

Российская Академия Естествознания
Издательский дом Академии Естествознания

Дальневосточный федеральный университет
ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова»
ФГБОУ ВПО «Дальневосточный государственный
технический рыбохо-зяйственный университет»
ООО «ФармОушен Лаб.»

Т.Н. Пивненко, Н.Н. Ковалев, Т.С. Запорожец

**БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА
К ПИЩЕ «АРТРОФИШ»
(в помощь практическому врачу)**

Монография

Москва
2015

УДК 577.113:197-1.05

ББК 30.16+ 36.94

ПЗ2

Рецензенты:

Костецкий Э.Я. – доктор биологических наук, профессор Школы естественных наук ДВФУ;

Бузолева Л.С. – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией НИИ эпидемиологии и микробиологии

Пивненко Т.Н., Ковалев Н.Н., Запорожец Т.С.

ПЗ2 Биологически активная добавка к пище «Артрофиш» (в помощь практическому врачу): монография / Т.Н. Пивненко, Н.Н. Ковалев, Т.С. Запорожец. – М.: Издательский дом Академии Естествознания, 2015. – 66 с.

ISBN 978-5-91327-335-2

В настоящем издании обобщены сведения о составе и свойствах препаратов из хрящевой ткани животных, в том числе наиболее подробно из хрящевой ткани гидробионтов Дальневосточных морей, а также представлен опыт применения биологически активной добавки к пище, полученной путем ферментативного гидролиза хрящевой ткани гидробионтов. Биотехнологический способ обеспечивает получение поликомпонентного продукта, который в отличие от препаратов-аналогов содержит свободные дисахариды и проявляет антипротеазную активность. Биопрепараты из различных видов гидробионтов стандартизованы по содержанию гексозаминов (не менее 2%) и содержат хондроитинсульфаты (6%) и коллаген (16–24%), фракционный состав их компонентов представлен комплексом высокомолекулярных (более 200 кДа), средномолекулярных (30–160 кДа) и низкомолекулярных соединений (менее 10 кДа) протеогликановой природы. В процессе ферментативного гидролиза хрящевой ткани гидробионтов образуются свободные дисахариды, идентифицированные методом капиллярного электрофореза, которые могут служить маркерами видовой принадлежности хрящевой ткани.

На модельных экспериментах и в клинике показаны динамика восстановления хрящевой ткани под действием гидролизата хрящевой ткани гидробионтов, положительное влияние БАД на соединительные ткани, включая кожные покровы, установлено его противовоспалительное и хондропротекторное действие. Антипротеазная активность биопрепарата соответствует наличию в нем наличие тканевых ингибиторов металлопротеиназ матрикса как основных противовоспалительных компонентов.

Данное пособие предназначено для врачей-терапевтов, иммунологов, инфекционистов, ревматологов, геронтологов и других специалистов, которые используют БАД к пище в комплексе лечения различных болезней.

ISBN 978-5-91327-335-2

© Пивненко Т.Н., Ковалев Н.Н.,
Запорожец Т.С., 2015

© ИД «Академия Естествознания»

© МОО «Академия Естествознания»

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время костная и костно-хрящевая ткань крупного рогатого скота активно используется для получения биологически активных веществ хондропротекторного действия. Однако данный источник значительно минерализован и содержит менее 1 % собственно хрящевой ткани. Анализ способов переработки хрящевой и костно-хрящевой ткани крупного рогатого скота показал, что они направлены на получение монокомпонентных препаратов, что снижает биологическую активность конечного продукта. Жесткие условия кислотного гидролиза, который чаще всего используют для обработки костно-хрящевой ткани, позволяют получить конечные продукты, содержащие только низкомолекулярные компоненты, не обладающие антипротеазной активностью.

В последние годы интенсивно исследуется роль тканевых ингибиторов протеиназ матрикса в процессах ангиогенеза *in vitro*, деструкции хряща *in vivo* (Docherty et al., 1992), инвазии опухоли (Mignatti et al., 1989; De Clerck et al., 1991). Интерес представляют исследования, направленные на выделение природных ингибиторов ферментов, участвующих в деструкции внеклеточного матрикса с целью выяснения физико-химических свойств активных компонентов и использования этих данных для понимания процессов, протекающих в организме, и возможности моделирования различных патологических состояний.

Хрящевая ткань гидробионтов может быть использована в качестве источника для получения биологически активных веществ: аминокислот, коллагена, тканевых ингибиторов протеиназ. Для разработки технологии натуральных комплексных препаратов из хрящевых тканей гидробионтов очень важно определить перспективные источники сырья и разработать методы, позволяющие путем биотрансформации максимально извлечь и сохранить активные компоненты.

Сырьевыми объектами для получения указанных соединений послужили хрящевые рыбы (акулы, скаты, осетры), а также кальмары.

В настоящем пособии обобщены результаты исследований по получению и изучению механизмов действия гидролизата хрящевой ткани гидробионтов, который разрешен к применению в качестве БАД к пище Роспотребнадзором.

Гидролизат хрящевой ткани гидробионтов выпускает ООО «ФармОушен Лаб.» (г. Партизанск Приморского края) под торговым названием «Артрофиш».

Глава 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ ЖИВОТНЫХ

Хрящ – полупрозрачная, бессосудистая соединительная ткань, выполняющая опорно-механическую функцию. Считается, что истинный хрящ имеется только у позвоночных. Но многие беспозвоночные – кольчатые черви, членистоногие, моллюски – также имеют хрящеподобную ткань, построенную из аналогичных исходных макромолекул (Хелминен и др., 1991).

Хрящ у млекопитающих имеется на суставных поверхностях костей, в местах сочленения ребер и грудины, а также сухожилий и костей. Из хрящевой ткани образованы перегородка носа, ушная раковина, гортань и кольца трахеи (Слуцкий, 1969; Павлова и др., 1988).

У хрящевых рыб (акулы, скаты) скелет полностью хрящевой. У хрящевых ганойдов (осетровых) он локально минерализован. У некоторых видов костистых рыб (тихоокеанские лососи) многие части черепа образованы хрящевой тканью. Хрящевые ткани находятся в позвоночной кости между телами позвонков рыб. Большинство костистых рыб содержат незначительное количество хрящевой ткани в межпозвоночных дисках, плавниках, черепной коробке.

У головоногих моллюсков хрящевым скелетом является головная капсула сложной формы, состоящая из трех обособленных отделов, в которых находятся нервные ганглии истатоциты. Кроме того, у некоторых головоногих есть хрящевые образования в основании щупалец и вдоль основания плавников (сепииды и вампироморфы), а также замыкательные хрящи и хрящевые образования на коже некоторых океанических кальмаров. Гладиус кальмаров (скелетная пластинка) в виде узкой перовидной, ланцетовидной или игловидной роговой пластинки располагается на спинной стороне тела по средней линии под слоем кожи или мантийных мышц и не является хрящевым образованием. У плавниковых осьминогов скелетная пластинка – хрящевое образование седловидной или подковообразной формы, поддерживает основания плавников (Несис, 1982).

Хрящевая ткань образована хондробластами и хондроцитами, расположенными поодиночке или группами в окружающем их межклеточном веществе, состоящем из коллагеновых волокон и основного (аморфного) вещества. Хондроциты составляют 1–10% объема хряща и отвечают за биосинтез и поддержание матрикса. Волокна состоят из молекул коллагена II типа, специфичного для хрящевой ткани, и образуют сеть, плотность которой возрастает вокруг клеток. Основное вещество состоит из высокомолекулярных полимеров – гликозаминогликанов, содержащих значительное количество гексозаминов, которые в тканях присоединены ковалентной связью к белкам (Павлова и др., 1988). Вместе с коллагеном II типа гликозаминогликаны в хрящевой ткани образуют сложный протеогликановый комплекс, молекулярная структура которого обуславливает упругость хряща. Такое сочетание структурных элементов придает уникальные эластические свойства хрящу и позволяет противостоять механическим воздействиям (Слуцкий, 1985, Tryggvason et al., 1987). Схематически структура хряща представлена на рис. 1.



Рис. 1. Структура хрящевой ткани (по Хелминен и др., 1991)

Коллаген отвечает за сопротивление растягивающим усилиям и за поддержание каркаса ткани, а протеоглики (крупные макромолекулы, заполняющие пространство между коллагеновыми фибриллами) наделяют хрящ амортизирующими свойствами и упругостью. Протеоглики связывают воду во внеклеточном матриксе, препятствуют утечке воды при сжатии и впитывают ее обратно. Рост хрящевой ткани происходит в результате деления хрящевых клеток (хондроцитов). С цепью гиалуроновой кислоты соединены агреканы (раньше их называли протеогликановые подъединицы), которые образованы белковой цепью, связанной с боковыми цепями в форме олигосахаридов, кератансульфата и хондроитинсульфата. Связь агрекана с гиалуроновой кислотой стабилизируется двумя молекулами связывающего протеина. (Слущкий, 1969; Павлова и др., 1988; Марри, Греннер и др., 1993; Риггз, Мелтон, 2000; Adam, 1991, 1995).

1.1. Гликозаминогликаны: хондроитинсульфаты, гиалуроновая кислота

Гликозаминогликаны (ГАГ) – длинные неразветвленные молекулы гетерополисахаридов, преимущественно состоящие из повторяющихся дисахаридных единиц (рис. 2), каждая из которых представлена гексозамином (D-галактозамином и D-глюкозамином) и обычно включает уоновую кислоту (Кочетков, 1967; Степаненко, 1978).

Гликозаминогликаны хрящевой ткани животных в основном представлены гиалуроновой кислотой, хондроитинсульфатами разных типов (А, Б, С, Д, Е), хондроитином и относятся к группе кислых гликозаминогликанов. В зависимости от наличия сульфатных групп гликозаминогликаны подразделяют на несulfатированные (гиалуроновая кислота и хондроитин) и sulfатированные (хондроитинсульфаты). Благодаря обилию сульфатных, а также карбоксильных групп уоновой кислоты, ГАГ являются полианионами и имеют отрицательный заряд, что позволяет им связываться с белками и липидами. При этом образуются протеоглики и гликолипиды.

Именно отрицательный заряд определяет такие физико-химические свойства ГАГ как высокая вязкость и резистентность к компрессии, что особенно важно для компонентов суставного хряща, суставной жидкости и других элементов опорно-двигательного аппарата. С другой стороны, их взаимодействие с внеклеточными макромолекулами, белками и компонентами клеточной поверхности обеспечивает структурную организацию соединительнотканного матрикса. ГАГ при нейтральных значениях рН связываются со всеми растворимыми коллагенами. Взаимосвязь коллагена и ГАГ обеспечивает прочность, упругость и эластичность хрящевой ткани.

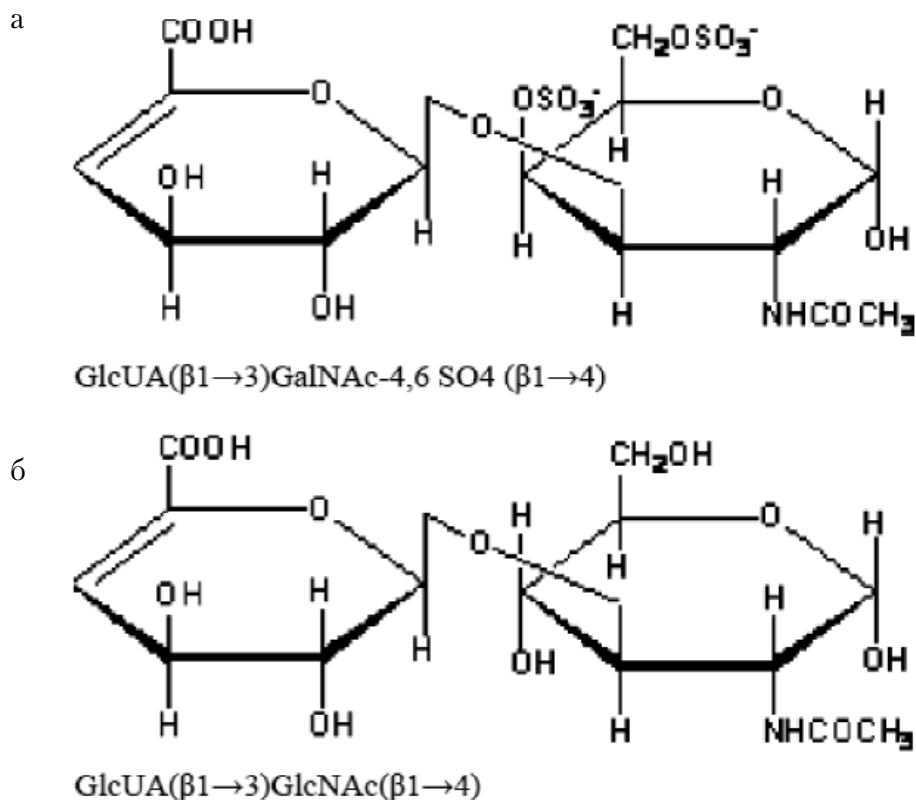


Рис. 2. Повторяющиеся дисахаридные:
а – хондроитинсульфата; б – гиалуроновой кислоты

Гиалуроновая кислота (ГК) содержится в основном веществе многих видов соединительной ткани в различных количествах (Balazs, 1965; Степаненко, 1978; Игнатова, Гуров, 1990). В хрящевой ткани она образует крупные полимеры, которые очень гигроскопичны, удерживают большой объем воды и за счет электростатических сил при определенном рН среды формируют комплексы с протеогликанами (Марри, Греннер и др., 1993). Молекулы гиалуроновой кислоты состоят из чередующихся остатков глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина. Эти дисахаридные фрагменты связаны в молекуле β -1,4 связями. По данным разных авторов (Balazs, 1965; Степаненко, 1978; Игнатова, Гуров, 1990) молекулярная масса ГК варьирует от 100 000 до 13 000 000 Да, и ее величина зависит от способов и источника выделения. В растворе макромолекула ГК имеет конформацию беспорядочно свернутого клубка. При слабом подкислении растворов гиалуроновой кислоты происходит необра-

тимое снижение вязкости в 2,5 раза. Под действием минеральных кислот происходит гидролиз молекулы с образованием глюкозамина, глюкуроновой кислоты, двуокиси углерода и уксусной кислоты.

Хондроитинсульфаты (ХС) состоят из чередующихся дисахаридных остатков несulfатированной уроновой кислоты (очень редко sulfатированной) и sulfатированного N-ацетилгалактозамина. Хондроитинсульфаты, из-за структурного разнообразия дисахаридов (основанного на количестве и положении sulfогрупп), представляют собой гетерогенную группу соединений, имеющих различную молекулярную массу, и подразделяются на несколько типов: А, Б, С, Д, Е (Abdel Fattah, Hammad, 2001). Как правило, ХС содержат около 40 дисахаридных компонентов и имеют молекулярную массу от 13 500 до 80 000 Да (Степаненко, 1978). ХС с помощью двух типов белков не ковалентно, но прочно присоединяются к гиалуриновой кислоте. Около 100 молекул ХС могут присоединиться к одной молекуле гиалуриновой кислоты (Марри, Греннер и др., 1993.). Полианионная молекула ХС является неотъемлемой частью протеогликановой структуры и ответственна за ячеистое строение и другие физикохимические свойства хряща. Кроме того, ХС служит основой для синтеза гиалуриновой кислоты.

Имеются многочисленные сведения о содержании и качественном составе ХС и гиалуриновой кислоты в тканях крупного рогатого скота как основного сырьевого источника для их выделения (Balazs, 1965; Иванкин и др., 1984; Мударисова и др., 1997; Иванкин, Неклюдов, 1998). Скрининг гексозаминов в сырье водного происхождения преимущественно проведен в мышцах, коже, слизях на поверхности кожи разных видов промысловых рыб и моллюсков (Сафронова, 1980). В соединительных тканях морских беспозвоночных находится около 1% кислых гликозаминогликанов, имеющих сходство с хондроитинсульфатами А и С хрящей позвоночных (Hunt, 1970). Методами гистохимии подробно исследован состав гликозаминогликанов и места их локализации в мышцах, коже и костях рыб (Кузьмин, Сафронова, 1974; Сафронова, 1976). Отдельные участки позвоночной кости различаются по составу гликозаминогликанов. Полоска ткани между хордой и телом позвонка содержит гиалуриновую кислоту и нейтральные гликозаминогликаны, в концах остистых отростков позвонков обнаруживаются гиалуриновая кислота, хондроитинсульфат и нейтральные гликозаминогликаны, в волокнистой оболочке позвонка и прилегающих к ней мягких тканях – только нейтральные гликозаминогликаны.

Что касается сведений о содержании гексозаминов в костно-хрящевой ткани промысловых гидробионтов, то имеющиеся данные очень разрознены, а отдельные исследования проведены на достаточно узком круге объектов. Чаще всего, данные о содержании гексозаминов в костях рыб приводятся без указания физиологического состояния объектов (Сафронова, 1980). В то же время имеются достоверные данные, что содержание гексозаминов и их качественный состав у наземных животных, человека и рыб с возрастом изменяется (Слуцкий, 1969; Balazs, 1965; Prodi, 1966; Rosenberg et al., 1965; Masumura, 1971). Сведений о количественном содержании гексозаминов в хрящевой ткани промысловых гидробионтов до настоящего времени не было. Имеются сведения о содержании гексозаминов в хрящевой ткани китов (Киселев, Мрочков, 1975; Иванкин, 1984) и акулы *Squalus acanthias* (Doyle, 1968).

Основными представителями гликозаминогликанов в акульих хрящах являются хондроитинсульфат С (ХС-С) и дерматансульфат (ДС или ХС В). В хрящах акул обнаружен также хондроитинсульфат Д, но преобладают хондроитинсульфаты С типа (Степаненко, 1978; Sugahara et al., 1992). Отличие ХС из акульих хрящей от ХС из хрящевой ткани сельскохозяйственных животных заключается в порядке чередования остатков β -D-глюкуроновой кислоты, N-ацетилглюкозамина и N-ацетил-галактозамина, а также в степени сульфатирования этих остатков. В хрящах акул обнаружен дерматансульфатпротеогликан с м.м. 70 000–100 000 Да, в которых белок составляет 30–60%. Все гликозаминогликаны присоединяются к белковому остову через O-гликозидную связь D-ксилозы с сериновым остатком пептидной цепи в ХС, ДС или через гликозиламидную связь N-ацетилглюкозамина с аспарагином в кератансульфатах. Ксилоза выполняет функцию связующего компонента между белком и полисахаридом. Из хрящей акул были выделены два протеогликана ПГ-1 и ПГ-2 с м.м. от $1 \cdot 10^6$ до $1 \cdot 10^{11}$ Да, содержащие как хондроитинсульфатные, так и кератансульфатные цепочки (Alves et al., 1994). Обнаруженные ПГ отличаются размером и содержанием кератансульфатных цепей. Большинство протеогликанов хряща акул с м.м. более 2 500 кДа содержат на N-конце участок, связывающий гиалуроновую кислоту, составляющий 1/3 или 1/4 часть центрального белка (Poole, 1986), а на С-конце лектиноподобный домен, участвующий в специфическом связывании полисахаридов, не образуя ковалентной связи (Ruoslahti, 1989). ХС А и С, а также несulfатированный хондроитин в различных соотношениях найдены в хряще кита (Susumu et al., 1974; Иванкин и др., 1984). Имеются данные (Balazs, 1965; Zaccoppe, 1973), что глаза рыб (барракуда, карп) содержат полисахарид, подобный гиалуронату натрия – ихтиозан А. Это несulfатированный полисахарид, содержащий эквивалентное количество гексозамина и гексуруновой кислоты. Соотношение глюкозамина и галактозамина в нем равно 2:1. Концентрация ихтиозана А у разных рыб колеблется от 80 до 1000 мкг/мл.

1.2. Коллаген

Коллагены составляют основу структуры кожи, костей, хрящей, сухожилий, кровеносных сосудов и играют важную роль в сохранении нормальной структуры и функции соединительной ткани всех животных (Слуцкий, 1969, 1985; Риггз, Мелтон, 2000; Руденская, 2003).

Коллаген (К) – нерастворимый фибриллярный белок, первичная структура которого складывается из повторяющихся последовательностей триплетов аминокислот глицин-Х-У, где Х и У позиции чаще заняты, соответственно, пролином и гидроксипролином. Эти повторяющиеся последовательности позволяют трем коллагеновым полипептидам (называемым α -цепями) формировать полужесткие, очень стабильные трехспиральные молекулы (рис. 3). Они могут быть гомополимерными (три идентичные α -цепи) и гетерополимерными (две или три разные α -цепи). Под влиянием регулярно располагающихся остатков пролина и оксипролина цепь принимает форму ломаной спирали; это обуславливается жесткостью

боковых групп пролина, а также тем обстоятельством, что пептидные связи, в образовании которых участвуют пролин и оксипролин, не могут образовать водородных связей. Остатки глицина образуют межцепочечные водородные связи, способствующие сохранению прочности структуры коллагена.

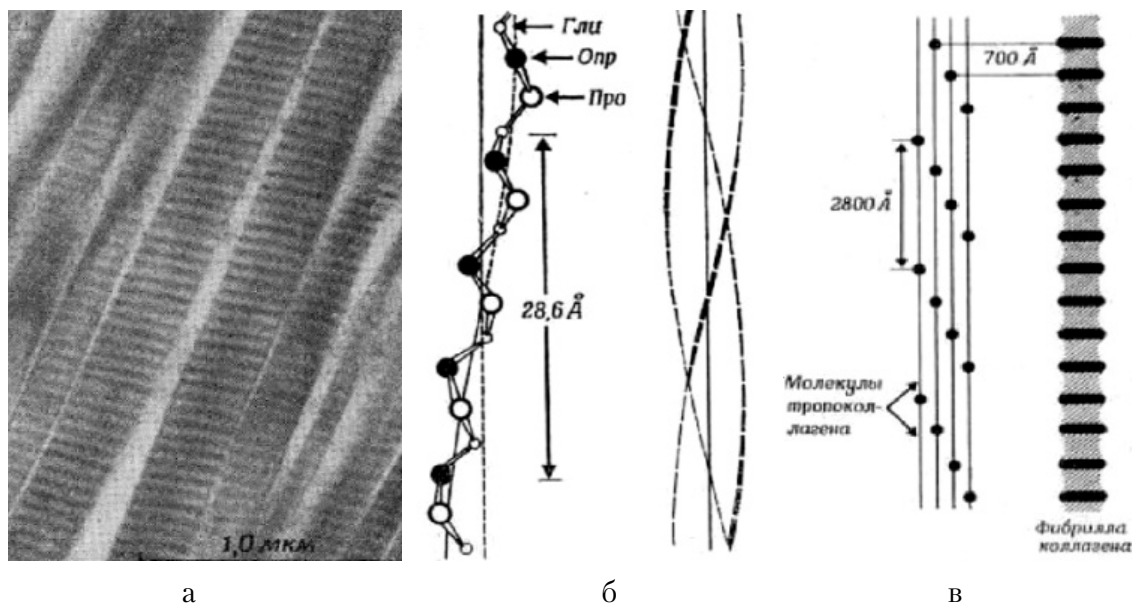


Рис. 3. Структура коллагена:

а – электронная микрофотография коллагена соединительной ткани.

Расстояние между повторяющимися структурными единицами равно 700 Å;

б – конформация полипептидных цепей в трёхцепочечной молекуле тропоколлагена;
в – ступенчатое расположение молекул тропоколлагена обуславливает появление в гидратированных волокнах коллагена повторяющихся структурных единиц, расстояние между которыми равно 700 Å (по Мусил и др., 1984)

Аминокислотные цепи коллагена обернуты друг вокруг друга и образуют «трех-волоконный канат», где отдельные волокна связаны между собой водородными связями. Такая пространственная структура возможна, только если аминокислотная последовательность строго соблюдается.

В результате образуется трехволоконная фибриллярная молекула – тропоколлаген, обладающая большой прочностью на растяжение. Это название происходит от слова тропос – обращенный внутрь – из-за того, что коллагеновые волокна всех соединительных тканей, выстланы тропоколлагеновыми молекулами, соединенными «конец в конец» и «бок о бок» – в шахматном порядке. Гидроксильные группы некоторых остатков лизина и оксилизина участвуют в образовании связи между соседними молекулами тропоколлагена. Таким образом, формируется жесткое нерастяжимое волокно. Фибробласты синтезируют молекулы тропоколлагена и выбрасывают их в матрикс, и только здесь происходит сборка коллагеновых волокон (рис. 4).

Коллагены кожи содержат в больших концентрациях пролин и оксипролин (около 20% от всех остальных аминокислот), глицин и аланин (свыше 50% от содержания других аминокислотных остатков), ароматические и серосодержащие аминокислоты практически отсутствуют или содержатся в весьма малых количествах. Кроме

того, коллаген является одним из немногих белков, содержащих оксипролин и оксилизин. Оксипролин и оксилизин образуются в молекуле проколлагена не в результате биосинтеза, а при гидроксировании пролина и лизина, которое начинается в период трансляции коллагеновой мРНК на рибосомах (Неклюдов, 2003).

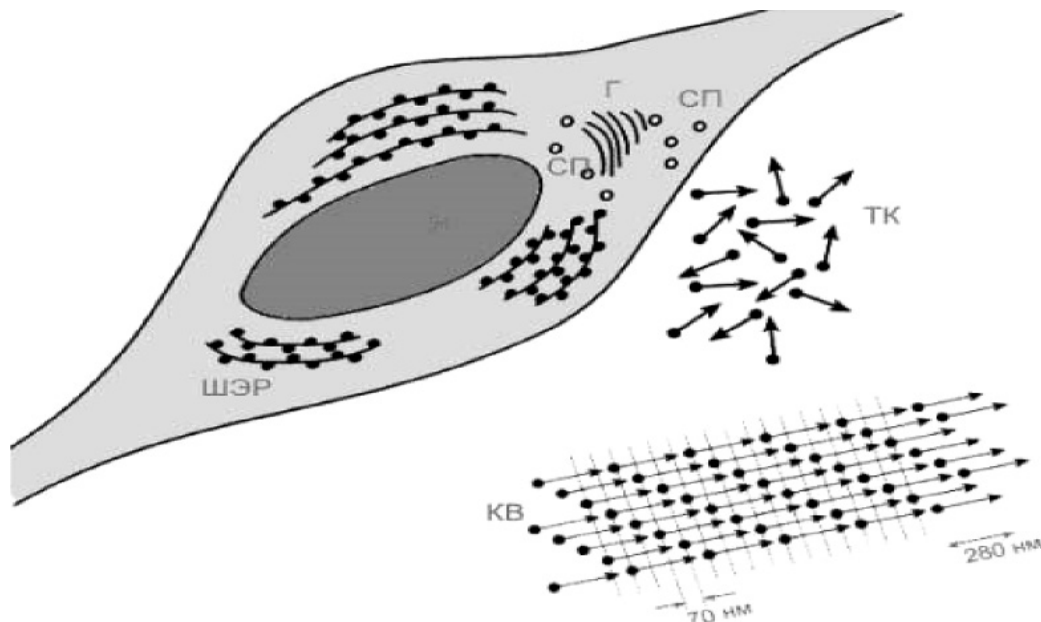


Рис. 4. Структура фибробласта и основные этапы синтеза коллагена.
Г – аппарат Гольджи; Я – ядро; ШЭР – шероховатый эндоплазматический ретикулум;
СП – секреторный пузырек; ТК – тропоколлаген; КВ – коллагеновое волокно

В настоящее время идентифицировано более 25 различных α -цепей, из которых формируется до 14 разных типов коллагеновых молекул, некоторые из них являются тканеспецифичными (Ленинджер, 1974; Риггз, Мелтон, 2000).

Таким образом, коллагены – это белки, которые:

а) содержат несколько повторов аминокислотной последовательности -Gly-X-Y-, в X-положении которой чаще всего расположен пролин, а в Y-положении – 4-гидрокси-пролин;

б) могут состоять из трех цепей с повторяющимися последовательностями, обладающими способностью к сворачиванию в характерную тройную спираль. По меньшей мере, 19 белков определены в настоящее время как принадлежащие к коллагенам. 10 родственных им белков содержат коллагеноподобные домены.

Коллагеновые белки составляют около половины массы сухого вещества суставного хряща; вблизи суставной поверхности их концентрация приближается к 90%. В других видах хрящевой ткани коллагены количественно преобладают над другими белками, обеспечивая прочность на растяжение и разрыв. (Слущкий, 1985). Количественно преобладающим белком протеогликанового комплекса хрящевой ткани является коллаген второго типа (КII). Он в незначительных количествах обнаружен в других специализированных тканях, например, в стекловидном теле глаз некоторых видов животных. Хрящевой ткани присущ необычный полиморфизм коллагеновых компонентов, проявляющийся

присутствием большого числа минорных коллагенов. Молекулярная формула КII хрящевой ткани имеет следующий вид: $[\alpha 1(\text{II})]_3$, что означает наличие трех идентичных $\alpha 1(\text{II})$ -цепей, которые отличаются от $\alpha 1(\text{I})$ -цепей более высоким содержанием оксипролина. Столь высокая концентрация оксипролина способствует увеличению количества связанных с ним углеводов. По-видимому, такая структура обеспечивает большую сольватную оболочку коллагена типа II по сравнению с типами I или III. В процессе биосинтеза коллагена С-пропептиды соединяются между собой бисульфидными мостиками и после отщепления от молекулы образуют белок, который называется хондрокальцин, с м.м. около 100 000 Да (Слуцкий, 1985).

Коллаген одиннадцатого типа (КXI) составляет приблизительно 3% хрящевого коллагена и образован двумя разными типами цепей (формула молекулы $\alpha 1(\text{XI})_2 \alpha 2(\text{XI})$). Со старением организма его количество в хряще уменьшается в пользу коллагена пятого типа (KV) (Канунго, 1982; Риггз и Мелтон, 2000).

Для хрящевой ткани характерно наличие наибольшего количества минорных коллагеновых компонентов. Такой полиморфизм коллагенов позволяет считать минорные компоненты регуляторами адаптационной пластичности хряща, метаболизма хондроцитов и морфогенетических процессов (Слуцкий, 1985).

Содержание коллагена в различных тканях и органах сельскохозяйственных животных (КРС, свиньи) характеризуют следующие данные (% от массы сухого вещества): дерма – 80–90; ахиллово сухожилие – 86; костная ткань – 17,5–25; хрящи – 46–67; роговица и склера глаз – 70; мышцы – 10. При этом коллаген составляет от 25 до 33% от общего количества белка (Титов, Апраксина, 1995). У костистых рыб коллагеновые белки преобладают в коже, сухожилиях, плавательном пузыре; у кольчатых червей и иглокожих в кожно-мускульном мешке; у моллюсков в кожных покровах и опорных хрящевых элементах.

Наиболее изучены свойства коллагенов в коже и мышечной ткани рыб. Коллаген кожи костистых рыб характеризуется частой встречаемостью молекул, состоящих из трех генетически различающихся α -цепочек, гетеротримера $\alpha 1 \alpha 2 \alpha 3$; среди изученных позвоночных животных цепочка $\alpha 3$ отмечена лишь у костистых рыб. В целом коллагены мышечной ткани костистых рыб, полученные методом электрофореза, идентичны соответствующим коллагенам типа I из кожи и имеют сходный аминокислотный состав. Однако коллагены мышечной ткани рыб более устойчивы к тепловой денатурации (более 100°C), чем коллагены кожи, что объясняется более высокой степенью гидроксирования пролина в мышечном коллагене. Термальная устойчивость мышечного коллагена определяется видом рыбы и по мере ее возрастания рыб можно расположить в следующем порядке: карп, угорь, скумбрия, сайра, кета.

В табл. 1 приведены данные о содержании коллагена и гексозаминов в соединительных тканях различных видов животных.

Составы субъединиц коллагена I типа из мышечной ткани и кожи являются идентичными у угря, скумбрии, сайры и карпа и отличаются у кеты. У последней коллаген кожи состоит из $\alpha 1 \alpha 2 \alpha 3$ гетеротримеров, а основная часть мышечного коллагена – из $(\alpha 1)_2 \alpha 2$ гетеротримеров (Богданов, Сафронова, 1993).

Содержание гексозаминов и коллагена в соединительной ткани животных

| Источник | Содержание, % сухой массы | | Ссылка |
|--|---------------------------|--------------|--|
| | гексозаминов | коллагена | |
| Млекопитающие | | | |
| Сухожилия человека | | 71,3 ± 0,6 г | Слуцкий Л.И., 1969 |
| Капсула тазобедренного сустава человека | 1,19 ± 0,69 | 60 ± 25,0 | Слуцкий Л.И., 1969 |
| Кожа человека | 0,55 ± 0,07 | 68,45 ± 1,93 | Курбанов Х., 1961 |
| Кожа крыс | 0,55 ± 0,07 | 56,3 ± 5,2 | Dickerson J.W., John P.M., цит. по Слуцкому Л.И., 1969 |
| Коленный сустав человека (гиалиновый хрящ) | 5,65 ± 1,17 | 47,2 ± 5,3 | Слуцкий Л.И., 1965 |
| Большеберцовая кость человека | 0,18 ± 0,01 | 19,6 ± 4,6 | Слуцкий Л.И., 1965 |
| Мениск человека (фиброзный хрящ) | 1,44 ± 0,14 | 69,5 ± 11,1 | Слуцкий Л.И., 1969 |
| Ушная раковина кролика (эластический хрящ) | 4,39 ± 0,31 | 39,5 ± 0,43 | Слуцкий Л.И., 1969 |
| Сельскохозяйственные животные | | | |
| Дерма | | 80–90 | Титов, Апраксина, 1995 |
| Ахиллово сухожилие | | 86 | То же |
| Костная ткань | | 17,5–25 | То же |
| Хрящи | | 46–67 | То же |
| Роговица и склера глаз | | 70 | То же |
| Мышцы | | 10 | То же |
| Хрящевые рыбы (хрящевой скелет) | | | |
| Акулы | 13,8 ± 0,01 | 22,95 | Суховерхова, 2006 |
| Скат | 12,7 ± 0,04 | 23,3 | То же |
| Калуга | 12,4 ± 0,01 | 24,2 | То же |
| Костистые рыбы (хрящевая ткань) | | | |
| Дальневосточные лососи | 0,52 ± 0,02 | 16 ± 0,03 | То же |
| Тресковые | 0,4 ± 0,002 | | |
| Беспозвоночные | | | |
| Кальмары (хрящевая капсула) | 8,5 ± 0,05 | 16 ± 0,1 | То же |
| Кукумария (мышечный мешок) | 5,2 ± 0,03 | 47 ± 0,5 | То же |

Ранее было установлено, что в гликопротеине из хрящевой ткани акулы (*Prionace glauca*) 75 % всех белков составляет коллаген (Cho, Kim, 2002). В гликопротеине из хряща теленка коллаген составляет 30 % от белка, а в хряще человека – 50 % (Mashburn, Hoffman, 1967). Исследования коллагена из хрящевой ткани осетра показали, что он идентичен коллагену второго типа позвоночных (Miller, 1974). В хряще акул, кроме коллагена II типа, присутствует коллаген I типа (Rama, Chandrakasan, 1984).

В литературе имеются сведения, что содержание коллагена, например, в мышечной ткани трепанга и кукумарии (Слущкая, 1972; 1976), коже кеты (Купина и др., 1997) и акулы (Tokahashi, Takei, 1954) немного ниже, чем в шкурах крупного рогатого скота (Канунго, 1982; Титов, Апраксина, 1995; Костин, 1951). При этом различия определяются не только количественным содержанием, но и соотношением имеющихся типов коллагена, а также физико-химическим характеристикам.

В плавниках акул, образованных хрящевой тканью, идентифицирован коллаген с высоким содержанием эластана – эластоидин (Тишин, 1969). Эластоидин переваривается на 23% пепсином с образованием коротких пептидных цепей неколлагеновой природы, которые на 29% состоят из тирозина. Прочность и жесткость плавников акул объясняют наличием в эластоидине перекрестных коллагеновых связей.

1.3. Белки неколлагеновой природы

Кроме гликозаминогликанов и коллагена, в составе матрикса костной и хрящевой ткани животных присутствуют белки неколлагеновой природы (табл. 2). Эти белки участвуют во взаимодействиях между клетками и выполняют адгезионные функции, обеспечивают процессы пролиферации, дифференциации и миграции клеток.

К неколлагеновым белкам хрящевой ткани относятся **фибронектин** и **ламинин**, которые взаимодействуют с фибробластами или клетками эндотелия. Молекулярная масса фибронектина составляет около 250 000 Да. **Ламинин** – это также гликопротеин, образованный одной большой и тремя более короткими цепями, представляющий собой крестообразную молекулу с м.м. около 800 000 Да. **Фибронектин** – это гликопротеин, состоящий из двух сходных, но не идентичных субъединиц, соединенных дисульфидной связью (Mosher, 1989). Оба эти белка полифункциональны – стимулируют пролиферацию, дифференциацию и миграцию клеток.

Важную группу адгезивных белков составляют **кадгерины** (*calcium dependent cell adhesion molecules*), которые подразделяются на группы E, N, P и, как следует из их названия, влияют на клеточную адгезию только при наличии кальция. Относительно недавно были описаны **селектины** (*selctins*), названные также Лес-СAMs. Один их домен, который связывается с карбогидратами, гомологичен, по-видимому, домену, присутствующему в лектинах (L), или в эпидермальном факторе роста (E), или в белках связывающих комплемент (P).

В межклеточных взаимодействиях большую роль играют другие белки. Это фосфорилированный белок – **остеопонтин**, чей синтез ингибируется кальцитонином. Анализ первичной последовательности белка (Prince et al., 1987) и кодирующей его ДНК позволил установить несколько интересных фактов, включая наличие повторов богатых аспарагиновой кислотой, которые, вероятно, придают остеопонтину способность связываться с гидроксиллапатитом, и каноническую последовательность аминокислот RGD (Arg-Gly-Asp в средней части молекулы), ответственную за адгезию клеток (Grzesik et al., 1993).

Основные неколлагеновые белки костной ткани животных и человека (по Риггз и Мелтон, 2000)

| Белок | м.м., Да | Отличительные признаки |
|--|------------------------------|---|
| <i>Гликопротеины:</i> | | |
| Остеонектин (SPARC, BM-40) | 43 000–46 000* 32 000** | Гликозилированный, фосфорилированный протеин; множественная низкая аффинность к Ca ²⁺ две структуры E–F hand, гомология с овомукоидом |
| Щелочная фосфатаза | S–S димер, 50 000–80 000* | Связывание Ca ²⁺ |
| BAG-75 | 75 000 | Содержит 60% углеводов (7% – сиаловая кислота), 8% фосфатов |
| <i>Белки, содержащие RGD:</i> | | |
| Тромбоспондин | S–S тример, 150 000 | Связывание Ca ²⁺ и гидроксиапатита, сайты связывания такие же, как у фибронектина; связывается с остеонектином; клеточная адгезия без распластывания |
| Фибронектин | S–S димер, 250 000 | Сайты связывания с поверхностью клеток, фибрином, гепарином, бактериями, желатином, коллагеном, ДНК; начальное прикрепление клеток |
| Витронектин | 70 000 | Связывается со многими белками матрикса и сыворотки, ответственными за прикрепление клеток |
| Остеопонтин (BSP-1, 2ar, SPP-1, pp69) | 45 000–75 000* 41 500** | Содержит N- и O-связанные олигосахариды, фосфосерин и тирозин, участвует в прикреплении клеток |
| Костный сиалопротеин | ~75 000* 33 500** | Содержит 50% углеводов (12% – сиаловая кислота); у некоторых видов происходит сульфатирование тирозина; участвует в прикреплении клеток |
| <i>Белки, содержащие γ-карбоксихлутаминовую кислоту:</i> | | |
| Gla-протеин матрикса | 15 000 | Одна внутримолекулярная связь S–S, 5 остатков gla |
| Остеокальцин | 12 000–14 000* 5 800** | Одна внутримолекулярная связь S–S, 3–5 остатков gla, связывание с гидроксиапатитом, зависимое от gla |

Примечания:

* – Определено с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН.

** – Для полипептида.

RGD – последовательность аминокислот Arg-Gly-Asp.

Еще один белок, идентифицированный в хрящевой ткани – **остеонектин**, называемый также SPARC (*secreted protein acidic rich in cysteine*). Это фосфорилированный гликопротеин с молекулярной массой 43000–46000 Да. Остеонектин найден в остеообластах, одонтобластах и в небольшом количестве в хондроцитах (Bianco et al., 1988). Исследования *in vitro* показали, что число типов клеток, которые синтезируют остеонектин, намного больше, чем это было отмечено *in vivo*. К ним относятся фибробласты (Otsuka et al., 1988), и эндотелиальные клетки (Sage, 1986). В связи с этим остеонектин имеет еще одно название «культуральный шоковый протеин», которое

говорит о том, что в условиях тканевых культур его продукция быстро усиливается. N-концевые последовательности данного белка отличаются высокой кислотностью, что может сказываться на конформации α -спирали с образованием до 12 участков связывания кальция, имеющих структуру типа EF-hand. В остеоонектине имеется богатая цистеином область, аминокислотные последовательности в которой гомологичны овомукоиду и другим ингибиторам сериновых протеиназ. Наличие этих последовательностей необычно для секретируемого белка, но участки связывания кальция, как и те последовательности, которые присутствуют в N-концевом отделе молекулы, придают остеоонектину способность связывания с гидроксилapatитом (Termine et al., 1981). Функции, которые выполняет остеоонектин в различных тканях, полностью не изучены. Исследования *in vitro* позволили предположить, что этот белок регулирует пролиферацию и взаимодействия клеток матрикса.

Из хрящевой ткани выделен высокомолекулярный гликопротеид – **хондронектин**. Его молекулярная масса составляет 180 000 Да. Установлено, что хондронектин синтезируется *in vivo* хондроцитами (Tryggvason et al., 1987).

Остеокальцин, присутствующий как в тканях, так и в сыворотке крови, обозначается также как GLA-протеин или BGP (*bone GLAprotein*), так как в своей молекуле он содержит от 3-х до 5-ти остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты (GLA). Глутаминовая кислота в его молекуле посттрансляционно карбоксилируется в позициях 17, 21, 24 в присутствии витамина К.

Из минерализованных участков позвонков атлантической суповой акулы (*Galeorhinus galeus*) был выделен **витамин-К-зависимый матриксный гликопротеин** (Rice et al., 1994). Его количество составляет 35–40% от общего количества неколлагеновых белков акулы. Он почти нерастворим в нейтральной среде и сохраняет способность к самоагрегации, которая может быть важной, но еще непонятой функцией. Этот гликопротеин содержит четыре аминокислотных остатка в 102–106 положениях. Молекулярная масса белка составляет 12 770 Да, что не на много меньше молекулярной массы GLA-протеина животных и человека (Риггз, Мелтон, 2000). Первые N-концевые 76 аминокислотных остатка гликопротеина акулы гомологичны последовательности GLA-протеина млекопитающих на 37%, а C-концевые 23 аминокислотных – отличаются. Этот C-терминальный сегмент акульего белка содержит только 8 основных аминокислот. Особенность GLA-протеина акулы и млекопитающих, а также всех известных витамин-К зависимых белков – это гомологичный участок из 15 аминокислотных остатков, функции которого пока не установлены.

Исследования низкомолекулярных белков хрящей акул показали, что белок из рифовой акулы (*Carcharhinus springeri*) обладает поразительным сходством с **тетранектином** из плазмы крови. Белок был выделен путем экстрагирования хряща в растворе 4 М гуанидинхлорида. Его аминокислотная последовательность представлена 166 аминокислотными остатками при м.м. – 18 430 Да. Белок на 45% идентичен тетранектину человека и участвует в процессе минерализации хрящевой ткани (Neamen et al., 1992). Тетранектин – глобулярный белок плазмы крови – состоит из четырех нековалентно связанных полипептидов с м.м. приблизительно 21 000 Да. Существует предположение, что тетранектин может принимать участие в фибринолизе и протеолизе тканей (Wewer et al., 1994).

1.4. Компоненты, регулирующие метаболизм хрящевой ткани

В управлении биологической активностью клеток играют важную роль **интегрины**, которые являются мембранными рецепторами, образованными большими гликопротеинами с двумя подъединицами – а и б. Это гетеродимеры, которые взаимно нековалентно связаны; б – подъединица, существующая примерно в 20 вариантах, комбинируется с разными а – подъединицами, что обуславливает разную активность рецепторов, ее петля стабилизирована бисульфидными мостиками. Размер отдельных подъединиц в диапазоне 120 000–200 000 Да. Во внеклеточной части б – подъединица содержит четыре повторяющиеся домена с 40 аминокислотами, из которых большую часть составляет цистеин. Некоторые а – подъединицы образованы тяжелыми и легкими цепями, взаимно соединенными дисульфидными связями. Большая часть молекулы интегринов с N-конца содержится вне клетки, где образует петлю, содержащую полярные аминокислоты, которые взаимодействуют посредством ионных связей с адгезионными протеинами, что ведет к конформационным изменениям обеих субкомпонентов включая цитоскелетный домен. Интегрированные цепи проникают через клеточную мембрану, являясь посредниками двустороннего «диалога» между внутри – и внеклеточной средой. Однако это касается, прежде всего, переноса информации из внеклеточного пространства в клеточный цитоскелет, образованный системой микротрубочек, микрофиламентов и микротрабекул, ответственный за внутриклеточный транспорт. Интегрины, вероятно, не находятся в прямом контакте со скелетом клетки, их связь осуществляется посредством других белков, например винкулина или талина. Вещества, которые влияют на клеточную пролиферацию и дифференциацию, влияют также на экспрессию интегринов, которые в большинстве случаев взаимодействуют с последовательностью RGD (arg-gly-asp) внеклеточных белков. Известны еще иные последовательности, с которыми связываются интегрины, например DGEA (asp-gly-glu-ala) или LDV (leu-asp-val), у ламинина пептидом связи является YIGSR (tyr-ile-gly-ser-arg), у эластина пептидом связи является VGVAPG (val-gly-val-ala-pro-gly). Интегрин после связи с соответствующим лигандом меняет свою конформацию, что приводит к изменению электрического поля. Это изменение является той информацией, которую клетка получает и которая влияет на внутриклеточные процессы. Если клетка перегружена информацией из наружной среды, возникает изменение в экспрессии интегринов так, что понижается количество сигналов поступающих в клетку, т.е. синтезируются такие интегрины, которые взаимодействуют с меньшим количеством адгезионных протеинов, присутствующих внеклеточно, что приводит к понижению информационного шума. Кроме того, происходит активный синтез протеолитических ферментов. В регуляции их образования принимают участие интегрины (Werb et al., 1989, цит. по Риггз, Мелтон, 2000). Для хондроцитов, которые в сравнении с другими видами клеток имеют мало рецепторов и не образуют некоторые интегрины, напр. b1 и b5 (Salter et al., 1992, цит. по Риггз, Мелтон, 2000), важен интегрин $\alpha 1\beta 1$, который дальше разделяется на 7 VLA (*very late activation antigene*). Так VLA-1 является рецептором для коллагена и ламинина, VLA-2 является рецептором для коллагена, VLA-3 для фибронектина, коллагена и ламинина, VLA-4 для фибронектина и CAM сосудов (VCAM-1). Хондроциты нор-

мального зрелого гиалинового хряща образуют в больших количествах интегрин $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1$ и $\alpha 3$, которые экскретируют только иногда и в маленьких количествах. Интегрин $\alpha v\beta 3$, который также содержится в хондроцитах, свидетельствует о наличии фибронектина в хряще. Хондроциты далее экскретируют интегрин, которые обеспечивают возможность их связывания с остеокальцином, остеопоном и с коллагенами типа II и VI (Loeser, 1993, цит. по Риггз, Мелтон, 2000). Связь интегринов с компонентами внеклеточной массы в некоторых случаях зависит от наличия двухвалентных катионов, например, связь коллагенов типов I и II зависит от Mg^{2+} . Адгезия фибронектина стимулируется как Mg^{2+} так и Ca^{2+} . В течение старения или патологических процессов происходит изменение в экспрессии интегринов. Клеточные функции координируются с помощью полипептидных медиаторов – цитокинов. Они представляют собой неоднородную группу молекул, влияющих на иммунные процессы. По месту их происхождения их называют лимфокинами, монокинами и PDGF (*platelet derived growth factor*). По их воздействию их обозначают как интерлейкины, факторы роста, интеркины – химокины, TNF α и β (катехтин), ангиогенетические факторы, гемопоетические факторы и интерфероны (INF α , β и γ). Специфическим воздействием на экспрессию генов при образовании и разрушении внеклеточных компонентов обладают, прежде всего, IL-1, IL-6, TNF- α (- β). Цитокины действуют в большинстве случаев на уровне матричной РНК, они стимулируют секрецию протеиназ и некоторые из них ингибируют экспрессию рецепторов (интегринов) в компонентах матрикса. Для хондроцитов наибольшее значение имеет интерлейкин-1, который действует в качестве стимулятора на экспрессию интегрин $\alpha 1$, кроме того вызывает ингибирование клеточной пролиферации и образования протеогликанов. Очень важной является такая его функция как стимуляция образования металлопротеиназ. Подобным образом действует TNF. Эти цитокины влияют на экспрессию некоторых интегринов, которые способствуют связыванию компонентов внеклеточной массы клетками. Комбинация TNF- α с интерфероном- γ понижает образование субкомпонента $\beta 1$, что влияет на взаимодействия между клетками и клеток с компонентами клеточной массы и на синтетическую активность клеток (Holtmann и Resch, 1995, цит. по Риггз, Мелтон, 2000). С другой стороны продукцию некоторых цитокинов стимулируют разные типы коллагена. Так коллаген типа II индуцирует экспрессию IL-1 β , IL-6 и TNF- α . Подобное воздействие, хотя менее выраженное, имеет также коллаген типа I.

1.5. Металлозависимые матриксные протеиназы (МПП) и тканевые ингибиторы металлопротеиназ матрикса (ТИМП)

К числу компонентов, синтезируемых эндогенно и способных аккумулироваться и сохраняться в костно-хрящевом матриксе человека и животных, Риггз и Мелтон (2000) относят:

- 1) ферменты, участвующие в деградации матрикса;
- 2) тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМП);
- 3) активатор плазминогена и его ингибитор.

В деградации хрящевого матрикса в различной степени и при различных условиях принимают участие четыре основных класса протеиназ: сериновые (трипсиновые, химотрипсиновые протеиназы, эластаза), цистеиновые протеиназы (катепсин В и Н), аспарагиновые протеиназы (пепсин, катепсин D) и металлопротеиназы (коллагеназы, желатиназы, стромелизин). **Матриксные металлопротеиназы (ММП)** – принимают участие в деградации всех белков матрикса, как в процессе онтогенеза, так и при дегенеративных изменениях хрящевого и костного матрикса (Риггз, 2000; Хасигов, 2001; Tryggvason et al., 1987; Fosang et al., 1996; Stracke et al., 2000). Наиболее изученными из них являются коллагеназы (КФ 3.4.24). В настоящее время известны четыре представителя этого семейства: интерстициальная коллагеназа I типа (ММП-1), коллагеназа нейтрофилов (ММП-8), коллагеназа 3 (ММП-13), коллагеназа 4 (ММП-18).

Коллагеназы – это ферменты семейства металлозависимых протеиназ матрикса, способные гидролизовать нативный коллаген. Эти ферменты играют решающую роль при развитии таких физиологических процессов как морфогенез, резорбция и ремоделирование тканей, миграция, адгезия, дифференцировка и пролиферация клеток (Docherty et al., 1992; Демина, Лысенко, 1996; Соловьева, 1994, 1998), а также при патологических состояниях (ревматоидный артрит, пародонтиты, изъязвления роговой оболочки глаз и т.д.).

Все ферменты этого семейства обладают общими характерными чертами:

- 1) содержат цинк в активном центре и относятся к кальцийзависимым протеиназам;
- 2) ингибируются хелатными агентами;
- 3) обладают сходной доменной структурой;
- 4) гидролизуют один или несколько компонентов матрикса и базальных мембран;
- 5) секретируются в виде проферментов;
- 6) проферменты активируются рядом протеиназ, тиолмодифицирующими агентами и хаотропными реагентами;
- 7) ингибируются тканевыми ингибиторами (Соловьева, 1994).

Коллагеназы гидролизуют интерстициальные нативные коллагены, в спиральной области, устойчивой к действию других протеиназ, по связи Gly-Leu (Ile), расположенной на расстоянии 1/4 длины молекулы от С-конца. Некоторым видам коллагеназ для эффективного связывания коллагена требуется достаточно протяженный участок его структурированной молекулы, что обозначает важную роль и каталитического, и субстрат-связывающего С-концевого доменов для взаимодействия с субстратом (Соловьева, 1998).

В норме процессы синтеза и расщепления гликозаминогликанов и коллагена находятся в равновесии. При воспалительных процессах, таких как артрит, происходит деполимеризация хрящевой ткани интерстициальными ферментами, сопровождаемая болезненным состоянием суставов. Исследования причин и непосредственно последствий артрита у человека и животных выявили повышенную концентрацию коллагеназы в местах деградации хряща (Воли, 1991; Milner, Elliott, Cawston, 2000; Данилевская, Николаев, 2002). Методами гистохимического окрашивания было показано, что на разрушающейся поверхности не было постоянных доминирующих специфических клеток, которые выделяют коллагеназу, но были обнаружены макро-

фаги, фибробласты, нейтрофилы, хондроциты и тучные клетки (Воли, 1991). Выявление скоплений тучных клеток в местах разрушений представляет несомненный интерес, так как эти клетки отвечают за выделение медиаторов и гидролитических ферментов.

Чаще всего запуск деградации тучных клеток осуществляет иммуноглобулин E (Ig E), который образуется в организме. Подтверждением этого служат данные, согласно которым в синовиальной жидкости, взятой у больных ревматоидным артритом, содержатся антитела к Ig E, специфичные к коллагену хряща (Воли, 1991). Это означает, что у больных аутоиммунный ответ направлен против компонентов хряща, что приводит к образованию Ig E-антител и к повышению чувствительности тучных клеток. При этих условиях хрящ становится как бы «чужеродной тканью», которая должна быть удалена при опосредованном участии компонентов, выделяемых тучными клетками. Несмотря на отсутствие способности разрушать сам коллаген, содержащее гранул тучных клеток (в частности, гистамин) может стимулировать продукцию коллагеназы в хондроцитах. Кроме того, тучные клетки способны воздействовать на макрофаги. Последние в результате вырабатывают фактор, идентифицированный как интерлейкин I, стимулирующий продукцию коллагеназы фибробластами. Схема, отражающая сложный механизм выделения интерстициальных коллагенолитических ферментов, в упрощенном варианте представлена на рис. 5.

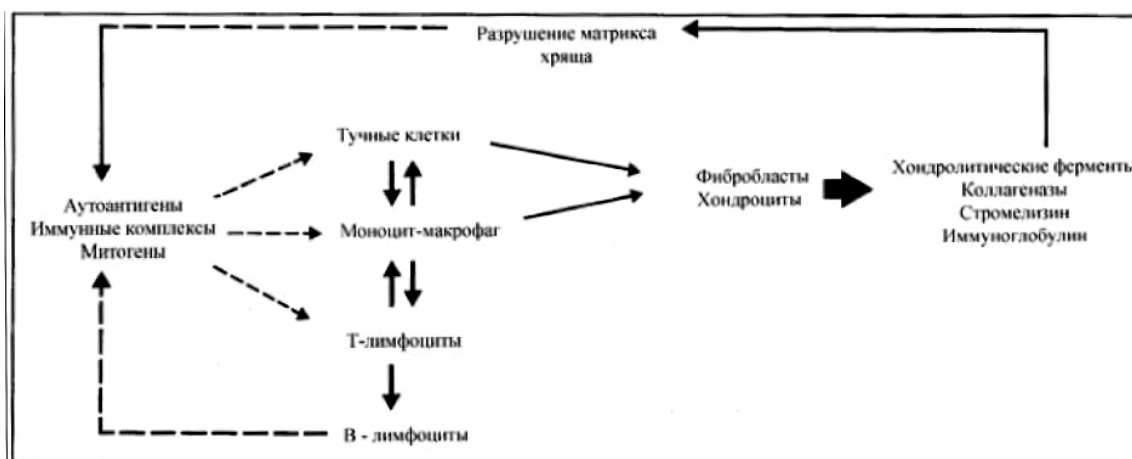


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая хронический цикл воспаления, характерный для ревматоидного артрита. Показаны возможные клеточные взаимодействия, приводящие к образованию разрушающих хрящ ферментов (Воли, 1991)

Биологические функции ММП реализуются в очень широком круге физиологических процессов. Это эмбриональное развитие и морфогенез, метаморфоз и ангиогенез. Особое место отводится металлопротеиназам в генерализации процессов инвазии и метастазирования опухолей (Tryggvason et al., 1987; Соловьева и др., 2001; Луценко и др., 2003). Получены данные, указывающие на наличие единого рецепторного механизма в регуляции процессов деградации матрикса и миграции клеток, что в конечном итоге обеспечивает инвазию и метастазирование. Решающим фактором в действии ММП является соотношение ферментов и их эндогенных ингибиторов в клетках опухоли и хозяина. Получены многочисленные данные об эффективном

ингибировании процессов инвазии и метастазирования в процессах *in vitro* и на экспериментальных животных (DeClerk et al., 1992). В настоящее время проводятся многочисленные исследования по разработке перспективных лекарственных препаратов на основе ингибиторов ММП.

На посттрансляционном уровне в физиологических условиях известны два основных пути регуляции активности ферментов:

- 1) активация проферментов;
- 2) взаимодействие с эндогенными ингибиторами.

Химические агенты, вызывающие активацию ММП – это тимолмодифицирующие и хаотропные агенты, аминокислоты, амино-фенилмеркурий-ацетат, окисленный глутатион. Нагревание также вызывает активацию проферментов.

Большая часть матриксных металлопротеиназ переходит в активную форму в результате сложного многоступенчатого процесса, основные этапы которого осуществляются, по-видимому, вне клетки. Активатором металлопротеиназ считают плазминоген, образующийся под влиянием тканевого активатора плазминогена, который синтезируется хондроцитами или клетками синовиальной жидкости. В нормальных физиологических условиях активность коллагеназ (способных разрушать все компоненты внеклеточного матрикса) подавляется с помощью тканевых ингибиторов металлопротеиназ (Tryggvason et al., 1987; Хасигов и др., 2001).

Тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМП) продуцируются хондроцитами и препятствуют активации ферментов и их разрушительному действию на ткань хряща. Полагают, что причиной остеоартроза является нарушение баланса между указанными факторами, которое приводит к повышенному разрушению матрикса или снижению его восстановления. У больных остеоартрозом отмечали повышенную концентрацию металлопротеиназ в ткани хряща (Воли, 1991; Fosang et al., 1996; Stracke et al., 2000). В настоящее время известно о четырех членах семейства ТИМП. Наиболее распространенным ингибитором является ТИМП-1 – гликопротеин с м.м. 30 кДа, в меньших количествах встречается ТИМП-2 – негликозилированный белок с м.м. 23 кДа. Оба ингибитора легко экстрагируются из хряща (Murphy et al., 1989). Также был выделен гликопротеин с м.м. 28,5 кДа (ТИМП-3) из фибробластов кожи человека, устойчивый к крайним значениям pH (Tryggvason et al., 1987). Известно, что ТИМП-1 и ТИМП-2 существуют в растворимой форме, тогда как ТИМП-3 нерастворим и находится исключительно в связанном с внеклеточным матриксом состоянии (Хасигов, 2001).

Проявление биологической активности ингибиторов связывают с их проникновением во внеклеточное пространство. Это было показано в многочисленных исследованиях, касающихся всех соединительных тканей млекопитающих, продуцирующих ингибиторы коллагеназ. Одна из групп таких биологически активных тканевых ингибиторов включает низкомолекулярные катионные белки с м.м. в пределах 11–40 кДа (Kuettner et al., 1976, Langer et al., 1976, Tryggvason et al., 1987).

Изученные ТИМП имеют ряд одинаковых структурных особенностей. Так, в консервативной части молекулы ТИМП находятся 12 остатков цистеина, которые образуют шесть дисульфидных мостиков. У всех ТИМП N-концевой домен, необходимый для проявления ингибиторной активности, содержит консенсусную

последовательность Val-Ile-Arg-Ala-Lys. Образование комплекса ТИМП с матриксными металлопротеиназами происходит с помощью нековалентных связей; при диссоциации комплекса и ингибитор, и фермент могут высвободиться в интактном виде (Murphy et al., 1989). Было показано, что в процессе ингибирования сначала происходит обратимое связывание ТИМП-1 с С-концевой последовательностью, а затем образуется прочный комплекс ингибитора с молекулой металлопротеиназы (Хасигов, 2001). На основании исследования рекомбинантной молекулы ТИМП-1 Мёрфи с соавторами (Murphy et al., 1991) предположили, что последовательность N-концевого домена ТИМП-1 определяет его способность ингибировать ферментативные реакции с участием матриксных металлопротеиназ. В дальнейшем при помощи направленного мутагенеза было установлено, что для проявления ингибиторной активности ТИМП-1 важна последовательность, расположенная между Cys 3 и Cys 13 N-концевого домена. Ингибиторная активность ТИМП-2 также связана с N-концевой последовательностью. Последовательность Gly-Cys-Glu-Glu-Cys, заключенная между двумя дисульфидными связями (Cys 13-Cys 124 и Cys 127-Cys 174) молекулы ТИМП-1, принимает участие в подавлении ферментативной активности коллагеназы фибробластов (De Clerck et al., 1991). Способность образовывать комплекс с неактивной формой фермента указывает на более сложные, чем простое подавление активности функции ТИМП.

В экстрактах хряща акул обнаружены низкомолекулярные белки, ингибирующие металлопротеиназы матрикса (пат. РФ 2157695). Из хрящевой ткани акул также выделен ингибитор ангиогенеза с м.м. около 10 кДа. Исследование структурных особенностей ингибитора показали, что это термоустойчивый протеогликан, содержащий цепи сульфатированного кератана и белка (Liang, Wong, 2000). Также было показано, что количество аналогичных белков в хрящевой ткани теленка в 100 раз ниже (Lee, Langer, 1983).

Таблица 3

Активаторы и ингибиторы метаболизма хрящевой ткани

| Стадия метаболизма | Активаторы | Ингибиторы |
|---|--|---|
| Анаболизм (синтез коллагена, протеогликанов и других компонентов матрикса) | Гормоны роста Факторы роста: IGFS;TGF-bs;PDGF; EGF;BMPs;CDMPs Интегрины; Низкомолекулярные составляющие хрящевой ткани (коллаген, хондроитины, гиалуроновая кислота, гексозамины и др.) | Интерлейкины: IL-1; IL-17;TNF-a; Интерферон; Глюкокортикоиды |
| Катаболизм (деструкция матрикса под действием гидролитических ферментов, в том числе матриксных протеиназ) | Интерферон Свободные радикалы Простагландины Плазминоген | ТИМП Антиоксиданты Ингибиторы плазминогена |

Взаимосвязь между проявлением активности матриксных металлопротеиназ (коллагеназ) и их ингибиторов прослеживается при различных физиологических и патологических состояниях тканей. Ряд авторов полагает, что ТИМП способны препятствовать развитию процессов инвазии и метастазирования опухолей, в связи с чем рассматривают эти компоненты как перспективные противоопухолевые средства (Yip et al., 1999).

Суммировать данные о характере метаболизма хрящевой ткани и влиянии на него отдельных компонентов можно следующим образом (табл. 3). Эти данные позволяют проводить направленный поиск препаратов для терапии патологических состояний хрящевой ткани.

Глава 2. СОСТАВ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ ИЗ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ ГИДРОБИОНТОВ

2.1. Содержание гексозаминов, хондроитинсульфатов, гиалуроновой кислоты, гексоз, коллагена и неколлагеновых белков

Для сравнения с известными коммерческими препаратами-хондропротекторами ферментативные гидролизаты (ФГ) из хрящевой ткани гидробионтов (используемые для получения «Артрофиша») были охарактеризованы по содержанию гексозаминов, хондроитинсульфатов, гиалуроновой кислоты, гексоз, свободных дисахаридов, коллагена и неколлагеновых белков и минеральных веществ (Суховерхова, 2006).

По содержанию гексозаминов ФГ из тканей хрящевых рыб (катрана, полярной акулы и калуги) в три раза превосходят таковые из костнохрящевой ткани лосося и хрящеподобной ткани кальмара. ФГ из хрящевой ткани ската отличается наибольшим содержанием гексозаминов (табл. 4).

Таблица 4

Сравнительный состав гексозаминов и сульфат-ионов в препаратах из хрящевой ткани, % от сухого вещества

| Препарат | Гексозамины | Сульфат-ионы | Соотношение гексозамины:сульфат-ионы |
|---|-------------|--------------|--------------------------------------|
| Ферментативные гидролизаты из хрящевой ткани | | | |
| Полярной акулы | 4,0 ± 0,10 | 6,5 ± 0,1 | 1:1,62 |
| Катрана | 5,0 ± 0,10 | 6,8 ± 0,2 | 1:1,36 |
| Ската | 6,30 ± 0,20 | 6,5 ± 0,2 | 1:1,00 |
| Калуги | 4,80 ± 0,09 | 5,9 ± 0,1 | 1:1,24 |
| Кальмара | 1,98 ± 0,02 | 6,3 ± 0,1 | 1:3,20 |
| Горбуши | 2,11 ± 0,01 | 6,4 ± 0,1 | 1:3,0 |
| Коммерческие препараты | | | |
| Хонсурид (Россия) | 20,8 ± 0,60 | 7,5 ± 0,15 | 1:0,36 |
| Гиалуроновая кислота (США) | 15,2 ± 0,30 | 5,7 ± 0,18 | 1:0,38 |
| Структум (Франция) | 14,2 ± 0,30 | 11,5 ± 0,10 | 1:0,80 |
| Глюкозаминосульфат (США) | 38,4 ± 0,80 | 10,4 ± 0,40 | 1: 0,30 |

Примечание. $n = 9, p < 0,05$.

Количество хондроитинсульфатов в препаратах оценивали по содержанию сульфат-ионов как предложено в фармакопейной статье № 421286-99 «Хонсурид». Соотношение гексозаминов и сульфат-ионов в ФГ из хрящевой ткани акулы, ската, катрана и осетра составляет примерно 1:1, а в гидролизатах из кальмара и лосося 1:3. В качестве образца сравнения использовали фармпрепарат «Хонсурид», который представляет собой хондроитинсульфат с чистотой 99%. При этом содержание в нем гексозаминов согласно фармстатье должно быть не менее 20%, а – сульфатионов

не менее 15%. То есть искомое соотношение должно составлять 1:0,8. Однако при экспериментальной проверке оказалось, что содержание сульфат-ионов в коммерческих препаратах ниже, что позволяет говорить о меньшей степени сульфатирования присутствующих в них гликозаминогликанов в отличие от ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов. Известно, что активность гликозаминогликанов, обусловлена их полианионной структурой и зависит от наличия в каждой дисахаридной единице хотя бы одной отрицательно заряженной карбоксильной или сульфатной группы, обеспечивающей высокую гидрофильность и поверхностно-активные свойства (Шитов, 1992; Данилевская, Николаев, 2002). Таким образом, высокая степень сульфатирования углеводов в ферментативных гидролизатах хрящевой ткани гидробионтов позволяет предположить их высокую биологическую активность.

Поскольку гексозамины содержатся также в несulfатированных аминсахарах (гиалуроновой кислоте и хондроитине), то в комплексных препаратах, каковыми являются ферментативные гидролизаты из гидробионтов, не следует ожидать строгого соблюдения соотношения рассматриваемых компонентов, так как вероятно имеет место наличие хондроитинсульфатов с различной степенью сульфатирования.

Кроме сравнительного анализа гексозаминов и сульфат-ионов был определен состав ряда других углеводных компонентов в полученных ФГ. По результатам качественного и количественного анализа показано, что препараты преимущественно отличаются содержанием гиалуроновой кислоты и гексозаминов. В ФГ из хрящевой ткани акулы и осетра в два раза больше гексозаминов и гиалуроновой кислоты по сравнению с препаратами из лосося и кальмара. Это может быть объяснено видовыми особенностями ткани.

В табл. 5 представлены результаты параллельного определения содержания свободных и связанных аминсахаров. Количество свободных аминсахаров в исследуемых ФГ было весьма велико и отличалось для разных видов гидробионтов. Тем не менее содержание свободных аминсахаров и гексоз, не содержащих аминогруппы, практически одинаково, что позволяет говорить о небольших количествах дезаминированных гексозаминов в хрящевой ткани гидробионтов.

Таблица 5

Состав углеводных компонентов ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов, %

| Ферментативный гидролизат из хрящевой ткани | Сумма гексозаминов | Гиалуроновая кислота | Гексозы | Свободные гексозамины |
|---|--------------------|----------------------|---------|-----------------------|
| Акулы | 4,4 | 2,0 | 1,6 | 0,5 |
| Калуги | 4,8 | 1,9 | 0,5 | 0,4 |
| Горбуши | 2,2 | 1,1 | 0,2 | 0,6 |
| Кальмара | 2,0 | 1,0 | 0,3 | 0,7 |

Белковые компоненты ФГ характеризовали по содержанию коллагеновых и неколлагеновых белков.

В исследуемых ФГ содержание коллагена варьирует от 16,2 до 24,8% в зависимости от вида сырья и практически в 2–3 раза ниже, чем в хрящевой ткани крупного рогатого скота (40–60%) (Слущкий, 1969) и мускульной оболочкой кукумарии (40–57%) (Слущкая, 1972).

Содержание неколлагеновых белков в ФГ рассчитывали по формуле, предложенной Смит, с учетом количества в препарате тирозина – специфичной для неколлагеновых белков аминокислоты (Слущкий, 1969). Известно, что в коллагене содержится не более 0,4–0,6% тирозина, несколько выше его концентрация в эластине. Зато в неколлагеновых белках тирозина примерно в 10 раз выше. Определив общую концентрацию тирозина и оксипролина в препаратах, можно оценить содержание неколлагеновых белков (Суховерхова, 2006). В отличие от хрящевой ткани человека и костей крыс, содержащих 11–16 и 10,9–12% неколлагеновых белков, соответственно (Слущкий, 1969), хрящевая ткань гидробионтов характеризуется иным соотношением указанных компонентов (табл. 6).

Таблица 6

Содержание коллагена в ферментативных гидролизатах
из хрящевой ткани гидробионтов, %

| Показатели | Акула | Осетр | Лосось | Кальмар |
|--|-------|-------|--------|---------|
| N(азот) _{коллагена} | 8,3 | 13,4 | 7,0 | 7,9 |
| Оксипролин, % | 1,84 | 3,0 | 1,82 | 1,41 |
| K (коэффициент пересчета оксипролина в коллаген) | 13,5 | 7,5 | 8,9 | 12,0 |
| Коллаген, % | 24,8 | 22,5 | 16,2 | 16,9 |
| Неколлагеновые белки, % | 22,3 | 23,8 | 42,7 | 45,0 |

В целом же ферментативные гидролизаты, по содержанию гексозаминов и хондроитинсульфатов, сравнимы с известными коммерческими препаратами, и, кроме того, дополнены коллагеном и неколлагеновыми белками как естественной составной частью хрящевой ткани.

2.2. Фракционный состав ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов

В большинстве случаев исследования в области анализа гликозаминогликанов проводятся в следующих направлениях:

- 1) идентификация различных типов гликозаминогликанов;
- 2) определение молекулярной массы;
- 3) структурный анализ доменов гликозаминогликанов.

Идентификацию типов гликозаминогликанов проводят в основном методом ионно-обменной высокоэффективной жидкостной хроматографией на различных сорбентах. Предварительно образцы подвергают последовательному ферментативному гидролизу либо получают производные гликозаминогликанов (Imanari et al., 1996).

Структурный анализ доменов гликозаминогликанов заключается в предварительном получении моно-, ди-, три-, тетрасахаридов с помощью специфичных ферментов. С использованием антител на данные сахара идентифицируют структуры последних и выделяют с помощью аффинной хроматографией. Полученные очищенные сахара подвергают структурному анализу методом ЯМР или капиллярным электрофорезом.

В качестве стандартов для определения молекулярных масс гликозаминогликанов используют нативные монодисперсные гликозаминогликаны либо синтезированные полимеры, такие как сульфатированные декстраны. Вастесен (Wasteson, 1971, цит. по Imanari et al., 1996) впервые показал, что монодисперсные гликозаминогликаны пригодны в качестве стандартов для определения молекулярных масс неизвестных гликозаминогликанов. Также получен монодисперсный гликозаминогликан из коммерческого хондроитинсульфата А трахеи быка, рекомендуемый в качестве стандарта для жидкостной хроматографии. Для определения молекулярных масс низкомолекулярных гликозаминогликанов используют также стандарты мономеров гликозаминогликанов (Volpi, 1993; Volpi, Bolagnani, 1993).

Для исследования фракционного состава ферментативных гидролизатов необходимо было использовать хроматографическую систему, позволяющую одновременно анализировать белковые и углеводные компоненты хрящевой ткани. Было показано, что в процессе ферментативного гидролиза, образуется несколько фракций. Все фракции содержат компоненты протеогликановой природы, так как поглощение наблюдается и при рефрактометрическом детектировании и при длине волны 280 нм (рис. 6, а).

Разделение и количественное определение углеводных компонентов, содержащих хондроитинсульфаты и гиалуроновую кислоту, в пробах сравнивали с имеющимися стандартами. В качестве стандартов использовали коммерческие препараты различных типов хондроитинсульфатов: хондроитинсульфат А (ХС А), С (ХС С), D (ХС D) и А из осетра (ХС А-1), гиалуроновую кислоту. Сопоставление хроматограмм позволило предположить, что высокомолекулярные фракции, образованные в процессе ферментативного гидролиза, действительно содержат хондроитинсульфаты и гиалуроновую кислоту (рис. 6).

Исследование хроматографического поведения четырех типов хондроитинсульфатов (А, А1, С, D) на колонке Shodex Asahipak GS-520H показало, что добиться удовлетворительного разделения хондроитинсульфатов не удастся вследствие полидисперсности имеющихся стандартов и сходства по времени удерживания при их разделении на колонке, что не может являться показателем для идентификации типов хондроитинсульфатов в неизвестных образцах (рис. 6, 7).

Для регистрации разделяемых компонентов использовали рефрактометрический детектор, сигнал которого пропорционален концентрации вещества и практически не зависит от его природы и молекулярной массы, мы можем идентифицировать пики на хроматограмме, содержащей углеводные полимеры, в составе которых имеются хондроитинсульфаты и гиалуроновая кислота.

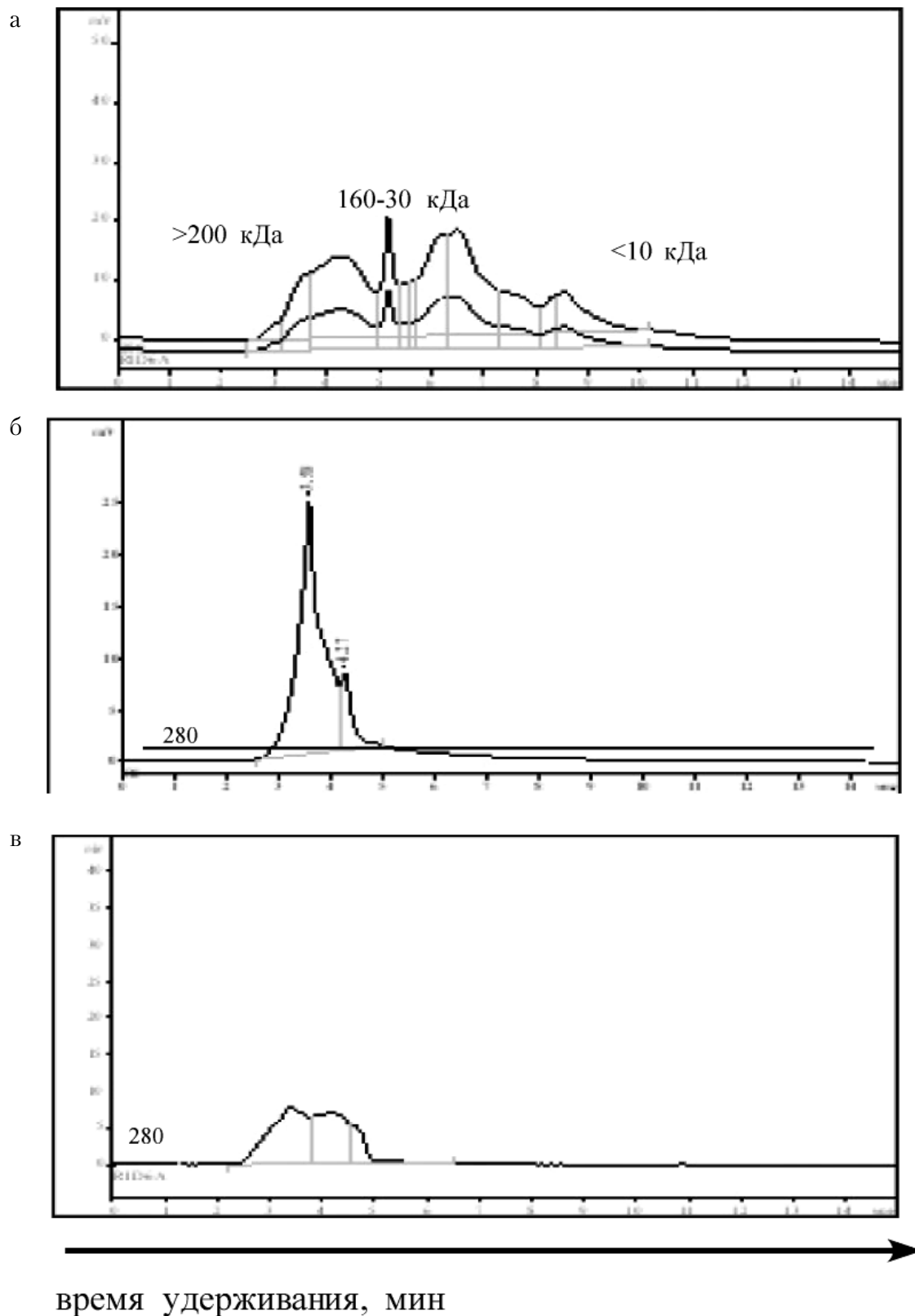


Рис. 6. Хроматограммы ферментативного гидролизата из хрящевой ткани осетра (а) и стандартов хондроитинсульфата А (б) и гиалуроновой кислоты (в). Разделение проводили методом ВЭЖХ на колонке Shodex Asahipak GS-520 Н. Детектирование осуществляли одновременно рефрактометрическим детектором RID 6А и при УФ 280 нм

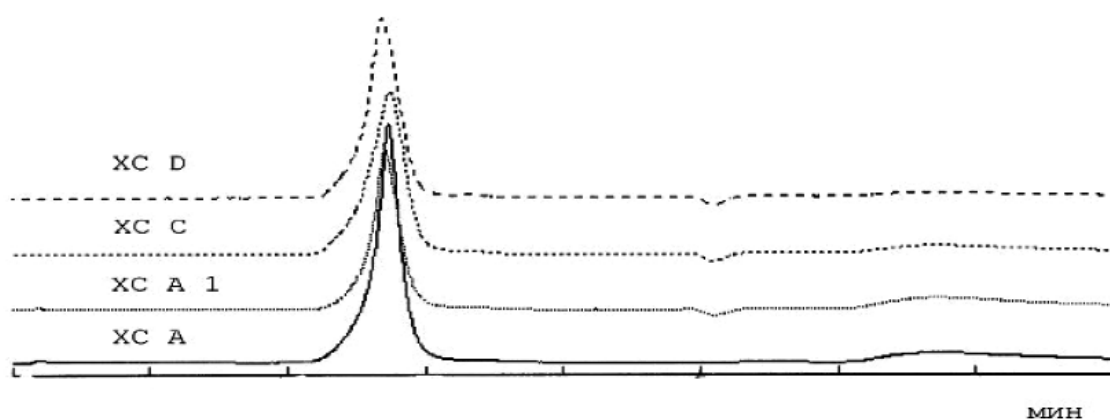


Рис. 7. Хроматограмма стандартов хондроитинсульфатов А из трахей быка (XC A), А из хряща осетра (XC A 1), С (XC C) и D (XC D).
Разделение проведено методом ВЭЖХ
на колонке Shodex Asahipak GS-520H, детектирование RID-6A

Хроматографическое разделение ферментативных гидролизатов, полученных с помощью гепатопанкреатина (рис. 8) из хрящевой ткани гидробионтов, показало, что их состав представлен 7–8 фракциями, которые условно можно разделить на три основных группы: фракции, содержащие высокомолекулярные компоненты (ВМС – 200 кДа и более), среднемoleкулярные (СМС – 30–160 кДа) и низкомолекулярные компоненты (НМС – 1–10 кДа и менее). Молекулярно-массовое распределение фракций в гидролизатах, полученных с помощью гепатопанкреатина, представлено в табл. 7. Все фракции содержат компоненты протеогликановой природы, так как поглощение пиков наблюдается при рефрактометрическом детектировании и при 280 нм.

При соблюдении разработанных условий гидролиза хрящевой ткани гепатопанкреатином в препаратах содержание высокомолекулярной фракции, представленной гиалуроновой кислотой и хондроитинсульфатами, аналогично для препаратов из акулы, ската и калуги (34, 36, 33 %, соответственно) и значительно выше в препаратах из лосося и кальмара (51 и 40 %).

После гидролиза хрящевой ткани протамексом в конечном продукте преобладали низкомолекулярные фракции (табл. 7).

Сравнение качественного состава полученных ФГ с препаратами аналогами, показало, что большинство из последних являются монокомпонентными, в состав которых входят либо высокомолекулярные соединения (ВМС) – препараты «Структум» и «Хонсурид», либо низкомолекулярные (НМС) – БАД «Глюкозаминсульфат». БАД к пище «Инолтра» представляет искусственно созданную композицию. ФГ из хрящевой ткани гидробионтов является поликомпонентным, сбалансированным продуктом.

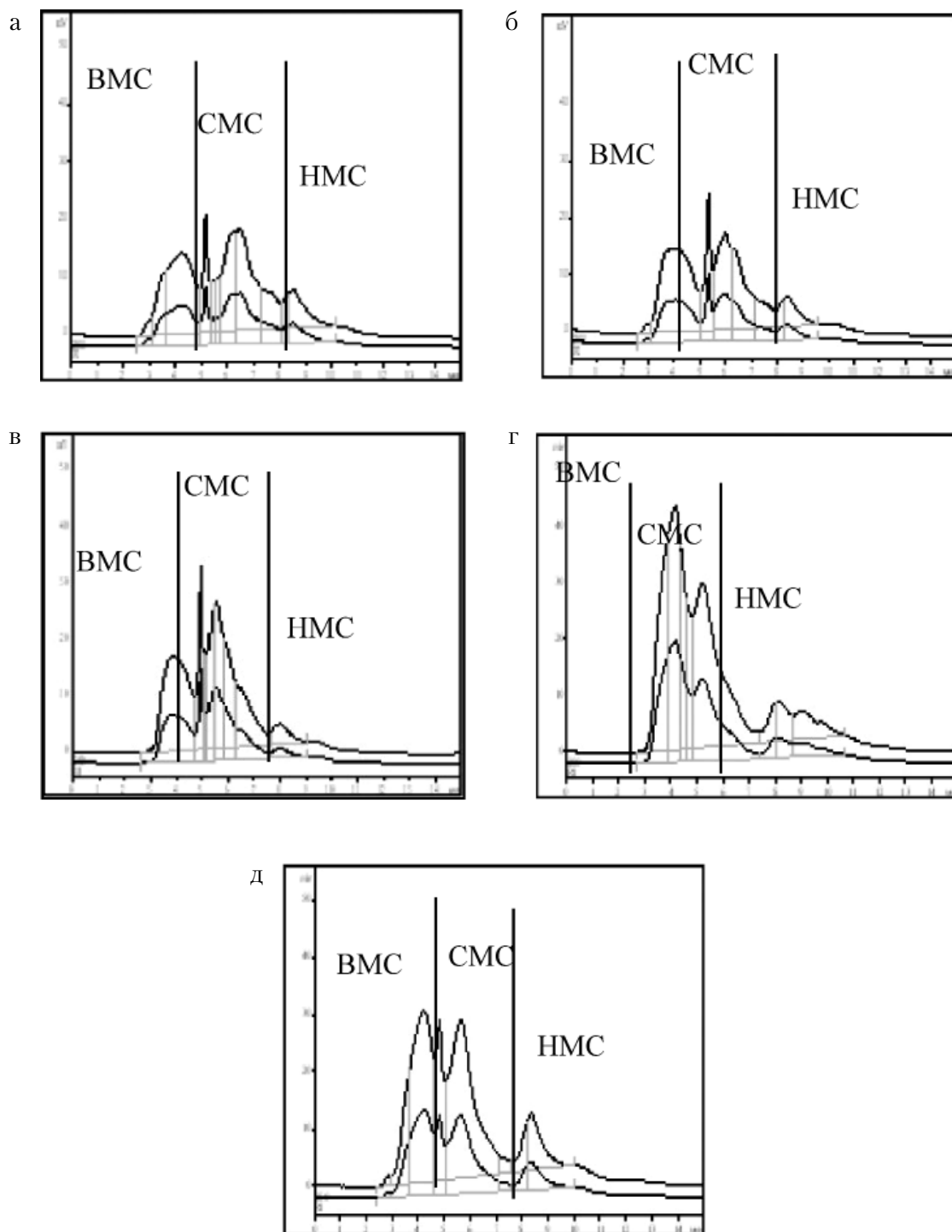


Рис. 8. Хроматограммы ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов, полученных с помощью гепатопанкреатина (а – акулы, б – ската, в – осетра, г – лосося, д – кальмара)

Таким образом, исследование молекулярно-массового распределения показало, что ферментативные гидролизаты из хрящевой ткани гидробионтов представляют комплекс продуктов гидролиза протеогликанового комплекса хрящевой ткани различной молекулярной массой.

Распределение фракций в ферментативных гидролизатах гидробионтов гепатопанкреатином, % от суммы анализируемых фракций

| Вид | Высокомолекулярная фракция (> 200 кДа) | Среднемолекулярная фракция (160–30 кДа) | Низкомолекулярная фракция (10–1 кДа) |
|--------------------------------------|--|---|--------------------------------------|
| Акула <i>Squalus acanthias</i> | 34 | 36 | 30 |
| Скат <i>Bathyraja aleutica</i> | 36 | 35 | 29 |
| Калуга <i>Huso dauricus</i> | 33 | 49 | 18 |
| Лосось <i>Oncorhynchus gorbuscha</i> | 51 | 36 | 13 |
| Кальмар <i>Todarodes pacificus</i> | 40 | 50 | 10 |

Примечание. $n = 3, p < 0,05$.

2.3. Исследование состава свободных дисахаридов

Для характеристики различий в составе углеводных компонентов ферментативных гидролизатов нами была использован сравнительный анализ содержания свободных дисахаридов с различной степенью сульфатирования, получаемых в процессе ферментативного гидролиза протеогликанов хрящевой ткани гидробионтов.

Количественное определение гексозаминов без предварительного исчерпывающего гидролиза экстрактов и ферментализатов выявило, что в процессе ферментативного гидролиза хрящевой ткани происходит накопление свободных гексозаминов. Анализ свободных дисахаридов и моносахаридов методом ВЭЖХ затруднен тем, что в процессе разделения по молекулярной массе они выходят в области низкомолекулярных соединений вместе с низкомолекулярными белками.

В связи с этим возникла необходимость поиска более чувствительных методов идентификации качественного состава свободных дисахаридов. Из литературных источников известно, что анализ биологических образцов, содержащих гликозаминогликаны возможен с помощью метода капиллярного электрофореза.

Главным преимуществом данного метода была возможность анализа водных растворов препаратов, а точнее ди- и трисульфатированных дисахаридов хондроитинсульфата в препаратах, которые при пероральном применении обладают высокой биодоступностью (Данилевская, Николаев, 2002). Используя метод капиллярного электрофореза и зная характерные условия разделения определенной группы соединений, возможно легко разделить и идентифицировать различные типы ди- и трисульфатированных дисахаридов, входящих в состав биополимеров.

Использовали метод определения несulfатированных дисахаридов гиалуроновой кислоты и различно сульфатированных дисахаридов хондроитинсульфатов с помощью капиллярного электрофореза после ферментативного гидролиза хондроитинсульфатов хондроитиназами (Karamanos, 1995). Автором были установлены закономерности выхода различно сульфатированных дисахаридов. Установлено, что первоначально в данных условиях мигрируют трисульфатированные, затем дисульфатированные, моно- и несulfатированные дисахариды. Под действием хондро-

итиназ происходит специфичное расщепление полимера на дисахаридные остатки. Структуры дисахаридов, полученных после ферментативного гидролиза специфичными хондроитиназами, представлены на рис. 10. Был исследован качественный состав и определено количественное содержание дисахаридов, образованных после гидролиза протеолитическими ферментами, имеющих аналогичные структуры и способных разделяться при условиях данного метода. Предполагаемый механизм гидролиза протеогликановой молекулы, с отщеплением свободных дисахаридов представлен на схеме (рис. 10).

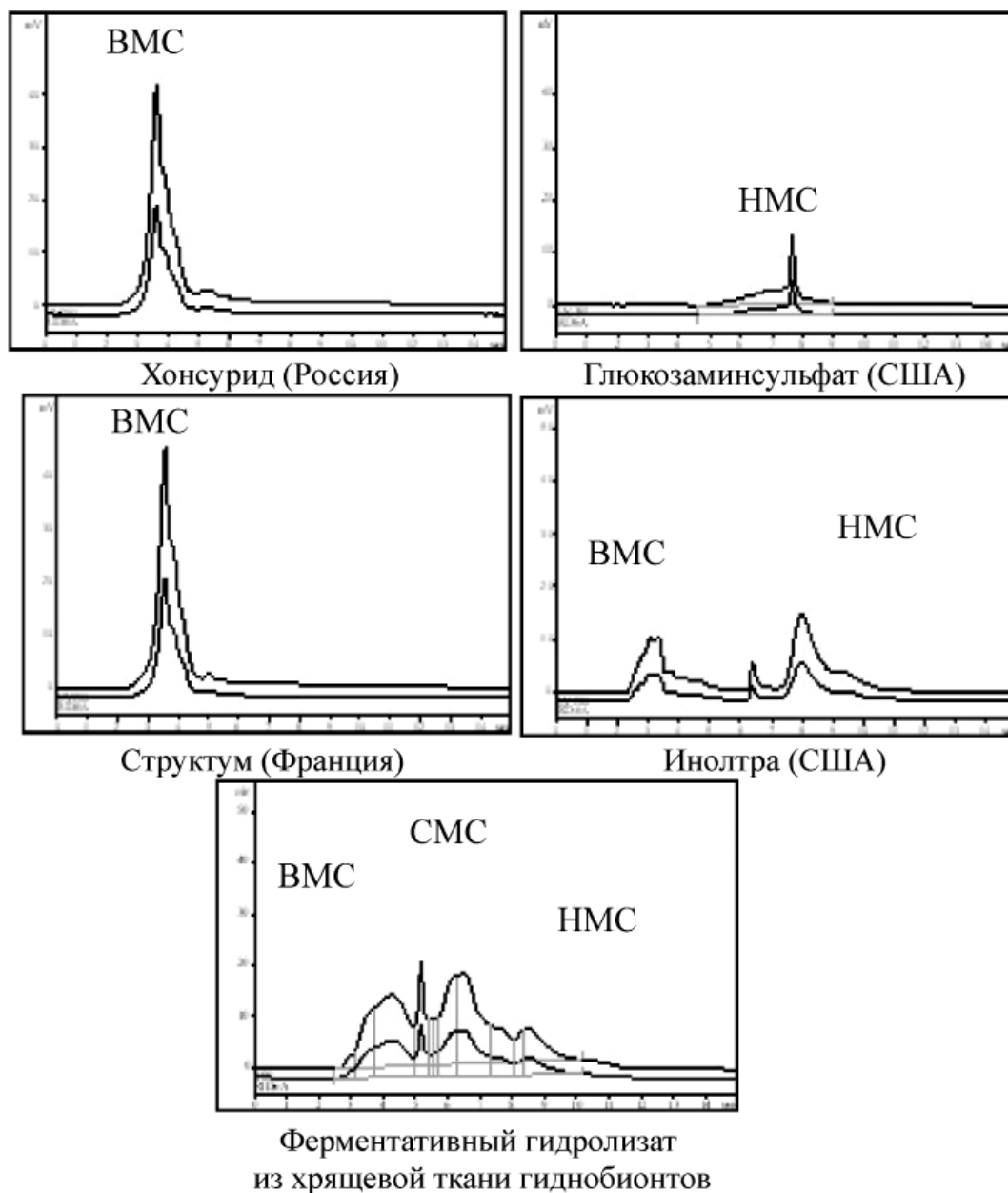


Рис. 9. Хроматограммы препаратов-аналогов из хрящевой ткани. Разделение проводили методом ВЭЖХ на колонке Shodex Asahipak GS520 H. Детектирование осуществляли одновременно рефрактометрическим детектором RID 6A и при $\lambda = 280$ нм

Содержание свободных дисахаридов в ферментативных гидролизатах хрящевой ткани гидробионтов, номера структур соответствуют рис. 10

| Содержание Δ -дисахаридов, % | Акула | Скат | Осетр | Лосось | Кальмар |
|-------------------------------------|-------|------|-------|--------|---------|
| I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| II | 6 | 5 | 9 | 0 | 3 |
| III | 3 | 1 | 2 | 0 | 2 |
| IV | 13 | 1 | 1 | 17 | 0 |
| V | 10 | 7 | 10 | 15 | 0 |
| VI | 14 | 20 | 14 | 11 | 7 |
| VII | 54 | 66 | 64 | 50 | 78 |

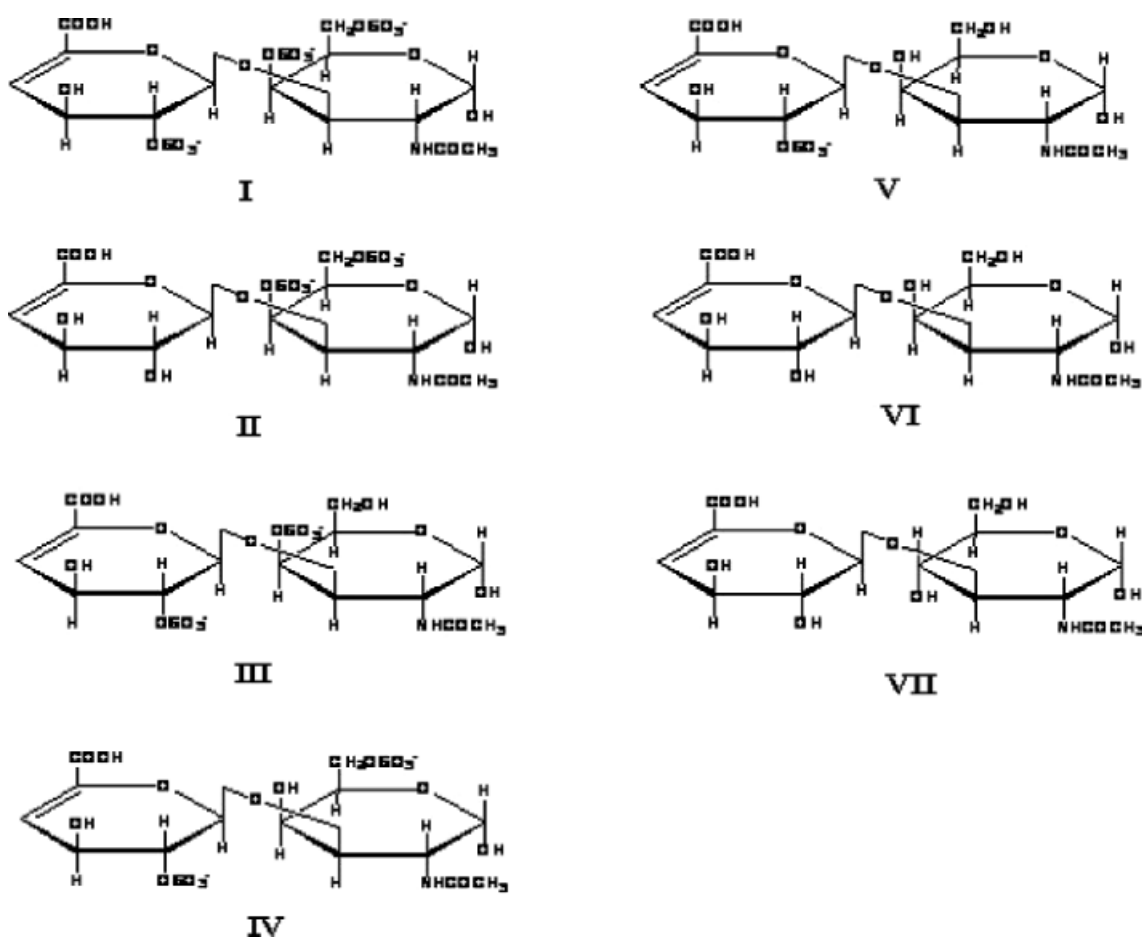


Рис. 10. Структуры сульфатированных и несulfатированных Δ -дисахаридов хондроитинсульфата (I – Δ -ди(2,4,6) трисульфатированный; II – Δ -ди(4,6) дисульфатированный; III – Δ -ди(2,4) дисульфатированный; IV – Δ -ди(2,6) дисульфатированный; V – Δ -ди(2) моносульфатированный; VI – Δ -динесульфатированный) и гиалуроновой кислоты (VII – Δ -динесульфатированный) (Karatanos, 1995).

Разделение дисахаридов ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов проводили на приборе «Капель-105» (Люмэкс, Россия). Анализ проведен на кварцевом капилляре (75 мкм внутренний диаметр, общая длина капилляра – 60 см, эффективная длина капилляра – 55 см) при длине волны 210 нм и температуре 25°C. Результаты обчислены с помощью программно-аппаратного комплекса для сбора и обработки хроматографических данных МультиХром (версия 1.5х). Количественную оценку определяемых в препаратах свободных дисахаридов выражали в процентах, от всей суммы содержащихся сульфатированных и несulfатированных дисахаридов.

В результате был определен состав свободных дисахаридов в препаратах из хрящевой ткани гидробионтов, полученных после гидролиза протеолитическими ферментами. Состав дисахаридов при соблюдении одних и тех же приемов технологии переработки сырья определяется видоспецифичностью ткани. Во всех гидролизатах, полученных с помощью гепатопанкреатина, вне зависимости от вида хрящевой ткани, отмечено высокое содержание несulfатированных дисахаридных остатков хондроитина и гиалуроната (структуры VI и VII).

ФГ из ткани хрящевых рыб (акулы, ската и осетра) аналогичны по составу и по соотношению дисахаридов. Характерной особенностью названных видов рыб является преимущественное содержание несulfатированных (примерно 70–93%), и меньшего количества моно- и дисulfатированных дисахаридов (30–27%). В ФГ из хрящевых рыб и осетров (хрящевых ганоидов) содержится минимальное количество дисulfатированных дисахаридов с сульфатными группами в положениях 2,4 и 2,6 (III, IV). Преобладающими являются моно-sulfатированные дисахариды (V) и дисulfатированные дисахариды с сульфогруппой в положениях 4,6 (II).

ФГ из костно-хрящевой ткани лососевых рыб отличается наличием трисульфатированных дисахаридов (структура I). Присутствуют также дисulfатированные в положениях 2,6 дисахариды (структура IV). Соотношение дисulfатированных дисахаридов к моносulfатированным (структура V) в ФГ из хрящевой ткани лососевых равно 1:1. Количество несulfатированных дисахаридов (структуры VI и VII) для этого объекта по сравнению с другими минимально и составляет 61%. Количество сульфатированных дисахаридов в сумме составляет 39%.

Хрящевая ткань кальмара по содержанию несulfатированных дисахаридов (95%) превосходит все исследованные хрящевые ткани гидробионтов (структуры VII и VI) из которых 78% – несulfатированный гиалуронат (VII). Характерной особенностью хряща кальмара является отсутствие моно- и три-sulfатированных дисахаридов. Из дисulfатированных дисахаридов идентифицированы структуры II и III, количество которых составляет 3 и 2%, соответственно.

Свободные дисахариды, образующиеся в процессе ферментативного гидролиза, являются специфическими маркерами видовой принадлежности хрящевой ткани гидробионтов. В целом наличие свободных дисахаридов является еще одной отличительной особенностью полученных ФГ, определяющей их биологическую активность благодаря высокой степени усвояемости при пероральном применении.

2.4. Аминокислотный состав ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов

По составу аминокислот гидролизаты из хрящевой ткани разных видов рыб не отличаются. Различия определяются суммарным содержанием аминокислот, и количеством отдельных аминокислот (табл. 9). Однако в целом средние значения каждой из указанных аминокислот приближаются к величинам, определенным в ферментативных гидролизатах из кожи свиней. Подобное количественное содержание отдельных аминокислот характерно для коллагена, в котором преобладают глицин, пролин и оксипролин. Поэтому данный препарат может рассматриваться как строительный материал для синтеза новых молекул коллагена.

Таблица 9

Содержание аминокислот в ферментативных гидролизатах из хрящевой ткани гидробионтов, % от суммы аминокислот

| Аминокислота | Акула | Калуга | Лосось | Кальмар |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Аспарагиновая | 8,5 | 7,5 | 10,1 | 10,7 |
| Глутаминовая | 12,7 | 13,0 | 14,3 | 15,3 |
| Пролин | <u>16,4</u> | <u>18,9</u> | 11,0 | 8,6 |
| Серин | 4,0 | 3,7 | 4,9 | 5,2 |
| Аланин | 6,25 | 6,8 | 7,2 | 5,7 |
| Цистеин | 2,5 | 0,9 | 1,4 | 1,5 |
| Тирозин | <u>1,84</u> | 1,9 | 2,9 | 3,1 |
| Глицин | 12,1 | 18,6 | 11,0 | 9,5 |
| Изолейцин | 4,4 | 2,5 | 2,2 | 3,8 |
| Лейцин | 5,5 | 4,7 | 6,1 | 6,7 |
| Лизин | 4,2 | 3,1 | 6,5 | 6,7 |
| Метионин | 0,5 | 0,6 | 0,7 | 0,6 |
| Фенилаланин | 3,9 | 2,8 | 3,2 | 3,8 |
| Треонин | 4,8 | 3,1 | 4,3 | 4,8 |
| Валин | 5,1 | 3,1 | 3,3 | 4,2 |
| Гистидин | 2,6 | 1,6 | 2,4 | 2,1 |
| Аргинин | 6,3 | 6,8 | 6,1 | 7,6 |
| ННЗ | 1,7 | 0,7 | 0,6 | 0,7 |
| Сумма аминокислот, % от массы препарата | 31,2 ± 1,3 | 32,2 ± 1,4 | 55,3 ± 2,5 | 52,4 ± 2,2 |

Примечание. $n = 4, p < 0,05$.

Суммарное содержание аминокислот в ферментативных гидролизатах также свидетельствуют о меньшем содержании коллагена в хрящевой ткани объектов и большей глубине гидролиза тканей. Повышенное содержание серина, возможно, является показателем присутствия в хрящевой ткани кальмара и лосося связующего компонента между хондроитинсульфатной цепью и белком (так как именно через

О-гликозидную связь ксилозы ХС с сериновым остатком пептидной цепи осуществляется связывание углеводов и пептидов в молекуле протеогликана). Количество аспарагиновой и глутаминовой кислот в ФГ из кальмара и лосося выше, чем в ФГ из хрящевых рыб. Из незаменимых аминокислот преобладают лейцин и лизин, которые по литературным данным участвуют в агрегации протеогликанов хрящевой ткани человека (Косягин, 1984).

2.5. Минеральный состав ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов

Содержание минеральных веществ в исследованных гидролизатах из хрящевой ткани гидробионтов находится в пределах 10–11 % от сухой массы (табл. 10). Исследование элементного состава показало, что содержание тяжелых металлов в препаратах из хрящевой ткани исследованных видов гидробионтов не превышает предельно допустимые концентрации и соответствует нормам СанПиН.

Таблица 10

Концентрации макро- и микроэлементов в ферментативных гидролизатах
из хрящевой ткани гидробионтов

| Элемент | Единица измерения | Объект | | | |
|----------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | Акула | Калуга | Лосось | Кальмар |
| Калий | мг/г | > 2,5 | > 1,4 | > 2,5 | > 2,5 |
| Магний | мг/г | 0,5 | 0,5 | 0,3 | 1,5 |
| Кальций | мг/г | 1,8 | 2,8 | 2,2 | 5,2 |
| Натрий | мг/г | 100,0 | 110,2 | 106,0 | 120,2 |
| Марганец | мг/кг | 2,3 | 3,3 | 2,3 | 2,4 |
| Хром | мг/кг | 5,7 | 7,0 | 6,0 | 5,7 |
| Медь | мг/кг | 6,7 | 3,3 | 2,0 | 20,0 |
| Цинк | мг/кг | 28,3 | 22,3 | 21,7 | 70,0 |
| Железо | мг/кг | 88,3 | 150,0 | 117,0 | 88,0 |
| Никель | мг/кг | 3,3 | 2,7 | 2,7 | 3,7 |
| Кадмий | мг/кг | 1,2 | 0,8 | 0,4 | 0,3 |
| Кобальт | мг/кг | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Свинец | мг/кг | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ртуть | мг/кг | 0 | 0 | 0 | 0 |

Примечание. $n = 3, p < 0,05$.

Следует отметить повышенное содержание эссенциальных макроэлементов (кальция, магния) и микро-элементов (марганца, хрома, цинка, меди) в гидролизате из хрящевой ткани кальмара по сравнению с аналогами из хрящевой ткани других видов гидробионтов. Магний является активатором в ряде важнейших ферментативных процессов. Также он является антистрессовым макроэлементом, оказывая

нормализующее действие на состояние нервной системы. Оптимальное соотношение кальция и магния в пищевых продуктах должно составлять не менее 2:1, что важно для лучшего усвоения обоих элементов (Пилат, Иванов, 2002). Содержание кальция в препаратах составляет 40–58% и магния – 6,2–16% от суммы микро- и макроэлементов в зависимости от вида сырья.

Анализ элементного состава показал, что в гидролизатах из хрящевой ткани гидробионтов данное соотношение может быть соблюдено без искусственного внесения микроэлементов. Хрящевая ткань гидробионтов аккумулирует цинк и наибольшее количество его определено в препаратах из хрящевой ткани кальмара, что согласуется с данными по содержанию цинка в гладиусе кальмара (Ковековдова, Симоконь, 1999). Тем не менее, содержание цинка в препаратах не превышает рекомендуемой дозы, которая составляет 12 мг/сутки.

Таким образом, ферментативные гидролизаты из гидробионтов, полученные по разработанному способу (Суховерхова, 2006), являются многокомпонентными и содержат такие биологически активные вещества гидробионтов как гексозамины, хондроитинсульфаты, коллаген, неколлагеновые белки, низкомолекулярные ингибиторы металлопротеиназ, свободные дисахариды и микроэлементы. В табл. 20 представлен химический состав гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов. Балланс белковых и углеводных компонентов характеризуется соотношением 3:1 в препаратах из хрящевых рыб и 5:1 из лосося и кальмара.

2.6. Антипротеазная активность препаратов из хрящевой ткани гидробионтов

Для оценки антипротеазной эффективности изучали ингибиторную активность полученного ферментативного гидролизата (ФГ) и сравнивали ее с активностью исходной ткани – водного экстракта сублимированного хряща акул (ВЭ). Для определения специфичности ингибиторного действия компонентов хрящевой ткани исследовали их влияние на активность ферментов по различным видам белковых низкомолекулярных субстратов (Клычкова, Пивненко, 2001).

Наиболее показательной является ингибиторная активность испытуемых препаратов по отношению к сериновым протеиназам и металлопротеиназам, так как именно эти классы ферментов активизируются при воспалительных деструктивных процессах в хрящевом матриксе (Риггз, 2000; Хасигов, 2001; Tryggvason et al., 1987; Fosang et al., 1996; Stracke et al., 2000). О величине ингибиторной активности судили по изменению коллагенолитической активности ферментов (микробиальной коллагеназы и пилорина), в присутствии разных концентраций водного экстракта и ферментативного гидролизата хрящевой ткани. Коллагеназа из *Clostridium histolyticum* по своим свойствам в целом аналогична типичным металлопротеиназам матрикса человека, гидролизует только коллаген и не проявляет специфичности по отношению к другим белкам. Пилорин, содержащий сериновые протеиназы, обладает широкой субстратной специфичностью, в том числе и коллагенолитической (Пивненко и др., 1997, Пивненко, 2004). Данная экспериментальная модель позволяет сравнить ингибиторную активность полученных различными способами компонентов хрящевой ткани акулы.

При сравнительном исследовании ингибиторной активности водного экстракта (ВЭ) и ферментативного гидролизата (ФГ) установлено присутствие ингибиторов протеиназ в обоих образцах. Антиколлагенолитический эффект имел место как в присутствии компонентов нативной (ВЭ), так и подвергнутой ферментативному гидролизу (ФГ) ткани. Полученные результаты согласуются с данными о проявлении антиколлагенолитической активности экстрактов из хрящевой ткани акул (Lee, Langer, 1983). Однако они ставят под сомнение полученные ранее выводы о снижении и даже исчезновении ингибиторной эффективности экстрагируемых компонентов хрящевой ткани акул после обработки экзогенными ферментами в процессе ее очистки от балластных белков (Пат US 4822607). Продукты гидролиза хрящевой ткани акул (*Squalus acanthias*) проявляют значительную ингибирующую активность в отношении коллагенолитического действия ферментов в отличие от компонентов экстракта (рис 11). Коллагенолитическая активность сериновых протеиназ, входящих в состав пилорина, снижается на 66 % под действием ВЭ, и на 89 % под действием ФГ. Разница в изменении коллагенолитической активности металлопротеиназы *Cl.histoliticum* под действием ВЭ и ФГ менее выражена (70 и 80 %), однако имеет ту же тенденцию.

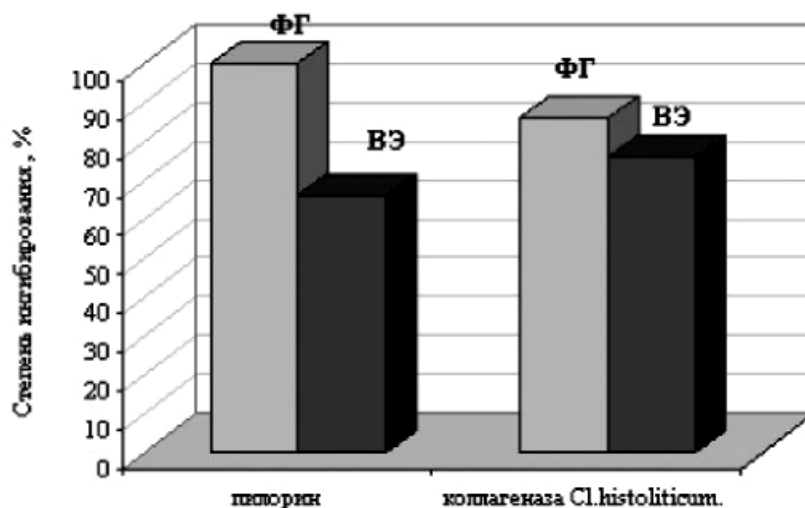


Рис. 11. Степень ингибирования (%) активности коллагеназы из *Clostridium histolyticum* (металлопротеиназы) и пилорина (сериновые протеиназы) в присутствии 0,1% ферментативного гидролизата (ФГ) и водного экстракта (ВЭ) из хрящевой ткани акулы (*Squalus acanthias*). Субстрат: коллаген из гольевого порошка

Антипротеазная активность компонентов хрящевой ткани крупного рогатого скота по данным авторов (Lee, Langer, 1983) почти в 100 раз ниже, чем у акул. Сравнение степени ингибирования протеиназ различного происхождения (рис. 12) показало, что наиболее высока она в ткани кальмара и после ферментативного гидролиза возрастает.

Однако суммарная антипротеазная активность экстрактов (определенная как произведение степени ингибирования на массу хрящевой ткани) наиболее высока у акул.

Таким образом, после детального рассмотрения компонентного состава ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов можно сделать вывод, что

полученные препараты из различных сырьевых источников могут быть стандартизованы по содержанию гексозаминов (не менее 2%), это позволяет создавать близкие по дозировке активных компонентов готовые формы (таблетки, капсулы) из различных источников сырья.

Препараты имеют сбалансированный состав в доступной для организма форме, а также проявляют антипротеазную активность, как один из существенных факторов противовоспалительного действия.

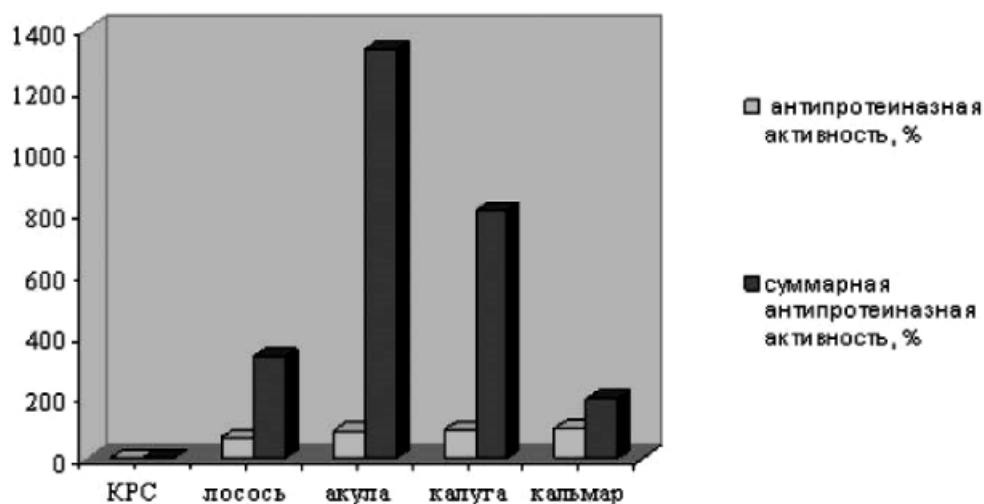


Рис. 12. Антипротеазная активность компонентов хрящевой ткани.
 Субстрат: коллаген из гольевого порошка. Фермент: коллагеназа из *Clostridium histolyticum*

Таблица 11

Состав ферментативных гидролизатов
 из хрящевой ткани гидробионтов, % от сухого вещества

| Компоненты | Ферментативные гидролизаты из | | | |
|------------------------|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | акулы | калуги | лосося | кальмара |
| Углеводы: | | | | |
| гексозамины | 4,4 ± 0,1 | 4,8 ± 0,09 | 2,11 ± 0,01 | 2,00 ± 0,02 |
| гиалуроновая кислота | 2,0 ± 0,05 | 1,9 ± 0,03 | 1,1 ± 0,03 | 1,0 ± 0,04 |
| свободные дисахариды | 0,5 ± 0,01 | 0,4 ± 0,008 | 0,6 ± 0,01 | 0,7 ± 0,009 |
| гексозы | 1,6 ± 0,05 | 0,5 ± 0,01 | 0,2 ± 0,01 | 0,3 ± 0,02 |
| хондроитинсульфаты | 6,5 ± 0,14 | 6,0 ± 0,1 | 6,4 ± 0,1 | 6,3 ± 0,1 |
| Белки: | | | | |
| коллаген | 25 ± 0,8 | 23 ± 0,7 | 16 ± 0,2 | 16,8 ± 0,2 |
| неколлагеновые белки | 22 ± 0,9 | 23,8 ± 0,9 | 42,7 ± 1,0 | 45 ± 1,1 |
| Свободные аминокислоты | 17,25 ± 0,4 | 15,4 ± 0,3 | 13,2 ± 0,5 | 12,5 ± 0,5 |
| Минеральные вещества | 9,0 ± 0,04 | 10,0 ± 0,06 | 10,0 ± 0,05 | 8,0 ± 0,06 |

На основании полученных результатов разработана технология БАД к пище «Артрофиш».

Глава 3. ХОНДРОПРОТЕКТОРНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ИЗ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ ГИДРОБИОНОВ

3.1. Биологическая активность компонентов, входящих в состав хрящевой ткани

Компоненты хрящевой ткани, охарактеризованные в предыдущем разделе, являются не только строительными элементами, но и выполняют целый ряд функций, обеспечивающих нормальный метаболизм. Так, гликозаминогликаны участвуют в реализации большого числа жизненно важных процессов и входят в состав различных тканей. Кроме выполнения структурно-механических функций, они участвуют в процессах биологического узнавания, межклеточного взаимодействия, где важную роль играют специфические углеводные последовательности гликозаминогликановых цепей, степень их сульфатирования и размер (Слущкий, 1969; Poole, 1986; Ruoslahti, 1989).

Имеются многочисленные сведения о биологической активности гликозаминогликанов и препаратов, содержащих гексозамины (Игнатова, Гуров, 1990; Шитов, 1992; Алексеева и др., 1995; Данилевская, Николаев, 2002; Timothy, Michael et al, 2000; Abdel Fattah, Hammad, 2001; пат. РФ 2077328; пат. WO 69444). Активность гликозаминогликанов, обусловленная полианионной структурой, зависит от наличия в каждой дисахаридной единице хотя бы одной отрицательно заряженной карбоксильной или сульфатной групп, обеспечивающих высокую гидрофильность и поверхностно-активные свойства. Гиалуронат по сравнению с другими гликозаминогликанами имеет наименьший заряд, тем самым и проявляя наименьшие хондропротекторные свойства.

Кроме этого, гликозаминогликаны являются предшественниками макромолекул суставного хряща, и введение их в организм облегчает регенерацию хрящевой ткани за счет использования «готового строительного материала» и способности накапливаться в очагах воспаления (Шитов, 1992; Руденко, 2005). Также, обеспечивая адекватное поступление гликозаминогликанов, в первую очередь глюкозаминов и хондроитинсульфатов, можно оказывать регуляторное воздействие на хондроциты и фибробласты, создавать более комфортный режим для продукции гликозаминогликанов, протеогликанов и коллагена. При этом создаются благоприятные метаболические условия для восстановления клеток при действии на них повреждающих факторов.

Показано, что при пероральном введении глюкозамина моносульфата и хондроитинсульфата происходит быстрое и практически полное всасывание, что свидетельствует об их хорошей биодоступности (Palmieri et al, 1990). При изучении фармакокинетики глюкозамина моносульфата на собаках с помощью радиоизотопного метода было обнаружено, что после однократного перорального введения препарат быстро обнаруживался в плазме ($t_{1/2} = 13$ мин) и исчезал из нее ($t_{1/2} = 118$ мин) (Setnikar et al, 1986). Через 30–60 мин было обнаружено его связывание с глобулинами. Пик

связывания с глобулинами приходился на 8 ч после применения препарата, затем отмечали постепенное снижение связывания ($t_{1/2} = 3$ дня). При изучении распределения этого компонента было отмечено быстрое элиминирование его из крови в соединительную ткань с избирательным накоплением в суставном хряще. Значительные количества были обнаружены в печени и почках. В остальных органах глюкозамин был выявлен в следовых количествах, что можно объяснить обычными процессами диффузии. Фармакокинетику глюкозамина у человека изучали методом хроматографического исследования, при этом было выявлено сходство с результатами, полученными на кроликах и собаках. При изучении биодоступности хондроитинсульфата у собаки радиоизотопным методом (Palmieri et al, 1990) было установлено, что при пероральном применении она превышала 70 %. Уровень препарата быстро нарастал в плазме с максимумом в 28 ч. При исследовании распределения был выявлен тропизм к хондроитин-содержащим тканям, в первую очередь, к суставному хрящу.

Таким образом, гликозаминогликаны имеют высокую степень биодоступности при пероральном введении и способность избирательно накапливаться в синовиальной жидкости, что делает такую форму их поступления более предпочтительной.

Хондроитинсульфат и глюкозамин обладают широким спектром терапевтического действия и высоким индексом безопасности. Многочисленные исследования по изучению токсичности и побочных эффектов доказали их безопасность (Timothy et al, 2000; Abdel Fattah, Hammad, 2001).

Известно, что гликозаминогликаны являются активными стимуляторами регенерации костной ткани (Серов, Шехтер, 1981). Отмечено ингибирующее действие глюкозамина на образование различных опухолей. Воздействие глюкозамина на рост карциносаркомы проверено *in vivo* на крысах. При введении глюкозамина внутривенно и подкожно у испытуемых животных (в 56 % случаев) отмечена регрессия опухолей и значительное удлинение срока жизни. Ингибирование роста опухолей наблюдалось при использовании глюкозамина и других аминокислот. Для иных сахаров подобного эффекта не выявлено (Bekesi et al., 1969; Bekesi, Winzler, 1970).

В исследованиях *in vivo* показано, что хондроитинсульфаты обладают противовоспалительной активностью, стимулируют синтез гиалуроновой кислоты и протеогликанов и ингибируют действие протеолитических ферментов (Abdel Fattah, Hammad, 2001). Было также показано, что хондроитин-4-сульфат влияет на сердечнососудистую систему. Он высвобождается тромбоцитами и участвует в регуляции свертывания крови, препятствуя образованию тромбов, вызывающих нарушение микроциркуляции в тканях. Предлагают использовать хондроитинсульфаты в комплексах с супероксиддисмутазой и каталазой в качестве антитромботических средств (Максименко и др., 1999). Как компоненты лекарственных средств хондроитинсульфаты стимулируют пролиферацию эндотелия роговицы глаза (Пат. РФ 2077328, 1997), репарацию кожи (Пат. РФ 2092156, 1997), эффективны при профилактике циститоподобных симптомов (Пат. US 6083933, 2001) и при лечении старческой деменции (Пат. WO 69444, 2001). В клинических исследованиях продемонстрирована эффективность хондроитинсульфата в отношении влияния на болевой синдром и функциональное состояние суставов (Алексеева и др., 1995; Данилевская, Николаев, 2002; Timothy et al., 2000). Лафонт и др. (Lafont et al., 1992) отмечают, что хондро-

итинсульфат С из акульных хрящей при обработке культуры нервных клеток не только увеличивал их рост, но и специфически стимулировал аксонный рост, в то время как дерматансульфат стимулировал рост дендритов. Точный механизм влияния гликозаминогликанов на указанные процессы пока не выяснен.

3.2. Изменения метаболизма в хрящевой ткани при остеоартрозе (по М. Адаму)

При остеоартрозе (ОА) в хряще и субхондральной кости происходит большое количество изменений. В хондроцитах меняется экспрессия генов кодирующих коллаген и вместо коллагена II идет синтез коллагенов I и III (Adam, Deyl, 1983). Такое изменение происходит также в микроскопически нормальном хряще в течение третьего десятилетия жизни. Вероятно, приведенные изменения в экспрессии генов, кодирующих разные типы коллагена, имеют связь со старением, и только при ОА они выражены в высшей степени. С этим очевидно имеют связь также изменения в экспрессии интегринов – вместо обычных $\alpha 3\beta 1$ и $\alpha 5\beta 1$ появляются $\alpha 1\beta 1$ и $\alpha 2\beta 1$, которые обладают свойством связываться с вновь синтезированными коллагенами типов I и III и фибронектином, который отсутствует в молодом хряще. Указанные типы коллагена имеют меньшую сольватную оболочку (чем тип II) и не выдерживают резкой нагрузки. Они менее стабильны в отношении неспецифических протеиназ чем тип II. Гиалиновый хрящ, таким образом, постепенно замещается на хрящ волокнистый. При распаде хряща фрагменты коллагена переходят в синовиальную жидкость, их количество можно установить по концентрации гидроксипролина, пиридинолина или деоксипиридинолина. Затем они переходят в кровь, а после в мочу. Однако если ОА поражает только хрящ, значения приведенных выше элементов в моче остаются в норме. Повышение их концентрации происходит, когда патологический процесс поражает субхондральную кость, в которой образуется грануляционная ткань, которая своими протеолитическими ферментами разрушает костные перекладины и вымывает приведенные элементы в кровь и мочу. Иначе говоря, повышенные концентрации пиридинолинов у больных ОА показывают на деструктивное поражение субхондральной кости. Под влиянием протеиназ, которые частично образуются в хондроцитах и частично поступают в хрящ из синовиальной жидкости, происходит расщепление как гликозаминовых, так и белковых цепей протеогликана. Продукты разрушения потом можно обнаружить как в синовиальной жидкости, так и в сыворотке крови, где концентрации соответствующих фрагментов являются очень низкими. Кроме приведенных изменений в синтезе хрящевого коллагена у некоторых больных происходит образование тканевых ингибиторов, концентрации которых в сыворотке крови достигают иногда высоких значений, как например, у больных прогрессивным полиартритом. Этот факт подтверждает гетерогенность патогенеза ОА. Лечение ОА пока неуспешно из-за пока не совсем ясных этиопатологических механизмов этого заболевания. Этиопатогенетическая гетерогенность усложняет также поиск новых лекарств. Различные нестероидные антиревматические средства являются сильными ингибиторами протеосинтеза. Доказано их взаимное влияние на некоторые цитокины и простагландины. Однако кроме позитивного влияния они

также имеют негативный эффект, например, они подавляют образование хрящевого коллагена и протеогликанов. Подобными свойствами обладают кортикостероиды, которые ингибируют экспрессию интегринов, так что клетки в дальнейшем не способны принимать соответствующие сигналы из внеклеточного пространства. Выделена и другая группа препаратов, которые оказывают постепенное влияние на процессы, характеризующие ОА. Эти препараты обозначаются сокращением SADOA (*slow acting drugs of OA*) и разделяются на:

1. DMOADs (*disease modifying OA drugs*) – препараты корректирующие симптомы болезни.

2. SYSADOA (*symptomatic slow acting drugs of OA*) – симптоматические лекарства медленного действия.

В первую группу DMOADs в настоящее время не входит ни одно лекарство. Наиболее близки по типу действия Румалон и Артепарон (полисульфатные гликозаминогликаны), которые используются уже несколько десятилетий. Однако доказать однозначно их модифицирующее влияние на ОА очень сложно, только из-за того, что ОА не является единым патологическим процессом. В другую группу SYSADOA зачислены препараты, облегчающие болезненные проявления и улучшающие функционирование пораженного сустава после длительного применения (1–2 месяца), при том, что эффект наблюдается минимально 2 месяца. В эту группу входят такие вещества, как гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат, глюкозаминсульфат, которые в качестве составных частей протеогликанов являются компонентами межклеточной массы хряща сустава. Механизм действия этих веществ достаточно сложен, и поэтому обсуждается их влияние на метаболизм, например, простагландинов, некоторых цитокинов: IL-1, TNF-а и других. Приведенные вещества могут воздействовать или прямо или посредством адгезивных протеинов с интегринами хондроцитов и таким образом влиять на их метаболизм. *In vitro* это доказано как в случае протеогликанов и коллагена. Такой механизм действия позволяет отнести указанные вещества к группе DMOADs.

3.3. Влияние коллагенового гидролизата на течение остеоартроза

Первоначально существовало мнение о том, что коллаген выполняет только механические функции и имеет очень медленный метаболический оборот. Однако эти сведения касаются только его нерастворимой фракции, тогда как фракции проколлагена имеют очень короткий биологический период полураспада, составляющий несколько десятков часов. В 1950-е годы было установлено, что коллаген играет очень важную роль в дифференциации и пролиферации клеток. Из этих представлений исходит применение диеты, богатой коллагеновым гидролизатом (авт. свид-во № 192437, 1984; Пат. US 4216204, 1984; Пат. № 233785, 1986), в частности, при остеопорозе (Пат. 2088240, 1993; Пат. WO 9605851, 1997; Пат. US 6025327, 1998), ревматоидном артрите (Пат. US 5856446, 2000; заявка № WO 98/44929). Кроме того, коллаген предлагается использовать в качестве полноценных пищевых волокон, как средство профилактики заболеваний желудочно-кишечного тракта (Неклюдов, 2003). Широко известно использование коллагена в косметологии (Langmaier et al.,

2002), пищевой промышленности (Джафаров, 1990; патент РФ 2096966, 1997; Антипова, Глотова, 2000).

В последнее время различные европейские и американские авторы также проводят эксперименты по изучению перорального воздействия коллагенового гидролизата. При этом количество и время применения препаратов не ограничиваются. Установлены значительные различия при использовании желатина и коллагенового гидролизата. Желатин является продуктом термической денатурации коллагена. Коллагеновый гидролизат является продуктом энзиматического расщепления коллагена. Чаще всего в виде сырья используют свиные или говяжьи шкуры, кости или хрящи. Коллаген является белком чрезвычайно важным для большого количества клеточных функций – для дифференциации, пролиферации, миграции и активности. Этими свойствами обусловлено также применение диеты насыщенной коллагеновым гидролизатом как при остеоартрозе, так и при остеопорозе. Понятия о том, что перорально принятые белки для усвоения должны полностью расщепиться на аминокислоты, были уже в семидесятых годах скорректированы после открытий, которые показали, что из пищеварительной системы всасываются не только пептиды, но и 10–20% использованных белков в интактном состоянии. На том факте, что из пищеварительной системы всасываются целые белки, основан принцип пероральной вакцинации, например, против полиомиелита или современная системная энзимотерапия.

Перорально введенные коллагеновые пептиды могут повлиять на патологический процесс, так как они связываются с интегринами соответствующих клеток. Это, в свою очередь меняет конформацию интегринов и в клетки поступают сигналы, которые влияют на синтез соответствующих веществ белкового характера. Одновременно может произойти изменение в экспрессии интегринов. Интегрины влияют на пролиферацию и миграцию клеток и связыванием. Коллагеновые пептиды оказывают влияние также на синтез некоторых цитокинов, которые играют важную роль в развитии патологических изменений.

Желатин долгое время считался сохраняющим здоровье компонентом пищи. Еще Hildegard von Bingen (1098–1179) рекомендовал регулярное и обильное употребление бульона из хряща телят для облегчения боли в суставах – с тех пор прошло более чем 800 лет. Однако в настоящее время доказано, что эффект ферментативных гидролизатов коллагена значительно превышает лечебный эффект желатина. Основные отличия эти компонентов касаются молекулярной массы: для желатина она составляет примерно 100 кД, для гидролизатов коллагена – 3–10 кД. Соответственно этому разнятся физико-химические свойства и усвоение компонентов в организме. В отличие от желатина коллагеновый гидролизат не желируется, растворим в холодной воде. Милан Адам в 1991 г. опубликовал результаты наблюдения за несколькими группами больных ОА, которые получали: желатин, коллагеновый гидролизат, смесь желатина с глицином и гидроксидом кальция, яичный альбумин и плацебо в течение 2-х месяцев. Явные признаки снижения болевого синдрома наблюдались только при употреблении коллагенового гидролизата, по сравнению с группой, принимавшей плацебо, – на 81%.

3.4. Использование препаратов из хрящевой ткани в качестве противоопухолевых средств

В последние десятилетия не было другого такого средства как «акулый хрящ», вокруг которого в такой мере сплелись бы научные открытия и неприкрытый бизнес, благие пожелания и заведомая дезинформация (М. Шлянкевич, 2000). В 1970-х годах доктор Дж. Фолкман высказал мысль о том, что при росте опухоли должна создаваться сеть кровеносных сосудов, которая питает раковые клетки. Если блокировать рост новых сосудов, то можно остановить рост опухоли. На экспериментальную проверку этой гипотезы ушло почти тридцать лет, и сейчас два вещества белковой природы – ангиостатин и эндостатин – испытывают в онкологических клиниках США. Идея о том, что в хрящевой ткани содержатся вещества, препятствующие прорастанию кровеносных сосудов в толщу хряща, также принадлежит д-ру Фолкману. Именно с хрящей и начал он поиск тех веществ, которые могли бы блокировать ангиогенез, т.е. рост новых кровеносных сосудов. Первые же опыты дали обнадеживающие результаты: кусочки хряща новорожденного кролика, посаженные в хориоаллантоисную оболочку куриного эмбриона, вызывали ингибирование образования капилляров, которую индуцировала растущая опухоль. Этот ингибитор ангиогенеза мог быть инактивирован нагреванием и извлечен из хряща кислым солевым раствором. Оказалось, что вещество, подавляющее рост сосудов – это олигопептиды небольшого молекулярного веса (менее сотни аминокислот). В дальнейшем было показано, что это тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМП). Ингибиторы ангиогенеза содержатся во всех видах хрящей, но в различных концентрациях. В 1980-х годах эти вещества были очищены и изучены некоторые их свойства. Было показано, что они тормозили деление эндотелиальных клеток, выстилающих внутреннюю оболочку кровеносных сосудов. Однако содержание этих веществ в хрящах было столь невелико, а процедура очистки так кропотлива, что ученые стали искать другие ингибиторы ангиогенеза. Были выделены два белковых вещества – ангиостатин и эндостатин. Первый – это фрагмент плазминогена, обнаруженный в моче мышей – носителей опухоли; второй – часть проколлагена XVIII, который отщепляется при формировании спирали коллагена. Опыты на животных показали, что эти вещества останавливали рост опухолей у мышей, а в больших дозах вели к их регрессии. Лэйн с соавторами разработали новый метод получения препарата из акульего хряща (Lane, 1992). Метод включал четыре основных этапа: 1 – очистка хрящевой ткани; 2 – сушка; 3 – измельчение; 4 – стерилизация. Продукт представлял собой сублимированную хрящевую ткань, и его клиническое применение показывало положительные результаты при лечении опухолей. Преимущества использования скелета акулы состояли в том, что – это чистый хрящ, не очень дорогой, поскольку промысел акул достаточно развит. С начала 1990-х годов развернулась невиданная по масштабам кампания по пропаганде акульего хряща для лечения рака. Лейна поддержали бельгийские онкологи, которые показали, что скормливание мышам акульих хрящей подавляло рост меланомы. Но в дальнейшем сами исследователи не смогли повторить этот опыт. На Кубе и в Мексике были организованы клинические проверки эффективности акульих хрящей при лечении разных форм рака. Это дало толчок производству и продаже препаратов из акульих хрящей. В Коста-Рике была построена фабрика по переработке акульих хрящей, затем такие же предприятия

появились в других частях света, в частности, в Новой Зеландии. По некоторым данным, в год перерабатывается более ста тысяч акульих голов, а оборот фирм составляет десятки миллионов долларов.

К результатам клинических испытаний на Кубе и в Мексике врачи и ученые отнеслись с недоверием. Группа датских ученых всесторонне исследовала влияние таких препаратов из акульих хрящей на рост и метастазирование мышинной саркомы. Животным скармливали акульи хрящи (препараты Sharkilage и MIA Shark Powder), выпускаемые двумя разными компаниями. Доза порошка при пересчете на вес человека составляла от 10 до 200 г в день. Препараты оказались нетоксичными, но они совершенно не тормозили рост опухолей и их метастазирование. Большое клиническое испытание эффективности препаратов акульих хрящей было проведено международной группой ученых и врачей. Исследование произведено по правилам проведения I и II фаз клинических испытаний, принятых в США, на группах больных с гистологически подтвержденным диагнозом рака III и IV стадий. Виды опухолей – рак легкого, молочной железы, толстой кишки, простаты, опухоли мозга и лимфомы. Результаты показали, что акульи хрящи в сравнительно умеренных дозах (1 г на кг веса тела) оказались токсичными для некоторых ослабленных больных или не были переносимы ими из-за нарушений функции желудочно-кишечного тракта. Авторы установили, что препараты акульих хрящей как самостоятельный лечебный агент оказались неэффективны при далеко зашедших формах рака. После такого заключения американские врачи перестали доверять акульим хрящам, несмотря на продолжающийся рекламный прессинг.

Тем не менее, проведенные научные исследования показали, что препараты из акульего хряща обладали антиангиогенной активностью и оказывали влияние на регрессию опухоли. Эти лечебно-профилактические продукты (пат. РФ № 2156132; пат. WO № 96/23512; пат. РФ № 2181292) представляли собой водные экстракты акульего хряща, имеющие в составе компоненты с молекулярной массой 1–500 кДа. Жидкий экстракт имел следующий состав: липиды – 0,10%; протеины – 1,77%; мукополисахариды и глюкозаминогликаны. Ингибитор ангиогенеза рекомендован для профилактики и предотвращения роста новообразований, а активатор ангиогенеза для стимуляции заживления ран.

На сегодняшний день идея ингибиторов ангиогенеза продолжает развиваться, уже подготовлено около 20 различных препаратов, некоторые из которых испытываются или применяются в практике. Среди них есть и препарат из акульих хрящей. Это – особым образом экстрагированное вещество, которое действительно обладает способностью подавлять рост новых сосудов. Разработала его канадская компания Этерна Лаб Инк, и называется оно АЕ-941/Неовастат. Это лекарство может также оказаться полезным при лечении ангиогенных и воспалительных заболеваний кожи, например, псориаза. А те формы, которые можно вводить внутримышечно или внутривенно, будут испытаны для лечения рака легких и почек.

Таким образом, в настоящее время очевидно, что хрящевая ткань вообще, и хрящевая ткань акул, в частности, содержит компоненты, препятствующие развитию неопластических процессов. Однако для того, чтобы перевести их в активную форму, которую можно было бы использовать в виде лекарственных препаратов, необходимо выделение, очистка и определение структуры. Что касается других видов рыб и морских беспозвоночных, то сведений о содержании в них противоопухолевых агентов нет.

Глава 4. ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАД К ПИЩЕ «АРТРОФИШ»

4.1. Исследование острой токсичности Артрофиша

По результатам, полученным в ходе разработки методов получения ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов и исследования химического состава и биологической активности выделенных препаратов, была создана технология БАД к пище «Артрофиш». На БАД «Артрофиш» составлена нормативная документация: Технические условия № 9283-004-74981775-14 Технологическая инструкция № 004-74981775-2014

На базе Пермской фармацевтической академии исследована острая токсичность гидролизатов хрящевой ткани гидробионтов. Исследования острой токсичности гидролизатов проводились в соответствии с рекомендациями Фармакологического комитета РФ (Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, 2000) по Прозоровскому (Прозоровский и др., 1978). Также показано, что продукты переработки хрящевой ткани, в том числе и ферментативные гидролизаты гипоаллергенны, не обладают мутагенными и тератогенными свойствами.

Установлено, что по классификации Измерова и др. (Березовская, 1978) препарат относится к III классу токсичности – к умеренно токсичным веществам. Средняя летальная доза (ЛД 50) гидролизата хрящевой ткани гидробионтов составляет 3890 ± 370 мг/кг массы животного. Рекомендуемая суточная доза для взрослого человека составляет 1,0 г, что в 300 раз меньше ЛД 50.

4.2. Испытания влияния ферментативного гидролизата из хрящевой ткани акулы (*Somniosus Pacificus*) на развитие индуцированной бензопиреном опухоли

Для проведения биологических испытаний были взяты две группы (опытная и контрольная) белых беспородных мышей массой 18 г. Животные опытной группы получали в добавление к обычному рациону в качестве питья растворенный в кипяченой воде ферментативный гидролизат из хрящевой ткани акулы в дозе 0,15–0,2 мг/мышь, при этом введение препарата было начато за 21 день до введения 3,4-бензопирена и было продолжено после. Животные контрольной группы получали обычный рацион. Животным обеих групп был введен 3,4-бензопирен в дозе 2 мг/мышь в 0,5 мл растительного кипяченого масла внутримышечно. Длительность эксперимента составила 7 месяцев (24.03.97-10.11.97). Результаты эксперимента представлены в табл. 12.

В контрольной группе у всех мышей развились злокачественные новообразования, в опытной группе к концу эксперимента осталось 5 мышей без явных признаков развивающейся опухоли.

Влияние ферментативного гидролизата из хрящевой ткани акулы
на выживаемость мышей после введения 3,4-бензопирена

| Контрольные точки | Контрольная группа | | | Опытная группа | | |
|-------------------|-----------------------|---------|--------------------|----------------|---------|--------------------|
| | всего живых | больных | процент смертности | всего живых | больных | процент смертности |
| Начало | 26 | | – | 34 | – | – |
| 21 сутки | введен 3,4-бензопирен | | | | | |
| 100 сутки | 26 | 15 | – | 34 | 13 | – |
| 108 сутки | 23 | 19 | 12 | 30 | 17 | 12 |
| 122 сутки | 17 | 15 | 35 | 25 | 19 | 26 |
| 130 сутки | 11 | 9 | 58 | 20 | 13 | 41 |
| 152 сутки | 3 | 3 | 88 | 9 | 4 | 74 |
| 157 сутки | 0 | – | 100 | 8 | 3 | 76 |
| 210 сутки | 0 | – | 100 | 5 | 0 | 85 |

В результате эксперимента было установлено, что у мышей, получавших ферментативный гидролизат из хрящевой ткани акулы, в 12,5% случаев не наблюдалось развития бензопирен-индуцированных опухолей. Проведенный эксперимент не позволяет сделать окончательного заключения, необходимы более детальные исследования. Например, повторение эксперимента на крысах, так как они более резистентны к условиям длительного содержания. Тем не менее, полученные результаты показывают, что ферментативный гидролизат из хрящевой ткани гидробионтов может быть исследован в качестве профилактического и лечебного препарата при онкологических заболеваниях.

4.3. Противовоспалительный эффект гидролизата из тканей гидробионтов

Противовоспалительная активность препарата была исследована в НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН и оценена на двух модельных системах:

- 1) модели асептического воспаления вызванного у мышей;
- 2) на модели инфекционно-аллергического псевдотуберкулезного артрита у кроликов.

Использование средств, обеспечивающих противовоспалительный эффект, является необходимым условием комплексного лечения воспалительного процесса. Для изучения эффективности испытуемых препаратов в эксперименте наиболее часто используются модели асептического воспаления, вызванного химическими агентами. Для воспроизведения асептического воспаления с преобладанием экссудативных явлений в последние годы используют сульфатированный гликозаминогликан-каррагинан.

Исследование противовоспалительной активности на мышах показало, что при скормливании гидролизата из тканей гидробионтов противовоспалительный эффект наблюдался в ранние сроки развития воспаления (на 3 сутки) и сохранялся на 6 сутки. На 3 сутки прирост массы лапки составил в контроле $139 \pm 17\%$, при введении гидролизата из тканей гидробионтов $101 \pm 7\%$; на 6-е сутки: в контроле – $64 \pm 4\%$, при введении гидролизата из тканей гидробионтов $52 \pm 4\%$. Пятикратное введение гидролизата через 6 суток после индукции воспаления, обеспечивало действие, сопоставимое с однократным введением.

В целом, результаты экспериментов свидетельствуют об умеренном, но статистически достоверном снижении интенсивности асептического воспаления, вызванного введением каррагинана.

В другой серии экспериментов воспроизводили инфекционно-аллергический псевдотуберкулезный артрит у кроликов.

При этом заболевании наблюдается не только бактериально токсическое поражение многих органов и систем (в том числе – развитие полиартрита), но и возникновение иммунопатологических состояний и реакций. Иммуитет при псевдотуберкулезе развивается медленно или не формируется вовсе (Сомов и др., 2001). Предлагаемая модель (Исачкова и др., 1984) позволяет оценить влияние гидролизата из тканей гидробрионтов, как на состояние пораженных органов, так и на состояние иммунитета. Результаты исследований сведены в табл. 13.

Таблица 13

Результаты испытаний гидролизата из тканей гидробрионтов
на модели инфекционно-аллергического псевдотуберкулезного артрита

| Показатели | Контрольная группа | Опытная группа |
|--|--|---|
| 1. Общие симптомы | Непостоянная хромота, обильное выпадение шерсти | Активность, прибавление в весе. Гладкая шерсть без выпадения |
| 2. Состояние пораженного коленного сустава | Округлость конфигурации коленного сустава, мелкоочечные кровоизлияния в суставной сумке. Серозная синовиальная жидкость в полости сустава | Единичные мелкоочечные кровоизлияния |
| 3. Изменения в синовиальной оболочке коленного сустава | Отек синовии, набухание коллагеновых волокон. Умеренное расширение и полнокровие сосудов. Фибриноидное набухание стенок сосудов, диапедезные кровоизлияния. Периваскулярная и слабая диффузная инфильтрация синовиальной оболочки лимфоидномacroфагальными клетками с примесью полиморфноядерных лейкоцитов, эозинофилов и плазматических клеток | Слабое разволокнение соединительной ткани, незначительная гиперемия сосудов, единичные кровоизлияния. Остаточные реактивновоспалительные изменения |
| 4. Макроскопические изменения внутренних органов | Синюшная окраска паренхимы легких, некротические очажки по краю и в паренхиме печени | Единичные очажки в стадии репарации |
| 5. Микроскопические изменения внутренних органов (печень, селезенка, легкие, лимфатические узлы) | Слабо выраженные некротические изменения. Мелкие очажки бронхопневмонии. Дистрофические изменения гепатоцитов | То же, но на фоне гиперплазии бронхассоциированной лимфоидной ткани, умеренной лимфоидномacroфагальной инфильтрации в портальных трактах печени. Гиперплазия В- и Т-зависимых зон селезенки и лимфатических узлов |

Полученные результаты позволили сделать заключение о том, что гидролизат из тканей гидробионтов оказывает положительный эффект и уменьшает морфологические проявления инфекционно-аллергического псевдотуберкулезного артрита. Препарат обладает также общеукрепляющим действием, вызывая улучшение общего состояния животных и развитие тканевых иммуноморфологических реакций.

4.4. Влияние гидролизата из тканей гидробионтов на экспрессию активационных мембранных молекул лимфоцитов периферической крови

В НИИЭМ СО РАМН под руководством д.м.н. Т.С. Запорожец были проведены исследования по влиянию гидролизата из тканей гидробионтов на экспрессию активационных мембранных молекул лимфоцитов периферической крови. Воспаление относится к числу наиболее распространенных патологических процессов и, являясь реакцией организма на местное повреждение, представляет собой сложное переплетение различных нервных, гуморальных и эффекторных механизмов, лежащих в основе большого числа воспалительных феноменов (альтерации, расстройств микроциркуляции с экссудацией и эмиграцией, пролиферации). Начальные стадии активационного процесса выражаются в запуске каскадных механизмов (чаще всего ферментных), конечной целью которых является экспрессия соответствующих генов. Продукты некоторых генов, связанных с активацией, появляются в различные сроки на поверхности лимфоцитов (Ярилин А.А., 1999). Таким образом, процесс активации сопровождается появлением, а чаще увеличением количества на внешней мембране лимфоцитов определенного набора эссенциальных, т.е. обязательных для данного функционального состояния клетки молекул. Это так называемые маркеры активации или «активационные» антигены. Комплекс активных антигенных пептидов и молекул HLA 2 класса с рецептором CD4 + T-лимфоцита является сигналом, «запускающим» всю последующую иммунную реакцию с выработкой цитокинов, активированием новых количеств макрофагов и лимфоцитов, мобилизацией нейтрофилов, продукцией специфических антител. Формирование комплекса рецептора лимфоцита (TCR-CD3) с антигенными пептидами и молекулой главного комплекса гистосовместимости (HLA-DR) служит одним из основных стимулов для дальнейших активационных процессов в иммунокомпетентных клетках. Часть из активационных молекул исходно отсутствует на поверхности лимфоцитов, и их экспрессия индуцируется в процессе обмена сигналами. Важными маркерами активации лимфоцитов является экспрессия рецепторов интерлейкина-2 (CD25), трансферрина (CD71), антигена CD95, опосредующего апоптоз. Последний появляется на поверхности клеток, свидетельствуя о предстоящем удалении лимфоцитов, выполнивших свою функцию. **CD69** – ранний маркер активации, вовлечен в ранние механизмы активации T-клеток, ЕК-клеток, моноцитов и тромбоцитов, формирует димеры, которые могут функционировать как трансдуктор сигнала, усиливая клеточную активацию. Экспрессируется в повышенных количествах на T-клетках из воспалительных инфильтратов при ревматоидном артрите, вирусных гепатитах, аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы.

Модулируя выраженность на клеточной поверхности активационных антигенов, можно достичь направленного изменения состояния активации иммунокомпетентных клеток, опосредующих развитие воспаления.

Лимфоциты периферической крови здоровых доноров выделяли на градиенте плотности фиколл-верографина ($d = 1,077$), отмывали забуференным фосфатно-солевым буфером и доводили до концентрации $2 \cdot 10^6$ /мл средой RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Жизнеспособность выделенных клеток, по данным теста на окрашиваемость трипановым синим, составляла 95–98%. Взвесь лимфоцитов помещали в силиконированные пробирки, «Артрофиш» вносили в конечной концентрации 10 мкг/мл и 100 мкг/мл и инкубировали в течение 24 часа в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C. Экспрессию мембранных молекул определяли методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, меченных флюоресцеин-изотиоцианатом и фикоэритрином к антигенам CD25, CD38, CD71, CD69, CD16, CD95.

Относительное содержание лимфоцитов периферической крови здоровых доноров, экспрессирующих ранние активационные маркеры (CD25, CD71, CD38, CD69) составляло $10,7 \pm 1,2\%$, $6,7 \pm 0,8\%$, $36,0 \pm 2,4\%$, $10,5 \pm 1,4\%$ соответственно.

Внесение в культуру лимфоцитов периферической крови гидролизата из тканей гидробионтов в конечной концентрации 10 и 100 мкг/мл приводило к уменьшению экспрессии ранних активационных антигенов (табл. 14).

Таблица 14

Изменение экспрессии ранних активационных антигенов под действием гидролизата из тканей гидробионтов

| CD (%) | Контроль | Гидролизат хрящевой ткани | |
|--------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 10 мкг/мл | 100 мкг/мл |
| CD25+ | $10,7 \pm 1,2$ | $6,8 \pm 0,6$ p = 0,02 | $12,3 \pm 1,6$ p = 0,7 |
| CD71+ | $6,7 \pm 0,8$ | $2,2 \pm 0,3$ p = 0,00 | $5,8 \pm 0,9$ p = 0,4 |
| CD38+ | $36,0 \pm 2,4$ | $25,2 \pm 1,8$ p = 0,005 | $25,9 \pm 2,3$ p = 0,01 |
| CD69+ | $10,5 \pm 1,4$ | $6,8 \pm 0,8$ p = 0,05 | $22,6 \pm 2,1$ p = 0,000 |
| CD95+ | $28,3 \pm 2,0$ | $13,7 \pm 2,1$ p = 0,00 | $20,9 \pm 3,0$ p = 0,028 |

Снижение экспрессии активационных антигенов определяет изменение функциональной активности иммунокомпетентных клеток, а способность к их модуляции – лежит в основе механизма противовоспалительного действия гидролизата из тканей гидробионтов.

Таким образом, БАД к пище «Артрофиш», полученный из хрящевой ткани гидробионтов, обладает умеренной противовоспалительной активностью, снижает уровень экспрессии ранних активационных антигенов лимфоцитов периферической крови человека.

4.5. Эффективность «Артрофиша» при полиостеоартрозе

На базе Приморского краевого центра профилактики остеопороза под руководством И.А. Рубашек было проведено клиническое испытание гидролизата из тканей гидробионтов, одновременно проводилось обычное медикаментозное лечение с использованием нестероидных противовоспалительных средств (НПВС).

Препарат применяли 28 пациенток в возрасте от 50 до 55 лет, состоящих на учете в Приморском краевом центре профилактики остеопороза по поводу заболеваний опорно-двигательного аппарата – полиостеоартроза в сочетании с остеопеническим синдромом (доклинической стадии остеопороза). Все испытуемые изъявили желание и дали согласие на участие в клиническом исследовании. Препарат принимали по 2 капсулы 2 раза в день в течение 2 месяцев. Наблюдение за пациентками проводилось 6 месяцев от начала приема БАД.

У всех испытуемых диагноз остеоартроза был подтвержден рентгенологически, при этом у 6-ти человек была I стадия, у 20 – II и у 2 – III рентгенологическая стадия процесса. Основным клиническим проявлением остеоартроза была боль в суставах.

Контрольную группу составили 15 женщин того же возраста с остеопеническим синдромом (Т-критерий был в среднем по группе – $2,1 \pm 0,1$). Средняя продолжительность заболевания составила 2,1 года, а суммарный индекс Лекена – 6,9, что достоверно не отличалось от пациенток опытной группы. В контрольной группе пациентки в среднем 6,2 дня в месяц вынуждены были принимать НПВП в связи с болями в суставах, что также достоверно не отличалось от пациенток в опытной группе.

В динамике наблюдения проводился осмотр пациенток врачом – ревматологом и оценка выраженности болевого синдрома, функциональной способности суставов. Исходно и через 6 месяцев проводилось исследование плотности костной ткани на ультразвуковом костном денситометре.

Клинический эффект гидролизата из тканей гидробионтов выражался, прежде всего, в уменьшении выраженности болевого синдрома. Первые признаки положительного воздействия появлялись через 2 недели и достигали максимума через 1 месяц от начала приёма препарата, оставаясь стабильными на протяжении всего времени приема. Так, в группе больных, получавших гидролизат из тканей гидробионтов, исходный уровень боли по визуально-аналоговой шкале составил 5,4 (в контрольной группе – 5,8), а через месяц в группе испытуемых 1,8 (в то время как в контрольной оставался на прежнем уровне – 6,0). 18 больных опытной группы, у которых была утренняя скованность в суставах, отметили ее исчезновение через 1 месяц. Интересным представляется тот факт, что 26 из 28 пациенток, принимающих гидролизат из тканей гидробионтов, прекратили прием НПВП в связи с улучшением состояния, в то время как пациентки контрольной группы продолжали прием НПВП по потребности с прежней частотой. На фоне приема гидролизата из тканей гидробионтов значительно улучшалось функциональное состояние суставов – увеличивался объем активных и пассивных движений в сравнении с контрольной группой.

Оценка в динамике плотности костной ткани (с помощью ультразвукового костного денситометра) до начала приема гидролизата из тканей гидробионтов и через 6 месяцев показала, что в опытной группе она стабилизировалась, не было

отрицательной динамики плотности костной ткани, что является благоприятным прогностическим признаком течения остеопороза.

Результаты отдаленного наблюдения за пациентками опытной группы показали: у 26 из 28 пациенток (92,9%) наблюдалась стойкая ремиссия, в течение которой пациентки практически не пользовались НПВП, и только у 2 через месяцев появились признаки некоторого ухудшения состояния. В контрольной группе на протяжении 6 месяцев наблюдения пациентки продолжали принимать НПВП по потребности, которая увеличилась в осенне-зимний период до 8,3 дня, что достоверно выше исходных значений. Не было отмечено побочных действий на прием препарата.

Таким образом, БАД к пище «Артрофиш» (при употреблении в рекомендуемых дозах) обладает хорошей клинической эффективностью при остеоартрозе средней степени тяжести, а также рекомендуется при сочетании остеоартроза с начальными проявлениями остеопороза. «Артрофиш» обладает как противовоспалительными, так и хондропротективными свойствами, быстро уменьшает болевой синдром, способствует улучшению функциональной способности суставов. На основании клинических испытаний получены рекомендации по проведению исследований для создания лекарственных средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные сведения убедительно свидетельствуют о том, что ряд промышленных объектов Дальневосточного региона может быть использован в качестве перспективных источников сырья для получения БАД к пище и лекарственных препаратов, обладающей хондропротекторными и противовоспалительными свойствами.

Обоснованы рациональные параметры деполимеризации хрящевой ткани гидробактериоцитов для обеспечения максимальной доступности фермент-субстратного взаимодействия, и последующий ферментативный гидролиз протеолитическими ферментами.

По результатам разработки методов получения ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробактериоцитов и исследования химического состава и биологической активности выделенных препаратов, была создана технология БАД к пище «Артрофиш». Препарат зарегистрирован как БАД к пище и внедрен в промышленное производство. Биотехнология БАД к пище «Артрофиш» обеспечивает получение поликомпонентного продукта, который в отличие от препаратов-аналогов содержит свободные дисахариды и проявляет антипротеазную активность. «Артрофиш» из различных сырьевых источников стандартизован по содержанию гексозаминов (не менее 2%) и содержит хондроитинсульфаты (6%) и коллаген (16–24%). Фракционный состав биопрепаратов из хрящевой ткани гидробактериоцитов представлен комплексом высокомолекулярных (> 200 кДа), средномолекулярных (30–160 кДа) и низкомолекулярных компонентов (менее 10 кДа) протеогликановой природы, молекулярно-массовое распределение которых определяется специфичностью ферментативного препарата. В процессе ферментативного гидролиза хрящевой ткани гидробактериоцитов образуются свободные дисахариды, идентифицированные методом капиллярного электрофореза, которые могут служить маркерами видовой принадлежности хрящевой ткани. БАД к пище «Артрофиш» является токсикологически безопасной. На модельных экспериментах и в клинике установлено ее противовоспалительное и хондропротекторное действие. Компоненты хрящевой ткани могут быть рассмотрены в перспективе для создания онкопротекторных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Алексеева Л.И., Беневоленская Л.И., Насонов Е.Л.** Структур (хондроитин-сульфат) – новое средство для лечения остеоартроза // Терапевтический архив. – 1995. – № 5. – С. 25-30.
2. **Алексеев Л.П.** Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1968. – т. 2. – 112 с.
3. **Антипова Л.В., Глотова И.А.** Получение коллагеновых субстанций на основе ферментативной обработки вторичного сырья мясной промышленности // Известия вузов. Пищевая технология. – 2000. – № 5-6. – С. 17-21.
4. **А. с. № . 192437.** Препарат для обработки ран / Сопеска Z. – 1984
5. **Бассейновые нормы отходов, потерь, выхода готовой продукции и расхода сырья при производстве мороженой продукции из рыб Дальнего Востока.** – М.: Государственный комитет Российской Федерации по Рыболовству, 2003 г. – 70 с.
6. **Беленький Б.Г., Ганкина Э.С., Мальцев В.Г.** Капиллярная жидкостная хромотография. – Л.: Наука, 1987. – с. 172-178.
7. **Березовская И.В.** Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения // Химический фармацевтический журнал. – 1978. – Т. 37, № 3. – С. 32-34.
8. **Воли А.** Тучные клетки – виновники артрита (перевод к.м.н. Т. Акимова) (стр. 245-255) в кн. Наука и человечество «Доступно и точно о главном в мировой науке». Международный ежегодник – М.: Знание, 1991. – С. 400.
9. **Волошина (Белая) О.В., Палагина М.В., Набокова А.А., Черкасова С.А., Ростовская М.Ф., Приходько Ю.В.** Концентрат рыбный белковый для профилактики и лечения остеопороза // Рыбная промышленность. – 2005. – № 3. – С. 46-48.
10. **Давидович В.В.** Биотехнология биологически активной добавки к пище «Моллюскам»: Дис. канд. техн. наук / ФГУП «ТИНРО-центр». – Владивосток, 2005. – 166 с.
11. **Данилевская Н.В., Николаев А.А.** Хондропротекторы и их использование в ветеринарии // Ветеринар. – 2002. – № 3. – С. 45-49.
12. **Дарбре А.** Аналитические методы. – В кн.: Практическая химия белка. Пер. с англ. / Под ред. А. Дарбре. – М.: Мир, 1989. – С. 243-333.
13. **Демина Н.С., Лысенко С.В.** Коллагенолитические ферменты, синтезируемые микроорганизмами (обзор) // Микробиология. – 1996. – Т. 65, вып. 3. – С. 293-304.
14. **Заявка РФ № 95110213/14.** Способ получения пористого коллагенсодержащего материала / Подорожко Е.А., Кулакова В.К., Курская Е.А., Лозинский В.И. // БИ, 1995.
15. **Заявка РФ № 97116345/14** Препарат, стимулирующий хондрогенез, Стим-бон-3 и способ его получения / Десятниченко К.С., Лунева С.Н., Ларионов А.А. Опубликовано 10.08.99.
16. **Заявка FR № 2597501** Способ получения коллагена / Tayot J., 1987.

-
17. **Заявка JP № 62-77327** Способ получения порошка из кожи / Уэно, 1987.
18. **Заявка. WO № . 98/44929** Препарат, содержащий гидролизированный коллаген и глюкозамин для лечения артроза/ Myers Andrew E. // Опубликовано ИСМ № 7, 2001, с. 7.
19. **Заявка. WO № 9836760** Ингибиторы и активаторы ангиогенеза из хряща акулы/ Slim G., Davis P., Je He, Xu Bei // Опубликовано ИСМ № 16, 1999, с. 47.
20. **Заявка. WO № 9945798** Способ получения состава на основе биоорганического кальция и питательная добавка, содержащая состав / Song Juntong, Yuan Xigui // Опубликовано ИСМ № 9, 2000
21. **Иванкин А.Н., Васюков С.Е., Панов В.П.** Получение, свойства и применение хондроитинсульфатов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 1984. – № 3. – С. 192–202.
22. **Иванкин А.Н., Неклюдов А. Д.** Получение гепарина и хондроитинсульфата из животной ткани ионообменным методом // Прикладная биохимия и микробиология. – 1998. – № 6. – С. 692–697.
23. **Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д., Кудряшов Л.С., Калинова Ю.Е., Тележкин В.В., Герман А.Б.** Влияние коллагеназной активности фермента из гепатопанкреаса краба на биохимическое состояние объектов животного происхождения // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2001. – № 1. – С. 28-32.
24. **Игнатова Е.Ю., Гуров А.Н.** Принципы извлечения и очистки гиалуроновой кислоты (обзор) // Химический фармацевтический журнал. – 1990. – Т. 24, № 3. – С. 42-46.
25. **Исачкова Л.М., Тимченко Н.Ф., Сомов Г.П.** Модель инфекционно-аллергического псевдотуберкулезного артрита у кроликов // Архив. – 1984. – № 5. – С. 69-74.
26. **Канунго М.** Биохимия старения. – М.: Мир, 1982. – с. 136–166.
27. **Кизеветтер И.В.** Биохимия сырья водного происхождения. – М.: Изд-во «Пищевая пром-ть», 1973. – 423 с.
28. **Киселев В.И., Мрочков К.А.** Биохимический состав коллагенсодержащего сырья // В книге Сафронова Т.М. Аминосахара промысловых видов рыб и беспозвоночных и их роль в формировании качества продукции. – М.: Пищевая пром-ть, 1980. – 112 с.
29. **Клычкова (Суховерхова) Г.Ю., Пивненко Т.Н.** Ингибиторная активность хрящевой ткани акулы и ее изменение под действием ферментативного гидролиза // Известия ТИНРО. – 2001. – Т. 129. – С. 74-81.
30. **Клычкова (Суховерхова) Г.Ю., Пивненко Т.Н., Ковалев Н.Н. Эпштейн Л.М.** Состав и биологическая активность хрящевой ткани гидробионтов // Известия ТИНРО. – 2003. – Т. 133. – С. 325-332
31. **Ковековдова Л. Т., Симоконь М.В.** Микроэлементный состав промысловых головоногих моллюсков: кальмаров и осьминога // Известия ТИНРО. – 1999. – Т. 125. – С. 9–13.
32. **Козырева О.Б.** Исследование физико-химических свойств покровных тканей головоногих моллюсков // Известия ТИНРО. – 1999. – Т. 125. – С. 80–84.
33. **Косягин Д.В.** Аминокислотный состав белка протеогликанов суставного хряща человека в норме и при патологии // Украинский биохимический журнал. – 1984. – Т. 56, № 5. – С. 549–551.

34. **Кочетков Н.К.** Методы химии углеводов. – М.: Изд. «Мир», 1967. – 268 с.
35. **Ленинджер А.** Биохимия. – М: Изд-во «Мир», 1974. – 957 с.
36. **Луценко С.В., Киселев С.М, Северин С.Е.** Молекулярные механизмы опухолевого ангиогенеза (обзор) // Биохимия. – 2003. – Т. 68, вып. 3. – С. 349-365.
37. **Максименко А.В., Тищенко Е.Г., Голубых В.Л.** Антитромботическое действие производных каталазы и хондроитинсульфата при артериальном поражении у крыс // Вопросы медицинской химии. – 1999. – Т. 45, № 6. – С. 48-51
38. **Максименко А.В., Тищенко Е.Г., Голубых В.Л.** Антитромботическая активность комплексов супероксидсмутазы с хондроитинсульфата при артериальном поражении у крыс // Вопросы медицинской химии. – 1999. – Т. 45, № 6. – С. 52-57.
39. **Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В.** Биохимия человека. – М.: Мир, 1993. – 453 с.
40. **Методические рекомендации 2.3.1.1915-04** Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ. – М, 2004. – С. 37.
41. **Мударисова Р.Х., Зимина Н.П., Глухов Е.А., Басченко И.А., Давыдова В.А., Зарудий Ф.А, Монаков Ю.Б.** Состав и фармакологическая активность хондроитинсульфата, полученного из трахей северного оленя // Химический фармацевтический журнал. – 1997. – № 2. – С. 25-27.
42. **Мусил Я., Новакова О., Кунц К.** Современная биохимия в схемах. – М.: Мир, 1984. – 171 с.
43. **Неклюдов А. Д.** Пищевые волокна животного происхождения. Коллаген и его фракции как необходимые компоненты новых и эффективных пищевых продуктов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39, № 3. – С. 261-272
44. **Павлов С.А., Чернов Н.В., Шестакова И.С., Касьянова А.А.** Химия и физика высокомолекулярных соединений в производстве искусственной кожи, кожи и меха – М.: Изд-во «Легкая индустрия», 1966. – 485 с.
45. Павлова В.Н., Копьева Т.Н., Павлов Г.Г. Хрящ. – М.: Медицина, 1988. – 210 с.
46. **Палагина М.В., Волошина (Белая) О.В., Набокова А.А., Приходько Ю.В., Ростовская М.Ф.** Продукты функционального питания на основе вторичного сырья рыбопереработки // Рыбная промышленность. – 2005. – № 1. – С. 28-30.
47. **Пат. РФ 2077328** Вещество для стимуляции пролиферации эндотелия роговицы человека // БИ 1997, № 11
48. **Пат. РФ 2092156** Раствор для стимуляции репарации кожи «коллагель» // БИ 1997, № 28,
49. **Пат. РФ 2096966** Способ подготовки коллагенсодержащего сырья для производства колбасной оболочки / Антипова Л.В., Глотова И.А. // БИ, 1997, № 33, с. 34.
50. **Пат. РФ 2082416** Способ получения комплексного препарата, содержащего мукополисахариды и коллаген из животного сырья / Аршинова Т.В., Рыкова В.И., Кучумова Л.Я., Сидоркина О.М. // БИ, № 18, 1997.
51. **Пат. РФ 2157695**, Экстракты хрящей акулы, способ их получения и применения / Дюпон Э., Бразо П., Жюно К., Даниель Х. // БИ 2000, № 10.
52. **Пат. РФ 2153812** Кормовая добавка для сельскохозяйственных животных / Тимошенко Н.В. и др. // БИ, 2000, № 22, с. 316.

53. Пат. РФ 2181292 Экстракты акульего хряща, обладающие противоколлагенолитическим, противовоспалительным, антиангиогенным и противоопухолевым действием, способ получения, способы применения и содержащие их композиции / Эрик Дюпон (СА), Поль Бразо (СА), Кристина Жюно (СА), Даниель Х. Мас (FR), Кенкет Маренус (US). Дата начала действия патента 07.08.1996. Оpubл. 20.04.2002; БИ 2003, № 36.

54. Пат. РФ 2161002 Пищевой общеукрепляющий лечебнопрофилактический продукт из хрящевой ткани акул и способ его получения / Пивненко Т.Н., Эпштейн Л.М., Позднякова Ю.М., Ковалев Н.Н., Гажа А.К., Апанасевич В.И., Беседнова Н.Н. – Заявлено 30.07.1999; Оpubл. 27.12.2000 //БИ 2000, № 36

55. Пат. РФ 2162331 Способ получения сульфатированных гликозаминогликанов. Панасюк А.Ф., Иванов С.Ю., Ларионов Е.В., Левин В.О., Саващук Д.А. // БИ 2001, № 1.

56. Пат. РФ 2201757 Средство профилактики и лечения дегенеративно-дистрофических изменений суставов и способ его получения / Десятниченко К.С., Матвеева Е.Л., Талашова И.А. // Оpubл. ИСМ, 2003, № 8, с. 23.

57. Пат РФ 2250047 Пищевой общеукрепляющий профилактический продукт из хрящевой ткани гидробионтов и способ его получения / Пивненко Т.Н, Клычкова (Суховерхова) Г.Ю., Ковалев Н.Н. Эпштейн Л.М., Музалева О.Ю., Бочаров Л.Н., Блинов Ю.Г. // Б И 2005, № 11.

58. Пат. РФ 2156132 Экстракты акульего хряща, обладающие антиангиогенной активностью и оказывающие влияние на регенерацию опухоли, способы их получения / Дюпон Э., Бразо Б., Жюно (США) // Опубликовано БИ № 26, 2000, С. 241

59. Пат. РФ № 2250047 Пищевой общеукрепляющий продукт из хрящевой ткани гидробионтов и способ его получения // Пивненко Т.Н., Клычкова Г.Ю., Эпштейн Л.М., Ковалев Н.Н., Музалева О.Ю., Бочаров Л.Н., Блинов Ю.Г. – 2003.

60. Пат US 4822607 Способ получения хрящевого препарата / Ballassa et al., 1989

61. Пат. US 6083933 Лечение циститоподобных симптомов с использованием хондроитинсульфата / Sungtack S. // Опубликовано ИСМ 2001, № 13

62. Патент US 6025327. Способ получения препарата для активации репаративного остеогенеза / Соловьев М. М., Владимирова Л. Г., Четкина Е. В. // Опубликовано БИ, 1998.

63. Пат. US 5856446 Способ лечения ревматоидного артрита низкой дозой коллагена типа II / Weiner H. L., Hafler D. A., Trentham D. E. // Опубликовано ИСМ 2000, № 1.

64. Пат. № 233785. (ГДР) Способ получения гемостатика из коллагена шкур животных / Biedermann M , 1986.

65. Пат. US 4216204. Препарат для лечения ожогов / Grammert S., 1984.

66. Пат. Sh 2094999 (Швеция) Способ получения коллагена/ Шеландер Э. , 1993

67. Пат. US 6149946 Способ и продукт с использованием хорды осетровых рыб для облегчения симптомов артрита / Aoyagi S., Demichele S. // Опубликовано ИСМ № 22, 2001.

68. Пат. US 6423347 Способ и продукт с использованием хорды осетровых рыб для облегчения симптомов артрита / Aoyagi S., Demichele S.// Опубликовано ИСМ № 14, 2003, с. 69.

69. Пат. **WO 69444** Применение гликозаминогликанов с М. м. 2400 для лечения старческого слабоумия / Cornelli U., DeAmbrosi L. // Опубликовано ИСМ 2001, № 22.

70. Пат. **WO 9605851** Применение безвкусного гидролизованного коллагена и содержащий его агент // Опубликовано ИСМ 1997, № 1

71. Пат **WO 96/23512** Extracts of shark cartilage, process of production and uses thereof / Dupont E., Juneau K., Maes D., Marenus K., 1996.

72. **Пилат Т.Л., Иванов А.А.** Биологически активные добавки к пище (теория, производство, применение). – М.: Авваллон, 2002. – 710 с.

73. **Петров К.П.** Методы биохимии растительных продуктов. – Киев: Изд-во «Высшая школа», 1978. – 224 с.

74. **Поттс Д., Свэби С.** Акулы. – М.: ООО «Изд-во Астрель», ООО «Изд-во АСТ», 2002. – 255 с.

75. **Прозоровский В.В., Прозоровская М.П., Демченко В.М.** Экспресс-метод определения средней смертельной (или средней эффективной) дозы и ее ошибки // Фармакология и токсикология. – 1978. – № 4. – С. 497-502.

76. **Риггз Б.Л., Мелтон Л. Дж.** Остеопороз. Пер с англ. М. – СПб.: ЗАО «Изд-во БИНОМ», «Невский диалект», 2000. – 560 с.

77. **Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.** – М., 2000. – 398 с.

78. **Рудаков О.Б., Полянский К.К.** Современная жидкостная хроматография углеводов // Молочная промышленность. – 1999. – № 4. – С. 25–27.

79. **Руденко В.Г.** Хондропротекторы – основа конструктивной терапии заболеваний суставов // Медфарм Холдинг www.healthua.com, 2005.

80. **Сафронова Т.М.** Аминосахара промысловых видов рыб и беспозвоночных и их роль в формировании качества продукции. – М.: Пищевая пром-ть, 1980. – 112 с.

81. **Серов В.В., Шехтер А.Б.** Соединительная ткань. – М.: Медицина, 1981. – 312 с.

82. **Слуцкая Т.Н.** Сравнительная характеристика сушеных трепанга и кукумарии // Сборник «Исследования по технологии рыбных продуктов», 1972. – вып. 3. – С. 139–146.

83. **Слуцкий Л.И.** Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. – Л.: Изд-во «Медицина», 1969. – 377 с.

84. **Слуцкий Л.И.** Современные представления о коллагеновых компонентах хрящевой ткани: обзор // Вопросы медицинской химии. – 1985. – Т.31. – С. 10–17.

85. **Соловьева Н.И.** Основные металлопротеиназы соединительнотканного матрикса // Биоорганическая химия. – 1994. – Т. 20, № 2. – С. 143–152.

86. **Соловьева Н.И.** Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции: обзор // Биоорганическая химия. – 1998. – Т. 24, № 4. – С. 245–255.

87. **Соловьева Н.И., Винокурова С.В., Дилакян Э.А., Гуреева Т.А., Журбицкая В.А., Балаевская Т.О.** Коллагеназы I и IV типов и их эндогенные регуляторы в иммортализованных и трансформированных фибробластах // Вопросы медицинской химии. – 2001. – Т. 24, № 1 – С. 143–148.

-
88. **Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф.** Псевдотуберкулез. – М.: Медицина, 2001 – 356 с.
89. **Степаненко Б.Н.** Химия и биохимия углеводов (полисахариды). – М.: Высшая школа, 1978. – 256 с.
90. **Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В.** Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. – М.: Химия, 1986. – 288 с.
91. **Суховерхова Г.Ю.** Биохимическая характеристика хрящевой ткани гидробионтов и технология БАД к пище. 2006. Автореф. дис.... канд. тех. наук – Владивосток, – 23 с.
92. **Тишин В.Е.** Использование акул для пищевых, кормовых и технических целей. – М.: ВНИРО, 1969. – 106 с.
93. **Шитов Г.Г.** Новые подходы к созданию лекарственных средств с хондропротекторными свойствами // Вестник Российской АМН. – 1992. – № 5. – С. 26-30.
94. **Шлянкевич М.** Акульки хрящи – еще одна легенда // «Вместе против рака». – 2000. – № 2. – С. 22–25.
95. **Хасигов П.З., Подобед О.В., Кцоева С.А., Гагагонова Т.М., Грачев С.В., Шишкин С.С. Березов Т.Т.** Металлопротеиназы матрикса нормальных тканей человека: обзор // Биохимии. – 2001. – Т. 66, вып. 2. – С. 167–179.
96. **Хелминен Х.Ю., Сээмэнэн А.М., Кивиранта И., Юрвелин Ю.** Секреты суставного хряща. в книге Наука и человечество «Доступно и точно о главном в мировой науке». Международный ежегодник. – М.: Знание, 1991. – 400 с.
97. **Хупе К.П., Розинг Г., Шренкер Х.** Аппаратура. – В кн.: Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии. – М.: Мир, 1988. – С. 100-170.
98. **Abdel Fattah W., Hammad T.** Chondroitin Sulfate and Glucosamine: a review of the Safety Profile // JANA. – 2001. – Vol. 3, № 4. – P. 16-23.
99. **Adam M.** Welche Wirkung haben Gelatinepräparate // Therapiewoche. – 1991. – Vol./1. – P. 2456-2461
100. **Adam M.** Gelatine – Moglicher medizinischer Einsatz // Apotheker Journal Heft. – 1995. – Vol. 9. – P. 18-22
101. **Alves M.L, Straus A., Takahashi H., Michelacci J.M.** Production and characterization of monoclonal-antibodies to shark cartilage proteoglycan // Brazilian journal of medical and biological research. – 1994. – Vol. 27, № 9. – P. 2103–2108.
102. **D,Arce S.M., Carney S.L., Howe T.J.** Preliminary investigation into the purification, NMR analysis, and molecular modeling of chondroitin sulfate epitopes // Carbohydrate research. – 1994. – Vol. 255. – P. 41–59.
103. **Balazs E.A.** The amino sugars: The chemistry and biology of compounds containing amino sugars. – NY, 1965. – P. 401–460.
104. **Bekesi J.G., Bekesi E., Winzler R.J.** Inhibitory effect of D-glycosamine and other sugars on the biosynthesis of protein, ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid in normal and neoplastic tissue // Journal biological chemistry. – 1969. – Vol. 244, № 14. – P. 3766–3772.
105. **Bekesi J.G., Winzler R.J.** Inhibitory effect of D-glycosamine on the growth of Walker 256 carcinosarcoma and on protein, RNA and DNA synthesis // Cancer research. – 1970. – Vol. 30, № 12. – P. 2905–2912.

106. **Bianco P., Silvestrini G., Termine J., Bonucci E.** Immunohistochemical localization of osteonectin in developing human and calf bone using monoclonal antibodies // *Calcify Tissue Interaction*. – 1988. – Vol. 43. – P. 155–161.
107. **Boas N.F.** Method for the determination of hexosamines in tissues // *Journal of Biological Chemistry*. – 1953. – Vol. 204, № 2. – P. 553–565.
108. **Cho J, Kim Y.** Sharks: A potential source of antiangiogenic factors and tumor treatments // *Marine biotechnology*. – 2002. – Vol. 4, № 6. – P. 521–525.
109. **Docherty A.J.P., J.O'Connell, Crable T., Angal S., Murphy G.** The matrix metalloproteinase and their natural inhibitors: prospects for treating degenerative tissue diseases // *Trends Biotechnology*. – 1992. – Vol. 10. – P. 200–207.
110. **De Clerck J.A., Jean T.D, Chan D., Shimada H., Langeley K.E.** Inhibition of tumor invasion of Smooth Muscle Cell Layers by recombinant human metalloproteinase inhibitor // *Cancer Research*. – 1991. – Vol. 51. – P. 2151–2157.
111. **Doyle J.** Aging changes in cartilage from *Squalus acanthias* // *Comparative biochemistry and physiology*. – 1968. – Vol. 25, № 1. – P. 201–206.
112. **Folkman J.** An inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage // *Cancer*. – 1963. – Vol. 16. – P. 453–455.
113. **Folkman J.** Isolation of a cartilage factor that inhibits tumor neovascularisation // *Science*. – 1976. – Vol. 193. – P. 70–71.
114. **Fosang A., Last K., Knauper V., Murphy G., Neame P.** Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13) // *FEBS Letters*. – 1996. – Vol. 380. – P. 17–20.
115. **Grzesik WJ, van der Pluijm G, Gehron Robey P.** Osteoblastbone matrix interactions // *Italic Journal Mineral Elect. Metabolism*. – 1993. – Vol. 7. – P. 253–255.
116. **Hunt S.** Polysaccharide-protein complexes in invertebrates – London, New-York: Academic press, 1970. – 329 p.
117. **Imanari T., Toida T., Koshiishi I., Toyoda H.** Highperformance liquid chromatographic analysis of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides // *Journal of Chromatography A*. – 1996. – Vol. 720. – P. 275–293.
118. **Karamanos N.K., Axelsson S., Vanky P., Tzanakakis G.N., Hjerpe A.** Determination of hyaluronan and galactosaminoglycan disaccharides by high-performance capillary electrophoresis at the attomole level. Applications to analyses of tissue and cell culture proteoglycans // *Journal of Chromatography A*. – 1995. – Vol. 696. – P. 295–305.
119. **Kuettner K., Judith H., Eisenstein R., Harper E.** Collagenase inhibition by cationic proteins derived from cartilage and aorta // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1976. – Vol. 72, № 1. – P. 40–46.
120. **Lafont F, Rouget M., Trellet A., Prochiantz A., Rousselet A.** In vitro control of neuronal polarity by glycosaminoglycans // *Development*. – 1992. – Vol. 144, № 1. – P. 17.
121. **Lane I.W.** Sharks don't get cancer. – Garden City, NY: Avery Publishing Group, 1992
122. **Langmaier F, Mladek M., Kolomaznik K., Sukop S.** Isolation of elastin and collagen polypeptides from long cattle tendons as raw material for the cosmetic industry // *International journal of cosmetic science*. – 2002. – № 24. – P. 273–279.

-
123. **Langer R., Brem H., Falterman K., Klein M., Folkman J.** Isolation of a cartilage factor that inhibits tumor neovascularisation // *Science*. – 1976. – Vol. 193. – P. 70–71.
124. **Lee A., Langer R.** Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis // *Science*. – 1983. – Vol. 221. – P. 1185–1187.
125. **Liang J.H., Wong K.P.** The characterization of angiogenesis inhibitor from shark cartilage // *Advanced Experimental Medical Biology*. – 2000. – Vol. 476. – P. 209–232.
126. **Mashburn T.A., Hoffman J.** The presence of collagen in proteopolysaccharide from shark cartilage // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1967. – Vol. 29, № 5. – P. 686–691.
127. **Masumura Y.** Changes with age of water-binding capacity and acid mucopolysaccharide content in the rat skin // *Journal gerontology*. – 1971. – Vol. 26, № 3. – P. 386–390.
128. **Mignatti P., Tsuboi R., Robbins E., Rifkin B.R.** In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor – induced proteinases // *Journal Cell Biology*. – 1989. – Vol. 108. – P. 671–682.
129. **Miller E.J.** Characterization of notochord collagen as a cartilage type collagen // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1974. – Vol. 60, № 1. – P. 424–430.
130. **Milner J. M., Elliot S.F., Cawston T.E.** Activation of collagenases is a key control point in cartilage collagen matrix degradation // *International journal of experimental pathology*. – 2000. – Vol. 81. – P. 14–15.
131. **Mosher D.F.** *Fibronectin*. – New York: Academic Press, 1989.
132. **Murphy G., Koklitis P., Carne A.F.** Dissociation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) from enzyme complexes yields fully active inhibitor // *Biochemical Journal*. – 1989. – Vol. 261. – P. 1031–1034.
133. **Murphy G.** The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity // *Biochemistry*. – 1991. – Vol. 30. – P. 8097–8102.
134. **Neamen P., Joung C., Treep J.** Primary structure of a protein isolated from Reef Shark cartilage that is similar to the mammalian C-type lectin homolog tetranectine // *Protein science*. – 1992. – Vol.1. – P. 161–168.
135. **Oikawa T, Ashino-Fuse H, Shimamura M, Koide U, Iwaguchi A** A novel angiogenic inhibitor derived from Japanese shark cartilage (I). Extraction and estimation of inhibitory activities toward tumor and embryonic angiogenesis // *Cancer Letters*. – 1990. – Vol. 15. – P. 181–186.
136. **Otsuka K., Pitara S., Overall C.M., Aubin J.E., Sodck J.** Biochemical comparison of fibroblast populations from different periodontal tissues: characterization of matrix protein, and collagenolytic enzyme synthesis // *Bio-chemistry Cell Biology*. – 1988. – Vol. 66. – P. 167–176.
137. **Palmieri L., Conte A.** Metabolic rate of exogenous chondroitin sulfate in the experimental on the animals // *Drug Research*. – 1990. – Vol. 40, № 3. – P. 17–23.
138. **Pool R.** *Proteoglycans in health and disease: structure and function* // *Biochemistry journal*. – 1986. – Vol. 236. – P. 1–14.

139. **Ponton A., Coulombe B., Skup D.** Decreased expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in metastatic tumor cells leading to increased levels of collagenase activity // *Cancer research*. – 1991. – Vol. 51. – P. 2138–2143.

140. **Prince C., Oosawa T., Butler W., Tomana M., Bhowan A., Bhowan M., Schroheuloher R.** Isolation, characterization and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone // *Journal Biology Chemistry*. – 1987. – Vol. 262. – P. 2900-2907.

141. **Prodi G.** Data on dermis mucopolysaccharides and their evolution in growing animals // *Biochemistry et physiology tissue*. – 1966. – P. 33-39.

142. **Prudden J.** The acceleration of wound healing with cartilage // *Surgeon Gynecology*. – 1957. – P. 105-283.

143. **Rama S., Chandrakasan G.** Distribution of different molecular species of collagen in the vertebral cartilage of shark (*Carcharius acutus*) // *Connect Tissue Research*. – 1984. – Vol. 12. – P. 11-19.

144. **Rise J., Willamson M., Price P.** Isolation an sequence of the vitamin-K-depended matrix Gla protein from the calcified cartilage of Soupfi n shark // *Journal an bone and mineral research*. – 1994. – Vol. 9, № 4. – P. 567–576.

145. **Rosenberg L., Johnson B., Schubert M.** Proteinpolysaccharides from human articular and costal cartilage // *Journal clinical investigation*. – 1965. – Vol. 44, № 10. – P. 1647-1656.

146. **Ruuslahti E.** Proteoglycans in cell regulation // *J.Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 264. – P. 13369–13372.

147. **Sage E.N.** Culture chock: selective uptake and rapid release of a novel serum protein by endothelial cells *in vitro* // *The Journal of biological chemistry*. – 1986. – Vol. 261. – P. 7082–7092.

148. **Setnikar A., Giacchetti C.** et al. Pharmacokinetics of Giucosamine in Dog and Man // *Drug Research*. – 1986. – Vol. 36, № 4. – P. 70-73.

149. **Sorgente N., Keuttner K., Soble L., Eisenstein R.** // Lab. investigation, 1975 in Langer R., Brem H., Falterman K., Klein M., Folkman J. Isolation of a cartilage factor that inhibits tumor neovascularisation // *Science*. – 1976. – Vol. 93. – P. 70-71.

150. **Stracke J., Fosang A., Last K., Mercuri F.** Matrix metalloproteinase 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) // *FEBS Letters*. – 2000. – Vol. 478. – P. 52-56.

151. **Sugahara K., Ohi J., Harada T., Dewaard P., Vliegenthart J.** Structural studies on sulfated oligosaccharides devived from the carbohydrateprotein linkage region on chondroitin-6-sulfate proteoglycans of shark cartilage. 1. 6 compaunds compounds containing 0 or 1 sulfate and/ or phosphate residue. 2. 7 compounds containing 2 or 3 sulfate residues // *The Journal of biological chemistry*. – 1992. – Vol. 267. – P. 6027-6043.

152. **Susumu H., Hidetaka Y., Kiyoshi T.** Use of Fourier transform ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy for sulfate placement in chondroitin sulfates // *Journal of Biochemistry*. – 1974. – Vol. 76, № 1. – P. 209-211.

153. **Tanaka K.** Physicochemical properties of chondroitin sulfate // *Journal biochemistry*. – 1978. – Vol. 83. – P. 647-659.

-
154. **Termine J.D, Kleinman H.K, Whitson S.W, Conn K.M, McGarvey M.L, Martin G.R.** Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen // *Cell*. – 1981. – Vol. 26. – P. 99-105.
155. **Timothy E, Michael P.** Glucosamine and Chondroitin for Treatment of Osteoarthritis // *JANA*. – March 15. – 2000. – Vol. 283, № 11. – P. 33-37.
156. **Tryggvason K., Hoyhtya M., Salo T.** Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion // *Biochemistry Biophysical Acta* – 1987. – Vol. 907. – P. 191-217.
157. **Wewer U., Ibaraci K.** A potential role for tetranectin in mineralisation during osteogenesis // *Journal of cell biology*. – 1994. – Vol. 127. – P. 1767-1769.
158. **Yip D., Ahmad A., Karapetis C., Hawkins C., Harper P.** Matrix metalloproteinase inhibitors: applications in oncology // *Investigational new drugs*. – 1999. – Vol. 17. – P. 387-399.

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ | 3 |
| Глава 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ ЖИВОТНЫХ | 4 |
| 1.1. Гликозаминогликаны: хондроитинсульфаты, гиалуроновая кислота | 5 |
| 1.2. Коллаген..... | 8 |
| 1.3. Белки неколлагеновой природы..... | 13 |
| 1.4. Компоненты, регулирующие метаболизм хрящевой ткани | 16 |
| 1.5. Металлозависимые матриксные протеиназы (МПП) и тканевые ингибиторы металлопротеиназ матрикса (ТИМП)..... | 17 |
| Глава 2. СОСТАВ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ ИЗ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ ГИДРОБИОНТОВ | 23 |
| 2.1. Содержание гексозаминов, хондроитинсульфатов, гиалуроновой кислоты, гексоз, коллагена и неколлагеновых белков | 23 |
| 2.2. Фракционный состав ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов..... | 25 |
| 2.3. Исследование состава свободных дисахаридов | 30 |
| 2.4. Аминокислотный состав ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов..... | 34 |
| 2.5. Минеральный состав ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов..... | 35 |
| 2.6. Антипротеазная активность препаратов из хрящевой ткани гидробионтов..... | 36 |
| Глава 3. ХОНДРОПРОТЕКТОРНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ИЗ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ ГИДРОБИОНТОВ | 39 |
| 3.1. Биологическая активность компонентов, входящих в состав хрящевой ткани | 39 |
| 3.2. Изменения метаболизма в хрящевой ткани при остеоартрозе (по М. Адаму) | 41 |
| 3.3. Влияние коллагенового гидролизата на течение остеоартроза | 42 |
| 3.4. Использование препаратов из хрящевой ткани в качестве противоопухолевых средств..... | 44 |
| Глава 4. ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАД К ПИЩЕ «АРТРОФИШ» | 46 |
| 4.1. Исследование острой токсичности Артрофиша..... | 46 |
| 4.2. Испытания влияния ферментативного гидролизата из хрящевой ткани акулы (<i>Somniosus Pacificus</i>) на развитие индуцированной бензопиреном опухоли | 46 |

| | |
|--|----|
| 4.3. Противовоспалительный эффект гидролизата из тканей гидробионтов..... | 47 |
| 4.4. Влияние гидролизата из тканей гидробионтов на экспрессию активационных мембранных молекул лимфоцитов периферической крови | 49 |
| 4.5. Эффективность «Артрофиша» при полиостеоартрозе | 51 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 53 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 54 |

Научное издание

Пивненко Татьяна Николаевна
Ковалев Николай Николаевич
Запорожец Татьяна Станиславовна

**БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА
К ПИЩЕ «АРТРОФИШ»
(в помощь практическому врачу)**

Монография



Компьютерный набор, корректура
и форматирование автора
Технический редактор Кулакова Г.А.
Подписано в печать 07.05.2015
Бумага офсетная.
Гарнитура PetersburgС
Формат 60×84 1/8
Печать трафаретная. Печ. л. 8,25.
Тираж 500 экз. Заказ № 022-15.

Отпечатано в типографии ИД «Академия Естествознания»,
440026, г. Пенза, ул. Лермонтова, 3