

Использование биопрепаратов

УДК 664.957: 577.1: 596.2

Функциональные компоненты ферментированной хрящевой ткани рыб и их влияние на экспрессию маркеров активации лимфоцитов

© 2017 г. Т.Н. ПИВНЕНКО^{1,*}, Г.Ю. СУХОВЕРХОВА¹, Т.С. ЗАПОРОЖЕЦ², А.К. ГАЖА², Л.А. ИВАНУШКО²

¹ ФГБОУ ВПО "Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет", Владивосток, 690087

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», Владивосток, 690087

e-mail: tnpivnenko@mail.ru*

Поступила 13.07.2016 г.

Принята в печать 07.11.2016 г.

Был изучен состав ферментативного гидролизата хряща рыб, предназначенного для создания нутрицевтиков широкого спектра действия, а также с использованием биомаркеров исследована его противовоспалительная активность. С этой целью применяли ВЭЖХ, капиллярный электрофорез, ингибиторный анализ и цитометрию. Установлено наличие в ГХР уроновых кислот, гексозаминов, свободных Δ-дисахаридов и аминокислот (в растворимом состоянии), коллагена и неколлагеновых белков. Исследование фракционного состава препаратов показало присутствие белок-углеводных конъюгатов с ММ 30–160 кДа. Среди свободных Δ-дисахаридов преобладали несурьфатированные, в то время как дисурьфатированные дисахариды составляли меньшинство, а трисульфатированные полностью отсутствовали. Установлено ингибиторное действие ГХР на сериновые и металлопротеиназы, а также на уровень экспрессии ранних антигенов активации лимфоцитов периферической крови человека как показатель умеренного противовоспалительного действия препаратов.

Ключевые слова: антипротеазная активность, Δ-дисахариды, коллаген, молекулярные биомаркеры, противовоспалительное действие, ферментативный гидролиз, хрящевая ткань рыб.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-3-66-80

В настоящее время изучение биохимических механизмов развития остеоартроза, наиболее распространенного заболевания опорно-двигательного аппарата, значительно расширило спектр хондропротекторов. Первоначально использовали препараты натурального происхождения на основе экстрактов хрящей животных и/или растительных экстрактов (алфлутоп, мукартрин, румалон, артепарон). В дальнейшем стали выделять и очищать отдельные компоненты для создания монопрепаратов на основе гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфатов или глюкозаминов. В качестве хондропротекторов нового поколения, имеющих доказанный клинический эффект, рассматривают комбинированные препараты глюкозаминов с хондроитинсульфатами в сочетании с другими компонентами: витамином Е, полиненасы-

щенными жирными кислотами, аскорбатом марганца, нестероидными противовоспалительными средствами [1–3].

Для получения натуральных веществ хондропротекторного действия чаще всего используют костно-хрящевую ткань крупного рогатого скота, содержащую менее 1% собственно хрящевой ткани и отличающуюся высокой степенью минерализации. Подавляющее большинство способов переработки этого вида сырья сводится к получению монокомпонентных препаратов, что значительно сужает спектр биологической активности конечного продукта. В то же время, известно, что хрящевые рыбы, такие как акулы и скаты, имеют полностью хрящевой скелет, а у хрящевых ганоидов (осетровых) он лишь локально минерализован. Имеются многочисленные сведения о вы-

Список сокращений: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГА – гексозамины; ГАГ – гликозаминогликаны; ГК – гиалуроновая кислота; ГХР – гидролизованный хрящ рыб; КС – кератансульфаты; ММ – молекулярная масса; НКБ – неколлагеновые белки; ОА – остеоартроз; Олиз – оксизин; Опро – оксипролин; ТИМП – тканевые ингибиторы металлопротеиназ; ФГА – фитогемагглютинин; ХС – хондроитинсульфаты.

сокой концентрации ТИМП в хрящевой ткани рыб, а также гликозаминогликанов, содержащих хондроитинсульфаты и кератансульфаты, которые совместно с коллагеном и гиалуроновой кислотой образуют протеогликаны. Влияние этих веществ на метаболизм и регенерацию хрящевой ткани объясняется не только выполняемой ими ролью «готового строительного материала», но и установленной способностью накапливаться в очагах воспаления и снижать его уровень [2–6].

Количественно преобладающим белком протеогликанового комплекса хрящевой ткани является коллаген, который не только выполняет механические функции, но играет важную роль в дифференциации и пролиферации клеток, что определяет применение этого белка и его растворимых производных при остеопорозе и артритах [7–10].

Важную роль в метаболизме хрящевого соединительнотканного матрикса играют ТИМП – низкомолекулярные гликопептиды, подавляющие активность эндогенных коллагенолитических ферментов (КФ 3.4.24) – инициаторов воспалительных процессов и деполимеризации хрящевой ткани [11–12]. На примере акул известно, что концентрация ТИМП в хряще морских организмов значительно выше, чем у наземных животных [13–14].

Применение ферментативного гидролиза для обработки хрящевой ткани рыб позволяет перевести высокомолекулярные компоненты в доступную для усвоения организмом форму при минимальном нарушении их нативной структуры. Полученные таким способом поликомпонентные препараты способны влиять на различные механизмы развития заболеваний опорно-двигательной системы и на иммунный ответ.

В настоящее время доказана ведущая роль иммунной системы в патогенезе хронических деструктивных заболеваний, в том числе и хронического воспаления хрящевой ткани [15]. Основное значение в развитии и подавлении воспаления принадлежит процессам активации лимфоцитов. Активированные лимфоциты, макрофаги, фибробласты и синовиоциты способны вырабатывать определенный набор провоспалительных цитокинов, играющих существенную роль в развитии системных проявлений хронического воспаления суставов. В качестве активаторов лимфоцитов могут выступать ХС и ТИМП [16–17]. Для подтверждения положительного эффекта хондропротекторов важны как оценка конечного результата лечения, так и исследование вероятного механизма действия препаратов.

Цель данной работы – изучение состава и биологической активности препаратов из хрящевой ткани акул и осетров, предназначенных для создания нутрицевтиков широкого спектра действия, и выявление их противовоспалительного эффекта с использованием биомаркеров.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Реактивы и объекты исследования

В работе использовали следующие реактивы: 4-диметил-аминобензальдегид, глюкозамингидрохлорид, глюконовую кислоту, галактозу, оксипролин (Sigma-Aldrich, США), а также хондроитинсульфаты А, С, и А-1 и коллагеназу *Clostridium histolyticum* (ICN, США). Ферментный препарат «Крусэнзим» из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschatica* был произведен в ТИПРО-Центре (Владивосток) и зарегистрирован в Роспотребнадзоре СГР № RU.77.99.26.010.Е.018573.06.11. Активность препарата составляла 1200 Е/г массы (по модифицированному методу Ансона).

Полярная акула *Somniosus pacificus*, катран *Squalus acanthias* и калуга *Huso dauricus* были заготовлены на месте промысла и в свежем или замороженном виде доставлены в лабораторию. Хрящевую ткань отделяли и использовали для получения препаратов согласно способу, описанному в патенте РФ № 2250047 [18]. Основными его стадиями являются солевая экстракция, ферментативный гидролиз, термоинактивация ферментов, осаждение и удаление нерастворимых компонентов.

Анализ состава препаратов

Количество воды определяли на инфракрасном влагомере Kett F-1A (Kett Electric Laboratory, Япония).

Содержание элементов анализировали методом атомно-абсорбционной спектроскопии на приборе фирмы Nippon Jarell Ash (Япония), модель AA-855. Концентрацию кадмия, кобальта, никеля, свинца, мышьяка и селена измеряли на атомно-абсорбционном спектрофотометре Shimadzu, модель 6800 (Япония), используя в качестве атомизатора графитовую кювету.

Суммарное содержание гексозаминов определяли колориметрическим методом Эльсона и Моргана после гидролиза образцов 4 н. HCl (ЛОГОСИБ, Новосибирск) в течение 4 ч при 100°C [19].

Содержание уроновых кислот оценивали карбазоловым методом с помощью реакции Дише согласно модификации [20] (MCD, Россия). В качестве стандартов использовали 20–200 мкМ растворы глюконовой кислоты.

Содержание сульфат-ионов определяли турбидиметрически после гидролиза образцов в 4 н. HCl, последующего осаждения ионов сульфата хлористым барием (MCD) и регистрации степени помутнения раствора при 405 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-3600, Япония. В качестве стандартов использовали растворы сернокислого калия (MCD).

Общее содержание гексоз определяли антроновым методом с использованием галактозы в качестве стандарта [21].

Количество хондроитинсульфата измеряли методом фармакопей (ФС 42-3741-99), описанным в [22]. Согласно протоколу, препарат гидролизуют концентрированной серной кислотой, проводят реакцию с карбазолом и измеряли оптическую плотность полученной смеси относительно контрольного раствора ХС при длине волны 530 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-3600. Плотность контрольного раствора принимали за 100%.

Состав аминокислот определяли в стандартных условиях на аминокислотном анализаторе Hitachi L-8800 (Япония).

Общее содержание белка анализировали методом Кьельдаля на автоматической системе Kjeltac Auto System 1043 (Tecator, Швеция).

Содержание коллагена рассчитывали по количеству оксипролина в экстракте или гидролизате с использованием коэффициента пересчета 13,6 [23].

Содержание неколлагеновых белков рассчитывали по формуле, предложенной Smits (цит. по [24]):

$$НКБ = \frac{[Tир] - \left([Опро] \cdot \frac{0,6}{13,6} \right) \cdot 100}{5,5} \cdot \%,$$

где *Tир* – содержание тирозина в пробе; *Опро* – содержание оксипролина; 0,6 – среднее содержание тирозина в коллагене; 5,5 – среднее содержание тирозина в неколлагеновых белках; 13,6 – среднее содержание оксипролина в коллагене.

Фракционный состав препаратов

Состав фракций в исследуемых гидролизатах определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Shimadzu LC-10Avr (Япония) с рефрактометри-

ческим детектором RID-6А на колонке Shodex Asahipak GS-520H (сорбент – поливинил). Элюентом служила дистиллированная вода, скорость подвижной фазы составляла 1 мл/мин. Для определения ММ углеводсодержащих фракций колонку калибровали с помощью декстранов массой 10 кДа, 20, 40, 70, 80, 110, 250, 500 и 2000 кДа (Pharmacia Biotech, Швеция). В указанных условиях наблюдали линейное разделение компонентов по ММ в диапазоне от 0,180 до 200 кДа. Для определения ММ белковых компонентов колонку калибровали по следующим стандартам: γ -глобулин (160 кДа), бычий сывороточный альбумин (67 кДа), овальбумин (45 кДа), химотрипсиноген А (24 кДа), цитохром *c* (13 кДа), апротинин (6,5 кДа), бацитрацин (1,4 кДа) (Sigma-Aldrich, США). В заданных условиях наблюдали линейное разделение белков в диапазоне ММ от 10 до 67 кДа. ММ и молекулярно-массовое распределение компонентов рассчитывали с помощью программно-аппаратного комплекса обработки хроматографических данных МультиХром (версия 1.6) (АМПЕРСЕНД, Россия).

Разделение Δ -дисахаридов

Для этой цели использовали капиллярный электрофорез на приборе «Капель-105» (Люмэкс, Россия) с кварцевым капилляром (внутренний диаметр 75 мкм, общая длина 60 см, эффективная длина 55 см) при температуре 25°C; детекцию осуществляли при 210 нм. Разделение проводили при напряжении 20 кВ в рабочем 15 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 3,0, в течение 20 мин со скоростью потока 1 мл/мин в обратной полярности. Высоту и площадь пиков рассчитывали с помощью МультиХром (версия 1.6 х).

Определение ингибирующего действия хрящевых гидролизатов на активность протеиназ

Активность протеолитических ферментов крусэнзима из *P. camtschatica* и коллагеназы из *S. histolyticum* при инкубации в присутствии различных концентраций препаратов хрящевой ткани измеряли модифицированным методом Ансона через определенные промежутки времени. Раствор фермента и исследуемого препарата использовали в соотношении 1:0,1; 1:0,25; 1:0,5; 1:1; 1:5; 1:8 и 1:10. Смесь растворов выдерживали в течение 30 мин, 60 и 120 мин при температуре 4°C и рН 8,0, после чего определяли ее поглощение

спектрофотометрическим методом на приборе Shimadzu UV-3600. Степень ингибирования препаратов выражали в % от исходной активности протеиназ, принятой за 100 %.

Определение ингибиторного действия хрящевых гидролизатов на экспрессию активационных антигенов лимфоцитов человека

Для исследования влияния препаратов на экспрессию активационных антигенов использовали периферическую кровь от здоровых доноров с гепарином (25 Е/мл), разведенную 1:1 полной культуральной средой, содержащей RPMI-1640, 0,01 М HEPES, 200 мМ L-глутамин и 100 мг/мл гентамицина (Sigma-Aldrich). Препарат вносили в образцы разведенной крови до конечной концентрации 100 мкг/мл и инкубировали в течение 2 ч в CO₂-инкубаторе (ИЛМ-170-01, «Ламинар-С», Россия) при 37°C, после чего добавляли фитогемагглютинин (ФГА) (Sigma-Aldrich) до конечной концентрации 10 мкг/мл и продолжали инкубацию еще в течение 24 ч. Контрольные пробы (интактные клетки и клетки с ФГА) инкубировали с полной культуральной средой (см. выше).

Экспрессию активационных маркеров на поверхности клеток оценивали через 24 ч методом двуцветного цитометрического анализа в программе Cell Quest на проточном цитометре

FACSCalibur (Becton Dickinson, Нидерланды) с использованием моноклональных антител к молекулам CD69-PE и CD25-PE (Beckman Coulter, США) и соответствующих изотипических контролей (Beckman Coulter). Оценивали средний уровень флуоресценции клеток в исследованной популяции и процент лимфоцитов, экспрессирующих активационный маркер. Статистический анализ проводили с использованием прикладного пакета Statistica 6, рассчитывая *W* – критерий Шапиро–Уилка и парный *t*-критерий Стьюдента. Уровень доверительной вероятности был равен 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении общего компонентного состава исходной хрящевой ткани акул и осетра показано отсутствие существенных различий между ними (табл. 1). Гиалиновый хрящ млекопитающих менее обводнен, чем хрящи всех исследованных видов, особенно осетра, содержит больше белка и имеет большую степень минерализации. Известно, что хрящевая ткань гидробионтов отличается от хряща млекопитающих уже на уровне макромолекулярной структуры. Предполагают, что это связано с различиями в гидродинамических размерах молекул протеогликанов, определяемых, в свою очередь, длиной, количеством и способами связывания ГАГ с ГК и коровыми белками. Отмечено существенное преобладание ГАУ

Таблица 1

Химический состав хрящевой ткани рыб и крупного рогатого скота, % от общей сырой массы

Chemical composition of fish and cattle cartilage tissue, % of total raw mass

Компоненты	Акула		Осетр <i>Huso dauricus</i>	Крупный рогатый скот [25, 26]
	<i>Squalus acanthias</i>	<i>Somniosus pacificus</i>		
Вода	71,3±0,20	74,6±0,700	83,9±1,10	55,4
Общий белок	16,4±0,30	15,1±0,100	11,7±0,30	17,6
Липиды	0,2±0,04	0,2±0,040	0,4±0,01	3,4
Минеральные вещества	3,5±0,40	2,9±0,200	3,3±0,10	6,8
Общие углеводы	5,5±0,20	4,6±0,400	3,7±0,10	2,1
Гексозамины	2,8±0,30	3,1±0,200	2,5±0,40	–
Уроновые кислоты	0,4±0,02	0,5±0,010	0,5±0,01	0,7
Гексозы	0,2±0,01	0,2±0,010	0,3±0,02	2,6

Примечание: (–) – не указано, not shown.

Состав ферментативных гидролизатов хрящевой ткани рыб, % от сухой массы**Composition of enzymatic hydrolysates of fish cartilage, % of dry mass**

Компонент	Акула	Осетр
Уроновые кислоты	2,0±0,05	1,8±0,030
Гексозамины	4,4±0,10	4,8±0,090
Сульфат-ионы	6,8±0,20	6,5±0,200
Свободные дисахариды	0,5±0,01	0,4±0,008
Гексозы	1,6±0,05	0,5±0,010
Хондроитинсульфаты	6,5±0,14	6,0±0,100
Коллаген	25,2±0,80	23,1±0,700
Неколлагеновые белки	22,1±0,90	23,5±0,900
Свободные аминокислоты	17,3±0,40	15,4±0,300
Минеральные вещества	10,9±0,04	12,7±0,060

Примечание: n – количество измерений (здесь и в табл. 3–5). $n = 9$, $p < 0,05$.

гидробрионтов над уроновыми кислотами. При этом прочность связывания ГК в протеогликанах морских объектов значительно ниже, а гуанидин-гидрохлорид слабо влияет на диссоциацию коровых белков и ГАГ [27, 28].

Для выделения протеогликанов и ГАГ из хрящевой ткани часто применяют способы ферментативного гидролиза. При этом используют не только хондроитиназы, специфически расщепляющие углеводную составляющую, но и ферменты протеолитического действия. Из них наиболее часто применяют папаин, способный разрывать ковалентные связи между коровым белком и ГАГ [27–29]. В данной работе мы ставили целью не выделение и очистку какой-либо из составляющих хрящевой ткани, а сохранение разнообразия компонентов, каждый из которых обладает функциональной активностью, и перевод их максимального количества в растворимую форму. При этом использовали суммарный препарат протеиназ из гепатопанкреаса камчатского краба, характеризующийся наличием сериновых протеиназ с весьма широкой субстратной специфичностью, способных гидролизовать нативный коллаген. Кроме того, известно, что этот ферментный препарат проявляет экзогликозидазную активность в отношении ХС как субстрата [30, 31].

Перед ферментализмом хрящевую ткань подвергали экстракции 1%-ным раствором хлорида натрия. Уже на этой стадии наблюдали частичную деструкцию белково-полисахаридных комп-

лексов и переход в раствор не только соле- и водорастворимых белков, но гликоконъюгатов, а также свободных гексозаминов (данные не приведены). После этой процедуры доступность белковых компонентов для ферментативной деструкции значительно повышалась. В то же время, указанная концентрация хлорида натрия не снижала активность ферментов, а наоборот, стабилизировала их, позволяя увеличивать время эффективного гидролиза. Полученные после ферментализма препараты были поликомпонентными и содержали и углеводные, и белковые составляющие (табл. 2). Поскольку значительных отличий между препаратами из двух видов акул не наблюдали, в дальнейшем их характеристики приведены в виде объединенных усредненных показателей.

Высокая биологическая активность ГАГ обусловлена их полианионной структурой и зависит от наличия в каждой дисахаридной единице хотя бы одной отрицательно заряженной сульфатной группы, обеспечивающей компонентам высокую гидрофильность и поверхностно-активные свойства. Соотношение гексозаминов и сульфатионов в продуктах из хрящевой ткани акул и осетра составило примерно 1:1,5 (см. табл. 2), что совпадает с известными данными и свидетельствует о высокой степени сульфатирования ХС гидробрионтов [29, 32, 33]. Известно, что в хрящах акул преобладают ХС С-типа, хотя обнаружены и соединения D-типа, а также кератан- и дерматансульфаты. ХС акулиных хрящей отличаются от ХС

**Состав аминокислот в ферментативных гидролизатах из хрящевой ткани рыб,
% от суммы аминокислот**

Content of amino acids in fish cartilage enzymatic hydrolysates, % of sum

Название аминокислоты	Протеиногенная (в составе белка) аминокислота		Свободная аминокислота	
	Акула	Осетр	Акула	Осетр
Аспарагиновая кислота	7,5	6,5	14,9	12,9
Глутаминовая кислота	11,7	13,0	13,5	15,1
Пролин	16,4	18,1	0	0
Оксипролин	6,3	7,1	0	0
Серин	4,0	3,7	4,7	4,3
Аланин	6,2	6,8	7,2	7,9
Цистеин	1,5	0,8	0	0
Тирозин	1,3	1,0	0	0
Глицин	12,1	17,6	13,2	18,9
Изолейцин	4,2	2,5	5,5	3,3
Лейцин	4,3	3,4	6,4	5,3
Лизин	4,0	3,1	5,0	3,9
Оксилизин	0,9	0,7	0	0
Метионин	0,5	0,6	1,5	1,2
Фенилаланин	3,6	2,4	5,5	3,7
Треонин	4,4	3,1	5,3	3,5
Валин	5,0	3,1	6,8	4,1
Гистидин	2,2	1,2	2,4	1,5
Аргинин	5,1	5,7	6,3	7,2

Примечание: $n = 4, p < 0,05$.

хрящевой ткани наземных животных порядком чередования остатков β -D-глюкуроновой кислоты, N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина, а также степенью сульфатирования этих остатков [32, 34].

Среди исследованных компонентов преобладали растворимые белки, в равной степени коллаген и НКБ; последние не содержали оксипролин и имели, как показано ниже, невысокую ММ. Выход растворимого коллагена от его количества в исходном сырье составил 68–79 % в обоих случаях. В оставшемся осадке количество уроновых кислот и аминокислот не превышало 10% и 22 % от исходного количества, соответственно.

Как известно, преобладающими в хрящах акул и осетров являются коллагены II типа, характеризующиеся высокой степенью биосовмести-

мости. Молекула этого коллагена имеет структуру $[\alpha 1(\text{IY})]_3$, то есть содержит три идентичных $\alpha 1(\text{II})$ -цепи, которые отличаются от $\alpha 1(\text{I})$ -цепей более высоким содержанием оксизирина. Столь высокая концентрация оксизирина способствует увеличению количества связанных с ним углеводов. Ранее было показано, что коллаген в гликопротеине хрящевой ткани акул составляет 75 % белков, телянка – 30 %, а человека – 50 % [35, 36]. Исследования коллагена из хрящевой ткани осетра показали, что он идентичен коллагену II типа млекопитающих [37].

Характеристика аминокислот, входящих в состав белков, и свободных аминокислот в ферментализатах хрящевой ткани рыб представлена в табл. 3. Среди протеиногенных аминокислот сумма пролина и оксипролина приближается к 25 %.

Концентрация минеральных макро- и микроэлементов в ферментолізатах хряща рыб
Concentration of mineral elements in fish cartilage enzymatic hydrolysates

Макроэлемент	Акула	Осетр	Микроэлемент	Акула	Осетр
	мг/г			мг/кг	
Натрий	100,4	110,2	Марганец	2,3	3,3
Калий	2,5	1,4	Хром	5,7	7,0
Магний	0,5	0,5	Медь	6,7	3,3
Кальций	1,8	2,8	Цинк	28,3	22,3
			Железо	88,3	150,0
			Никель	3,3	2,7
			Токсичный элемент		
			Кадмий	1,2	0,8
			Кобальт	0	0
			Свинец	0	0
			Ртуть	0	0

Примечание: $n = 3, p < 0,05$.

Этот факт, а также высокое содержание глицина (> 12 %) позволяют считать большинство из растворимых белков исследуемых препаратов продуктами деструкции коллагена. Среди свободных аминокислот преобладали глицин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты и полностью отсутствовали пролин, оксипролин и оксизин, а также тирозин и цистеин.

Значительную долю в ферментолізатах (до 13 %) составляли минеральные элементы, среди которых наиболее высоким было содержание натрия, частично привносимого в процессе солевой экстракции (табл. 4). Среди микроэлементов преобладали железо и цинк. Токсичные металлы за исключением кадмия в низкой концентрации, не превышающей предельно допустимых значений, обнаружены не были.

Для анализа молекулярно-массового распределения фракций ферментативных гидролизатов хрящевой ткани рыб использовали хроматографическое оборудование, позволяющее одновременно анализировать белковые и углеводные компоненты (рис. 1). Условно были выделены три основные фракции, содержащие высокомолекулярные (≥ 200 кДа), средномолекулярные (30–160 кДа) и низкомолекулярные (≤ 10 кДа) компоненты. По количественному соотношению

их распределение составило 1:1:1 для препаратов из осетра и 2:3:1 из акулы.

Разделение и количественное определение компонентов в образцах сравнивали с теми же процессами в отношении углеводных стандартов, в качестве которых использовали коммерческие препараты различных типов ХС (А, А1, С, D) и ГК. Сопоставление хроматограмм препаратов и стандартов позволило с большой степенью вероятности предположить, что высокомолекулярные фракции препаратов, образованные в процессе ферментативного гидролиза, содержат и ХС, и ГК (см. рис. 1).

Выход пиков ХС и ГК ферментолізатов происходил в высокомолекулярной зоне; это позволило предположить, что около 30% ГАГ хрящевой ткани акулы и 20% ткани осетра перешли в водорастворимое состояние без существенных изменений структуры, а 70% и 80 %, соответственно, в той или иной степени подверглись деструкции при обработке.

Хроматография стандартных препаратов хондроитинсульфата на колонке Shodex Asahipak GS-520H обеспечивала одновременный выход всех четырех типов ХС, что не позволило бы использовать этот метод для их разделения (рис. 2). В то же время, разделение фракций из гидролизованной хрящевой ткани рыб было наиболее

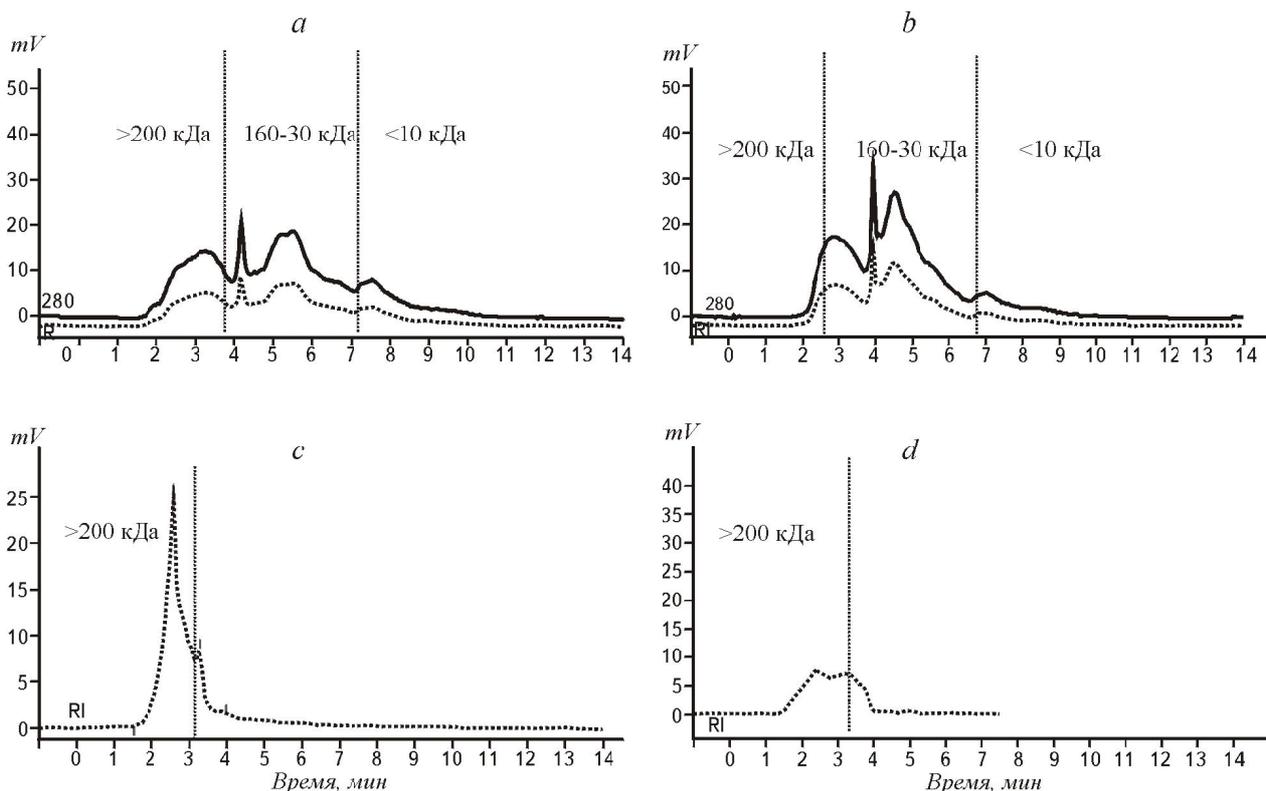


Рис. 1. ВЭЖХ ферментативных гидролизатов хрящевой ткани акулы (а) и осетра (b), а также стандартов хондроитин-сульфата (с) и гиалуроновой кислоты (d). Колонка Shodex Asahipak GS-520H; одновременная спектрометрическая (280 нм) (сплошная линия) и рефрактометрическая (прерывистая линия) детекция (RID 6A)

Fig. 1. HPLC of shark (a) and sturgeon (b) cartilage enzymatic hydrolysates, and of chondroitin sulfate (c) and hyaluronic acid (d) reference preparations. A column of Shodex Asahipak GS-520H; simultaneous spectrometry (280 nm) (solid line) and refractometry (broken line) detection (RID 6A)

эффективным именно с использованием данной колонки (см. рис. 1).

ГАГ состоят из повторяющихся мономеров – дисахаридов, образованных сульфатированными или несulfатированными остатками d-глюкуроновой кислоты (GlcA) и N-ацетил-d-галактозамина (GalNAc), связанных между собой повторяющимися (β1→3)- и (β1→4)-связями. При этом отдельные представители семейства ГАГ различаются между собой количеством и положением

сульфатных групп и их сочетанием в полисахаридной цепи. Наличие три-, ди-, моно- и несulfатированных дисахаридов в ГАГ является ткане- и видоспецифичным признаком. Наибольшие различия в количестве и соотношении специфически сульфатированных дисахаридов в ГАГ наблюдаются между наземными животными и хрящевыми рыбами [27, 28].

В процессе ферментативного гидролиза происходило высвобождение некоторого количества

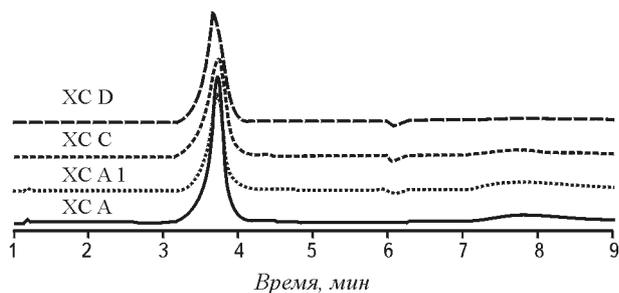


Рис. 2. ВЭЖХ стандартов хондроитинсульфата типов А, С, D из трахей быка и типа А1 из хряща осетра. Колонка Shodex Asahipak GS-520H

Fig. 2. HPLC of A, C, D types chondroitin reference from bovine trachea and of A1 type chondroitin references from sturgeon cartilage. A column of Shodex Asahipak GS-520H

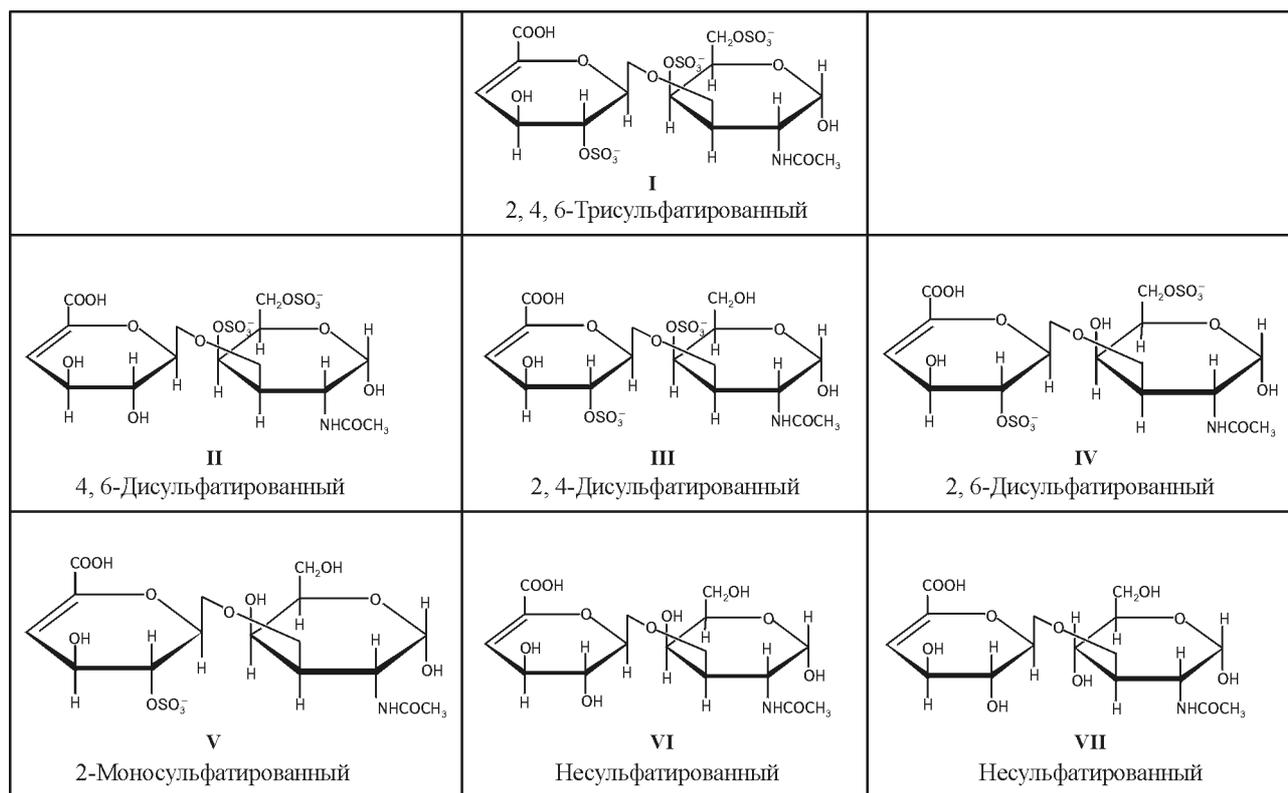


Рис. 3. Структура сульфатированных и несульфатированных Д-дисахаридов хондроитинсульфатов (I–VI) и гиалуронана (VII), образующихся после гидролиза ГАГ хондроитиназой ABC (по [38])

Fig. 3. Structure of sulfated and non-sulfated delta-disaccharides chondroitin sulfates (I–VI) and hyaluronan (VII) resulting from hydrolysis of GAG by chondroitinase ABC (according to [38])

Δ-дисахаридов из ГК и ХС; их содержание достигало 0,4–0,5% от сухой массы препарата (см. табл. 2). Для определения качественного и количественного состава Δ-дисахаридов после ферментативного гидролиза мы использовали метод капиллярного электрофореза по Караманосу [38] с целью идентификации несульфатированных и различным образом сульфатированных дисахаридов. Автор применял гидролиз ГАГ хондроитиназой ABC и установил закономерности перемещения при электрофорезе специфически сульфатированных дисахаридов: в заданных условиях первыми мигрируют три-, далее ди-, моносульфатированные и несульфатированные дисахариды. Структура и положение сульфатных групп в молекуле дисахаридов, полученных после гидролиза ГАГ хондроитиназой ABC, показаны на рис. 3.

При анализе свободных Δ-дисахаридов, входящих в состав ферментолита из хряща рыб, получены результаты, имеющие высокую степень аналогии с данными [38] (рис. 4). Совпадение по времени выхода фракций при тех же условиях про-

ведения электрофореза позволило предположить наличие в наших препаратах и объектах анализа в [38] дисахаридов аналогичной структуры.

При расчете количественного содержания Δ-дисахаридов в полученных препаратах установлено преобладание несульфатированных компонентов (структуры VI и VII) (78% – для акул и 68% – для осетра), из которых 64% и 54 %, соответственно, являются дисахаридами ГК (VII). Содержание моно- и дисульфатированных дисахаридов в препаратах из тканей акул составило 10% и 22 %, осетров – 10% и 12%, соответственно. Среди дисульфатированных Δ-дисахаридов в препарате акул преобладает структура IV (2,6-дисульфат-производные) (13%); в препарате осетра доминирует структура II (4,6-дисульфат-производные) (9 %) (табл. 5). Трисульфатированные свободные Δ-дисахариды (структура I) в препаратах из хрящей рыб не обнаружены, хотя ранее сообщалось об их наличии в составе ХС кальмара и акулы [39].

Как известно, в метаболизме хрящевой ткани важную роль играют матричные металлопро-

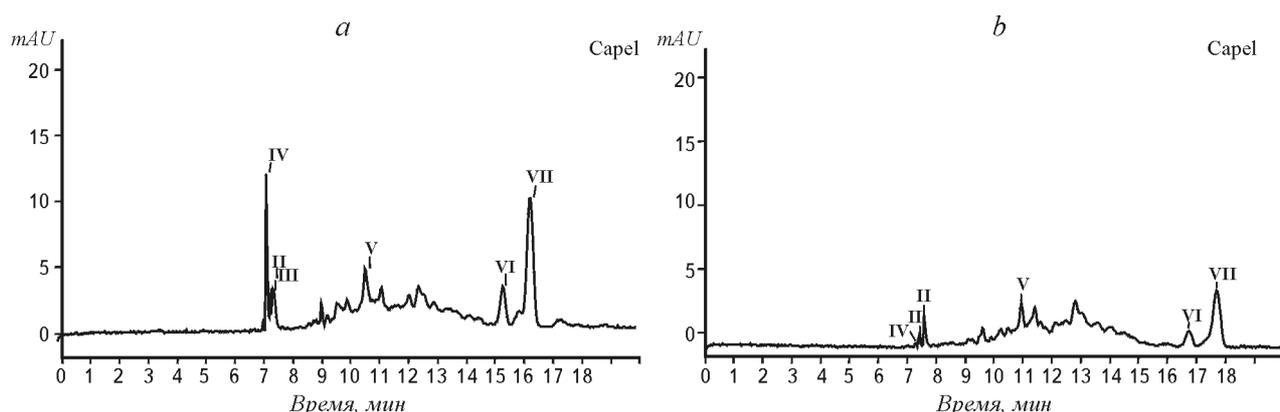


Рис. 4. Капиллярный электрофорез свободных Δ -дисахаридов, содержащихся в ферментативных гидролизатах хрящевой ткани акулы (а) и осетра (b). Пики I–VII соответствуют структурам, приведенным на рис. 3

Fig. 4. Capillary electrophoresis of free delta-disaccharides in shark (a) and sturgeon (b) cartilage hydrolysates. Peaks I–VII are in consent with structures represented in Fig. 3

теиназы (стромелизин, коллагеназа, желатиназа), которые продуцируются в неактивной форме, но после активации способны разрушать компоненты внеклеточного матрикса, вызывая воспаление [11, 12, 40]. Показана роль ХС в регуляции активности матриксных металлопротеиназ и подавлении воспалительных процессов, в том числе снижении болевого синдрома и улучшении функционального состояния суставов [40]. Однако основными регуляторами воспаления и ангиогенеза являются ТИМП. Наиболее распространенным считается ТИМП-1 – гликопротеин с ММ 30 кДа; в меньших количествах встречается ТИМП-2 – не-

гликозилированный белок с ММ 23 кДа. Оба легко экстрагируются из хряща и сохраняют устойчивость к действию протеолитических ферментов; их концентрация особенно высока у гидробионтов [13, 17, 41–43]. Взаимосвязь между активностью матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов проявляется при различных физиологических и патологических состояниях тканей [17, 44].

В настоящем исследовании была определена ингибиторная специфичность водных экстрактов и гидролизатов из хрящевой ткани рыб (табл. 6). Влияние компонентов на активность ферментов устанавливали по изменению коллагено- и казеи-

Таблица 5

Содержание дисахаридов различной структуры в ферментативных гидролизатах хрящевой ткани рыб, % от суммы свободных дисахиридов

Content of disaccharides of various structures in fish cartilage enzymatic hydrolysates, % of total free disaccharide amount

Структура Δ -дисахаридов		Содержание дисахаридов, %	
		Акула	Осетр
Трисульфатированные	I	Отсутствуют	Отсутствуют
	II	6,4±0,20	9,1±0,50
	III	3,0±0,04	2,0±0,01
Дисульфатированные	IV	13,0±1,10	1,0±0,05
	V	10±0,40	10±0,60
Моносульфатированные	VI	14±0,60	14±0,80
	VII	54±1,40	64±0,70

Примечание: I–VII – структуры, приведенные на рис. 3 (structures represented in Fig.3). n = 4; p < 0,05.

Ингибирующее действие водных экстрактов и гидролизатов из хрящевой ткани рыб на активность протеиназ в отношении казеина и коллагена

Inhibiting effect of fish cartilage aqueous extracts and hydrolysates on proteinase activity towards casein and collagen

Ингибитор	Остаточная активность протеиназ	
	Сериновая протеиназа (крусэнзим)	Металлозависимая протеиназа (коллагеназа)
	<i>Казеин</i>	
Отсутствует	260,0±31,2 Е/г	0
Водный экстракт ткани		
акулы	188,6±12,7	0
осетра	198,5±16,3	0
Гидролизат ткани		
акулы	87,2±4,9	0
осетра	78,7±5,2	0
	<i>Коллаген I типа</i>	
Отсутствует	69,5 ± 23,6 Е/мг	220,1 ±27,1 Е/мг
Водный экстракт ткани		
акулы	22,8±2,2	55,7±7,1
осетра	Не опред.	Не опред.
Гидролизат ткани		
акулы	14,2±3,8	62,4±5,3
осетра	8,8±1,9	75,8±2,4

Примечание: $n = 4$, $p < 0,05$; массовое соотношение фермент/ингибитор для гидролизатов равно 1:1. Исходная активность микробной протеиназы по казеину нулевая.

Mass ratio enzyme/inhibitor was equal to 1:1 for hydrolysates. Initial activity proteinase in microbial enzyme is zero.

нолитической активности. Для этого использовали мультиферментный комплекс (крусэнзим) из гепатопанкреаса камчатского краба, содержащий преимущественно сериновые протеиназы (КФ 3.4.21), и коллагеназу из *C. histolyticum* (КФ 3.4.24), для которой характерна специфичность металлопротеиназ. Несмотря на различия в механизме каталитического действия, эти ферменты обладают способностью расщеплять нативный коллаген [30]. Их использование определялось двумя целями: для установления противовоспалительного действия компонентов хрящевых гидролизатов мы изучали взаимодействие гидролизатов из ткани рыб с металлопротеиназой, а для сравнительной характеристики ингибиторной специфичности оценивали также их влияние на сериновую протеиназу.

Следует отметить, что при ферментализации для получения препаратов из тканей рыб применяли соотношение сырье/фермент, равное 100:1 (в дальнейшем ферменты инактивировали термически), а для определения ингибиторных свойств гидролизатов использовали соотношение фермент/экстракт, равное 10:1; 4:1; 1:1 и 1:5. Наивысший ингибирующий эффект был достигнут при соотношении 1:1; дальнейшее увеличение количества ингибитора не изменяло степень торможения активности ферментов. В водных экстрактах хрящей рыб преобладали белковые компоненты с ММ ниже 10 кДа (90% от суммы белковых фракций); после ферментативного гидролиза в полученных препаратах в основном присутствовали более высокомолекулярные компоненты – с ММ выше 200 кДа (около 30%) и от 30 до 160 кДа (30–50%).

Доля низкомолекулярных соединений (< 10 кДа) составляла 20–30%.

При расщеплении казеина продукты водного экстракта хрящей рыб несущественно снижали активность протеиназ из гепатопанкреаса краба. Исходная активность микробного фермента в отношении этого субстрата была равна нулю. При расщеплении коллагена из кожи теленка (I типа) наблюдаемый ингибиторный эффект в отношении обоих ферментных препаратов был весьма существенным. Так, водный экстракт хрящей акулы снижал активность протеиназ краба примерно на 77 %, а ферментативный гидролизат – на 86 %. Для гидролизата ткани осетра это снижение составляло около 88 %. Действие ингибиторов как из гидролизатов, так и из водных экстрактов хряща акулы на активность металлозависимой коллагеназы из *S. histoliticum* было сходным – примерно 75% и 72% от исходной активности, соответственно. Для гидролизата из хрящей осетра ингибирование оценивалось в 66%.

На следующем этапе исследовали влияние препаратов на экспрессию активационных мембранных молекул лимфоцитов периферической крови. Начальные стадии активационного процесса выражаются в запуске каскадных механизмов (чаще ферментных), конечной целью которых является экспрессия соответствующих генов.

Продукты генов, связанных с активацией – маркеры активации, или активационные антигены – появляются в различные сроки на поверхности лимфоцитов [45]. Среди них CD69 – ранний маркер активации, вовлеченный в механизмы активации Т-клеток, ЕК-клеток, моноцитов и тромбоцитов; он регулирует иммунный ответ путем модуляции экспрессии различных цитокинов [46]. Установлено, что суммарное содержание CD69 + Т-лимфоциты в синовиальной жидкости и мембране пациентов коррелируют с активностью ОА [47]. Кроме того, показано, что у мышей коллаген-индуцированный артрит не развивается в отсутствие CD69 (CD69-null) [48]. Это свидетельствует о важной роли данного антигена в патогенезе артрита и целесообразности его использования в качестве терапевтической мишени.

В настоящей работе было установлено, что инкубация клеток периферической крови в течение 24 ч с препаратом из хряща акулы в концентрации 100 мкг/мл не сопровождалась изменением количества лимфоцитов, экспрессирующих активационные молекулы CD69 и CD25. В то же время, плотность молекул на мембранах лимфоцитов, оцениваемая по средней интенсивности флуоресценции, в группе клеток 2 после добавления ферментализата хрящевой ткани снижалась по сравнению с группой 1 (табл. 7).

Таблица 7

Изменение экспрессии ранних активационных антигенов на лимфоцитах периферической крови под действием продуктов гидролизованного хряща акулы

Change in expression of early activation antigens on peripheral blood lymphocytes under the action of shark cartilage hydrolysate products

Антиген-маркер	Критерии активации лимфоцитов	Клетки крови	<i>W</i>	<i>M</i> ± <i>y</i>	<i>Me (LQ-UQ)</i> =10,00–90,00	Парный <i>t</i> -критерий
1	2	3	4	5	6	7
CD69 ⁺	Количество клеток, экспрессирующих маркер	1	0,87	9,0±4,9	7,50 (4,50; 9,50)	<i>P</i> ₁₋₂ 0,400
		2	0,92	10,5±3,1	10,00 (7,00; 15,00)	
		3	0,94	57,7±8,2	56,00 (46,00; 68,00)	<i>P</i> ₃₋₄ 0,011
		4	0,93	49,0±5,8	49,10 (41,00; 55,50)	
	Средняя интенсивность флуоресценции (плотность молекул на мембранах лимфоцитов)	1	0,87	39,6±4,5	39,00 (35,00; 48,00)	<i>P</i> ₁₋₂ 0,003
		2	0,92	29,6±6,5	29,50 (21,50; 39,00)	
		3	0,87	324,2±55,5	340,00 (240,00; 400,00)	<i>P</i> ₃₋₄ 0,031
		4	0,93	250,5±29,5	256,00 (210,00; 280,00)	

1	2	3	4	5	6	7
CD25 ⁺	Количество клеток, экспрессирующих маркер	1	0,92	14,2 ±4,9	15,00 (7,00; 19,50)	P ₁₋₂ 0,401
		2	0,96	16,1 ±3,1	17,00 (8,00; 22,00)	
		3	0,89	29,4±5,1	28,00 (24,00; 37,00)	P ₃₋₄ 0,046
		4	0,93	23,4±6,6	34,00 (14,00; 32,00)	
	Средняя интенсивность флюоресценции (плотность молекул на мембранах лимфоцитов)	1	0,97	21,6±4,6	22,00 (15,00; 28,00)	P ₃₋₄ 0,002
		2	0,93	20,6 ±3,3	20,50 (17,00; 26,00)	
		3	0,95	45,1±6,1	46,00 (36,50; 52,00)	
		4	0,93	43,4±6,1	43,00 (35,00; 50,00)	

Примечание: 1 – контроль (интактные клетки крови); 2 – клетки крови, инкубированные 24 ч с ферментализатом хряща акулы; 3 – клетки крови, стимулированные ФГА (24 ч), 4 – клетки крови, инкубированные с ферментализатом хряща акулы перед стимуляцией ФГА. *W* – критерий Шапиро–Уилка; *M* – среднее арифметическое ± стандартное отклонение; *Me* – медиана, (*LQ–UQ*) – интерквартильный размах.

Footnote: (1), control (intact blood cells); (2), blood cells after incubation with shark cartilage hydrolysate; (3), PHA-stimulated blood cells (24 h); (4), blood cells incubated with shark cartilage hydrolysate before PHA stimulation. *W*, Shapiro–Wilk criterion; *M*, arithmetic mean; *Me*, median; and (*LQ–UQ*), interquantile range.

Инкубирование периферической крови с препаратом хрящевой ткани перед добавлением митогена ФГА (см. табл. 7, группа 4) привело к уменьшению количества клеток, экспрессирующих активационные молекулы CD69 и CD25 ($P_{3-4} = 0,011$ и $P_{3-4} = 0,046$, соответственно) и снижению их плотности на мембранах. Средняя интенсивность флуоресценции CD69 и CD25 на лимфоцитах, обработанных исследуемым препаратом и стимулированных ФГА, значимо ниже таковой на клетках, стимулированных ФГА без обработки ГХР (см. табл.7, группы 3 и 4) ($P_{3-4} = 0,031$ и $P_{3-4} = 0,002$, соответственно).

Полученные данные демонстрируют возможность снижения экспрессии молекул CD69 и CD25 на лимфоцитах периферической крови человека под действием препаратов из хряща акул. А, как уже было сказано, модулируя выраженность на клеточной поверхности активных доменов структур, опосредующих межклеточные взаимодействия, можно изменять течение ранних этапов активации клеток иммунной системы и последующие стадии их функционального ответа, сопровождающего развитие воспаления.

Таким образом, из хрящевой ткани хрящевых рыб методом ферментативного гидролиза получены поликомпонентные препараты, содержащие растворимые белки и полисахариды, а также низкомолекулярные компоненты, включая сво-

бодные аминокислоты и Д-дисахариды. Полученные препараты обладают ингибиторной активностью в отношении сериновых и металлозависимых протеиназ. Исследование влияние хрящевых гидролизатов на снижение уровня экспрессии ранних активационных антигенов лимфоцитов периферической крови человека позволяет предположить их умеренную противовоспалительную активность, что, однако, требует дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Литвинова Е.В., Стандара В.М. Хондропротекторные препараты: современное состояние и перспективы их создания. *Фармаком.*, 2006, (1–2), 148–133.
2. Kresse H., Schönherr E. Proteoglycans of extracellular matrix and grows control. *Cell. Physiol.* 2001, 189 (3), 266–274. doi:10.1002/jcp.10030
3. Henry G., Garren W.L. Inflammatory mediators in wound healing. *Surg.Clin.N.Am.*, 2003. 83(3), 1736. doi: 10.1016/S0039-6109(02)00200-1
4. Malemud C.J. Matrix metalloproteases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front. Biosci.*, 2006, 11, 1696–1701. doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00812.x
5. Karousou E. Ronga M., and Vigetti D. Collagen, proteoglycans, MMP-2, MMP-9 and TIMPs in human Achilles tendon rupture. *Clin.Orthop.Rel.Res.*, 2008. 466(7), 1577–1582. doi: 10.1007/s11999-008-0255-y

6. Nabuchi H., Nabuchi O., and Kimata K. Sulfatation pattern in glycosaminoglycans: does it have a code- *Glycoconj.*, 2004, 21(1–2), 47–52.
doi: 10.1023/b:glyc.0000043747.87325.5e
7. Аршинова Т.В., Рыкова В.И., Кучумова Л.Я. и др., Способ получения комплексного препарата, содержащего мукополисахариды и коллаген из животного сырья. Патент РФ, 2082416, А 61 К 35/32. 1997.
8. Myers A.E. A preparation for therapy of arthrosis containing hydrolyzed collagen protein and glucosamine. Composition renfermant une proteine de collagene hydrolysee et de la glucosamine, pour le traitement des arthroses Patent of EU 991413, A61 K 38/39. 2001.
9. Alkayali A., Hydrolyzed collagen type II and use thereof. Patent of USA, 6025327, А 61 К 38/39. 2000.
10. Weiner H.L., Hafler D.A., Trentham D.E. Method of treating rheumatoid arthritis with low dose type II collagen. Patent of USA, 5856446, А 61 К 38/39, 2000.
11. Fosang A., Last K., Knauper V., et al. Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13) *FEBS Letters.* 1996, 380, 17–20. doi: 10.1016/0014-5793 (95)01539-6
12. Stracke J., Fosang A., Last K. et al. Matrix metalloproteinase 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *FEBS Letters.*, 2000, 478, 52–56. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01819-6
13. Lee A., Langer R. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science.* 1983, 221, 1185–1187.
14. Дюпон Э., Бразо П., Жюно К. и др., Экстракты хрящей акулы, способ их получения и применения. Патент РФ, 21812922003, 61 К 35/36, 2000.
15. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А., Юрченко Л.Н. Системное воспаление с позиции теории типового патологического процесса. *Цитокины и воспаление*, 2007, 6(4), 9-21.
16. Pool R. Proteoglycans in health and disease: structure and function. *Biochemistry J.*, 1986, 236, 1–14.
doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07800.x
17. Milner J.M., Elliot S.F., Cawston T.E. Activation of procollagenases is a key control point in cartilage collagen matrix degradation. *International J. Experimental Pathology*, 2000, 81, 14–15.
doi: 10.1002/1529-0131(200109)44:9<2084::AID-ART359> 3.0.CO;2-R
18. Пивненко Т.Н., Клычкова Г.Ю., Ковалев Н.Н. и др. Пищевой общеукрепляющий продукт из хрящевой ткани гидробионтов и способ его получения. Патент РФ 2250047. А 23 L 1/30, А 23 L 1/325, 2005.
19. Elson L.A., Morgan W. J. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochem. J.*, 1933, 27, 1824–1828.
20. Taylor, K.A., Buchanan-Smith J.G. A colorimetric method for quantitation of uronic acids and a specific assay for galacturonic acid. *Anal. Biochem.*, 1992, 201, 190–196.
doi: 10.1016/0003-2697 (92)90194-C
21. Chaplin M.F. Carbohydrate analysis. A practical approach. Eds. by M. Chaplin and J. Kennedy. Oxford University Press: IRL Press Limited, 1986. 1–40
22. Шкарина Т.Н., Исаева И.В., Ковалева С.В. и др. Лекарственные средства, содержащие хондроитин сульфат. *Фармация*, 2007, 3, 42–48.
23. Woessner Jr. J.F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, 93, 440–447.
24. Слуцкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Ленинград: Медицина, 1969, 9.
25. Wu Y., Cisewski S.E., Sachs B.L. et al. The region-dependent biomechanical and biochemical properties of bovine articular endplate. *J. Biomech.*, 2015, 48, 12.
doi:10.1016/j.jbiomech. 2015.07.005
26. Fermor H.L., McLure S.W.D., and Taylor S.D. Biological, biochemical and biomechanical characterization of articular cartilage from the porcine, bovine and ovine hip and knee. *Bio-Medical Materials Engineering.*, 2015, 25(4), 381–395.
doi: 10.3233/BME-151533
27. Vynios D.H., Aletras A., Tsiganos C.P. et al. Proteoglycans from squid cranial cartilage extraction and characterization. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1985, 80B (4), 761–766.
doi:10.1016/0305-0491(85)90458_4.
28. Hjerpe A., Engfeldt B., Tsegendis T., et al. Analysis of the acid polysaccharides from squid cranial cartilage and examination of a novel polysaccharide. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 757, 85–91.
doi:10.1016/0304-4165(83)90155_4
29. Garnjanagoonchorn W., Wongekalak L., Engkagul A. Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage. *Chemical Engineering Processing*, 2007, 465–471.
doi: 10.1016/j.cep.2006.05/019
30. Сахаров И.Ю., Литвин Ф.Е., Митькевич О.В. Гидролиз белков коллагенолитическими протеиназами камчатского краба. *Биоорг. химия*, 1994, 20(2), 190–195.
31. Руденская Г.Н. Брахиурины – сериновые коллагенолитические ферменты крабов. *Биор. химия*, 2003, 29(2), 117–128.
32. Sugahara K., Ohi J., Harada T. et al. Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region on chondroitin-6-sulfate proteoglycans of shark cartilage. *J. Biological Chemistry*, 1992, 267, 6027–6043.
doi/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16436.
33. Uchisawa H., Okusaki B., Ichita J. Binding between calcium ions and chondroitin sulfate chains of salmon nasal cartilage glycosaminoglycan *Int. Congr. Ser.*, 2001, 1223, 205–220.
doi: 10.1016/S0531-5131(01)99458-7
34. Xie J., Ye H.Y., Luo X.F. et al. An efficient preparation of chondroitin sulfate and collagen peptides from shark cartilage. *Int. Food Res. J.*, 2014, 21(3), 1171–1175.
35. Jeevithan E., Bao B., Bu Y., et al. Type II Collagen and gelatin from Silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) cartilage: isolation, purification, physicochemical and antioxidant properties. *Mar. Drugs.*, 2014, 12, 3852–3873.
doi:10.3390/md12073852
36. Merly L., Smith S.L. Collagen type II, alpha 1 protein: a bioactive component of shark cartilage. *Int. Immunopharmacol.*, 2013, 15, 309–315. doi: 10.1016/j.intimp.2012.12.001.

37. Liang Q., Wang L., and Sun W. Isolation and characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Process Biochem.*, 2014, 49, 318–323. doi: 10.1016/j.procbio.2013.12.003.
38. Karamanos N.K., Axelsson S., Vanky P., et al. Determination of hyaluronan and galactosaminoglycan disaccharides by high-performance capillary electrophoresis at the attomole level. Applications to analyses of tissue and cell culture proteoglycans. *J. Chromatography A*. 1995, 696, 295–305. doi: 10.1016/0021-9673(94)01294-O
39. Vynios D.H., and Tsiganos C.P. Squid proteoglycans: isolation and characterization of three populations from cranial cartilage. *Biochimica Biophysica Acta*, 1990, 1033, 139–147. doi: 10.1016/0304-4165(90)90004-G
40. Соловьёва Н.И. Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции: обзор. *Биоорг. Химия*, 1998, 24(4), 245–255.
41. Liang J.H., Wong K.P. The characterization of angiogenesis inhibitor from shark cartilage. *Adv. Experimental Med. Biology*, 2000, 476, 209–232. doi: 10.1007/978-1-4615-4221-6_17
42. Murphy G., Koklitis P., and Carne A.F. Dissociation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) from enzyme complexes yields fully active inhibitor. *Biochemical J.*, 1989, 261, 1031–1034. doi: 10.1016/S0934-8832(11)-80093-4
43. Cho J., Kim Y. Sharks: a potential source of antiangiogenic factors and tumor treatments. *Marine Biotechnology*, 2002, 4(6), 521–525. doi: 10.1007/s10126-002-0064-3
44. Abdel Fattah W., Hammad T.A. Chondroitin sulfate and glucosamine: a review of the Safety Profile. *JANA*, 2001, 3(4), 16–23.
45. Reddy M., Eirikis E., Davis H.M., et al., Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune. *Immunol. Methods.*, 2004, 293, 127–142. doi.org/10.1016/j.jim.2004.07.006
46. De Maria R., Cifone M.G., Trotta R. Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. *Exp. Med.*, 1994, 180, 1999–2004.
47. Laffon A., Garcia-Vicuca R., Humbria A., et al. Unregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, 1991, 88, 546–552.
48. Murata K., Inami M., Hasegawa A., et al. CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies. *Int Immunol.*, 2003, 15, 987–992. doi:10.1093/intimm/dxg102

Functional Components of Enzymatically Hydrolyzed Fish Cartilage and their Effect on the Expression of Lymphocyte Activation Markers

T.N. PIVNENKO^{1,*}, G.Yu. SUKHOVERKHOVA¹, T.S. ZAPOROZHETS², A.K. GAZHA², and L.A. IVANUSHKO²

¹The Far Eastern State Technical Fisheries University, Vladivostok, 690087 Russia

²The Somov Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087 Russia

e-mail: tnpivnenko@mail.ru*

Received July 13, 2016

Accepted November 07, 2016

Abstract – The composition of hydrolyzed fish cartilage (HFC), a broad-spectrum nutraceutical, has been analyzed, and its anti-inflammatory effect has been investigated using biomarkers. To this end, HPLC, capillary electrophoresis, inhibitory analysis and cytometry were employed. The occurrence of uronic acids, hexosamines, free delta-disaccharides, collagen and non-collagenic proteins and amino-acids in soluble state was established in HFC. The analysis of the fractional composition of the preparations showed the presence of protein-carbohydrate conjugates with MM 30–160 kDa. Non-sulfated delta-disaccharides prevailed in the corresponding fraction, whereas disulfates were minor and trisulfates completely absent. HFC was shown to inhibit serine and metalloproteinases and to reduce the expression of early activation antigens of human peripheral blood lymphocytes which testified to the moderate anti-inflammatory effect of the preparations.

Key words: anti-inflammatory effect, antiproteolytic effect, collagen, delta-disaccharides, enzymatic hydrolysis, fish cartilage, molecular biomarkers.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-3-66-80