

**РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСА
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ КОЛЛАГЕНА
И ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ ДЛЯ
ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНЕЙ
ОПОРНО-ДВИГАТЕЛЬНОГО АППАРАТА**

**Николаева Т.И., Молчанов М.В.
Лауринавичюс К.С., Кузнецова
С.М., Емельяненко В.И.,
Шеховцов П.В.**

***ИТЭБ РАН, ИБФМ РАН
Московская обл., г. Пущино***

Болезни опорно-двигательного аппарата человека представляют как медицинскую, так и биологическую проблему. Заболевания костей и суставов сопровождаются разрушением соединительных тканей, их структурных компонентов: коллагеновых фибрилл и протеогликанов.

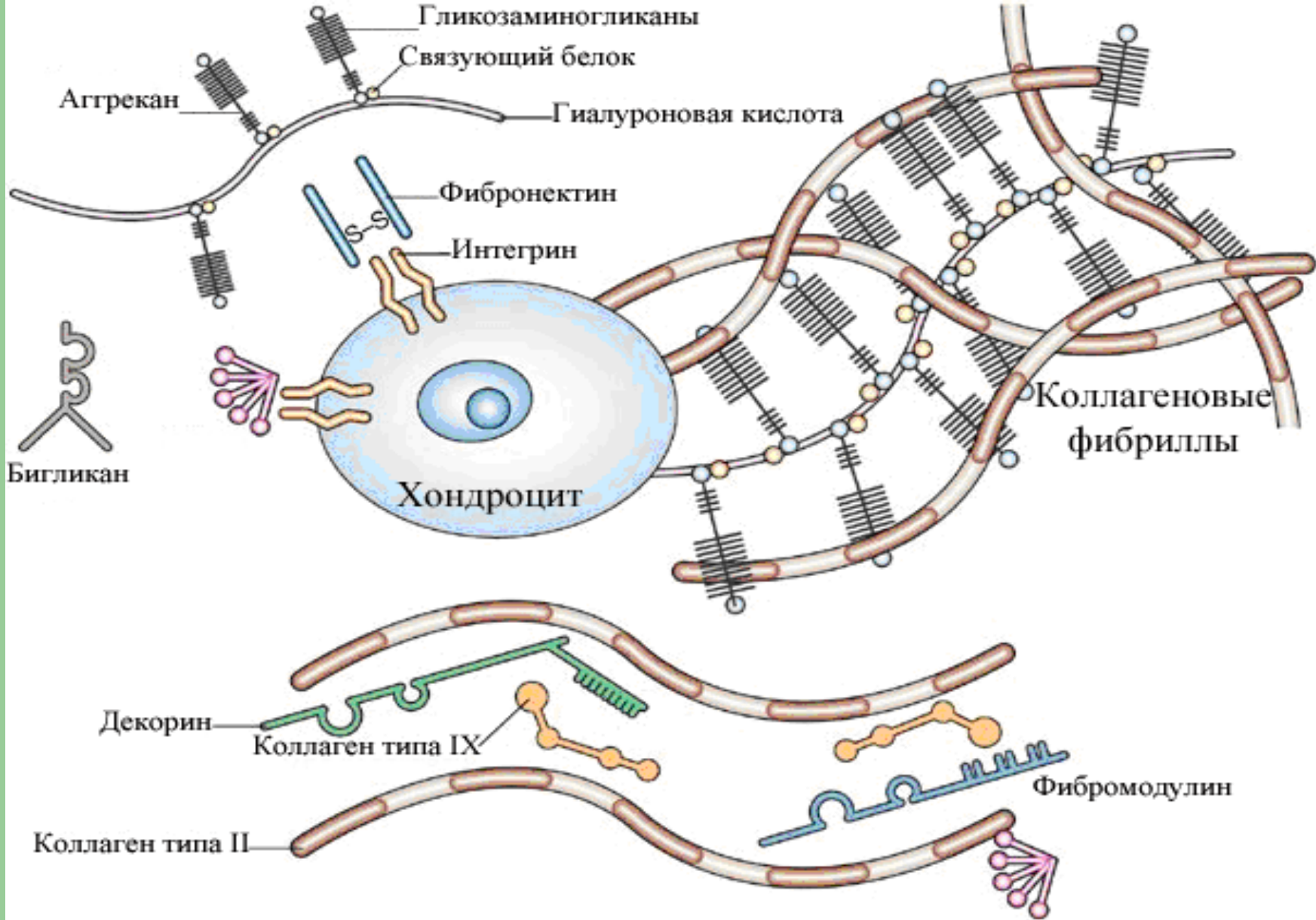


Рис. 1. Схематическое изображение внеклеточного матрикса хрящевой ткани

В последние 20 лет в медицине с целью профилактики и лечения болезней человека применяют нутрицевтики (биологически активные добавки). Одной из попыток во многих странах является использование гликозаминогликанов (природные и синтетические хондропротекторы), которые восстанавливают соединительные ткани не полностью. Другой попыткой является применение гидролизатов коллагена.

1. Германия : Клинические исследования в Англии, Германии, США выявили улучшение функций суставов лишь в Германии.

Moskovich R.W. Semin. Arthritis Rheum. 2000. V. 30. P. 87-99.

2. США: Эффективны коллагеновые гидролизаты с витаминами С, D.

Lopez H. L. Amer. Acad. Physic. Med. Rehab. 2012. V. 4. P. S155 - S168.

3. Нидерланды: Стимулирующее действие - после 6 мес. приёма.

Van Vijven J.P., Luijsterburg P.A., Verhagen A.P., van Osch G.J., Kloppenburg M., Bierma-Zeinstra S.M. Osteoarthritis Cartilage. 2012. V. 20. N 8. P. 809 – 821.

Одним из перспективных решений этой проблемы является получение гидролизованного коллагена, содержащего низкомолекулярные (короткие) пептиды, в комплексе с гликозаминогликанами.

Низкомолекулярные пептиды могут выполнять не только **строительную**, но и **регуляторную** функцию. Известно, что пептиды коллагена регулируют функции нейроэндокринной и иммунной систем. Глипролины Pro-Gly-Pro, Gly-Pro, Pro-Gly активизируют также протекторно-защитный эффект в желудке и ускорение заживления язв (*Бакаева З.В. и др. // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2018. Т.165. С.438-442*).

Недостающие концентрации коллагена и протеогликанов можно восполнить веществами, содержащимися в соединительных тканях сельскохозяйственных животных. Мы разработали природоподобную технологию получения комплексов низкомолекулярных пептидов коллагена с гликозаминогликанами, которая включает последовательные этапы от работы с сырьём до ферментативного гидролиза.

**Таблица 1. Параметры гомогенизации
гиалиновых хрящей из трахей крупного рогатого скота**

| Образец | t (время гомогенизации) | P (давление) | T (температура, С) | Размеры частиц (нм) |
|----------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| А | 10, 10, 30 мин. | 40, 60, 80 МПа | 30°, 45°, 60° С | 380 |
| В | 10, 10, 10 мин. | 40, 60, 80 МПа | 30°, 45°, 60-65° С | 374 |
| С | 15, 15, 15 мин. | 40, 60, 80 МПа | 30°, 45°, 65-70° С | 300 |
| Е | 15, 15, 35 мин. | 40, 60, 80 МПа | 30°, 45°, 70° С | 319 |
| Ф | 15, 15, 15, 10 мин. | 40, 60, 80, 100 МПа | 30°, 45°, 70°, 80- 85° С | 393 |

Исследование физико-химических свойств гомогенатов

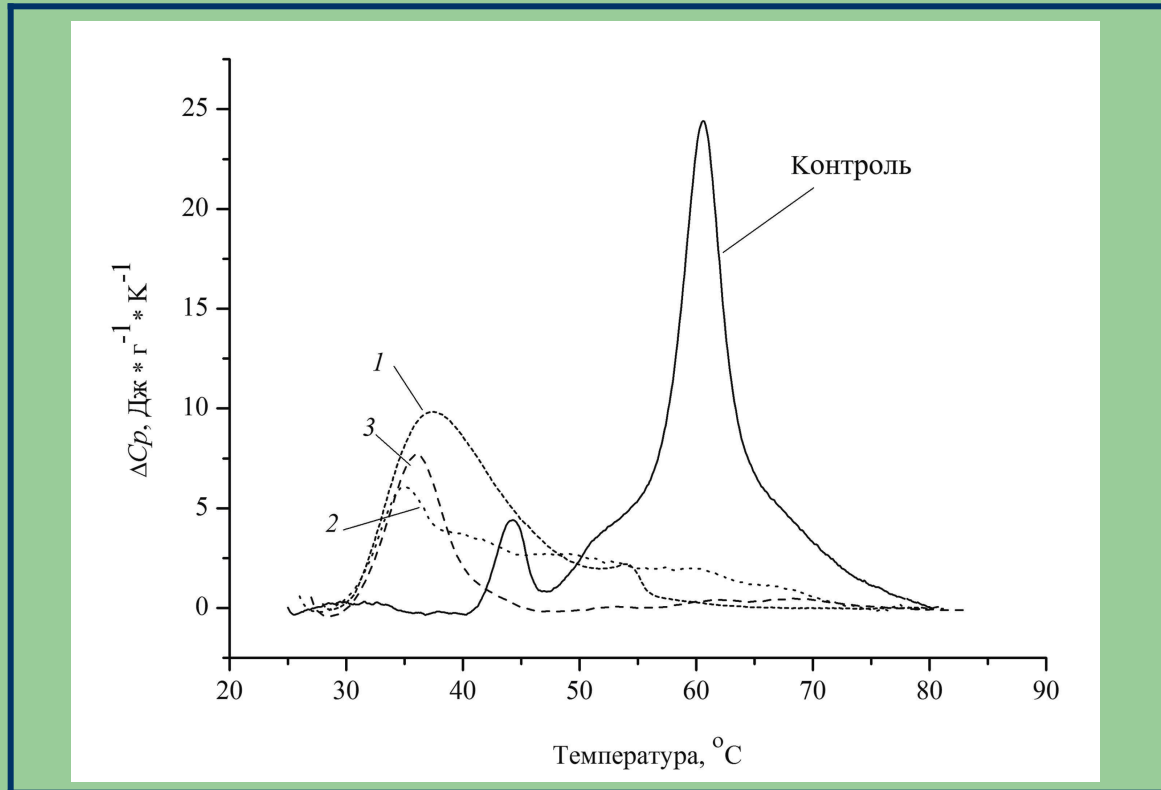


Рис. 2. Температурные зависимости избыточной удельной теплоёмкости коллагена в образцах гиалиновых хрящей при высоких значениях давления и температуры гомогенизации. 1 – образец после гомогенизации при температуре 70° С; 2 – образец, гомогенизированный при температуре 70° С, охлаждённый до 20° С, а затем термостатированный при 70° С и атмосферном давлении; 3 – образец после гомогенизации при температуре 80° С.

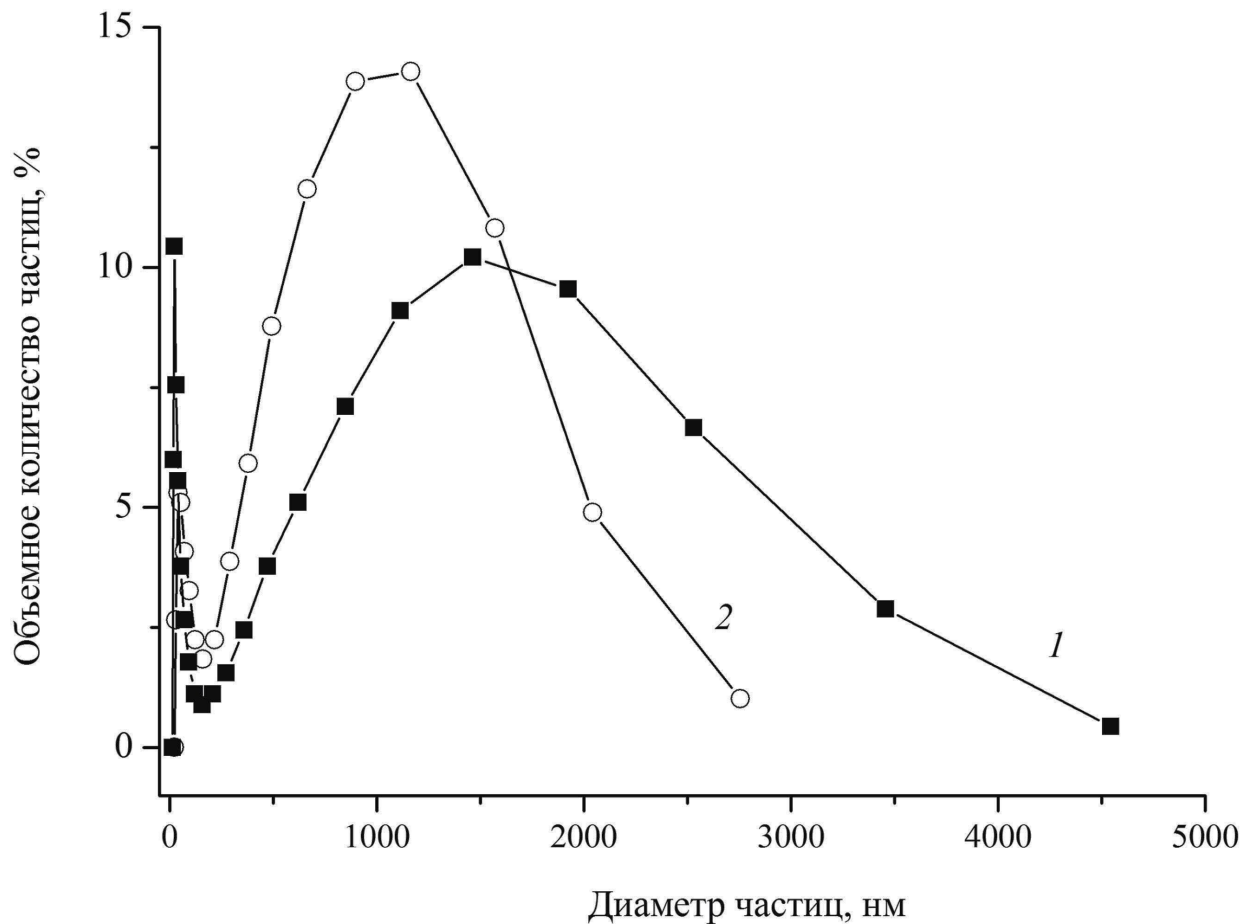


Рис. 3. Распределение частиц по размерам в образцах гиалиновых хрящей, гомогенизированных при высоких значениях давления и различных температурах: 1 – температура 70° С, 2 – температура 80° С .

Исследование ферментативного гидролиза биополимеров хрящевой ткани в зависимости от pH, температуры, концентрации ферментов и продолжительности процесса. Ферментные препараты: лекарственное протеолитическое средство на основе папаина "Карипазим" выпускают в России два производителя из п. Оболенск Московской обл. - ЗАО "Вифитех" и ООО "МедФлорина".

Карипазим содержит папаин, химопапаин А и Б, пептидазы А и Б, лизоцим. Папаин и его аналоги катализируют расщепление белков преимущественно по связям, в образовании которых участвует аминокислота Gly.

Поскольку в коллагене содержится 33% Gly, с помощью папаина при определённых условиях гидролизуются молекулы коллагена. Высокая эффективность действия папаина на биополимеры хрящевой ткани связана также с расщеплением полисахаридных цепей протеогликанов.

Intens. [a.u.]

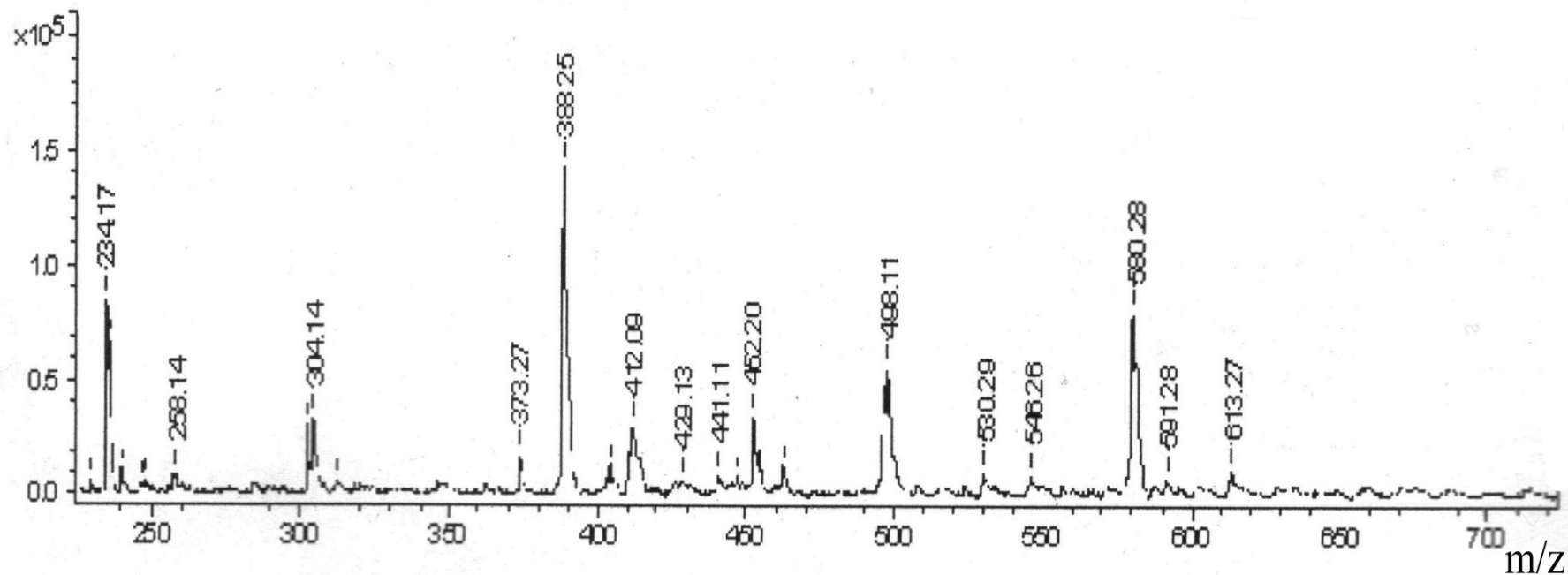


Рис. 4. Распределение молекулярных масс пептидов, образованных под влиянием карипазима в 33,4 mM К-На фосфатном буфере, рН 6,0 при температуре 50°C, концентрации 5 % в течение 4 часов.

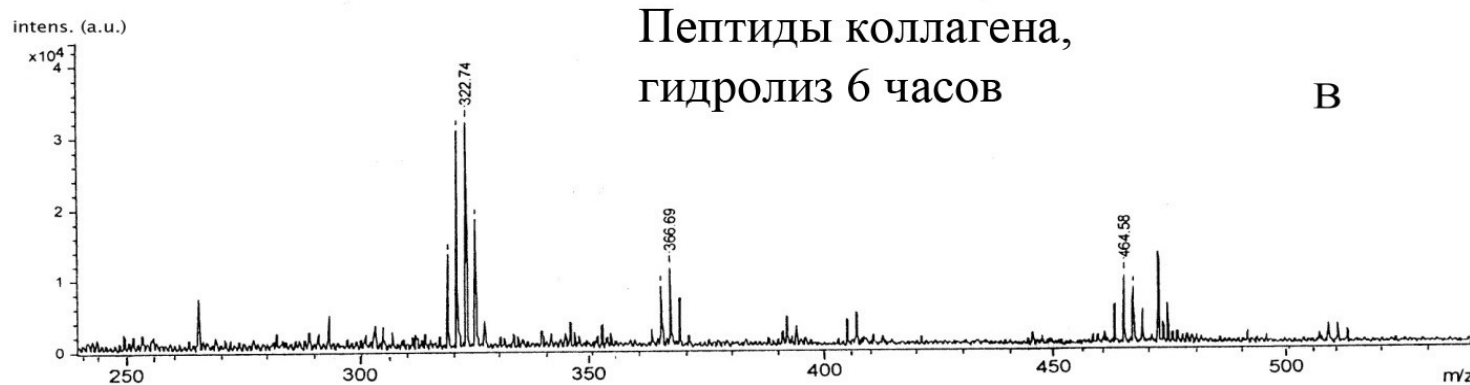
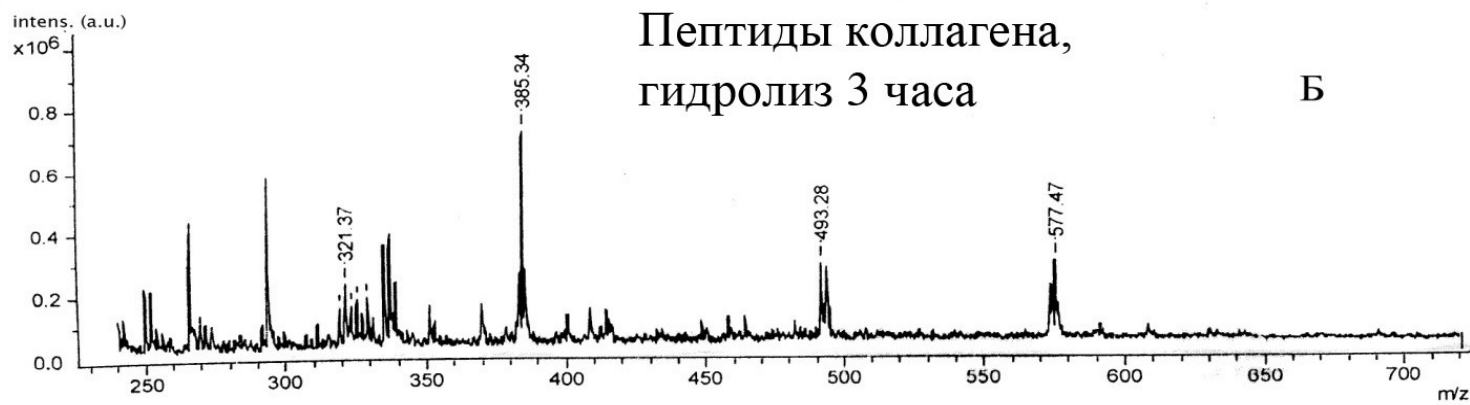
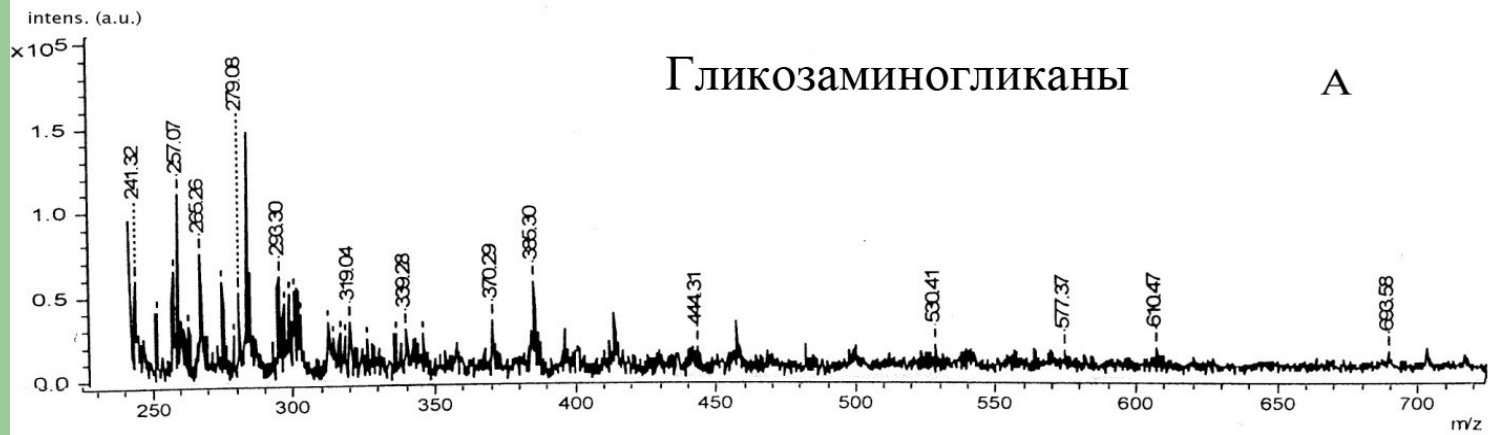


Рис. 5. Распределение молекулярных масс ГАГ и пептидов коллагена.

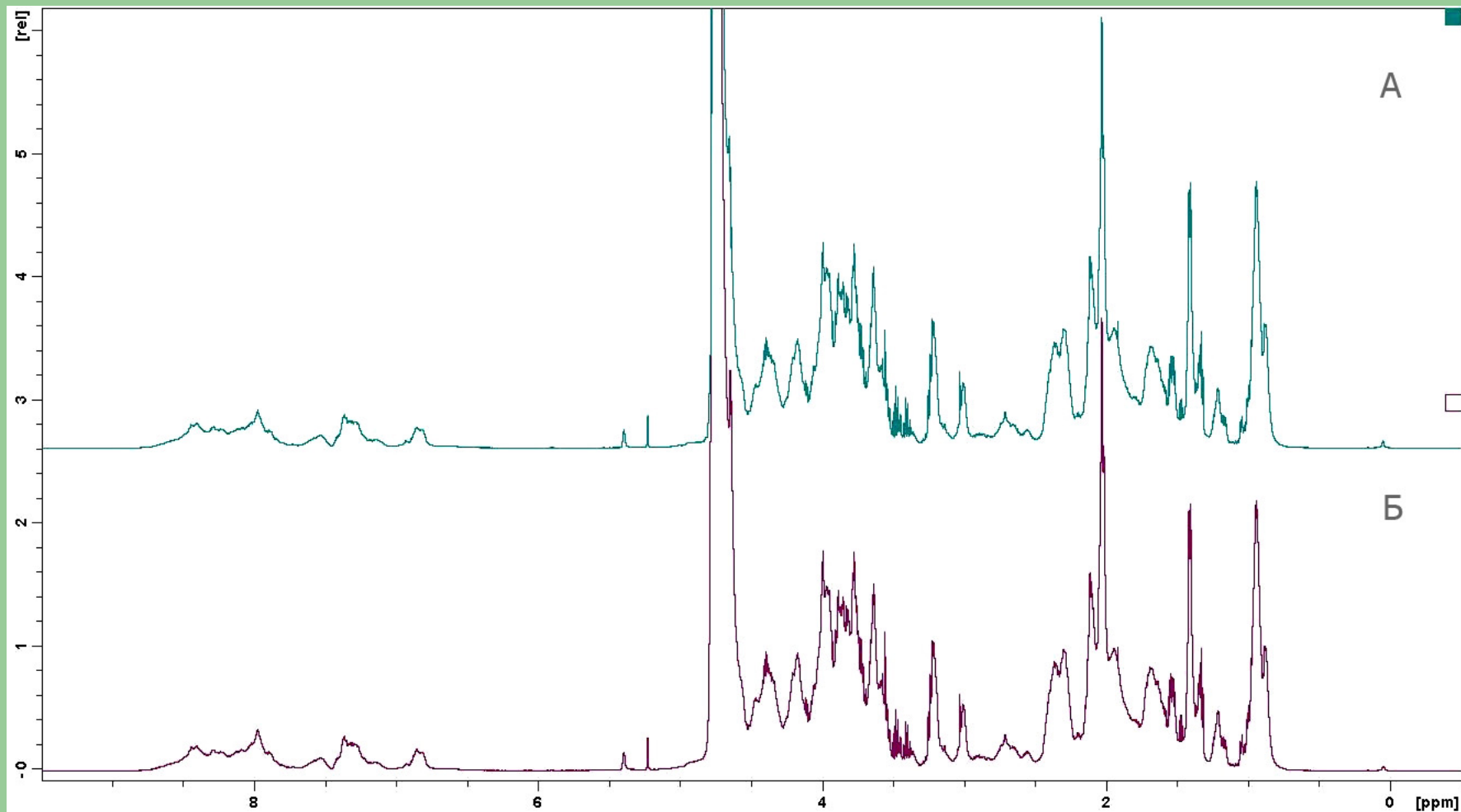
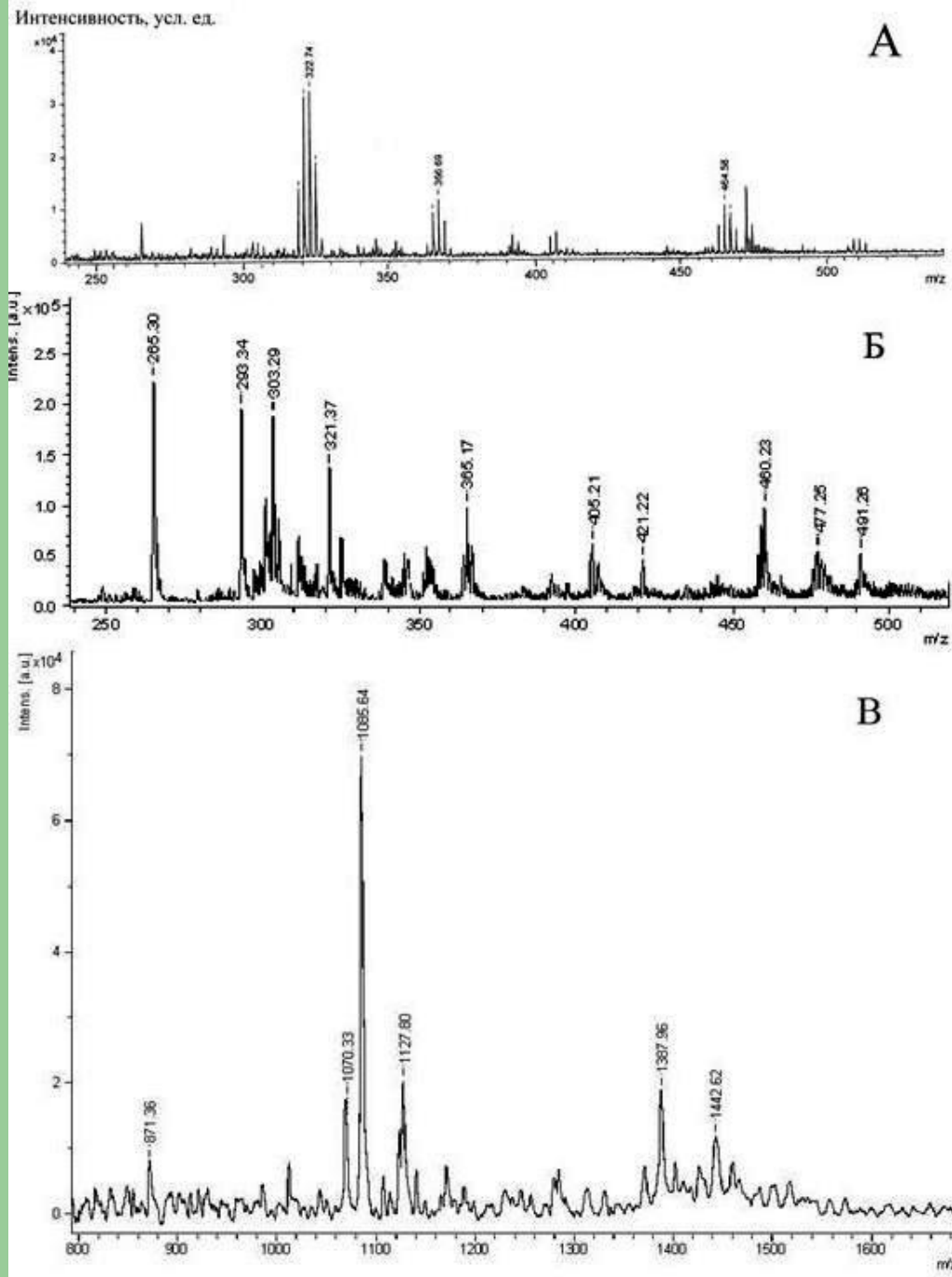


Рис. 6. 2D протонные ЯМР-спектры гидролизатов гиалиновых хрящей, полученных под влиянием карипазима (концентрация 5%) в 33,4 mM К-Na фосфатном буфере, pH 6,0 при температуре 55°C в течение 3 час. (А) и 6 час. (Б), ppm – миллионные доли

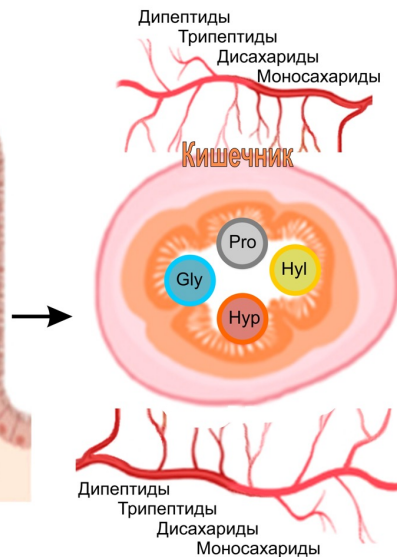
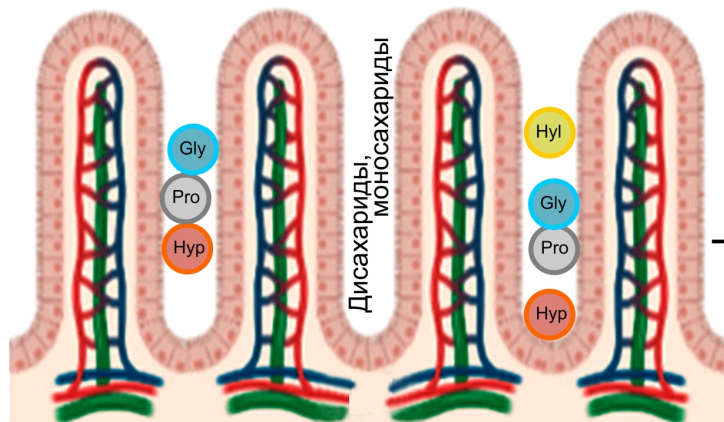
Рис. 7. Распределение молекулярных масс пептидов, образованных под влиянием карипазима в 33,4 mM К-Na фосфатном буфере, pH 6,0 при температуре 55° С, концентрации 10% в течение 6 час – А. Распределение молекулярных масс компонентов импортных аналогов, содержащих гидролизат коллагена типа II: «Flexinovo» (Польша) – Б и «BioCell Collagen II» (США) – В.



Характерные свойства низкомолекулярных пептидов, дисахаридов и моносахаридов: высокая растворимость, биодоступность и усваиваемость (*Тимофеева Н.М. и др. Успехи совр. физиол. 2000. Т.31. С.24-37; Тутельян В.А. и др. Успехи совр. биол. 2014. Т.134. С. 227-235*).

Низкомолекулярные компоненты выполняют структурную функцию, участвуют в образовании матрикса соединительных тканей. Экзогенные пептиды, которые содержат менее 50 аминокислот, по исследованиям Замятнина А.А. с соавторами, выполняют регуляторную роль в организме человека (*Zamyatnin A.A., Borchikov A.S., Vladimirov M.G. et. al. Nucl. Acids Res. 2006. Vol. 34. P. D261–D266*).

ЖКТ Всасывание



Матрикс



Артритные суставы



Здоровые (вылеченные) суставы

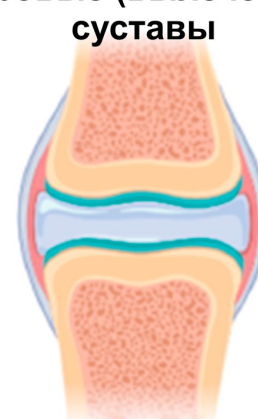


Рис. 8. Возможный механизм поступления компонентов для биосинтеза коллагена, протеогликанов и образования матрикса хрящевой ткани.

Выводы:

- 1. На основании физико-химических свойств гомогенатов определена оптимальная температура гомогенизации хрящей.**
- 2. Протеолиз биополимеров хрящевой ткани эффективен под влиянием российского лекарственного средства «Карипазим» (ООО «МедФлорина», п.Оболенск, Московская обл.).**
- 3. Карипазим позволяет получать низкомолекулярные (короткие) пептиды коллагена от 240 до 520 D.**
- 4. Нутрицевтики на основе комплекса низкомолекулярных пептидов коллагена и гликозаминогликанов могут быть использованы в профилактике и лечении болезней суставно-связочного аппарата, в медицине для поддерживающей терапии, при лечении дисплазии соединительной ткани у детей.**

Наши публикации

1. Николаева Т.И., Шеховцов П.В. Гидролизаты коллагена в профилактике и лечении заболеваний суставов. *Фундаментальные исследования*, 2014, № 12, ч. 3, с. 524-528.
2. Николаева Т.И., Молчанов М.В., Лауринавичюс К.С., Капцов В.В., Шеховцов П.В. Ферментативный гидролиз биополимеров хрящевой ткани под влиянием фитопана. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015, № 12, ч. 7, с. 1252-1256.
3. Николаева Т.И., Молчанов М.В., Лауринавичюс К.С., Капцов В.В., Шеховцов П.В. Исследование ферментативного гидролиза коллагенов хрящевой ткани. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016, № 10, ч. 3, с. 442-447.
4. Николаева Т.И., Молчанов М.В., Лауринавичюс К.С., Капцов В.В., Шеховцов П.В. Разработка комплекса низкомолекулярных пептидов коллагена с гликозаминогликановыми компонентами. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2018, т. 165, № 5, с. 571-576.
5. Николаева Т.И., Лауринавичюс К.С., Капцов В.В., Черный Р.А., Шеховцов П.В. Коллагеновые пептиды из гиалиновых хрящей для лечения и профилактики болезней суставов: получение и свойства. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019, т. 167, № 2, с. 194-199.
6. Николаева Т.И., Кузнецова С.М., Емельяненко В.И., Смирнов А.А., Шеховцов П.В. Получение коротких пептидов коллагена 2 типа: температурные условия гомогенизации хрящей и гидролиз коллагена. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021, т. 171, № 1, с. 38-42.
7. ПАТЕНТ РФ № 2489906 «Биологически активная добавка к пище на основе денатурированного коллагена». Приоритет изобретения 18/04/2012 г.
8. ПАТЕНТ РФ № 2653001 «Биологически активная добавка к пище на основе бурых морских водорослей для устранения соединительнотканной недостаточности и укрепления суставно-связочного аппарата». Приоритет изобретения 23/12/2016 г.

Благодарим за внимание!