

УДК 664.951.014:577.15

Г.Ю. Суховерхова¹, Т.Н. Пивненко¹, Н.Н. Ковалев¹,
С.В. Суховерхов^{2*}

¹ Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр,
690091, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4;

² Институт химии ДВО РАН, 690022, г. Владивосток,
пр. 100-летия Владивостока, 159

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА ДЛЯ АНАЛИЗА СВОБОДНЫХ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ И НЕСУЛЬФАТИРОВАННЫХ ДИСАХАРИДОВ В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТАХ ИЗ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ ГИДРОБИОНТОВ

Оценена возможность использования метода капиллярного электрофореза для анализа свободных сульфатированных и несulfатированных дисахаридов в препаратах из хрящевой ткани гидробионтов, полученных методом ферментативного гидролиза. Установлено, что наибольшее количество свободных дисахаридов образуется при гидролизе хрящевой ткани гидробионтов ферментами, обладающими и протеолитической, и коллагенолитической активностью (комплексный ферментный препарат из гепатопанкреаса краба). Определено, что гидролизат из хрящевой ткани лососевых рыб кроме моно- и дисульфатированных дисахаридов хондроитинсульфата содержит трисульфатированные.

Ключевые слова: дисахариды, капиллярный электрофорез, хрящевая ткань гидробионтов.

Suhoverhova G.Yu., Pivnenko T.N., Kovalev N.N., Suhoverhov S.V. Using the capillary electrophoresis for analysis of free sulfated and unsulfated disaccharides of chondroitin sulfate in hydrolytic preparations from cartilage tissue of marine animals // *Izv. TINRO*. — 2010. — Vol. 161. — P. 309–317.

Possibility of the capillary electrophoresis method application for analysis of free sulfated and unsulfated disaccharides in preparations from cartilage tissue of marine animals is evaluated. The most amount of free disaccharides is formed by selective hydrolysis of the cartilage tissue with the enzymes possessing both proteolytic and collagenolytic activity (as the enzyme complex from hepatopancreas of crabs). Using of enzymatic preparations with different substrate specificity provides different ratio of components with sulfated and unsulfated structure. The preparation from cartilage

* Суховерхова Галина Юрьевна, кандидат технических наук, научный сотрудник, e-mail: tinro@tinro.ru; Пивненко Татьяна Николаевна, доктор биологических наук, заведующая сектором, e-mail: pivnenko@tinro.ru; Ковалев Николай Николаевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией, e-mail: kovalevnn@tinro.ru; Суховерхов Станислав Валерьевич, кандидат химических наук, заведующий лабораторией, e-mail: sv28@nm.ru.

tissue of salmon, except of mono- and disulfated disaccharides, contains trisulfated disaccharides in the chondroitin sulfate. The hydrolyzate from squids tissue is distinguished by the highest content of the unsulfated disaccharides.

Key words: free sulfated disaccharide, free unsulfated disaccharide, capillary electrophoresis, cartilage.

Введение

Гликозаминогликаны — основные компоненты хрящевой ткани животных — представлены в основном 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 несульфатированные (гиалуроновая кислота и хондроитин) и сульфатированные (хондроитинсульфаты). Благодаря обилию сульфатных, а также карбоксильных групп уроновой кислоты гликозаминогликаны являются полианионами и имеют отрицательный заряд, что позволяет им связываться с белками и липидами (Кочетков, 1967; Степаненко, 1978; Pool, 1986; Ruoslahti, 1989). Активность гликозаминогликанов, обусловленная их полианионной структурой, зависит от наличия в каждой дисахаридной единице хотя бы одной отрицательно заряженной карбоксильной или сульфатной группы, обеспечивающей высокую гидрофильность и поверхностно-активные свойства (Игнатова, Гуров, 1990; Шитов, 1992; Алексеева и др., 1995; Данилевская, Николаев, 2002).

Известно, что хондроитинсульфаты животного происхождения сульфатированы преимущественно в положениях С-4 и С-6 галактозамина и очень редко в положении С-2 уроновой кислоты. Гликозаминогликаны хрящевой ткани гидробионтов предположительно обладают более высокой степенью сульфатирования в отличие от хондроитинсульфатов из хрящей теплокровных животных (Doyle, 1968; Hunt, 1970; Кузьмин, Сафронова, 1974; Sugahara et al., 1992, 1996).

Многочисленные работы по выделению гликозаминогликанов свидетельствуют о востребованности таких препаратов, однако большинство из них касаются переработки тканей сельскохозяйственных животных (Клычкова, 2004; Пат. РФ № 2082416, № 2096038, № 2139716, № 2181292, № 2250047; Пат. US № 6149946). В связи с этим практическую значимость приобрела задача качественной идентификации и количественного определения хондроитинсульфатов, гиалуроновой кислоты и продуктов их гидролиза в смесях с сопутствующими соединениями.

Современным общепринятым методом анализа смеси подобных соединений является ВЭЖХ (Imanari et al., 1996). Однако исследование состава хондроитинсульфатов методом ВЭЖХ требует предварительного синтеза производных, для чего необходимы дорогостоящие реактивы и специфичные хроматографические колонки. Альтернативой анализа водорастворимых образцов, содержащих свободные гликозаминогликаны, является метод капиллярного электрофореза (Karamanos et al., 1995; Kitagawa et al., 1995), который основан на разделении компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием электрического поля, параметры электромиграции специфичны для каждого сорта заряженных частиц. Диффузионные, сорбционные, конвекционные, гравитационные факторы в капилляре существенно ослаблены, благодаря чему достигается рекордная эффективность разделения.

Цель настоящей работы — исследование качественного и количественного состава свободных дисахаридов в гидролизатах из хрящевой ткани гидробионтов и возможности использования капиллярного электрофореза для контроля качества выпускаемой продукции.

Материалы и методы

Материалами исследования служили препараты из хрящевой ткани акулы *Somniosus antarcticus*, ската *Bathyrāja aleutica*, осетра *Huso dauricus*, лосося *Oncorhynchus gorbuscha*, хрящеподобной ткани кальмара *Ommastrephes bartrami*. Препараты были получены методом ферментативного гидролиза по технологии, разработанной в ТИПРО-центре (Пат. РФ № 2250047) с помощью коллагеназы краба (ТУ № 9280-055-02698170-00) — комплексного ферментного препарата из гепатопанкреаса краба с удельной активностью по казеину 200 Е/г и протамекса — коммерческого ферментного препарата из *Bacillus protease* с удельной активностью 300 Е/г (Гигиеническое заключение № 77.99.9.916.П.15411.10.00).

Разделение дисахаридов проводили на приборе “Капель-105” (Люмэкс, Россия) на кварцевом капилляре (внутренний диаметр 75 мкм, общая длина капилляра 60 см, эффективная длина капилляра 55 см), детекция при длине волны 210 нм и температуре 25 °С. Перед нанесением пробы капилляр промывали 0,1 М NaOH в течение 1 мин, затем рабочим буфером (15 мМ натрий — ортофосфатный буфер с рН 3,00) в течение 4 мин. Пробу препарата (концентрация 1 мг/мл) растворяли в бидистиллированной воде, пропускали через мембранный фильтр с порами размером 0,45 мкм. Пробу в капилляр вносили автоматически, под давлением 30 мбар, объемом 1,0 мкл в течение 10 с. Разделение проводили при 20 кВ в рабочем буфере в течение 20 мин со скоростью потока 1 мл/мин в обратной полярности. В данных условиях искомые соединения мигрируют от катода (–) к аноду (+) согласно электрофоретической подвижности и против электроосмотического потока буфера.

Результаты были обчислены с помощью программно-аппаратного комплекса для сбора и обработки хроматографических данных МультиХром (версия 1.6 х) (Каламбет, 2003). Количественную оценку определяемых в препаратах свободных дисахаридов выражали в процентах от всей суммы содержащихся сульфатированных и несulfатированных дисахаридов.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что ферментативные гидролизаты из хрящевой ткани гидробионтов (БАД к пище “Артротин”), в составе которых выявлены свободные пептиды, аминокислоты, гексозамины и хондроитинсульфаты, содержат от 2 до 6 % аминсахаров (Пивненко и др., 2003; Клычкова, 2004). Биологическая активность хондроитинсульфатов зависит от химического строения полисахарида, числа функциональных групп, молекулярной массы. Практический интерес представляют свободные хондроитинсульфаты, а точнее ди- и трисульфатированные дисахариды хондроитинсульфата, так как известно, что именно низкомолекулярные хондроитинсульфаты при пероральном применении обладают высокой усвояемостью (Abdel Fattah, Hammad, 2001; Данилевская, Николаев, 2002).

Используемый нами ранее (Пивненко и др., 2003) хроматографический метод совместного анализа белков и полисахаридов не позволил идентифицировать свободные аминсахара. В настоящей работе воспроизведен метод определения методом капиллярного электрофореза несulfатированных дисахаридов гиалуроновой кислоты и различно сульфатированных дисахаридов хондроитинсульфатов как производных ферментативного гидролиза гликозаминогликанов хондроитиназами (Karamanos et al., 1995). Структуры дисахаридов представлены на рис. 1. Был исследован качественный состав и определено количественное содержание дисахаридов хондроитинсульфата и дисахаридов гиалуроновой кислоты (после гидролиза хрящевой ткани протеиназами), имеющих аналогичные структуры и способных разделяться в условиях предложенного метода.

Предполагаемый механизм гидролиза протеогликановой молекулы различными ферментами, с отщеплением свободных дисахаридов представлен на схеме, предложенной Я. Мусилом с соавторами (1984) (рис. 2).

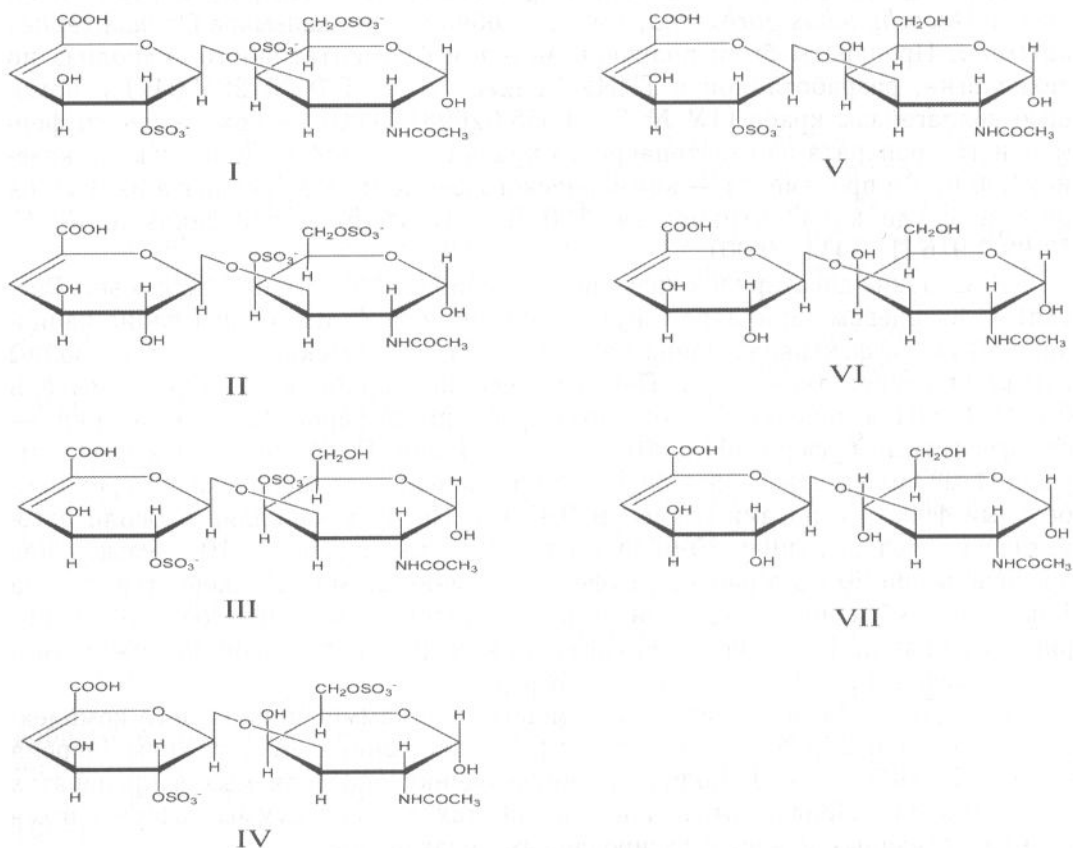


Рис. 1. Структуры Δ-дисахаридов хондроитинсульфата (I — Δ-ди(2,4,6)трисульфатированный; II — Δ-ди(4,6)дисульфатированный; III — Δ-ди(2,4)дисульфатированный; IV — Δ-ди(2,6)дисульфатированный; V — Δ-ди(2)моносульфатированный; VI — Δ-динесульфатированный) и гиалуроновой кислоты (VII — Δ-динесульфатированный)

Fig. 1. Structures of Δ-disaccharides of chondroitin sulfate (I — Δ-di(2,4,6)trisulfated; II — Δ-di(4,6)disulfated; III — Δ-di(2,4)disulfated; IV — Δ-di(2,6)disulfated; V — Δ-di(2)monosulfated; VI — Δ-diunsulfated) and Δ-disaccharides of hyaluronic acid (VII — Δ-diunsulfated)

Качественный состав свободных сахаров в ферментативных гидролизатах из хрящевой ткани гидробионтов представлен три-, ди-, моно- и несульфатированными дисахаридами (структуры I–VII). Состав дисахаридов при применении одинаковых способов обработки имеет выраженную видоспецифичность. Отмечено высокое содержание во всех препаратах несульфатированных дисахаридных остатков хондроитина и гиалуроновой кислоты (структуры VI и VII).

Препараты из хрящевых рыб (акулы, ската и осетра) были очень похожи по соотношению дисахаридов (рис. 1, 3 и 4, А, Б, В). Они преимущественно содержали несульфатированные (68–86 %), моно- и дисульфатированные дисахариды (14–30 %). Как видно на диаграммах, во всех препаратах из хрящевых рыб содержится минимальное количество дисульфатированных дисахаридов с сульфатными группами в положениях 2, 4 (III), а для ската и осетра также 2, 6 (IV). Преобладают моносульфатированный дисахарид (V) и дисульфатированный дисахарид с сульфогруппой в положениях 4, 6 (II).

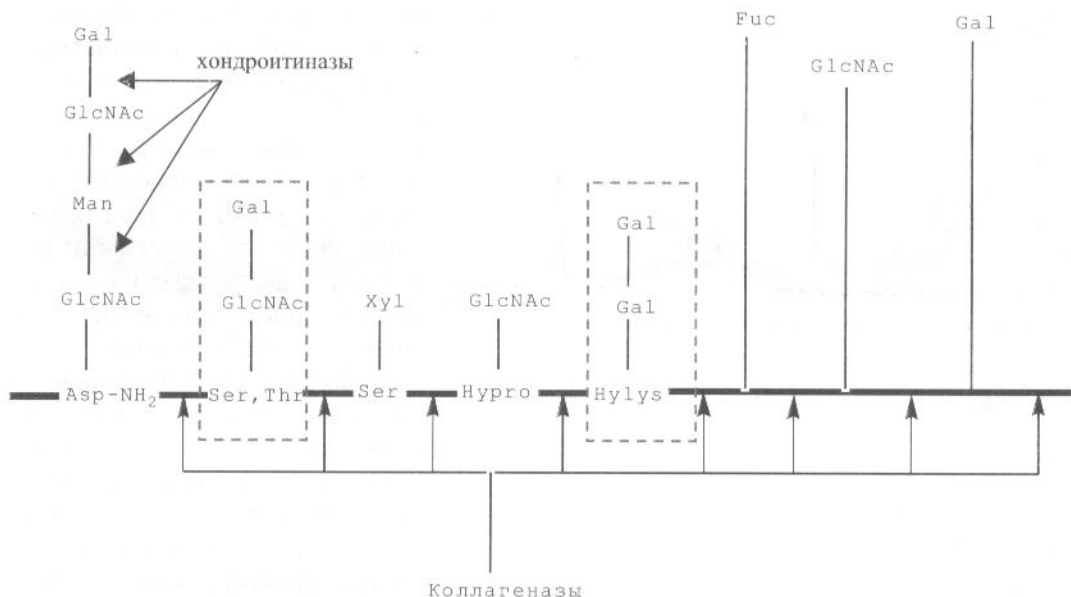


Рис. 2. Схема ферментативного расщепления высокомолекулярных компонентов соединительной ткани протеолитическими ферментами (Мусил и др., 1984). Указаны места действия хондроитиназ и коллагенолитических ферментов

Fig. 2. Scheme of proteolytic enzymatic digestion of high molecular compounds of connective tissue (Мусил и др., 1984). The sites of proteases and collagenases action are shown

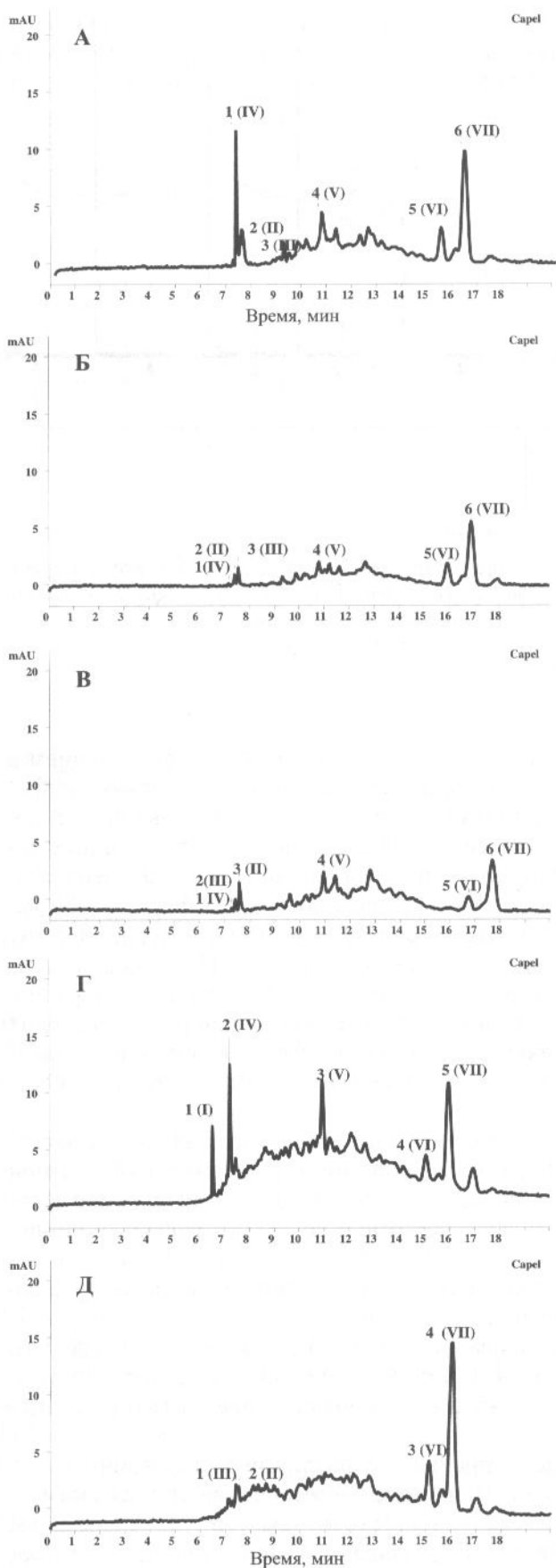
Препарат из хрящевой ткани лосося (рис. 1, 3 и 4, Г) отличался наличием в его составе трисульфатированного дисахарида (структура I). Из дисульфатированных дисахаридов был обнаружен только компонент, сульфатированный в положениях 2, 6 (структура IV). Для лососей количество несульфатированных дисахаридов (структуры VI и VII) минимально по сравнению с другими препаратами и составляет 61 %; количество всех сульфатированных дисахаридов — 39 %.

Препарат из хрящевой ткани кальмара (рис. 3 и 4, Д) по содержанию несульфатированных дисахаридов превосходит все исследуемые. Их общее количество составляет 95 % (структуры VII и VI), из них 78 % дисахаридов гиалуроновой кислоты (VII). При этом препарат из хрящевой ткани кальмара не содержит три- и моносульфатированных дисахаридов. Из дисульфатированных компонентов идентифицированы структуры II и III, количество которых составляет соответственно 3 и 2 %.

В ходе работы было проведено сравнение состава свободных дисахаридов, полученных с использованием ферментных препаратов с различной субстратной специфичностью. При этом были использованы только протеолитические ферменты, а результатом процесса было высвобождение не только белковых компонентов, но и полисахаридов. Вероятно, с помощью используемых ферментов отщепляются дисахариды, которые могли быть связаны с белковой частью хрящевой ткани в процессе гликозилирования проколлагена.

Использование в процессе гидролиза ферментного препарата, обладающего только протеолитической активностью (протамекс), позволило получить ферментативный гидролизат с меньшим содержанием свободных трисульфатированных дисахаридов (рис. 5).

Коллагеназа краба и протамекс проявляют различную специфичность в отношении хрящевой ткани, о чем свидетельствует соотношение трисульфатированных и моносульфатированных дисахаридов (структуры I и V). С помощью протамекса удалось получить препарат с преобладанием моносульфатированных



дисахаридов. При использовании коллагеназы краба происходит более глубокий гидролиз коллагена хрящевой ткани, что приводит к высвобождению большего количества дисахаридов. Однако, как видно из данных таблицы, соотношение сульфатированных и несulfатированных дисахаридов практически не зависит от типа фермента.

Логическим продолжением проделанной работы было бы сравнение биологической активности препаратов различного состава. Однако гистоморфологические исследования не позволили установить таковые различия. Вероятно, нужно найти более тонкую модель для подобных исследований и подобрать более чувствительные биомаркеры.

Рис. 3. Электрофореграммы компонентов, содержащихся в ферментативных гидролизатах из хрящевой ткани акулы (А), ската (Б), осетра (В), лосося (Г) и кальмара (Д), полученных с помощью коллагеназы краба. На оси ординат (mAU) — единицы оптической плотности $\times 10^{-3}$. В скобках номера структур, соответствующих рис. 1

Fig. 3. Electrophoregrams of the components in enzymatic hydrolyzates from cartilage tissues of shark (А), skate (Б), sturgeon (В), salmon (Г), and squid (Д), extracted with using the crab collagenase. Ordinates — absorption units $\times 10^{-3}$ (mAU); in brackets — the numbers of structures from Fig. 1

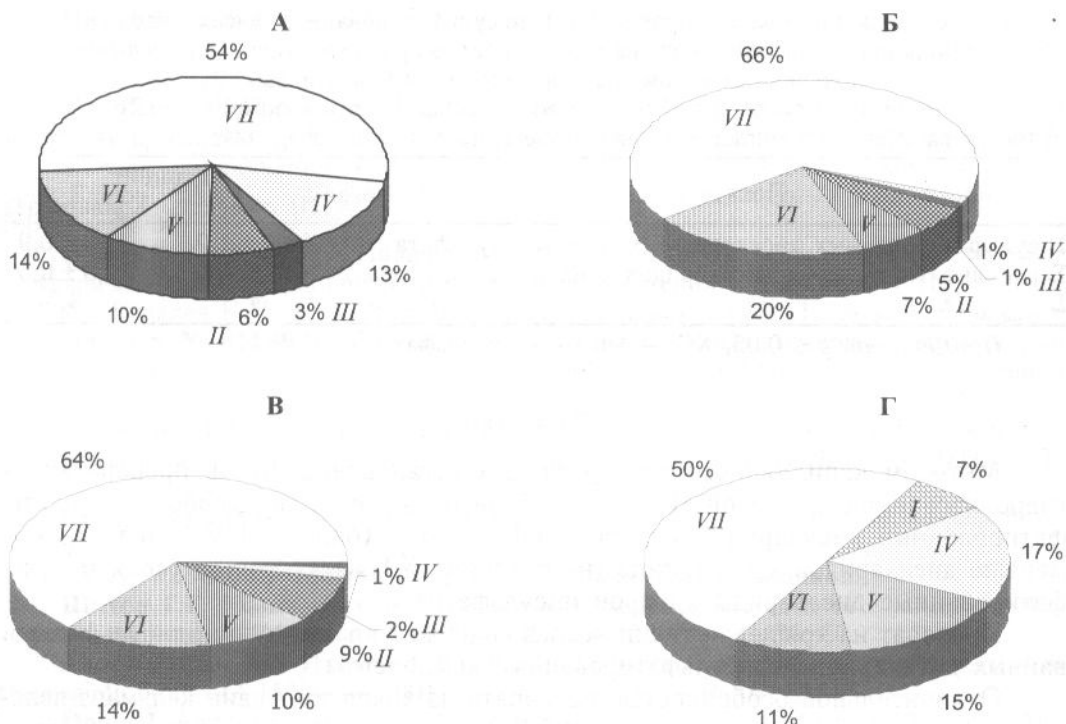


Рис. 4. Качественный состав свободных дисахаридов (структуры I–VII) ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани акулы (А), ската (Б), осетра (В), лосося (Г) и кальмара (Д) после гидролиза коллагеназой краба

Fig. 4. Qualitative composition of free disaccharides (structures I–VII) in enzymatic hydrolyzates from cartilage tissues of shark (А), skate (Б), sturgeon (В), salmon (Г), and squid (Д), extracted with using the crab collagenase

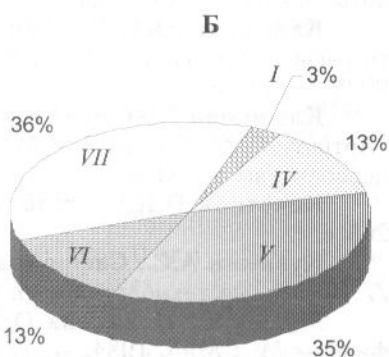
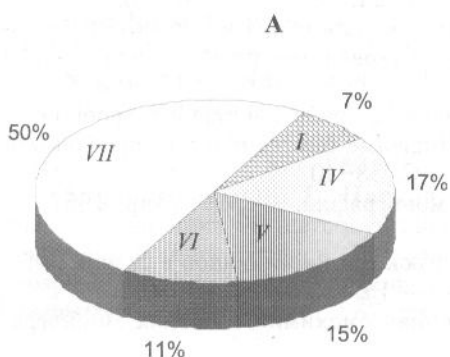
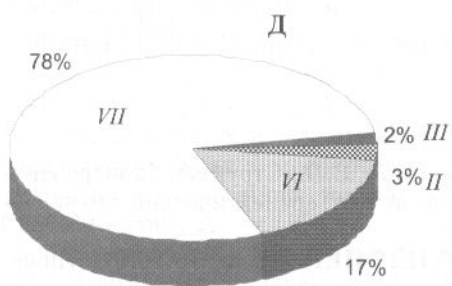


Рис. 5. Качественный состав свободных дисахаридов (структуры I–VII), содержащихся в препаратах из костно-хрящевой ткани лосося после гидролиза коллагеназой (А) и протомексом (Б)

Fig. 5. Qualitative composition of free disaccharides (structures I–VII) in enzymatic hydrolyzates from cartilage tissues of salmon extracted with using the crab collagenase (А) and in bacterial enzyme — protamex (Б)

Содержание сульфатированных и несulfатированных дисахаридов хондроитинсульфатов в препарате из костно-хрящевой ткани лососевых, полученных с помощью протамекса и коллагеназы, %

Contents of sulfated and unsulfated disaccharides of chondroitin sulfate in the preparation from salmon cartilage tissue extracted with collagenase and protamex, %

Показатель	Фермент	
	Протамекс	Коллагеназа
Σ сульфатированных дисахаридов хондроитинсульфата	$51,0 \pm 1,0$	$37,0 \pm 0,9$
Σ несulfатированных дисахаридов хондроитинсульфата	$13,0 \pm 0,6$	$12,0 \pm 0,5$
Σ сульф. ХС / Σ несulf. ХС	4	3

Примечание. $p \leq 0,05$, ХС — хондроитинсульфат.

Выводы

Методом капиллярного электрофореза установлено, что в препаратах из гидролизованной хрящевой ткани гидробионтов преобладают свободные несulfатированные дисахариды гиалуриновой кислоты (более 50 %), значительно меньше дисахаридов хондроитина (не более 20 %), остальное составляют сульфатированные дисахариды хондроитинсульфатов.

Препарат из хрящевой ткани лосося содержит кроме моно- и дисulfатированных дисахаридов трисульфатированные компоненты.

Отличительной особенностью препарата из хрящевой ткани кальмара является наиболее высокое содержание (95 %) несulfатированных дисахаридов.

Использование для гидролиза хрящевой ткани протеолитических ферментов с различной субстратной специфичностью позволяет получать препараты с различными соотношениями сульфатированных и несulfатированных компонентов.

Список литературы

Алексеева Л.И., Беневоленская Л.И., Насонов Е.Л. Структур (хондроитинсульфат) — новое средство для лечения остеоартроза // Терапевтический архив. — 1995. — № 5. — С. 25–30.

Гигиеническое заключение № 77.99.9.916.П.15411.10.00 от 30.10.00. Пищевая добавка — ферментный препарат “Протамекс”.

Данилевская Н.В., Николаев А.А. Хондропротекторы и их использование в ветеринарии // Ветеринар. — 2002. — № 3. — С. 17–20.

Игнатова Е.Ю., Гуров А.Н. Принципы извлечения и очистки гиалуриновой кислоты (обзор) // Хим. фармацевт. журн. — 1990. — Т. 24, № 3. — С. 42–46.

Каламбет Ю.А. Программно-аппаратный комплекс для сбора и обработки хроматографических данных МультиХром. Версия 1.6x : руководство пользователя. — М., 2003. — 122 с.

Клычкова Г.Ю. Биологически активная добавка из хрящевой ткани гидробионтов “Артротин” // Мат-лы 2-го Междунар. симпоз. “Пищевые биотехнологии: проблемы и перспективы в XXI веке”. — Владивосток, 2004. — С. 38–40.

Кочетков Н.К. Методы химии углеводов : монография. — М. : Мир, 1967. — 268 с.

Кузьмин А.С., Сафронова Т.М. Выявление глюкозаминогликанов в тканях рыбы // Исслед. по технологии рыб. продуктов. — 1974. — Вып. 5. — С. 79–80.

Мусил Я., Новакова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах : монография. — М. : Мир, 1984. — 171 с.

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. // Бюл. изобрет. — 1997. — № 4.

Пат. РФ № 2096038. Способ получения агрегатов протеогликанов из соединительной ткани животного / Кузьмина С.А., Бычков С.М., Маклакова И.А., Багров С.Н. // Бюл. изобрет. — 1999. — № 13.

Пат. РФ № 2139716. Способ получения агрегатов протеогликанов из хряща сельскохозяйственных животных / Кузьмина С.А., Баньковская Е.О., Иванов С.Ю., Ларионов Е.В. // Бюл. изобрет. — 1999. — № 29.

Пат. РФ № 2181292. Экстракты акульего хряща, обладающие противоклаге-нолитическим, противовоспалительным, антиангиогенным и противоопухолевым действием, способ получения, способы применения и содержащие их композиции / Эрик Дюпон (СА), Поль Бразо (СА), Кристина Жюно (СА) и др. // Бюл. изобрет. — 2002. — № 36.

Пат. РФ № 2250047. Пищевой общеукрепляющий профилактический продукт из хрящевой ткани гидробионтов и способ его получения / Пивненко Т.Н., Клычкова Г.Ю., Ковалев Н.Н. и др. // Бюл. изобрет. — 2005. — № 11.

Пат. US № 6149946. Способ и продукт с использованием хорды осетровых рыб для облегчения симптомов артрита / Aoyagi Seiji, Demichele Stephen J. // Изобретения стран мира. — 2001. — № 22.

Пивненко Т.Н., Клычкова Г.Ю., Ковалев Н.Н., Эпштейн Л.М. Состав и биологическая активность хрящевой ткани гидробионтов // Изв. ТИПРО. — 2003. — Т. 133. — С. 325–332.

Степаненко Н.Б. Химия и биохимия углеводов (полисахариды) : монография. — М., 1978. — 288 с.

ТУ № 9280-055-02698170-00 Коллагеназа краба пищевая.

Шитов Г.Г. Новые подходы к созданию лекарственных средств с хондропротекторными свойствами // Вестн. РАМН. — 1992. — № 5. — С. 26–30.

Abdel Fattah W., Hammad T. Chondroitin sulfate and glucosamine: a review of their safety profile // JANA. — 2001. — Vol. 3, iss. 4. — P. 16–23.

Doyle J. Aging changes in cartilage from *Squalus Acanthias* // Comp. Biochem. And Physiol. — 1968. — Vol. 25, № 1. — P. 201–206.

Hunt S. Polysaccharide-protein complexes in invertebrates. — L.; N.Y. : Acad. Press, 1970. — 329 p.

Imanari T., Toida T., Koshiishi I., Toyoda H. High-performance liquid chromatographic analysis of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides // J. of Chromatography A. — 1996. — Vol. 720. — P. 275–293.

Karamanos N.K., Axelsson S., Vanky P. et al. Determination of hyaluronan and galactosaminoglycan disaccharides by high-performance capillary electrophoresis at the attomole level. Applications to analyses of tissue and cell culture proteoglycans // J. of Chromatography A. — 1995. — Vol. 696. — P. 295–305.

Kitagawa H., Kinoshita A., Sugahara K. Microanalysis of glycosaminoglycan-derived disaccharides labeled with the fluorophore 2-aminoacridone by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography // Analytical biochemistry. — 1995. — Vol. 232. — P. 114–121.

Pool A.R. Proteoglycans in health and disease: structure and function // Biochemistry J. — 1986. — Vol. 236. — P. 1–14.

Ruoslahti E. Proteoglycans in cell regulation // J. of Biological Chemistry. — 1989. — Vol. 264, iss. 23. — P. 13369–13372.

Sugahara K., Nadanaka S., Takeda K., Kojima T. Structural analysis of unsaturated hexasaccharides isolated from shark cartilage chondroitinesulfate-D that are substrates for the exolytic action of chondroitin ABC lyase // European J. of Biochemistry. — 1996. — Vol. 239, iss. 3. — P. 871–880.

Sugahara K., Ohi J., Harada T. et al. Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region on chondroitin-6-sulfate proteoglycans of shark cartilage. 1. 6 compounds containing 0 or 1 sulfate and/or phosphate residue. 2. 7 compounds containing 2 or 3 sulfate residues // J. of Biological Chemistry. — 1992. — Vol. 267, iss. 9. — P. 6027–6043.

Поступила в редакцию 2.03.10 г.