при остеоартрозе

Четина Е.В., Кашеварова Н.Г., Шарапова Е.П.

ФГБНУ Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой, Москва, Россия
115522 Москва, Каширское шоссе, 34А

V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia
34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522

Контакты: Елена Васильевна Четина;
etchetina@mail.ru

Contact:
Elena Chetina
etchetina@mail.ru

Поступила 24.09.14

Остеоартроз (ОА) — это хроническое заболевание, которое связано с болью, скованностью, ограничением подвижности и воспалением сустава, а также с деструкцией суставного хряща. Недавние исследования показали значение дифференцировки (гипертрофии) хондроцитов как одного из механизмов деградации хряща при ОА. Это указывает на глубокие изменения метаболизма хондроцитов в ходе резорбции хряща, которые обуславливаются нарушением регуляции функционирования клеток. Одним из основных клеточных метаболических регуляторов является белок mTOR (mechanistic target of rapamycin), который контролирует клеточные процессы роста, пролиферации, биосинтеза белка, а также интегрирует внеклеточные сигналы от факторов роста и гормонов с доступностью аминокислот и внутриклеточным энергетическим статусом. Значение активности mTOR для разрушения суставного хряща при ОА подтверждается значительными изменениями в работе регуляторной сети mTOR, включающей многочисленные внутриклеточные (факторы роста, аденозинтрифосфат, доступность кислорода и аутофагию) и внеклеточные (глюкозу, аминокислоты, липиды и гексозамин) сигналы. Более того, измененная экспрессия гена *mTOR* в крови больных ОА связана либо с усилением боли, либо с синовитом, что указывает на глубокую метаболическую гетерогенность больных ОА и необходимость дифференцированного подхода к терапии. Перечисленные проблемы и обсуждаются в данном обзоре.

Ключевые слова: mTOR, остеоартроз; суставной хрящ; периферическая кровь; регуляция путей метаболизма.
Для ссылки: Четина ЕВ, Кашеварова НГ, Шарапова ЕП. Функции сигнального пути mTOR в здоровых хондроцитах суставного хряща и при остеоартрозе. Научно-практическая ревматология. 2016;54(5):590-597.

FUNCTIONS OF THE mTOR SIGNALING PATHWAY IN NORMAL ARTICULAR CARTILAGE CHONDROCYTES AND IN OSTEOARTHRITIS Chetina E.V., Kashevarova N.G., Sharapova E.P.

Osteoarthritis (OA) is a chronic disease associated with pain, stiffness, limited mobility and joint inflammation, as well as articular cartilage destruction. Recent studies have shown the importance of chondrocyte differentiation (hypertrophy) as one of the mechanisms of cartilage degradation in OA. This suggests that chondrocyte metabolism undergoes the profound changes during cartilage resorption, which are due to dysregulation of cell function. One of the major cellular metabolic regulators is the protein mTOR (mechanistic target of rapamycin) that controls cell growth, proliferation, protein biosynthesis and integrates extracellular signals from growth factors and hormones with amino acid availability and intracellular energy status. The importance of mTOR activity for articular cartilage destruction in OA is confirmed by significant changes in the work of mTOR regulatory network that involves multiple intracellular (growth factors, adenosine triphosphate, oxygen availability, and autophagy) and extracellular (glucose, amino acids, lipids, and hexosamine) signals. Moreover, the altered expression of the *mTOR* gene in the blood of patients with OA is associated with either increased pain or synovitis, which indicates that there is a strong metabolic heterogeneity in patients with OA and a need for a differentiated therapeutic approach. The above problems are discussed in this review.

Key words: mTOR; osteoarthritis; articular cartilage; peripheral blood; regulation of metabolic pathways.

For reference: Chetina EV, Kashevarova NG, Sharapova EP. Functions of the mTOR signaling pathway in normal articular cartilage chondrocytes and in osteoarthritis. Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice. 2016;54(5):590-597 (In Russ.).

doi: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2016-590-597>

Остеоартроз (ОА) является системным заболеванием, при котором может повреждаться один или многие суставы и происходят дегенеративные изменения суставного хряща, ремоделирование субхондральной кости и частично воспаление синовиальной оболочки [1]. Это сопровождается болью и ограничением подвижности вследствие разрушения суставного хряща. Недавно было доказано, что клиническому проявлению заболевания предшествует фенотипическая модификация (гипертрофия) суставных хондроцитов, подобная той, что наблюдается в фетальных хондроцитах во время их созревания в ростковой пластинке [1, 2]. Это ассоциировалось с повышением экспрессии генов, участвующих

в разрушении суставного хряща, изменением экспрессии регуляторных ростовых и транскрипционных факторов и маркеров апоптоза [3–5]. Однако при ингибировании разрушения хряща путем блокирования локального протеолиза агреккана и коллагена с использованием генетических манипуляций в опытах на животных наблюдались уменьшение боли и тяжести заболевания, тогда как изменений в образовании остеофигов не происходило [6, 7]. Более того, клинические исследования ингибиторов протеиназы или провоспалительных цитокинов также не были успешны [8–11]. Поэтому идентификация предшествующих факторов, регулирующих экспрессию катаболических молекул

и/или гипертрофию хондроцитов в суставном хряще, важна для более глубокого понимания регуляторных механизмов, которые контролируют функции суставных хондроцитов [12].

Предыдущие исследования показали, что большинство идентифицированных генов, активных при ОА, кодируют сигнальные белки [13, 14]. Известны многочисленные сигнальные пути, регулирующие активность хондроцитов [14–17]. Эти сигнальные пути очень гибкие, и поэтому их, вероятно, можно модифицировать [15]. Поскольку разрушение суставного хряща при ОА связано с гипертрофией хондроцитов, сигнальные молекулы, которые регулируют активность хондроцитов как в ростковой пластинке, так и во взрослом суставном хряще, при ОА могут представлять особый интерес [18]. Например, активация фосфорилирования путем ERK (extracellular signal-regulated kinase) 1/2 и подавление p38, которое приводит к гипертрофной дифференцировке суставных хондроцитов, как было описано ранее [19, 20]. В то же время модифицировать специфические сигнальные пути при ОА достаточно сложно вследствие их разнообразия и переплетения функций [21]. Например, прямое воздействие на путь бета-катенина опасно, поскольку он необходим для стабильности фенотипа суставных хондроцитов и может вызывать опухолевый рост [22].

В связи с этим может оказаться перспективным воздействие на сигнальные пути нутриентов, которые могут вызывать избыточную массу тела и обуславливают развитие сердечно-сосудистых заболеваний, некоторых видов рака, сахарного диабета и других болезней [23]. Традиционно нутриенты, такие как аминокислоты, углеводы и липиды, до недавнего времени считались исключительно субстратами для генерации высокоэнергетических молекул и биосинтетических предшественников макромолекул. Между тем в настоящее время уже очевидно, что нутриенты могут функционировать как сигнальные молекулы в пищевых сигнальных путях, которые регулируют различные аспекты энергетического метаболизма, а также контролировать рост клеток, их пролиферацию и жизнеспособность [24].

Сигнальный путь mTOR (mechanistic target of rapamycin)

У человека экспрессия генов регулируется нутриентами, которые взаимодействуют с сигнальными путями, включая mTOR, интегрирующий сигналы от аминокислот, ростовых факторов и энергетического статуса клетки [24–27]. mTOR является каталитической субъединицей, состоящей из двух различных комплексов: mTORC1 и mTORC2. Комплексы различаются по связыванию mTOR со вспомогательными белками. Раптор является рапамицин-чувствительным регуляторным белком, связанным с mTORC1. mTORC1 регулируется посредством TSC (tuberous sclerosis) 1/2 белковым комплексом – супрессором опухолей. TSC1 не обладает каталитической активностью, а TSC2 функционирует как белок, активирующий гуанозинтрифосфатазу, которая ингибирует Rheb (Ras homolog enriched in brain). Инактивация комплекса TSC приводит к активации mTOR [28]. Недавно было показано, что mTORC1 может быть также активирован посредством RAS-подобной гуанозинтрифосфат RALB [29]. mTORC1 принимает сигналы от факторов роста

и нутриентов и поэтому регулирует пролиферацию, метаболизм и жизнеспособность клеток. Раптор связывается с mTORC2 и не чувствителен к рапамицину [30]. Активность mTORC2 связана с миграцией клеток, метаболизмом гликогена и, возможно, регулирует глюконеогенез [31].

Регуляция функций хондроцитов в фетальном и суставном хряще посредством mTOR

Сигнальный путь mTOR (СПМТ) ответствен за регуляцию созревания, пролиферации хондроцитов, продукцию хрящевого матрикса и рост клеток во время развития скелета [32–36]. Так, у молодых крыс рапамицин (РАП) значительно уменьшал рост костей вследствие увеличения гипертрофной зоны ростковой пластинки [за счет подавления экспрессии РТН/РТНрР (parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide) и увеличения экспрессии Indian hedgehog (Ihh)] и вследствие уменьшения пролиферации хондроцитов, связанной с подавлением mTOR. Это сопровождалось сокращением числа TRAP (TNF receptor associated factor)-позитивных многоядерных хондро/остеокластов, экспрессией лиганда рецептора активатора ядерного фактора каппа В (RANKL) и сосудистого эндотелиального фактора роста [34]. РАП также уменьшал инсулин-зависимый рост фетальных метатарзальных эксплантатов крыс вследствие селективного воздействия на гипертрофную зону ростковой пластинки, но не на пролиферацию клеток [37]. В настоящее время некоторые исследования также указывают на необходимость СПМТ для метаболизма суставных хондроцитов, поддержания внеклеточного матрикса (ВКМ) и развития ОА, поскольку экспрессия mTOR обнаружена в здоровом суставном хряще человека и при ОА [38, 39].

Необходимость СПМТ для метаболизма хондроцитов также подтверждается исследованиями роли регуляторов mTOR в функционировании суставного хряща, поскольку, будучи главным регулятором различных клеточных процессов, mTOR сам является мишенью для регуляции.

Аутофагия

Аутофагия необходима для увеличения жизнеспособности клеток. Процессы аутофагии происходят в лизосомах и регулируются кислородом, нутриентами и доступностью энергии. В состоянии аутофагии клетка поедает себя для генерации энергии и/или для удаления дефектных органелл, однако при большой длительности аутофагия может активировать апоптоз [37, 40].

В хондроцитах аутофагия регулируется активностью аденозинмонофосфат-протеинкиназы (АМПК) и mTOR в зависимости от присутствия фактора, индуцированного гипоксией (HIF) [32, 41–43]. В условиях прекращения роста усиление аутофагии связано с ингибированием mTOR [44, 45]. Ранее считалось, что аутофагия влияет на дифференцировку фетальных хондроцитов [46], поскольку она активировалась в терминально дифференцированных хондроцитах и позволяла этим клеткам выживать в сложном окружении [47].

Аутофагию также наблюдали в поверхностной и средней зонах суставного хряща при раннем ОА у животных [48], а также в хондроцитах здоровых лиц и больных ОА [32, 49]. Более интенсивные процессы аутофагии

отмечали в слабopоврежденном суставном хряще по сравнению со здоровыми или сильно поврежденными образцами, а также в культивируемых хондроцитах больных ОА по сравнению с нормальными [43]. Между тем в некоторых исследованиях отмечалось снижение активности процесса аутофагии в слабо- или сильноповрежденном хряще больных ОА по сравнению с нормальным хрящем [39, 49].

Аутофагия может иметь протективное значение для клеток в условиях стресса, поскольку она усиливалась в здоровых хондроцитах при пищевом (1% фетальной бычьей сыворотки) или катаболическом (в присутствии интерлейкина 1 β – ИЛ1 β – или нитропруссид натрия – генератора NO) стрессах [43]. Аутофагия, вероятно, также способна облегчать течение ОА, поскольку ее активация РАП уменьшала тяжесть заболевания. В коленных суставах мыши РАП ингибировал mTOR, регистрируемый по уменьшению концентрации белка S6, и активировал маркер аутофагии белок light chain 3 (LC3). Это сопровождалось уменьшением деструкции хряща, снижением экспрессии A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs (ADAMTS-5), матриксной металлопротеиназы 13 (ММП13), ИЛ1 β и подавлением синовиита [50], а также увеличением синтеза коллагена 2-го типа (КОЛ II) и агрекана [43].

Функции позитивных регуляторов mTOR в хондроцитах

Нутриенты, такие как аминокислоты и глюкоза, непосредственно воздействующие на mTOR, способны влиять на дифференцировку хондроцитов и рост трубчатых костей [33, 51].

Аминокислоты. Незаменимые аминокислоты считаются лимитирующим фактором клеточного метаболизма, поскольку они необходимы для биосинтеза белка, а также являются сигнальными молекулами в некоторых регуляторных путях. Лейцин является наиболее мощным регулятором СПМТ [52]. Так, хондротекторное и противовоспалительное действие смеси трав, обогащенных лейцином, эффективно ингибирует ММП9 и ММП13, высвобождение гликозаминогликанов (ГАГ), индуцибельную NO-синтазу (iNOS) и продукцию NO, а также увеличивает экспрессию КОЛ II в хондроцитах человека и эксплантатах хряща при их стимуляции ИЛ1 β [53]. Напротив, недостаток лейцина приводил к ингибированию роста фетальных метатарзальных эксплантатов крыс, что сопровождалось уменьшением пролиферации и гипертрофии клеток и частичным ингибированием активности mTOR. В хондрогенных клетках ATDC5 недостаток лейцина ингибировал увеличение числа клеток, аккумуляцию протеогликана, а также экспрессию коллагена X типа (КОЛ X) и Ihh [33].

Глюкоза. Регуляция mTOR глюкозой осуществляется с использованием нескольких механизмов: ингибирование mTOR происходит при лимитировании глюкозы вследствие снижения соотношения аденозинтрифосфат/аденозинмонофосфат (АТФ/АМФ) с последующей активацией АМПК [54] или глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (GAPDH)-зависимого ингибирования Rheb [55]. mTOR регулируется глюкозой и может быть важным участником метаболизма хондроцитов, поскольку некоторые исследования продемонстрировали важную роль гликолиза в биологии суставных хондроцитов.

В связи с тем что суставной хрящ не имеет кровеносных сосудов и нечувствителен к инсулину, он использует глюкозу как главный источник энергии, предшественника для биосинтеза ГАГ и регулятора экспрессии генов [56]. В гипоксической среде суставного хряща анаэробный гликолиз считается основным способом продукции АТФ для поддержания биосинтеза ВКМ и сохранения жизнеспособности хондроцитов, тогда как митохондриальное окислительное фосфорилирование служит физиологическим резервом для продукции АТФ [57] и источником свободных радикалов (ROS), генерируемых в митохондриальной цепи переноса электронов для поддержания клеточного окислительно-восстановительного равновесия в пользу гликолиза [58]. Необходимость гликолиза для биосинтеза протеогликанов суставного хряща подтверждается тем, что он более эффективно подавляется ингибиторами гликолиза, чем разбавителями окислительного фосфорилирования. Более того, окисление GAPDH перекисью водорода приводило к ингибированию биосинтеза коркового белка протеогликана в экспериментах *in vitro* и на модели острого артрита в опытах на животных [59].

Гликолиз регулируется экспрессией транспортеров глюкозы (GLUTs) посредством провоспалительных цитокинов. Как анаболические (трансформирующий ростовой фактор β 1 – ТРФ β 1), так и катаболические (ИЛ1 β) факторы способны в равной степени усиливать транспорт глюкозы в культурах здоровых хондроцитов человека. Между тем транспорт глюкозы, стимулируемый ТРФ β 1, не был связан с повышением экспрессии GLUTs (1, 3, 6, 8, 10) и включал активацию сигнальных путей протеин-киназы C (PKC) и ERK, тогда как в случае ИЛ1 β он сопровождался повышением экспрессии GLUT1 и 6 и зависел от PKC и p38 MAP-киназы, а также продуцировал высокие уровни лактата, указывая на активацию гликолиза [56].

Ингибирование гликолиза фторидом натрия приводило к снижению синтеза АТФ, ингибированию пролиферации и дифференцировки хондроцитов человека и их гибели. Более того, обработка хондроцитов фторидом натрия в комбинации с лактатом увеличивала экспрессию генов, ассоциированных с гипертрофией хондроцитов: щелочной фосфатазы, СЭРФ, КОЛ X, ММП13 и ММП9 [60]. Изменение функций гликолиза также наблюдали при ОА. Например, развитие спонтанного ОА у морских свинок связано со снижением уровня внутриклеточного АТФ на 50%, несмотря на отсутствие нарушений в структуре митохондрий и с адаптивным увеличением гликолиза, на которое указывало увеличение соотношения концентрации лактат/пируват [57].

Между тем протеомные исследования хондроцитов больных ОА показали, что концентрации белков гликолиза (энолазы, GAPDH, фруктозо-дифосфат альдолазы) снижены [61]. Более того, ингибитор GAPDH – ацетат натрия – вызывал апоптоз хондроцитов, регистрируемый по увеличению уровней цитохром-С-оксидазы и каспазы 3, а также продукции ROS [62]. Кроме того, значительное снижение уровня мРНК GLUT1 наблюдали в клинических образцах хряща больных ОА, что, как предполагается, вызывает неспособность его регенерации у больных ОА [63].

Факторы роста. Положительными регуляторами mTOR во многих тканях являются факторы роста, прежде

всего инсулиновый фактор роста 1 (ИФР1). В суставном хряще поддержание ВКМ, зависящее от ростовых факторов, также опосредуется mTOR. Поэтому уменьшение ИФР-стимулируемого синтеза протеогликанов в культурах нормальных хондроцитов человека наблюдали при ингибировании mTOR [64]. Кроме того, СПМТ связан с повышением экспрессии гена тканевого ингибитора металлопротеиназ 3 в присутствии ТРФβ в суставных хондроцитах человека и может обеспечивать укрепление матрикса суставного хряща, увеличивать жизнеспособность хондроцитов и поддерживать целостность тканей сустава [65].

Функции негативных регуляторов mTOR в хондроцитах

АМПК является гетеротримерной серин-треонинкиназой, которая активируется при лимитировании внутриклеточной энергии. Она стимулирует катаболизм АТФ и ингибирует активность его биосинтеза [66]. У млекопитающих АМПК активирует комплекс TSC2–TSC1 и, таким образом, ингибирует mTOR [67]. АМПК регулирует гомеостаз энергии и метаболизм клеток, а также обладает противовоспалительными свойствами во многих тканях.

Активность АМПК также поддерживает гомеостаз суставного хряща, поскольку сохраняется в нормальных суставных хондроцитах и хряще, но снижается в хондроцитах и хряще больных ОА, а также в нормальных хондроцитах, обработанных ИЛ1β или фактором некроза опухоли α (ФНОα). Снижение АМПК приводило к усилению катаболического ответа на ИЛ1β или ФНОα в хондроцитах человека и мышей и было связано с увеличением высвобождения ММП3 и ММП13. Более того, активаторы АМПК подавляли прокатаболическое действие ИЛ1β и ФНОα в хондроцитах и способность ФНОα и ИЛ8 индуцировать экспрессию КОЛ X [68–70].

Гипоксия. В регуляции mTOR посредством гипоксии участвуют белки REDD (regulated in development and DNA damage response) 1/2, передающие сигналы на комплекс TSC1/2 [71].

Низкая концентрация кислорода является оптимальной и протективной для суставного хряща, поскольку при гипоксии наблюдалось ингибирование каспазы 8 и продукции ROS, которые были предварительно индуцированы в суставных хондроцитах обработкой ингибитором протеосом и стимулятором апоптоза ФНО-зависимым ингибирующим апоптоз лигандом (TNF-related apoptosis-inducing ligand; TRAIL) в условиях нормальной (20%) концентрации кислорода [72]. В присутствии оптимальной (5%) концентрации кислорода для суставных хондроцитов свиньи наблюдались продукция максимального количества АТФ и наиболее эффективная защита от стимулирующего воздействия ИЛ1 и NO, тогда как в присутствии 20% или 1% концентрации кислорода уровни АТФ снижались, а экспрессия АМПК повышалась [73, 74]. Более того, при гипоксии, индуцированной хлоридом кобальта (миметик гипоксии), увеличивались поглощение глюкозы и продукция лактата и повышалась экспрессия мРНК GLUT1 в культуре суставных хондроцитов [63, 75].

НIF – транскрипционные факторы, которые осуществляют контроль концентрации кислорода [76]. Активность NIF необходима для функционирования как фетального, так и взрослого хряща. Например, в ростковой пла-

стинке NIF1α экспрессируется в центральной ее части [77], а его инактивация в фетальных хондроцитах значительно ингибирует анаэробную продукцию энергии и синтез ВКМ [78]. Во взрослом суставном хряще NIF1α найден как в хондроцитах здоровых лиц, так и у больных ОА, причем в хряще больных ОА экспрессия NIF1α увеличивается в зависимости от тяжести заболевания [78]. Кроме того, NIF1α, как предполагается, вовлекается в репарацию хряща, поскольку наблюдалась продукция гиалинового матрикса при суперпродукции NIF1α в присутствии ИФР1 и морфогенетического белка кости 2 (BMP2) в клетках периоста в области хондральных повреждений коленных суставов животных [79].

Гексозаминовый путь. Сигнальный путь гексозамина является дополнительным сенсором глюкозы и ответствен за ее перераспределение либо для синтеза АТФ, либо для запасаения в форме липидов и/или гликогена. Этот путь может также участвовать в синтезе лептина и адипонектина, которые способны активировать АМПК и ингибировать mTOR [24]. Другой механизм участия сигнального пути гексозамина в ингибировании mTOR наблюдали в суставных хондроцитах здоровых лиц, где глюкозамин активировал аутофагию и ингибировав поглощение глюкозы в качестве конкурентного ингибитора [80, 81].

Аминосахар глюкозамин широко используется для облегчения симптомов ОА, возможно, потому что хондроциты используют этот сахар как структурный компонент для синтеза ГАГ в ВКМ [82]. Показано, что глюкозамин уменьшает скорость пролиферации, дифференцировки и минерализации фетальных и суставных хондроцитов [83, 84] путем подавления катаболических ММП, агреканизации, провоспалительных медиаторов, а также путем индукции синтеза проанаболической гиалуроновой кислоты *in vitro* [85–87].

В некоторых клинических исследованиях сообщалось об уменьшении боли и остановке процесса сужения суставной щели после лечения глюкозамином [88]. Это может быть связано с индукцией экспрессии ТРФβ1и ростового фактора соединительной ткани, а также с уменьшением содержания маркера разрушения хряща – олигомерного белка матрикса хряща [89, 90]. Между тем в большинстве клинических исследований сообщается о значительном количестве не ответивших на терапию глюкозамином или меньшем терапевтическом эффекте по сравнению с нефармакологическими средствами, такими как упражнения или снижение массы тела [91–93].

Липиды. Избыточная масса тела является одним из главных факторов риска ОА. Активированная белая жировая ткань увеличивает синтез провоспалительных цитокинов, тогда как адипокины способны усиливать синовиальное воспаление, активность разрушающих хрящ ферментов и ремоделирование матрикса кости [94, 95]. Например, показано, что адипонектин индуцировал активность ММП и резорбцию коллагена в хряще больных ОА или в культивируемых хондроцитах человека, которая была опосредована ингибитором mTOR АМПК [96–98].

Изменения в метаболизме липидов, ассоциированные с ОА, включают увеличение депонирования клеточных фосфолипидов и липидов в суставе [99–101]. Это нарушает метаболизм холестерина и жирных кислот в хондроцитах больных ОА [101–103]. Недавно показано, что при использовании пищевой добавки, содержащей n-3 полиненасыщенные жирные кислоты (n-3PUFAs), значительно

уменьшалось разрушение суставного хряща, снижалась экспрессия MMP13 и ADAMTS-5 в модельной системе ОА в опытах на животных. При этом экзогенные и эндогенные n-3PUFAs подавляли экспрессию mTOR и усиливали аутофагию в суставных хондроцитах. Усиление синтеза n-3PUFAs из n-6PUFAs оказалось способным замедлить возникновение ОА благодаря ингибированию mTOR, усилению аутофагии и жизнеспособности суставных хондроцитов [104].

mTOR как маркер системных проявлений остеоартроза

Данные, приведенные выше, показывают важную роль СПМТ в хондроцитах хряща как здоровых лиц, так и больных ОА. Между тем системные проявления ОА требуют дополнительных исследований, сфокусированных на тканях вне суставного хряща, которые также повреждаются при ОА [105].

Изменения экспрессии нетканеспецифичных регуляторных белков, связанные с проявлениями заболевания, могут свидетельствовать о нарушении экспрессии генов в других тканях, помимо хряща. Это подтверждается наблюдениями по изменению экспрессии генов, связанных с фетальной дифференцировкой хондроцитов, таких как BMP 2, 4 и 6, а также связанного с runt транскрипционного фактора 2 (Runx2) в периферической крови больных ОА [106].

Оценка изменений экспрессии генов в крови является новым подходом в исследованиях по ОА. Так, на основании транскриптомного и микрочипового анализа экспрессии генов оказалось возможным дифференцировать больных ОА и контрольных лиц [107, 108]. Более того, повышение экспрессии гена ИЛ1 β в крови больных ОА сопровождалось усилением боли и предопределяло более высокий риск рентгенологического прогрессирования заболевания [109], тогда как высокая экспрессия ФНО α ассоциировалась с высокой экспрессией mTOR и более частыми случаями синовита у больных ОА [39].

Повышение экспрессии гена mTOR в крови может сопровождаться усилением разрушения суставного хряща, поскольку сообщалось о положительной корреляции между экспрессией гена mTOR в крови и суставном хряще тех же больных ОА на поздней стадии заболевания [39]. Кроме

того, экспрессия гена mTOR оказалась повышенной как в суставном хряще, так и в крови больных ОА на поздней стадии [39].

В то же время избыточное ингибирование экспрессии mTOR также неблагоприятно, поскольку низкая экспрессия гена mTOR ассоциировалась с усилением боли при функционировании сустава [39], которая может быть связана с активацией сигнального пути ERK в сенсорных нейронах [110]. Поэтому, хотя терапия мышцей ингибиторами mTOR оказалась способна уменьшить тяжесть экспериментального ОА [78, 79] и воспалительного артрита [38, 111], необходимы дополнительные исследования по ингибированию гена mTOR у больных ОА.

Вывод

Значение регуляции mTOR в метаболизме хондроцитов, а также изменения активности положительных и отрицательных регуляторов СПМТ при ОА свидетельствуют о его участии в развитии, прогрессировании и исходе заболевания. Между тем большинство исследований СПМТ, связанных с ОА, проведено на животных моделях или культивируемых хондроцитах. Результаты, полученные в этих условиях, не обязательно означают, что идентичные процессы происходят у больных ОА. Поэтому клинические исследования необходимы для идентификации роли СПМТ при ОА. Поскольку mTOR регулируется нутриентами, СПМТ способен объединить такие процессы, как энергетический метаболизм, рост, пролиферацию и жизнеспособность клеток. Это создает возможности для идентификации новых терапевтических мишеней, использование которых будет реализовано в создании безопасных и эффективных терапевтических средств, способных ослабить симптомы и замедлить прогрессирование ОА.

Прозрачность исследования

Работа осуществлена при финансовой поддержке РФФИ (проекты №12-04-00038a).

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Poole AR, Guilak F, Abramson SB. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Moskowitz RW, Altman RD, Hochberg MC, et al., editors. Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management. 4th ed. Lippincott, PA: Williams & Wilkins; 2007. P. 27-9.
2. Tchetina EV. Developmental mechanisms in articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Arthritis*. 2011;2011:683970. doi: 10.1155/2011/683970. Epub 2010 Dec 29.
3. Tchetina EV, Webb G, Poole AR. Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions. *J Rheumatol*. 2005 May;32(5):876-86.
4. Tchetina EV, Kobayashi M, Yasuda T, et al. Chondrocyte hypertrophy can be induced by a cryptic sequence of type II collagen and is accompanied by the induction of MMP-13 and collagenase activity: implications for development and arthritis. *Matrix Biology*. 2007 May;26(4):247-58. doi: 10.1016/j.matbio.2007.01.006. Epub 2007 Jan 19.
5. Tchetina EV, Antoniou J, Tanzer M, et al. Transforming growth factor-beta2 suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic cartilage, reduces expression of genes associated with chondrocyte hypertrophy and degradation, and increases prostaglandin E(2) production. *Am J Pathol*. 2006 Jan;168(1):131-40. doi: 10.2353/ajpath.2006.050369
6. Glasson SS. In vivo osteoarthritis target validation utilizing genetically-modified mice. *Curr Drug Targets*. 2007 Feb;8(2):367-76. doi: 10.2174/138945007779940061
7. Little CB, Fosang AJ. Is cartilage matrix breakdown an appropriate therapeutic target in osteoarthritis – insights from studies of aggrecan and collagen proteolysis? *Curr Drug Targets*. 2010 May;11(5):561-75. doi: 10.2174/138945010791011956
8. Botter SM, Glasson SS, Hopkins B, et al. ADAMTS5-/- mice have less subchondral bone changes after induction of osteoarthritis through surgical instability: implications for a link between cartilage and subchondral bone changes. *Osteoarthr Cartilage*. 2009 May;17(5):636-45. doi: 10.1016/j.joca.2008.09.018. Epub 2008 Oct 17.

9. Bondeson J. Are we moving in the right direction with osteoarthritis drug discovery? *Expert Opin Ther Targets*. 2011 Dec;15(12):1355-68. doi: 10.1517/14728222.2011.636740. Epub 2011 Nov 16.
10. Chevalier X, Mugnier B, Bouvenot G. Targeted anti-cytokine therapies for osteoarthritis. *Bull Acad Natl Med*. 2006 Oct;190(7):1411-20.
11. Gonzalo-Gil E, Criado G, Santiago B, et al. Transforming growth factor (TGF)- β signalling is increased in rheumatoid synovium but TGF- β blockade does not modify experimental arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2013 Nov;174(2):245-55. doi: 10.1111/cei.12179
12. Schroepel JP, Crist JD, Anderson HC, Wang J. Molecular regulation of articular chondrocyte function and its significance in osteoarthritis. *Histol Histopathol*. 2011 Mar;26(3):377-94.
13. Rousseau JC, Delmas PD. Biological markers in osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007 Jun;3(6):346-56. doi: 10.1038/ncprheum0508
14. Wu L, Huang X, Li L, et al. Insights on biology and pathology of HIF-1 α /-2 α , TGF β /BMP, Wnt/ β -catenin, and NF- κ B pathways in osteoarthritis. *Curr Pharm Design*. 2012;18(22):3293-312. doi: 10.2174/1381612811209023293
15. Scanzello CR, Plaas A, Crow MK. Innate immune system activation in osteoarthritis: is osteoarthritis a chronic wound? *Curr Opin Rheumatol*. 2008 Sept;20(5):565-72. doi: 10.1097/BOR.0b013e32830aba34
16. Marcu KB, Otero M, Olivetto E, et al. NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA. *Curr Drug Targets*. 2010 May;11(5):599-613. doi: 10.2174/138945010791011938
17. Valdes AM, Spector TD. The clinical relevance of genetic susceptibility to osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010 Feb;24(1):3-14. doi: 10.1016/j.berh.2009.08.005
18. Dreier R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(5):216. doi: 10.1186/ar3117. Epub 2010 Sep 16.
19. Prasadam I, van Gennip S, Friis T, et al. ERK-1/2 and p38 in the regulation of hypertrophic changes of normal articular cartilage chondrocytes induced by osteoarthritic subchondral osteoblasts. *Arthritis Rheum*. 2010 May;62(5):1349-60. doi: 10.1002/art.27397
20. Li TF, Gao L, Sheu TJ, et al. Aberrant hypertrophy in Smad3-deficient murine chondrocytes is rescued by restoring transforming growth factor beta-activated kinase 1/activating transcription factor 2 signaling: a potential clinical implication for osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 Aug;62(8):2359-69. doi: 10.1002/art.27537
21. Berenbaum F. Signaling transduction: target in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2004 Sep;16(5):616-22. doi: 10.1097/01.bor.0000133663.37352.4a
22. Blom AB, van Lent PL, van der Kraan PM, van den Berg WB. To seek shelter from the WNT in osteoarthritis? WNT-signaling as a target for osteoarthritis therapy. *Curr Drug Targets*. 2010 May;11(5):620-9. doi: 10.2174/138945010791011901
23. Walker WA, Blackburn G. Symposium introduction: nutrition and gene regulation. *J Nutr*. 2004 Sep;134(9):2434S-6S.
24. Marshall S. Role of insulin, adipocyte hormones, and nutrient-sensing pathways in regulating fuel metabolism and energy homeostasis: a nutritional perspective of diabetes, obesity, and cancer. *Sci STKE*. 2006 Aug 1;2006(346):re7. doi: 10.1126/stke.3462006re7
25. Kimball SR, Jefferson LS. Molecular mechanisms through which amino acids mediate signaling through the mammalian target of rapamycin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004 Jan;7(1):39-44. doi: 10.1097/00075197-200401000-00008
26. Maloney CA, Rees WD. Gene-nutrient interactions during fetal development. *Reproduction*. 2005 Oct;130(4):401-10. doi: 10.1530/rep.1.00523
27. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*. 2009 Oct 15;122(Pt 20):3589-94. doi: 10.1242/jcs.051011
28. Altomare DA, Khaled AR. Homeostasis and the importance for a balance between AKT/mTOR activity and intracellular signaling. *Curr Med Chem*. 2012;19(22):3748-62. doi: 10.2174/092986712801661130
29. Martin TD, Chen X-W, Kaplan REW, et al. Ral and Rheb GTPase activating proteins integrate mTOR and GTPase signaling in aging, autophagy, and tumor cell invasion. *Mol Cell*. 2014 Jan 22;53(2):209-20. doi: 10.1016/j.molcel.2013.12.004. Epub 2014 Jan 2.
30. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Jan;12(1):21-35. doi: 10.1038/nrm3025. Epub 2010 Dec 15.
31. Wang RH, Kim HS, Xiao C, et al. Hepatic Sirt1 deficiency in mice impairs mTORc2/Akt signaling and results in hyperglycemia, oxidative damage, and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2011 Nov;121(11):4477-90. doi: 10.1172/JCI46243. Epub 2011 Oct 3.
32. Bohensky J, Leshinsky S, Srinivas V, Shapiro IM. Chondrocyte autophagy is stimulated by HIF-1 dependent AMPK activation and mTOR suppression. *Pediatr Nephrol*. 2010 Apr;25(4):633-42. doi: 10.1007/s00467-009-1310-y. Epub 2009 Oct 15.
33. Kim MS, Wu KY, Auyeung V, et al. Leucine restriction inhibits chondrocyte proliferation and differentiation through mechanisms both dependent and independent of mTOR signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Jun; 296(6):E1374-82. doi: 10.1152/ajpendo.91018.2008. Epub 2009 Apr 28.
34. Sanchez CP, He Y-Z. Bone growth during rapamycin therapy in young rats. *BMC Pediatrics*. 2009 Jan 13;9:3. doi: 10.1186/1471-2431-9-3
35. Rokutanda S, Fujita T, Kanatani N, et al. Akt regulates skeletal development through GSK3, mTOR, and FoxOs. *Dev Biol*. 2009 Apr 1;328(1):78-93. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.01.009. Epub 2009 Jan 14.
36. Lai LP, Lilley BN, Sanes JR, McMahon AP. Lkb1/Stk11 regulation of mTOR signaling controls the transition of chondrocyte fates and suppresses skeletal tumor formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 Nov 26;110(48):19450-5. doi: 10.1073/pnas.1309001110. Epub 2013 Nov 11.
37. Wei Y, Sinha S, Levine B. Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy*. 2008 Oct;4(7):949-51. doi: 10.4161/auto.6788. Epub 2008 Oct 14.
38. Cejka D, Hayer S, Niederreiter B, et al. Mammalian target of rapamycin signaling is crucial for joint destruction in experimental arthritis and is activated in osteoclasts from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 Aug;62(8):2294-302. doi: 10.1002/art.27504
39. Tchetina EV, Poole AR, Zaitseva EM, et al. Differences in Mammalian target of rapamycin gene expression in the peripheral blood and articular cartilages of osteoarthritic patients and disease activity. *Arthritis*. 2013;2013:461486. doi: 10.1155/2013/461486. Epub 2013 Jun 25.
40. Lotz MK, Carames B. Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and OA. *Nat Rev Rheumatol*. 2011 Aug;7(10):579-87. doi: 10.1038/nrrheum.2011.109
41. Srinivas V, Bohensky J, Zahm AM, Shapiro IM. Autophagy in mineralizing tissues: microenvironmental perspectives. *Cell Cycle*. 2009 Feb 1;8(3):391-3. doi: 10.4161/cc.8.3.7545
42. Srinivas V, Bohensky J, Shapiro IM. Autophagy: a new phase in the maturation of growth plate chondrocytes is regulated by HIF, mTOR and AMP kinase. *Cells Tissues Organs*. 2009;189(1-4):88-92. doi: 10.1159/000151428. Epub 2009 Feb 4.
43. Sasaki H, Takayama K, Matsushita T, et al. Autophagy modulates osteoarthritis-related gene expression in human chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2012 Jun;64(6):1920-8. doi: 10.1002/art.34323. Epub 2011 Dec 6.
44. Raught B, Gingras AC, Sonenberg N. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Jun 19;98(13):7037-44.

45. Zhang M, Zhang J, Lu L, et al. Enhancement of chondrocyte autophagy is an early response in the degenerative cartilage of the temporomandibular joint to biomechanical dental stimulation. *Apoptosis*. 2013 Apr;18(4):423-34. doi: 10.1007/s10495-013-0811-0
46. Shapiro IM, Adams CS, Freeman S, Srinivas V. Fate of the hypertrophic chondrocyte: microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005 Dec;75(4):330-9. doi: 10.1002/bdrc.20057
47. Srinivas V, Shapiro IM. Chondrocytes embedded in the epiphyseal growth plates of long bones undergo autophagy prior to the induction of osteogenesis. *Autophagy*. 2006 Jul-Sep;2(3):215-6. doi: 10.4161/auto.2649. Epub 2006 Jul 6.
48. Almonte-Becerril M, Navarro-Garcia F, Gonzalez-Robles A, et al. Cell death of chondrocytes is a combination between apoptosis and autophagy during the pathogenesis of osteoarthritis within an experimental model. *Apoptosis*. 2010 May;15(5):631-8. doi: 10.1007/s10495-010-0458-z
49. Carames B, Taniguchi N, Otsuki S, et al. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 Mar;62(3):791-801. doi: 10.1002/art.27305
50. Carames B, Hasegawa A, Taniguchi N, et al. Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012 Apr;71(4):575-81. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200557. Epub 2011 Nov 14.
51. Phornphutkul C, Wu KY, Auyeung V, et al. mTOR signaling contributes to chondrocyte differentiation. *Dev Dyn*. 2008 Mar;237(3):702-12. doi: 10.1002/dvdy.21464
52. Proud CG. Amino acids and mTOR signalling in anabolic function. *Biochem Soc Trans*. 2007 Nov;35(Pt 5):1187-90. doi: 10.1042/BST0351187
53. Akhtar N, Miller MJ, Haqqi TM. Effect of a Herbal-Leucine mix on the IL-1 β -induced cartilage degradation and inflammatory gene expression in human chondrocytes. *BMC Complement Altern Med*. 2011 Aug 19;11:66. doi: 10.1186/1472-6882-11-66
54. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 2003 Nov 26;115(5):577-90. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00929-2
55. Lee MN, Ha SH, Kim J, et al. Glycolytic flux signals to mTOR through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-mediated regulation of Rheb. *Mol Cell Biol*. 2009 Jul;29(4):3991-4001. doi: 10.1128/MCB.00165-09. Epub 2009 May 18.
56. Shikhman AR, Brinson DC, Lotz MK. Distinct pathways regulate facilitated glucose transport in human articular chondrocytes during anabolic and catabolic responses. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Jun;286(6):E980-5. doi: 10.1152/ajpendo.00243.2003. Epub 2004 Jan 28.
57. Johnson K, Jung A, Murphy A, et al. Mitochondrial oxidative phosphorylation is a downstream regulator of nitric oxide effects on chondrocyte matrix synthesis and mineralization. *Arthritis Rheum*. 2000 Jul;43(7):1560-70. doi: 10.1002/1529-0131(200007)43:7<1560::AID-ANR21>3.0.CO;2-S
58. Martin JA, Martini A, Molinari A, et al. Mitochondrial electron transport and glycolysis are coupled in articular cartilage. *Osteoarthr Cartilage*. 2012 Apr;20(4):323-9. doi: 10.1016/j.joca.2012.01.003. Epub 2012 Jan 16.
59. Baker MS, Bolis S, Lowther DA. Oxidation of articular cartilage glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) occurs in vivo during carrageenin-induced arthritis. *Agents Actions*. 1991 Mar;32(3-4):299-304. doi: 10.1007/BF01980890
60. Nishida T, Kubota S, Aoyama E, Takigawa M. Impaired glycolytic metabolism causes chondrocyte hypertrophy-like changes via promotion of phospho-Smad1/5/8 translocation into nucleus. *Osteoarthr Cartilage*. 2013 May;21(5):700-9. doi: 10.1016/j.joca.2013.01.013. Epub 2013 Feb 4.
61. Ruiz-Romero C, Carreira V, Rego I, et al. Proteomic analysis of human osteoarthritic chondrocytes reveals protein changes in stress and glycolysis. *Proteomics*. 2008 Feb;8(3):495-507. doi: 10.1002/pmic.200700249
62. Jiang L, Li L, Geng C, et al. Monosodium iodoacetate induces apoptosis via the mitochondrial pathway involving ROS production and caspase activation in rat chondrocytes in vitro. *J Orthop Res*. 2013 Mar;31(3):364-9. doi: 10.1002/jor.22250. Epub 2012 Nov 1.
63. Peansukmanee S, Vaughan-Thomas A, Carter SD, et al. Effects of hypoxia on glucose transport in primary equine chondrocytes in vitro and evidence of reduced GLUT1 gene expression in pathologic cartilage in vivo. *J Orthop Res*. 2009 Apr;27(4):529-35. doi: 10.1002/jor.20772
64. Starkman BG, Cravero JD, Delcarlo M, Loeser RF. IGF-I stimulation of proteoglycan synthesis by chondrocytes requires activation of the PI 3-kinase pathway but not ERK MAPK. *Biochem J*. 2005 Aug 1;389(Pt 3):723-9. doi: 10.1042/BJ20041636
65. Qureshi HY, Ahmad R, Sylvester J, Zafarullah M. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway for regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression by TGF-beta in human chondrocytes. *Cell Signal*. 2007 Aug;19(8):1643-51. doi: 10.1016/j.cellsig.2007.02.007. Epub 2007 Feb 22.
66. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*. 2005 Jan;1(1):15-25. doi: 10.1016/j.cmet.2004.12.003
67. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008 Apr 25;30(2):214-26. doi: 10.1016/j.molcel.2008.03.003
68. Terkeltaub R, Yang B, Lotz M, Liu-Bryan R. Chondrocyte AMP-activated protein kinase activity suppresses matrix degradation responses to proinflammatory cytokines interleukin-1 β and tumor necrosis factor α . *Arthritis Rheum*. 2011 Jul;63(7):1928-37. doi: 10.1002/art.30333
69. Petrusson F, Husa M, June R, et al. Linked decreases in liver kinase B1 and AMP-activated protein kinase activity modulate matrix catabolic responses to biomechanical injury in chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2013 Jul 25;15(4):R77. doi: 10.1186/ar4254
70. Husa M, Petrusson F, Lotz M, et al. C/EBP homologous protein drives pro-catabolic responses in chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2013 Dec 19;15(6):R218. doi: 10.1186/ar4415
71. Sofer A, Lei K, Johannessen CM, Ellisen LW. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol Cell Biol*. 2005 Jul;25(14):5834-45. doi: 10.1128/MCB.25.14.5834-5845.2005
72. Seol JW, Lee HB, Lee YJ, et al. Hypoxic resistance to articular chondrocyte apoptosis – a possible mechanism of maintaining homeostasis of normal articular cartilage. *FEBS J*. 2009 Dec;276(24):7375-85. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07451.x
73. Fermor B, Christensen SE, Youn I, et al. Oxygen, nitric oxide and articular cartilage. *Eur Cell Mater*. 2007 Apr 11;13:56-65.
74. Fermor B, Gurumurthy A, Diekmann BO. Hypoxia, ROS and energy metabolism in articular cartilage. *Osteoarthr Cartilage*. 2010 Sep;18(9):1167-73. doi: 10.1016/j.joca.2010.06.004. Epub 2010 Jul 13.
75. Mobasher A, Platt N, Thorpe C, Shakibaei M. Regulation of 2-deoxy-D-glucose transport, lactate metabolism, and MMP-2 secretion by the hypoxia mimetic cobalt chloride in articular chondrocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Dec;1091:83-93. doi: 10.1196/annals.1378.057
76. Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999;15:551-78. doi: 10.1146/annurev.cellbio.15.1.551
77. Pfander D, Gelse K. Hypoxia and osteoarthritis: how chondrocytes survive hypoxic environments. *Curr Opin Rheumatol*. 2007 Sep;19(5):457-62. doi: 10.1097/BOR.0b013e3282ba5693
78. Pfander D, Cramer T, Swoboda B. Hypoxia and HIF-1 α in osteoarthritis. *Int Orthop*. 2005 Feb;29(1):6-9. doi: 10.1007/s00264-004-0618-2. Epub 2004 Dec 21.

79. Gelse K, Mühle C, Knaup K, et al. Chondrogenic differentiation of growth factor-stimulated precursor cells in cartilage repair tissue is associated with increased HIF-1 α activity. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008 Dec;16(12):1457-65. doi: 10.1016/j.joca.2008.04.006. Epub 2008 Jun 3.
80. Windhaber RA, Wilkins RJ, Meredith D. Functional characterization of glucose transport in bovine articular chondrocytes. *Pflugers Arch*. 2003 Aug;446(5):572-7. doi: 10.1007/s00424-003-1080-5. Epub 2003 May 15.
81. Carames B, Kiosses WB, Akasaki Y, et al. Glucosamine activates autophagy in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum*. 2013 Jul;65(7):1843-52. doi: 10.1002/art.37977
82. Mobasheri A, Vannucci SJ, Bondy CA, et al. Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis. *Histol Histopathol*. 2002 Oct;17(4):1239-67.
83. Nakatani S, Mano H, Im R, et al. Glucosamine regulates differentiation of a chondrogenic cell line, ATDC5. *Biol Pharm Bull*. 2007 Mar;30(3):433-8. doi: 10.1248/bpb.30.433
84. Terry DE, Rees-Milton K, Pruss C, et al. Modulation of articular chondrocyte proliferation and anionic glycoconjugate synthesis by glucosamine (GlcN), N-acetyl GlcN (GlcNAc) GlcN sulfate salt (GlcN.S) and covalent glucosamine sulfates (GlcN-SO4). *Osteoarthritis Cartilage*. 2007 Aug;15(8):946-56. doi: 10.1016/j.joca.2007.02.010. Epub 2007 Apr 2.
85. Piperno M, Reboul P, Hellio Le Graverand MP, et al. Glucosamine sulfate modulates dysregulated activities of human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*. 2000 May;8(3):207-12. doi: 10.1053/joca.1999.0291
86. Gouze JN, Gouze E, Popp MP, et al. Exogenous glucosamine globally protects chondrocytes from the arthritogenic effects of IL-1 β . *Arthritis Res Ther*. 2006;8:R173. doi: 10.1186/ar2082
87. Igarashi M, Kaga I, Takamori Y, et al. Effects of glucosamine derivatives and uronic acids on the production of glycosaminoglycans by human synovial cells and chondrocytes. *Int J Mol Med*. 2011 Jun;27(6):821-7. doi: 10.3892/ijmm.2011.662. Epub 2011 Mar 31.
88. Pavelka K, Gatterova J, Olejarova M, et al. Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Arch Intern Med*. 2002 Oct 14;162(18):2113-23. doi: 10.1001/archinte.162.18.2113
89. Petersen SG, Saxne T, Heinegard D, et al. Glucosamine but not ibuprofen alters cartilage turnover in osteoarthritis patients in response to physical training. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Jan;18(1):34-40. doi: 10.1016/j.joca.2009.07.004. Epub 2009 Jul 15.
90. Ali AA, Lewis SM, Badgley HL, et al. Oral glucosamine increases expression of transforming growth factor β 1 (TGF β 1) and connective tissue growth factor (CTGF) mRNA in rat cartilage and kidney: implications for human efficacy and toxicity. *Arch Biochem Biophys*. 2011 Jun 1;510(1):11-8. doi: 10.1016/j.abb.2011.03.014. Epub 2011 Apr 3.
91. Durmus D, Alayli G, Aliyazicioglu Y, et al. Effects of glucosamine sulfate and exercise therapy on serum leptin levels in patients with knee osteoarthritis: preliminary results of randomized controlled clinical trial. *Rheumatol Int*. 2013 Mar;33(3):593-9. doi: 10.1007/s00296-012-2401-9. Epub 2012 Apr 3.
92. Henrotin Y, Mobasheri A, Marty M. Is there any scientific evidence for the use of glucosamine in the management of human osteoarthritis? *Arthritis Res Ther*. 2012 Jan 30;14(1):201. doi: 10.1186/ar3657
93. Sherman AL, Ojeda-Correal G, Mena J. Use of glucosamine and chondroitin in persons with osteoarthritis. *PM R*. 2012 May;4(5 Suppl):S110-6. doi: 10.1016/j.pmrj.2012.02.021
94. Iannone F, Lapadula G. Obesity and inflammation – targets for OA therapy. *Curr Drug Targets*. 2010 May;11(5):586-98. doi: 10.2174/138945010791011857
95. Villavilla A, Gomez R, Largo R, Herrero-Beaumont G. Lipid transport and metabolism in healthy and osteoarthritic cartilage. *Int J Mol Sci*. 2013 Oct 16;14(10):20793-808. doi: 10.3390/ijms141020793
96. Tong KM, Chen CP, Huang KC, et al. Adiponectin increases MMP-3 expression in human chondrocytes through AdipoR1 signaling pathway. *J Cell Biochem*. 2011 May;112(5):1431-40. doi: 10.1002/jcb.23059
97. Kang EH, Lee YJ, Kim TK, et al. Adiponectin is a potential catabolic mediator in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(6):R231. doi: 10.1186/ar3218. Epub 2010 Dec 31.
98. Tang CH, Chiu YC, Tan TW, et al. Adiponectin enhances IL-6 production in human synovial fibroblast via an AdipoR1 receptor, AMPK, p38, and NF- κ B pathway. *J Immunol*. 2007 Oct 15;179(8):5483-92. doi: 10.4049/jimmunol.179.8.5483
99. Gkretsi V, Simopoulou T, Tsezou A. Lipid metabolism and osteoarthritis: Lessons from atherosclerosis. *Prog Lipid Res*. 2011 Apr;50(2):133-40. doi: 10.1016/j.plipres.2010.11.001. Epub 2010 Nov 27.
100. Kosinska MK, Liebisch G, Lochnit G, et al. A lipidomic study of phospholipid classes and species in human synovial fluid. *Arthritis Rheum*. 2013 Sep;65(9):2323-33. doi: 10.1002/art.38053
101. Tsezou A, Iliopoulos D, Malizos KN, Simopoulou T. Impaired expression of genes regulating cholesterol efflux in human osteoarthritic chondrocytes. *J Orthop Res*. 2010 Aug;28(8):1033-9. doi: 10.1002/jor.21084
102. Bernstein P, Sticht C, Jacobi A, et al. Expression pattern differences between osteoarthritic chondrocytes and mesenchymal stem cells during chondrogenic differentiation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Dec;18(12):1596-607. doi: 10.1016/j.joca.2010.09.007. Epub 2010 Sep 29.
103. Gabay O, Sanchez, Salvat C, et al. A phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Jan;18(1):106-16. doi: 10.1016/j.joca.2009.08.019. Epub 2009 Sep 15.
104. Huang MJ, Wang L, Jin DD, et al. Enhancement of the synthesis of n-3 PUFAs in fat-1 transgenic mice inhibits mTORC1 signalling and delays surgically induced osteoarthritis in comparison with wild-type mice. *Ann Rheum Dis*. 2014 Sep;73(9):1719-27. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-203231. Epub 2013 Jul 12.
105. Loeser RF. Aging and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011 Sep;23(5):492-6. doi: 10.1097/BOR.0b013e3283494005
106. Grcevic D, Jajic Z, Kovacic N, et al. Peripheral blood expression profiles of bone morphogenetic proteins, tumor necrosis factor-superfamily molecules, and transcription factor Runx2 could be used as markers of the form of arthritis, disease activity, and therapeutic responsiveness. *J Rheumatol*. 2010 Feb;37(2):246-56. doi: 10.3899/jrheum.090167. Epub 2009 Dec 15.
107. Mahr S, Burmester GR, Hilke D, et al. Cis and Trans-acting gene regulation is associated with osteoarthritis. *Am J Hum Genet*. 2006 May;78(5):793-803. doi: 10.1086/503849. Epub 2006 Mar 22.
108. Marshal KW, Zhang H, Yager TD, et al. Blood-based biomarkers for detecting mild osteoarthritis in the human knee. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005 Oct;13(10):861-71. doi: 10.1016/j.joca.2005.06.002
109. Attur M, Belitskaya-Levy I, Oh C, et al. Increased interleukin-1 β gene expression in peripheral blood leukocytes is associated with increased pain and predicts risk for progression of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2011 Jul;63(7):1908-17. doi: 10.1002/art.30360
110. Melemedjian OK, Khoutorsky A, Sorge RE, et al. mTORC1 inhibition induces pain via IRS-1-dependent feedback activation of ERK. *Pain*. 2013 Jul;154(7):1080-91. doi: 10.1016/j.pain.2013.03.021. Epub 2013 Mar 15.
111. Laragione T, Gulko PS. MTOR regulates the invasive properties of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Mol Med*. 2010 Sept-Oct;16(9-10):352-8. doi: 10.2119/molmed.2010.00049. Epub 2010 May 27.