

УДК 615.89; 616.7

## КОМПЛЕКС ПЕПТИДОВ КОЛЛАГЕНА И ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ: ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ БОЛЕЗНЕЙ ОПОРНО-ДВИГАТЕЛЬНОГО АППАРАТА

© 2024 г. Т. И. Николаева<sup>1, \*</sup>, К. С. Лауринавичюс<sup>2</sup>, М. В. Молчанов<sup>1</sup>,  
С. М. Кузнецова<sup>1</sup>, В. И. Емельяненко<sup>1</sup>, П. В. Шеховцов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Московская обл., Пущино, Россия

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Московская обл., Пущино, Россия

\*e-mail: tomivnik@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.04.2024 г.

После доработки 05.07.2024 г.

Принята к публикации 05.07.2024 г.

Болезни опорно-двигательного аппарата человека представляют медицинскую проблему. Артриты, артрозы суставов, хондродисплазии позвоночника сопровождаются разрушением соединительных тканей, их структурных компонентов: коллагеновых фибрилл и протеогликанов. Гликозаминогликаны (хондропротекторы) давно используются для лечения артритов и артрозов, тогда как пептиды коллагена (гидролизированный коллаген) лишь в последние 10–15 лет применяются при заболеваниях суставов. Проектирование состава нутрицевтиков из коллагена и протеогликанов помогает решить задачу восполнения недостающих структурных компонентов в тканях опорно-двигательного аппарата. Мы полагаем, что одно из перспективных решений проблемы — получение комплекса пептидов коллагена и гликозаминогликанов, специфичных для соединительных тканей. Цель данного обзора — анализ имеющихся в литературе данных по пептидам коллагена, их комплексов с гликозаминогликанами, а также сравнение их по характеристикам с образцами, полученными в наших исследованиях.

**Ключевые слова:** коллаген, низкомолекулярные пептиды, гликозаминогликаны, масс-спектрометрия, ЯМР-спектроскопия, молекулярные массы, витаминно-минеральный комплекс

DOI: 10.31857/S0042132424060047, EDN: NRPSBX

### ВВЕДЕНИЕ

Болезни опорно-двигательного аппарата человека представляют медицинскую проблему. По данным МЗ РФ болезнями соединительных тканей суставов страдают от 7.5 до 30 млн человек. Официальные данные МЗ РФ, расчет Росстата за последние 20 лет находятся на сайте <https://rosstat.gov.ru/folder/13721#>.

### КОЛЛАГЕНОВЫЕ ФИБРИЛЛЫ И ПРОТЕОГЛИКАНЫ

Более 100 млн человек на планете страдают заболеваниями артрита, артроза, остеопороза (Grover, Samson, 2016; Porfírio, Fanaro, 2016). Болезни суставов, хондродисплазии позвоночника человека сопровождаются разрушением

структурных компонентов тканей: коллагеновых фибрилл и протеогликанов. Коллаген — основной белок соединительных тканей суставов: костей, хрящей, связок, сухожилий. Фибриллы коллагена определяют механическую прочность этих тканей, осуществляют передачу сигналов между клетками. Патологические процессы в тканях суставов коррелируют с более низкими концентрациями коллагена, по сравнению с нормой. Наблюдается истончение фибрилл коллагена, их разволокнение и потеря эластичности (Клиническая ревматология, 2005). В состав тканей хрящей, связок, сухожилий входят также протеогликаны, обеспечивая этим тканям упруго-эластичные и функциональные свойства. Протеогликаны образуют сеть из полисахаридных цепей гликозаминогликанов: гиалуроновой

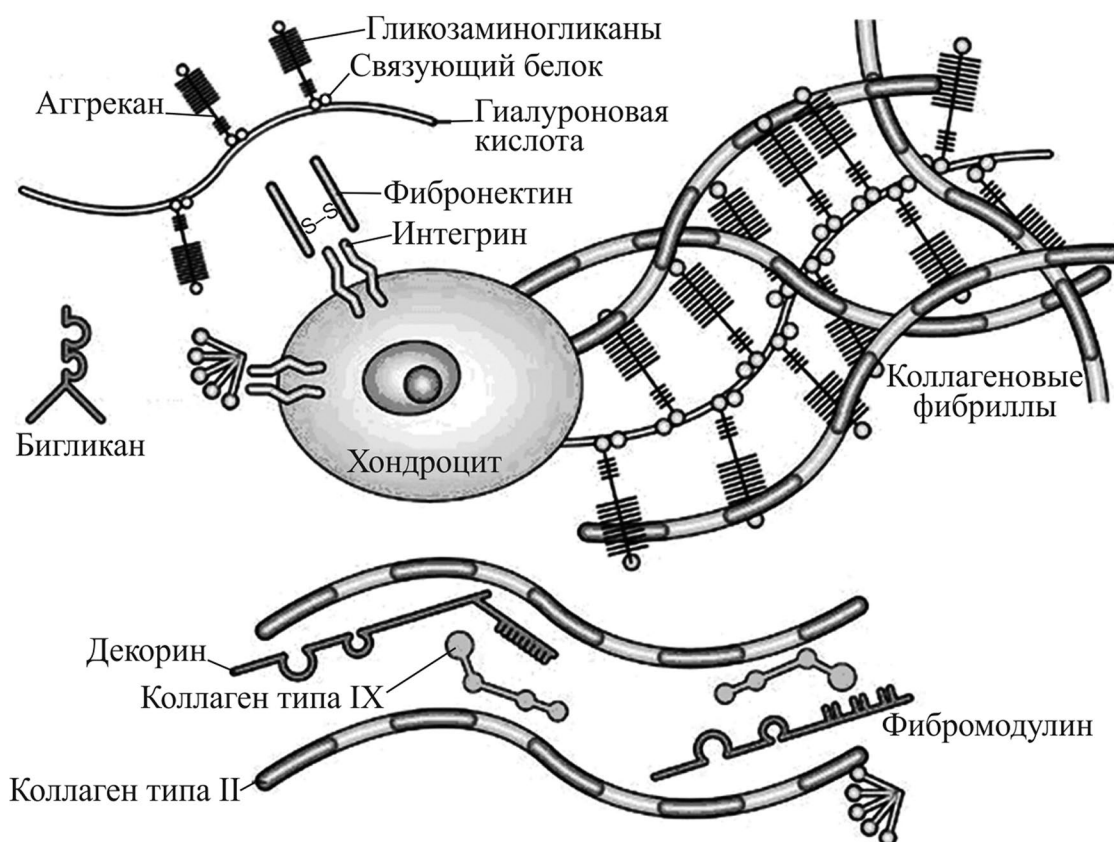
кислоты (ГК), хондроитин-4-сульфата, хондроитин-6-сульфата, кератан-сульфата. На рис. 1 схематически изображен внеклеточный матрикс (ВКМ) хрящевой соединительной ткани. ВКМ гиалиновых хрящей содержит 10% хондроцитов, 8% коллагена, 7% протеогликанов, 75% воды.

Поэтому на долю коллагена и гликозаминогликанов в хрящевой ткани приходится примерно равное содержание компонентов.

В медицинской практике для лечения болезней суставов используют преимущественно гликозаминогликаны (известны под названием хондропротекторы), а также их структурные единицы природного и синтетического происхождения. Поскольку в норме в хрящах суставов содержится примерно одинаковое количество и коллагена, и гликозаминогликанов, отсутствие коллагеновой компоненты в лекарствах приводит к восстановлению хрящей не более чем на 50%. Другие лечебные средства, в том числе стероидные и нестероидные препараты, направлены лишь на снижение боли и на восста-

новление подвижности суставов. Более того, эти лекарства обладают вредным побочным влиянием: они нарушают функционирование сердца, печени, почек и других внутренних органов. Поэтому есть основания для поиска альтернативных средств, которые могут заменить лекарства. Среди болезней опорно-двигательного аппарата человека самые распространенные — артрит, артроз, миозит, мышечно-связочная дисфункция, остеомиелит, остеопороз, остеохондроз, подагра, радикулит, рахит, сколиоз.

Следует заметить, что при заболеваниях опорно-двигательного аппарата в наибольшей степени разрушаются хрящи (Aigner, Stöve, 2003). Это определяется структурой фибрилл, которые имеют плотную упаковку молекул коллагена, но небольшой диаметр фибрилл, по сравнению с фибриллами кожи, сухожилий, связок. Кроме того, хрящи локализованы в местах связывания разных соединительных тканей, что может нарушать их функционирование. Суставно-связочный аппарат в позвоночнике и суставах



**Рис. 1.** Внеклеточный матрикс хрящевой соединительной ткани.

Суставной гиалиновый хрящ содержит 10% хондроцитов, 8% коллагена, 7% протеогликанов, 75% воды (по: Fox et al., 2009, модифицировано).

испытывает большую механическую нагрузку, и соединительные ткани в значительной степени могут также разрушаться в результате перегрузок. Гиалиновые хрящи, которые содержатся в замыкающих пластинках межпозвонковых дисков, придают жесткой структуре позвоночника определенную степень гибкости. При этом разрыв коллагеновых фибрилл и протеогликанов в замыкающих пластинках приводит к образованию позвонковых грыж (Лазерная инженерия хрящей, 2006). Известно, что в суставах гиалиновые хрящи тонким слоем окружают костную ткань (Павлова и др., 1988). Для укрепления тканей опорно-двигательного аппарата используют преимущественно синтетические биоматериалы. Однако во многих странах, кроме медицинских методов, разрабатывают также нутрициологический подход.

### СТРОЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА СОЕДИНИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

Биосинтез коллагена и протеогликанов происходит в специализированных клетках соединительных тканей. Например, в хондроците хрящевой ткани синтезируются и коллаген типа II, и гликозаминогликаны, но в разных частях клетки. Коллаген типа I — основной белок тканей опорно-двигательного аппарата: костей, сухожилий, связок. Синтезируется коллаген в остеобластах костей и фибробластах кожи.

Структура молекулы коллагена формируется из трех полипептидных  $\alpha$ -цепей. Каждая  $\alpha$ -цепь содержит регулярную последовательность триплетов из аминокислот Gly-X-Y, где первой аминокислотой является глицин. Таким образом, глицин составляет до 33% от содержания всех аминокислот в молекуле коллагена. Кроме выполнения структурной функции, глицин необходим для функционирования нервной системы (Потупчик и др., 2015). В триплетах в позициях X и Y располагаются аминокислоты пролин и гидроксипролин, причем содержание каждой из них составляет примерно 10%. Эти аминокислоты стабилизируют тройную спираль коллагена. Позиции X и Y занимают также гидрофобные аминокислоты: аланин, валин, серин, лейцин, треонин, фенилаланин, изолейцин, метионин, цистеин и гидрофильные аминокислоты: аргинин, гистидин, лизин, гидроксизин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота.

В разных соединительных тканях молекула коллагена типа I имеет свои характерные свойства, которые необходимы для выполнения структурной функции. В костях молекула коллагена содержит большое число альдегидных групп для межмолекулярного связывания и формиро-

вания суперспирализованных, плотноупакованных фибрилл. В сухожилиях и связках на основе коллагена типа I образуются фибриллы и волокна большой длины. Молекулы упакованы параллельно с прямой ориентацией, что соответствует напряжению вдоль оси фибрилл. Отметим, что фибриллы тканей опорно-двигательного аппарата формируются также из комплексов молекул коллагена типов I, II с коллагенами типов III, V, VI, IX, XI. Содержащиеся в небольших количествах минорные коллагены типов V, VI регулируют толщину фибрилл в сухожилиях, связываясь с коллагеном типа I. При связывании с коллагеном типа II минорных коллагенов типов IX, XI регулируется толщина фибрилл в хрящах и образуются фибриллы наименьшей толщины (20–40 нм). При этом механическая прочность тканей определяется суперспиральной структурой коллагеновых фибрилл. С коллагеновыми фибриллами в связках и сухожилиях связываются протеогликаны, что приводит к образованию коллагеновых волокон.

ВКМ — структурная основа всех соединительных тканей. Матрикс образуется в процессе связывания коллагена с другими биополимерами и молекулами. Протеогликаны и гликозаминогликаны, расположенные между коллагеновыми фибриллами, занимают большой объем в ткани. Их взаимодействие с коллагеном происходит преимущественно электростатически. Молекулярные механизмы образования матрикса в разных тканях различаются. В хрящах, сухожилиях, связках волокна формируются посредством связывания коллагеновых фибрилл с протеогликанами. Длина волокон в сухожилиях и связках достигает нескольких миллиметров и сантиметров. В промежутках между коллагеновыми фибриллами хрящей, сухожилий и связок расположены также гликопротеины (Kucharz, 1992). Волокна костей образуются на основе коллагеновых фибрилл типа I и кальциевых солей (Hong et al., 2022). Кристаллы солей и фибриллы расположены параллельно по отношению друг к другу. Упаковка таких слоев происходит в разных направлениях — от концентрической во внутренних частях костей до параллельной на их поверхностях (Николаева и др., 2007).

Коллаген, поступающий с пищей, распадается на фрагменты в процессе гидролиза под влиянием ферментов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Далее фрагменты могут расщепляться до пептидов. Низкомолекулярные пептиды могут расщепляться до аминокислот, ди- и трипептидов. В ЖКТ ди- и трипептиды всасываются с более высокой скоростью, по сравнению

с аминокислотами, поскольку в ЖКТ наряду с пассивным переносом веществ существует механизм АТФ-зависимого транспорта (Тутельян и др., 2003).

### ПОЛУЧЕНИЕ ПЕПТИДОВ КОЛЛАГЕНА

Для того чтобы коллаген усвоился в ЖКТ, требуется провести его гидролиз и получить низкомолекулярные пептиды. Однако перед гидролизом спиральные цепи молекул коллагена должны быть доступны для действия ферментов. Поскольку в нативном состоянии коллаген является молекулой большой длины и жесткой трехспиральной структуры, процесс денатурации белка позволяет развернуть полипептидные цепи. На рис. 2 схематически представлены денатурация молекулы коллагена и расщепление коллагена на низкомолекулярные пептиды.

В соединительных тканях в организме человека и животных на долю коллагена приходится до 30% белков (Николаева и др., 2007). Традиционная процедура для получения гидролизатов коллагена — экстракция белка из тканей животных разбавленными органическими кислотами (уксусная, лимонная). При этом применяют большие объемы растворов. Затем проводят концентрирование коллагена и ферментативный гидролиз. Обычно выход аминокислот и пептидов коллагена из соединительных тканей составляет 3–5%. Выход конечного продукта увеличивается до 10–15% в результате последовательных этапов ферментативного гидролиза и химического гидролиза (Пивненко и др., 2005). Однако химический гидролиз изменяет структуру аминокислот.

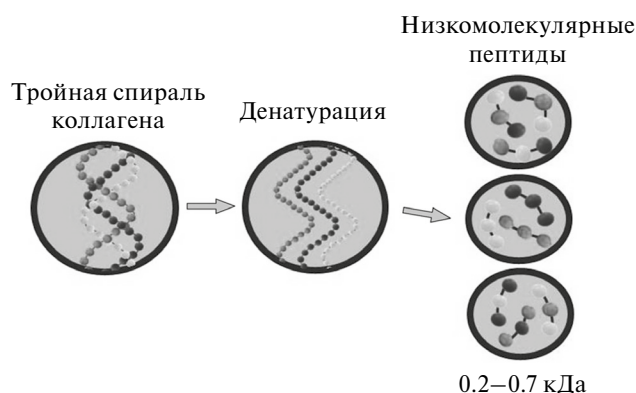
Другой способ получения гидролизатов коллагена — протеолиз коллагена в результате последовательного действия ряда ферментов.

В работе (Ahmed et al., 2020) изучено влияние разных ферментов на коллаген, выделенный экстракцией из тканей и находящийся в растворе. В результате пошагового действия трех ферментов гидролиз проявляет высокую эффективность в отношении расщепления коллагена и выхода пептидов. Более того, с использованием пепсина, трипсина и  $\alpha$ -химотрипсина получены пептиды коллагена, которые могут стимулировать ингибирующую активность ангиотензин I-превращающего фермента (Aleman et al., 2013).

Гидролизированный коллаген непосредственно из соединительных тканей сложно получить, что обусловлено строением тканей и высокой механической прочностью коллагеновых фибрилл, а это не дает возможности выделить большое количество расщепленного белка. Нами отработан экспериментальный метод получения гидролизатов коллагена и низкомолекулярных пептидов из гиалиновых хрящей, повышающий выход компонентов. Сначала проводится гомогенизация тканей, а затем ферментативный гидролиз (Николаева и др., 2015–2021). Известно, что в хрящах сельскохозяйственных животных и рыб содержатся прочно связанные спирализованные молекулы и фибриллы коллагена типа II. Плотная упаковка молекул коллагена достигается межмолекулярными связями в поперечном и продольном направлениях фибрилл. Пространственную структуру коллагеновых фибрилл в тканях хрящей стабилизируют протеогликаны. Разрушить сеть ВКМ можно разными методами дезинтеграции тканей. Процедура обработки сырья в гомогенизаторе высокого давления позволяет расщепить коллагеновые фибриллы и волокна большой длины на фрагменты (Капцов и др., 1989). Следовательно, гомогенизация позволяет получить частицы коллагеновых фибрилл, более доступные для протеолиза.

### ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГОМОГЕНАТОВ

Вследствие спиральной структуры нативный коллаген слабо доступен для действия ферментов. Поэтому денатурация коллагена — необходимый этап эффективного ферментативного гидролиза. Поскольку при денатурации белков происходит разрушение вторичной, третичной и четвертичной структуры, тройные спирали коллагена раскручиваются, образуются клубки полипептидных цепей, и фибриллы распадаются. Показано (Игнатьева и др., 2005), что денатурация коллагена в фибриллах хрящей происходит в диапазоне температур 50–90°C.



**Рис. 2.** Денатурация молекулы коллагена и расщепление коллагена на низкомолекулярные пептиды.

Протеогликаны препятствуют полной денатурации коллагена типа II в биологических тканях. Поэтому начальный этап обработки хрящей начинается с разрушения протеогликановой сети. Нами проведены исследования совместного действия значений высокого давления и температуры на гомогенизацию гиалиновых хрящей. Отметим, что температура — это существенный фактор для получения пептидов коллагена из хрящевой ткани. При этом температурные условия гомогенизации хрящей, влияющие на денатурацию коллагена, не изучены. Определение температурных условий гомогенизации позволяет регулировать денатурацию коллагена. При температуре  $\sim 100^\circ\text{C}$  денатурация коллагена происходит таким образом, что после ферментативного гидролиза молекулы расщепляются на аминокислоты (Selvakumar et al., 2012). Однако в ЖКТ аминокислоты всасываются медленнее, чем низкомолекулярные пептиды, содержащие от двух до трех аминокислот (Тутельян и др., 2003). Такие пептиды быстро усваиваются организмом, поступают в клетки и участвуют в биосинтезе коллагена.

Мы проводили определение значений температуры, вызывающих денатурацию коллагена в гомогенатах гиалиновых хрящей, анализируя данные калориметрических исследований. Сначала были изучены тепловые переходы фибрилл коллагена из нативного состояния в разупорядоченное в гомогенате, который был получен при температурах  $20\text{--}30^\circ\text{C}$ , исключающих денатурацию коллагена (контроль). Тепловые переходы в процессе прогрева гомогената наблюдались в интервале  $40\text{--}80^\circ\text{C}$ . Существенные термодинамические характеристики: энтальпия перехода  $\Delta H$  и полуширина перехода  $\Delta T$ . Следует заметить, что величину  $\Delta H$  применяют для оценки общего количества нековалентных связей в макромолекулах (Эдсол, Гатфренд, 1986). Величину  $\Delta T$  можно применять для анализа гомогенности полученных образцов. Более того, минимальная величина  $\Delta T$  коррелирует с минимальной толщиной фибрилл, которая совпадает с размерами фибрилл *in vivo* (Николаева и др., 2012).

После гомогенизации хрящей при разных, но денатурирующих коллаген, температурах мы определили термодинамические параметры разупорядоченности коллагеновых фибрилл (Николаева и др., 2021). Получены параметры, при которых структура коллагеновых фибрилл разрушается, а количество межмолекулярных связей снижается. Применение фотон-корреляционной спектроскопии и сканирующей микрокалориметрии обеспечивает сравнение

гомогенности гиалиновых хрящей. Совместное использование этих физических методов позволяет также определить оптимальную температуру гомогенизации для каждого вида хрящевого сырья.

Мы установили, что при температурах  $70$  и  $80^\circ\text{C}$  образуются гомогенаты с разными физико-химическими свойствами. При температуре  $80^\circ\text{C}$  получен более гомогенный образец гиалиновых хрящей. Более полная денатурация коллагена также происходит при  $80^\circ\text{C}$ . Размеры частиц в гомогенате при  $80^\circ\text{C}$  в 1.5 раза меньше, чем при  $70^\circ\text{C}$ . Следовательно, молекулы коллагена в гомогенате при  $80^\circ\text{C}$  более доступны для действия ферментов. Определена оптимальная температура гомогенизации для гиалиновых хрящей, которая равна  $80^\circ\text{C}$ . В результате совместного действия высокого давления ( $70\text{--}80$  МПа) и температуры ( $70\text{--}80^\circ\text{C}$ ) на гомогенизацию гиалиновых хрящей найдены условия гомогенизации ткани, при которых после протеолитического расщепления коллагена выход пептидов увеличивается в два раза, если сравнивать с пептидами, полученными авторами патента РФ № 2290936 (Хавинсон и др., 2007), и возрастает в три раза, если сравнивать с выходом коллагена после гидролиза хрящевых тканей гидробионтов, проведенного авторами патента РФ № 2250047 (Пивненко и др., 2005).

### ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ

Гидролиз коллагена в соединительных тканях можно проводить следующими способами: под влиянием температуры (тепловой гидролиз), под действием протеолитических ферментов (ферментативный гидролиз), под влиянием кислот и щелочей (химический гидролиз). Ферментативный гидролиз предпочтителен, поскольку после него не нарушается структура аминокислот. Под действием ферментов молекулярные связи между полипептидными цепями коллагена разрываются, а полипептидная цепь гидролизует на более мелкие пептиды с молекулярной массой менее 5 кДа (Ahmed et al., 2020). Гидролизаты, которые содержат комплекс аминокислот и низкомолекулярных пептидов, не требуют больших затрат энергии в процессе пищеварения и усвоения.

Гидролиз биополимеров гиалиновых хрящей мы проводили последовательными процедурами с применением ряда ферментов. Как правило, для гидролиза белков используют не отдельные протеазы, а комплексы ферментов (Телишевская, 2000). Эти ферменты обладают специфичным действием, разрывая определенные связи в белках. Известно, что химопсин содержит

смесь  $\alpha$ -химотрипсина и трипсина. Трипсин гидролизует пептидные связи, содержащие остатки аргинина и лизина;  $\alpha$ -химотрипсин расщепляет пептидные связи с остатками ароматических аминокислот тирозина и триптофана. Сначала был исследован протеолиз под влиянием ферментов с каталитической активностью при разных значениях pH. Мы сравнивали действие ферментов панкреатина, пепсина, химопсина, трипсина и папаина с импортными аналогами. Далее нами был выбран папаин импортного производства (AppliChem, Deutschland) и лекарственное протеолитическое средство карипазим, которое выпускают в России ЗАО “ВифиТех” и ООО “МедФлорина” (пос. Оболенск, Московская обл.). В состав карипазима входят следующие ферменты: папаин, химопапаины А и Б, пептидазы А и Б, лизоцим, содержащие в своих активных центрах сульфгидрильные группы. Папаин и его аналоги гидролизуют пептидные, амидные и эфирные связи, содержащие аргинин, лизин, фенилаланин, а также тиоловые эфиры и N-ацетилированные связи. Выражена специфичность в отношении глицина и лейцина. Поэтому под влиянием папаина молекулы коллагена легко расщепляются на фрагменты, поскольку коллаген содержит не менее 33% аминокислоты Gly. Более того, высокая эффективность действия папаина на биополимеры хрящевой ткани связана также с расщеплением полисахаридных цепей протеогликанов.

В процессе ферментативного гидролиза температура, время, pH и концентрация фермента являются ключевыми факторами для образования пептида, и, следовательно, они влияют на характеристики полученного пептида. Параметры протеолиза варьируют для разных ферментов, но предпочтительными являются следующие значения: температура 35–70°C, концентрация фермента 0.01–5.00%, pH 1.5–11 и время 10–600 мин. Эти величины определены при исследовании гидролиза белков из тканей и органов сельскохозяйственных животных (Телишевская, 2000) и морских рыб (Ahmed et al., 2020). Температура и pH существенно влияют на кинетику ферментативной реакции и различаются для каждого фермента.

В результате исследования ферментативных гидролизатов, полученных под влиянием карипазима, показано, что степень гидролиза выше у образцов производителя ООО “МедФлорина”, по сравнению с образцами производителя ЗАО “ВифиТех” и папаином зарубежного производителя “AppliChem”. Степень гидролиза с повышением температуры от 50 до 60°C и концентрации карипазима от 1 до 10% возрастает (Николаева

и др., 2023). При повышении температуры протеолиза и концентрации карипазима молекулярный вес пептидов коллагена снижается.

Распределение пептидов по молекулярным массам после гидролиза в течение 3 ч находится в диапазоне 240–620 Да, тогда как после гидролиза в течение 6 ч пептидный профиль расположен в интервале 240–520 Да. В пептидах коллагена могут содержаться триплеты аминокислот, содержащие преимущественно аминокислоты глицин, пролин, гидроксипролин, аланин (Gly-Pro-Hyp, Gly-Pro-Ala), а также дипептиды (Gly-Pro, Hyp-Gly) и другие составы аминокислот, включающие от 2 до 10 аминокислотных остатков. Исследование методом ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) гидролиза образцов коллагена показало, что в пептидах содержится 2–10 аминокислотных остатков, что подтверждает данные масс-спектропии.

#### РЕГУЛЯЦИЯ РАЗМЕРОВ ПЕПТИДОВ КОЛЛАГЕНА ТИПА II, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ГИАЛИНОВЫХ ХРЯЩЕЙ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Мы определили (Николаева и др., 2018, 2019), что ферментами, катализирующими расщепление специфических связей в полипептидных цепях, можно влиять на размеры пептидов и разрабатывать образцы, содержащие пептиды коллагена разных молекулярных масс. Под влиянием химопсина получены пептиды молекулярных масс от 900 до 7000 Да, а под действием карипазима — пептиды с меньшей молекулярной массой — от 250 до 780 Да. Растворимость лиофилизированных образцов, полученных в результате протеолиза ферментами, различалась: от легко растворимой после действия карипазима до умеренно растворимой после действия химопсина. Таким образом, пептиды низких молекулярных масс (от 250 до 780 Да) обладали более высокой степенью растворения в воде.

В работе (Николаева и др., 2018) приведены масс-спектры пептидов коллагена и гликозаминогликанов, полученных после гидролиза при температуре 55°C. Распределение компонентов гликозаминогликанов по молекулярным массам в гидролизатах, образованных в течение шести часов, находится в диапазоне 240–720 Да. Как уже отмечалось, гиалиновые хрящи содержат следующие гликозаминогликаны: ГК, хондроитин-4-сульфат, хондроитин-6-сульфат, кератан-сульфат. Гликозаминогликаны — гетерополисахариды высокого молекулярного веса, состоящие из повторяющихся дисахаридных единиц. Хондроитин-сульфаты содержат дисаха-

риды идуроновой кислоты и сульфатированного N-ацетилгалактозамина. Кератан-сульфат содержит галактозу и N-ацетилглюкозамин. Молекулы ГК, которые включают чередующиеся остатки глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина, могут расщепляться на более однородные фрагменты, по сравнению с хондроитин-сульфатами и кератан-сульфатом. В данных условиях гидролиза получены низкомолекулярные компоненты гликозаминогликанов, структура которых соответствует дисахаридам.

Расщепленность ГК, хондроитин-сульфатов и кератан-сульфата на моносахариды и дисахариды способствует их биодоступности и эффективному усвоению в организме человека. На ЯМР-спектрах идентифицирована глюкоза, которая является одним из конечных продуктов расщепления гликозаминогликанов (Николаева и др., 2023).

#### ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА ПЕПТИДОВ КОЛЛАГЕНА И ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ

Мы получили из хрящевой ткани с помощью ферментного препарата карипазим комплекс тканеспецифичных низкомолекулярных пептидов коллагена и дисахаридов гликозаминогликанов, молекулярные массы которых изменяются от 240 до 720 Да. При сопоставлении наших данных с результатами, опубликованными в работах других авторов, замечено, что пептиды коллагена типа II из хрящей цыплят образуют комплексы с высокомолекулярными хондроитин-сульфатами и ГК. При этом молекулярные массы пептидов в BioCell Collagen II (Now Int., USA) изменяются от 1500 до 2500 Да (Alkayali, 2000) и, соответственно, на порядок выше, по сравнению с пептидами, полученными в нашей работе. Как видно из рис. 3, наш образец по молекулярным массам сравним с образцом FlexiNovo (Adamed Consumer Healthcare S.A., Polska) и имеет преимущество при сравнении с образцом BioCell Collagen II (Now Int., USA).

Полученный в ООО “ФармОушенЛаб” (Россия) комплекс коллагена и гликозаминогликанов содержится в пищевом общеукрепляющем профилактическом продукте из хрящевой ткани гидробионтов “Артрофиш” (Пивненко и др., 2015). Однако ферментативные гидролизаты, которые выделены с помощью гепатопанкреатина, состоят из гликозаминогликанов с высокомолекулярными, средномолекулярными и низкомолекулярными компонентами. Молекулярный вес в последней группе гликозаминогликанов изменяется от 1000 до 10000 Да.

Эти данные превышают молекулярные веса гликозаминогликанов, которые получены под влиянием карипазима в нашей работе. Исследования по коллагену в гидролизатах гидробионтов направлены на определение содержания свободных аминокислот и их состава, но не пептидов.

Коллагеновый пептид типа II в комплексе с ГК подавляет синовиальное воспаление и нормализует состав синовиальной жидкости (Ших, 2021).

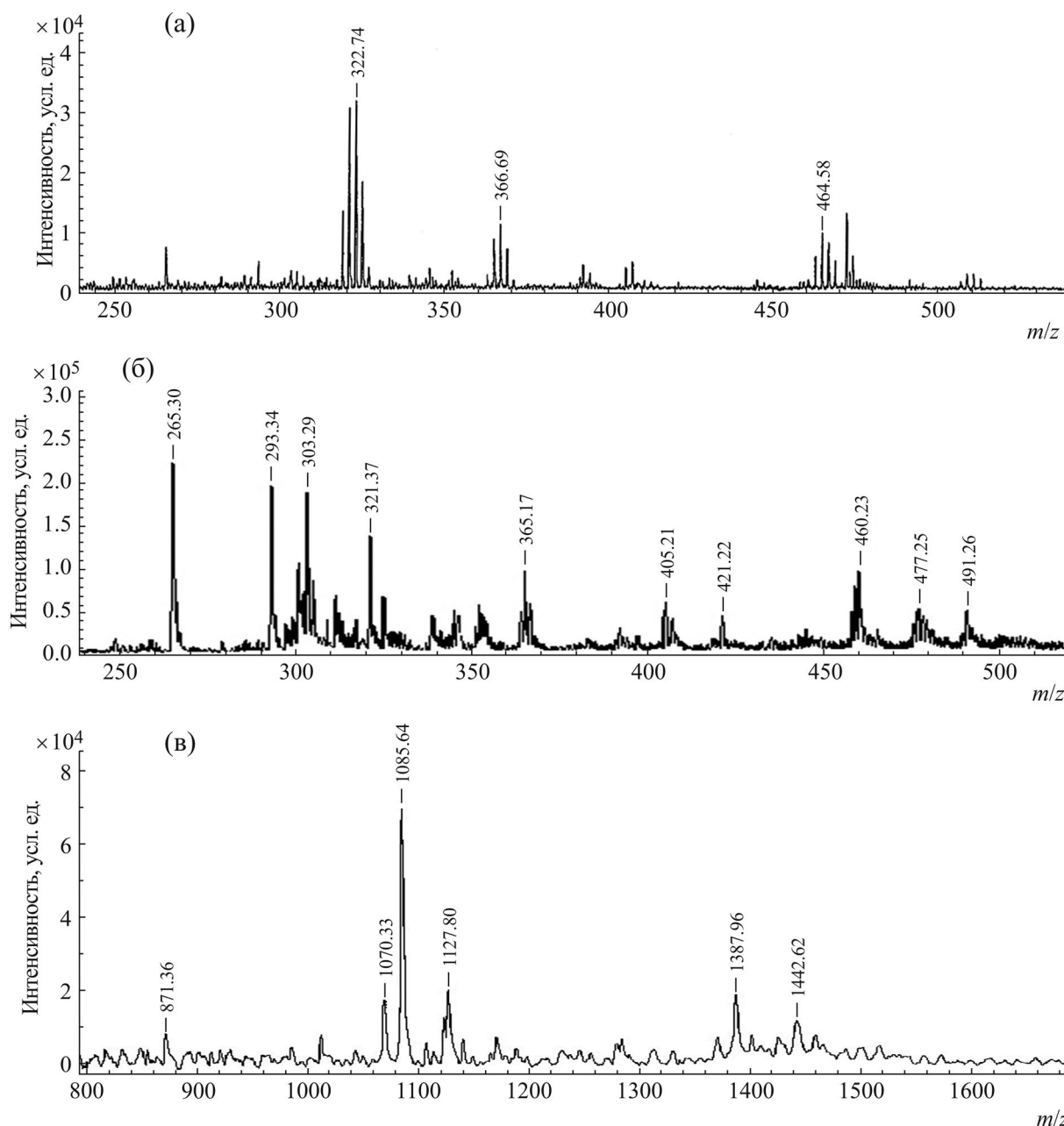
В организме человека ГК присутствует в соединительных тканях и органах: в синовиальной жидкости, в кровеносных сосудах, головном мозге, хрящах, сердечных клапанах. Наиболее высокая концентрация наблюдается в синовиальной жидкости в суставах и составляет 3–4 мг/мл. Известно, что у пациентов с остеоартрозом снижается концентрация ГК в синовиальной жидкости. Исследование на модели клеток кишечного эпителия Caco-2 показало, что количество ГК, которая всасывается клетками Caco-2, увеличивается по мере того, как молекулярная масса уменьшается (Hisada et al., 2008).

Следует отметить, что для формирования фибрилл и волокон необходим набор из компонентов биополимеров, специфичных для матрикса соединительной ткани. Комплекс тканеспецифичных веществ можно получать из соединительных тканей сельскохозяйственных животных. Низкий молекулярный вес биополимеров определяет их биодоступность в организме человека и высокий уровень усвоения в ЖКТ. Поступая в клетки (хондроциты), аминокислоты, низкомолекулярные пептиды коллагена и гликозаминогликаны могут участвовать в образовании фибрилл коллагена и протеогликанов, в формировании матрикса хрящевой ткани, в укреплении матрикса и таким образом влиять на процесс выздоровления при болезнях суставов и позвоночника.

#### ЛЕЧЕНИЕ БОЛЕЗНЕЙ ОПОРНО-ДВИГАТЕЛЬНОГО АППАРАТА

Лекарственные средства на основе коллагена для лечения болезней опорно-двигательного аппарата не созданы. Тем не менее в некоторых странах после использования гидролизатов коллагена достигнуты определенные успехи в лечении остеоартроза (Ameye, Chee, 2006; Lopez, 2012). В последние 10–15 лет разрабатывают нутрицевтики, которые получают из соединительных тканей животных и гидробионтов, дополненных экстрактами из растений (Ших, 2021). Нутрицевтики — это концентраты био-





**Рис. 3.** Распределение молекулярных масс пептидов, образованных под влиянием карипазима в 33.4 mM K-Na-фосфатном буфере, pH 6.0 при температуре 55°C, концентрации 10% в течение 6 ч (а) и в импортных аналогах, содержащих гидролизат коллагена типа II: FlexiNovo (Adamed Consumer Healthcare S.A., Polska) (б) и BioCell Collagen II (Now Int., USA) (в).

Распределение молекулярных масс пептидов характеризует соотношение массы иона и числа зарядов иона —  $m/z$ . Поскольку заряд иона почти всегда равен 1 при МАЛДИ-масс-спектрометрии (МАЛДИ — матрично-активированная лазерная десорбция), значение  $m/z$  считается массой иона.

В настоящей работе рассматриваются и сравниваются данные молекулярных масс, расположенные по оси X. Величина пика иона по оси Y (интенсивность) определяется относительным количеством иона в образце.

логически активных веществ, предназначенные для приема в пищу в целях обогащения рациона питания человека отдельными биологически активными веществами и/или их комплексами.

Первая страна, в которой в качестве функционального питания применили нутрицевтики, —

Япония. Отметим, что в США, странах Европы, в Китае, Южной Корее и Японии нутриенты используют в медицине в целях профилактики и лечения болезней человека. После совместного действия гидролизата коллагена и витамина С состояние больных остеоартрозом облегчается



(Lopez, 2012). Коллагеновые гидролизаты способствуют улучшению функций коленного сустава у пациентов не только с облегченной формой остеоартроза, но и с его сложной формой. Однако прием гидролизатов необходимо проводить в течение длительного времени — не менее полугода (Schadow et al., 2017).

#### *Остеопороз*

Остеопороз как хроническое заболевание характеризуется снижением костной массы. Рассмотрена возможность (Chen et al., 2022) применения гидролизатов коллагена в качестве нутрицевтиков для предупреждения и лечения остеопороза. Исследование влияния гидролизатов коллагена на метаболизм костей показывает, что гидролизаты коллагена молекулярных масс 2000–6000 Да можно использовать для лечения остеопороза. Гидролизаты коллагена Fortibone® (Gelita AG, Deutschland) в ЖКТ, которые расщепляются на ди-, три-, тетрапептиды, обнаружены в кровеносной системе. Таким образом, низкомолекулярные пептиды коллагена из двух–четырёх аминокислот могут легко усваиваться в организме человека.

Подтверждено (Chen et al., 2022) влияние гидролизатов коллагена на пролиферацию остеобластов человека. Соответственно, установлена зависимость от дозы стимуляция экспрессии гена мРНК коллагена типа I и биосинтеза белка. Заметим, что применяемые нутрицевтические средства могут регулировать специфические функции в организме человека и снижать риск развития остеопороза. Для предупреждения остеопороза эффективно сочетание гидролизатов коллагена с кальцием и витамином D, что повышает плотность костной массы и уменьшает риск переломов. Показано (Chen et al., 2022) анаболическое влияние специфических коллагеновых пептидов на образование костей и повышение плотности минералов в костях. Женщины в период менопаузы применяли пептиды Fortibone® ежедневно по 5 г в течение одного года. Контрольная группа использовала мальтодекстрин. Необходимо отметить, что лекарственные средства, которые применяют для лечения остеопороза: бифосфонаты, моноклональные антитела, имеют побочные эффекты. Тогда как у гидролизатов коллагена, полученных в результате теплового и ферментативного гидролиза, они отсутствуют, или наблюдаются аллергические реакции лишь у небольшого числа пациентов.

Получены данные, что специфические коллагеновые пептиды повышают плотность минералов в костях у женщин (León-López et al., 2019).

Содержание маркеров N-концевого пропептида коллагена типа I (PINP) и C-концевого телопептида коллагена типа I (CTX1) показывает, что увеличивается образование костей и снижается их деградация. Коллагеновые пептиды могут действовать как сигнальные молекулы и таким образом влиять на анаболический процесс. Одна группа женщин в период менопаузы применяла гидролизаты коллагена в сочетании с кальцием и витамином D. Другая группа использовала комплекс пептидов коллагена в сочетании с кальцитонином, кальцием, витамином D. Установлено, что потеря костной массы у женщин второй группы значительно ниже, чем у женщин первой.

#### *Тендинопатия*

Для лечения болезни сухожилий ног (ахиллов тендинит) проведена (Hong et al., 2019) проверка действия комплекса из гидролизованного коллагена типа I, глюкозамина, хондроитин-сульфата, витамина С с растительными добавками. Клинические испытания по изучению снижения боли проводили в течение двух месяцев. Однако положительный эффект удалось установить лишь у 1/3 пациентов. Поэтому авторы работы применили более высокие концентрации компонентов, которые использовали в течение одного месяца, но положительного результата не получили.

Также для лечения ахиллова тендинита использован (Choudhary et al., 2021) комплекс из гидролизованного коллагена кожи свиней, хондроитин-сульфата, гиалуроната натрия и витамина С. Применение этого состава в течение трех месяцев более эффективно для снижения боли, по сравнению с приемом лекарства диклофенак.

Отметим, что применение нутрицевтических средств для лечения соединительных тканей требует длительного времени. Известно, что биосинтез коллагена в клетках и образование фибрилл коллагена во ВКМ кожи происходит в течение полугода (Persikov, Brodsky, 2002). Тогда как в хрящевой ткани на образование матрикса и укрепления ткани требуется около года (Лазерная инженерия хрящей, 2006). Такое различие, по-видимому, обусловлено более низким числом клеток (хондроцитов) в хрящевой ткани, по сравнению с клетками (фибробластами) кожной ткани.

#### *Остеоартроз (остеоартрит)*

Остеоартроз (остеоартрит) — это хроническое дегенеративно-дистрофическое заболевание суставов, которое характеризуется дегенера-

цией суставного хряща с последующими изменениями субхондральной кости. Вследствие воздействия различных факторов возникают нарушения обмена веществ, синтезирующей активности хондроцитов и повреждения матрикса суставного хряща. Установлено, что в основе нарушения структуры хряща лежат качественные изменения и количественное уменьшение протеогликанов и коллагеновых фибрилл (Клиническая ревматология, 2005). В норме в суставном хряще уравновешены процессы их синтеза и деградации. При остеоартрозе происходит потеря гликозаминогликанов, протеогликанов и изменение структуры коллагеновых фибрилл.

Определенную роль в патогенезе остеоартроза играет воспаление. Показано (Schadow et al., 2017), что при остеоартрозе активизируются ферменты, которые расщепляют протеогликаны: агреканызы ADAMTS4 и ADAMTS5. Затем действуют коллагеназы MMP-1, MMP-3 и MMP-13, далее расщепляющие протеогликаны, а также коллагеновые фибриллы.

Проверено влияние коллагеновых пептидов Mobiforte® (Astrid Twardy GmbH, Deutschland), Peptan® F 2000 и Peptan® F 5000 (Rousselot BVBA, Belgium) на обмен веществ у мышей. Показано, что коллагеновые пептиды регулируют содержание противовоспалительных цитокинов: IL-6, TNFα и sICAM-1. Обнаружено, что Mobiforte® и Peptan® F 5000 при относительно высоких концентрациях повышают содержание IL-6 в культуре хондроцитов. Mobiforte® и Peptan® F 5000 при этих концентрациях ингибировали также активность агреканызы ADAMTS4.

Исследование и лечение остеоартрита коленного сустава пептидами коллагена у женщин проводили в течение шести месяцев. Peptan® B 2000 (Rousselot BVBA, Belgium) получен из гиалиновых хрящей крупного рогатого скота. В качестве контроля (плацебо) использован мальтодекстрин. Женщины в возрасте от 40 до 70 лет принимали ежедневно по 8 г Peptan® B 2000. Клинические испытания показали положительное действие пептидов Peptan® B 2000 в виде снижения боли, повышения подвижности и улучшения функций коленного сустава у пациентов с остеоартритом. Коллагеновые пептиды снижали боль более эффективно, по сравнению с глюкозамином. Поэтому на основании проведенных исследований предложено (Bruyère et al., 2012) применять больным остеоартритом пептиды Peptan® B 2000 для улучшения своего здоровья.

Следует заметить, что используемые в медицинской практике гидролизаты коллагена, которые получают из разных тканей, облегчают состояние больных артритом и артрозами

на начальном и среднем этапе заболеваний (van Vlijven et al., 2012). Гидролизаты кожного коллагена в течение шести месяцев применяли в клинических испытаниях в трех странах: Англии, Германии и США (Moskowitz, 2000). Статистически значимое различие по снижению боли у пациентов, если сравнивать с пациентами, которые принимали плацебо, установлено лишь в Германии.

Цель исследования в работе (Zdzieblik et al., 2021) — оценка применения специфичных коллагеновых пептидов для уменьшения боли у спортсменов с проблемами функционирования коленей во время занятий спортом. Спортсмены с болью в суставах принимали по 5 г биологически активных пептидов коллагена Fortigel® (Gelita AG, Deutschland) или плацебо ежедневно в течение 12 недель. Данное исследование молодых физически активных индивидуумов показало, что ежедневный прием 5 г коллагеновых пептидов приводит к статистически значимому снижению боли в коленных суставах после 12 недель лечения, по сравнению с плацебо. В целом, этим исследованием подтверждена эффективность использования коллагеновых пептидов при болях в коленном суставе, при этом уровень физической активности определяет варианты терапии, режим применения и дозировки.

Остеоартрит протекает по механизму метаболических процессов катаболизма и анаболизма. Баланс в направлении анаболизма, биосинтеза коллагена и гликозаминогликанов, образования коллагеновых фибрилл и протеогликанов возможно регулировать низкомолекулярными пептидами коллагена и гликозаминогликанами. Потерю гликозаминогликанов и коллагена у больных остеоартрозом можно устранить нутрицевтиками, которые содержат низкомолекулярные компоненты и которые легко усваиваются. Применен (Farì et al., 2022) комплекс из пептидов коллагена Fortigel®, витамина С, гиалуроната натрия, марганца и меди в сочетании с лечебной физкультурой (кинезиотерапией). Больные испытывали хроническую боль в нижней части позвоночника — поясничный остеоартроз. Контролем была группа больных, реабилитацию которых проводили только лечебной физкультурой. Пероральная добавка гидролизированных пептидов коллагена Fortigel® показала себя как эффективное вспомогательное средство при неинвазивных методах лечения, которые используются в настоящее время для проблем, связанных с износом и старением суставных хрящей.

В 2010 г. показано (Asari et al., 2010), как гидролизат коллагена связывается с TLR4 (тол-

подобный рецептор 4), присутствуя в кишечном эпителии. Такое связывание индуцирует выработку IL-10 — цитокина с противовоспалительным действием. Более того, анализ массива ДНК из толстого кишечника показал, что гидролизат коллагена стимулирует повышающую экспрессию цитокина, но понижающую регуляцию экспрессии плейотропина. Эти биологические механизмы определяют противовоспалительные эффекты и модулируют биохимические пути боли.

Также терапевтический эффект заключается в том, что влияние гидролизата коллагена может быть достигнуто по механизму, подобному действию глюкозамина. Глюкозамин может облегчить симптомы, связанные с остеоартритом. Глюкозамин *in vivo* под действием лизосомальных ферментов превращается в N-ацетилглюкозамин внутри клеток (Anderson et al., 2005). N-ацетилглюкозамин — моносахарид, который вместе с глюкуроновой кислотой образует основной дисахарид в ГК. Поэтому N-ацетилглюкозамин, который получают для перорального приема ГК, может облегчить симптомы остеоартрита, в частности продемонстрирован (Punzi et al., 1989) противовоспалительный эффект аналогов ГК.

В исследовании (Clark et al., 2002) показано, что у морских свинок аскорбиновая кислота замедляет прогрессирующий остеоартрит посредством регуляции экспрессии и активности пролил-4-гидроксилазы коллагена II типа и агрекана в хряще. Следовательно, витамин С оказывает ряд регуляторных эффектов на костно-суставную систему, преимущественно при остеогенезе, хондрогенезе и остеобластогенезе (Aghajanian et al., 2015).

Медь служит кофактором для ряда ферментов, включая супероксиддисмутазу, цитохромоксидазу и лизилоксидазу, в хрящах и в других тканях. Последний фермент стимулирует поперечную сшивку полипептидных цепей коллагена и таким образом усиливает механическую прочность фибрилл. Дефицит меди приводит к уменьшению сшивки, что провоцирует ослабление хряща и способствует его фрагментации (Fife et al., 1994).

Марганец показал свою эффективность в уменьшении симптомов остеоартрита в сочетании с хондропротекторами (Ganini et al., 2018), возможно, благодаря антиоксидантному действию супероксиддисмутазы.

Рассмотрен (Elango et al., 2022) возможный механизм действия пептидов коллагена при лечении остеоартрита. Наиболее распространенный белок в суставном хряще и межпозвоночных дисках — коллаген типа II. Поэтому считается,

что он способствует росту, восстановлению и заживлению хрящей без побочных эффектов при пероральном приеме. В таблице работы (Elango et al., 2022) обобщены результаты исследований антиартритного действия коллагеновых пептидов. Ранее сообщалось (Paul et al., 2019), что коллагеновые добавки, содержащие большое количество глицина, пролина, оксипролина улучшают физиологию суставного хряща и защищают от окисления и воспаления.

Одна из основных задач приема коллагеновых добавок относится к регуляции перорально вводимых антигенов для подавления или снижения иммунного ответа (Mobasher et al., 2021). Реакция восприимчивости и невосприимчивости к коллагену зависит от спиральной структуры белка. Известно, что специфические эпитопы тройной спирали коллагена взаимодействуют с клетками иммунной системы. Считается, что пептиды с более низкой молекулярной массой могут без труда всасываться после приема пищи в тонком кишечнике и транспортироваться через кровеносную систему в остальную часть тела, включая кости и суставы, где они поддерживают гомеостаз (Skov et al., 2019). Чтобы облегчить всасывание и получить фрагменты пептидов, коллаген гидролизуют с помощью тепловой денатурации и ферментов. В зависимости от процесса могут быть получены совершенно разные пептиды коллагена с уникальными пептидными последовательностями и молекулярной массой. Различные биологические процессы, в частности снижение воспаления суставов и субхондральной кости, могут регулироваться пептидами коллагена. Кроме того, коллагеновые пептиды с более низкой молекулярной массой могут лучше всасываться в тонком кишечнике и тем самым достигать тканей-мишеней, включая суставы.

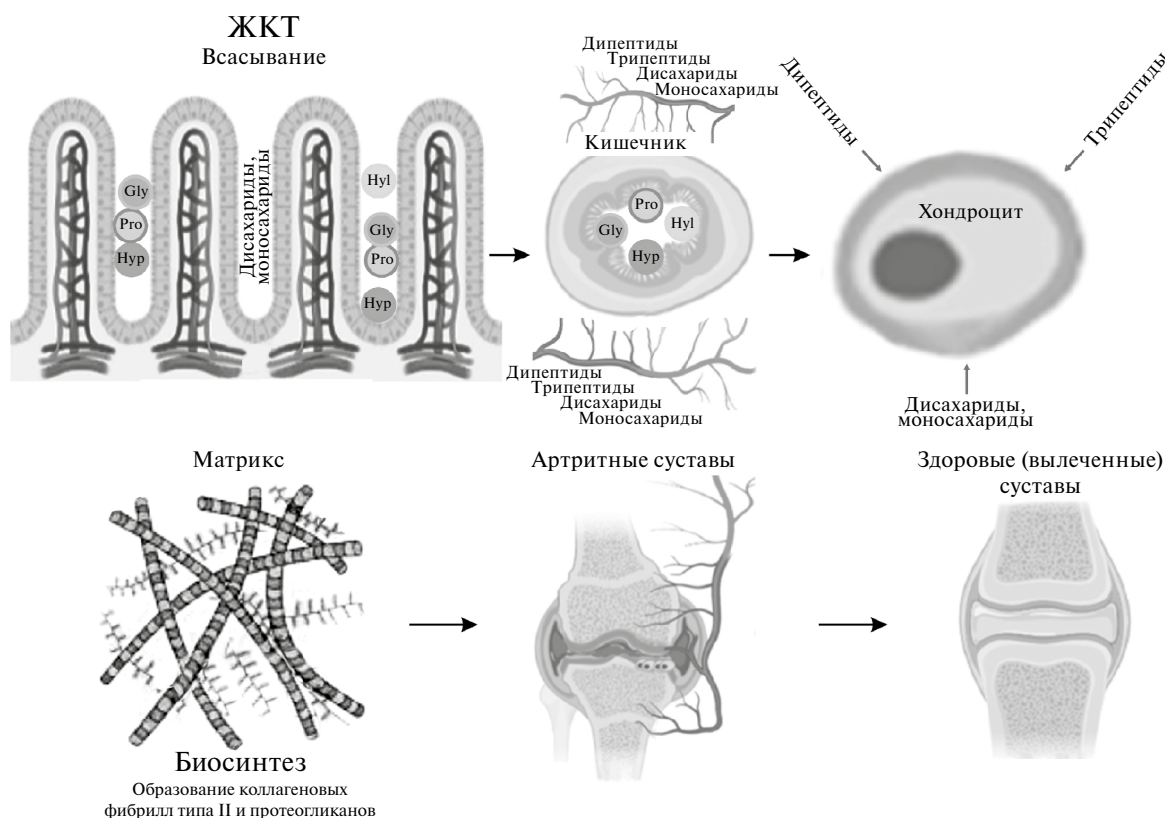
Исследования показали, что гидролизованные коллагеновые пептиды с молекулярной массой около 8 кДа (Zhang et al., 2016) всасываются через ворсинки кишечника, а пептиды коллагена в диапазоне от 1.5 до 2.5 кДа (Oesser et al., 1999) поглощаются серозной оболочкой кишечника и оздоравливают суставы. После приема внутрь организма пептиды обнаруживаются в кровеносной системе на протяжении 4 ч (Wang et al., 2015). Сигналы инициируются связыванием пептидов коллагена с  $\alpha 2A$ -доменом рецептора интегрин, что способствует росту хондроцитов (Siebert et al., 2010).

Утверждается (Pabst, Mowat, 2012), что коллагеновые пептиды уменьшают системные атаки Т-клеток на хрящ за счет взаимодействия эпитопов с тканью кишечника, что позволяет избежать повреждения хряща и воспаления

суставов. Гидролизаты коллагена расщепляли и далее превращали в более мелкие пептиды для придания им иммуномодулирующих свойств. Более мелкие пептиды улучшают биодоступность коллагена, по сравнению с неденатурированным коллагеном (León-López et al., 2019). Чтобы подтвердить это открытие, несколько исследований *in vitro* показали, что пептиды коллагена могут накапливаться в хряще при высоких дозах, активизировать хондроциты для образования макромолекул ВКМ, стимулировать активность остеобластов и подавлять активность остеокластов (Oesser et al., 2003; Guillerminet et al., 2010).

Клиническое исследование с участием 147 здоровых атлетов, которым давали по 25 мл жидкого препарата (содержащего 10 г гидролизата коллагена) и жидкий ксантан (группа плацебо), показало, что добавление гидролизатов коллагена уменьшает дискомфорт и боль в суставах при ходьбе, переносе предметов и поднятии тяжестей (Clark et al., 2008). В другом клиническом исследовании 15 здоровых мужчин получали разовую дозу перорального препарата, состоящего из 10 г гидролизата коллагена, растворенного в 100 мл молока или воды. Исследование показало наличие более высокой концентрации специфичных для коллагена аминокислот (глицин, пролин, оксипролин и оксилизин) в плазме крови, которые затем были обнаружены в синовиальной ткани сустава (Walrand et al., 2008). Полученные в работе (Schunck et al., 2007) результаты позволяют сделать предположение, что коллагеновый пептид типа II способствует уменьшению дегенеративных изменений во ВКМ, стимулируя анаболические процессы в хрящевой ткани.

Анализируя данные литературы, мы полагаем, что более эффективно могут всасываться и участвовать в образовании ВКМ ди- и трипептиды коллагена, моно- и дисахариды гликозаминогликанов. Мы предлагаем следующий механизм поступления необходимых компонентов для лечения артрита, который схематически изображен на рис. 4.



**Рис. 4.** Предложен возможный механизм поступления компонентов для биосинтеза коллагена, протеогликанов и образования матрикса хрящевой ткани. Аминокислоты глицин (Gly), пролин (Pro), гидроксипролин (Hyp), гидроксилизин (Hyl) входят в структуру тройной спирали коллагена, составляют основные компоненты триплетов Gly-X-Y. После расщепления молекул коллагена в ЖКТ до аминокислот, дипептидов и трипептидов происходит их всасывание, поступление в кровь, а затем в хондроциты. Дипептиды состоят из двух аминокислотных остатков, трипептиды — из трех. Пептиды и синтезированные в клетках молекулы связываются вблизи поверхности клеток, образуя внеклеточный матрикс и хрящевую ткань. Происходит замещение разрушенных хрящей новыми хрящами.

## ВИТАМИННО-МИНЕРАЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС

Эффективность нутрицевтиков возрастает, если в их состав входят витамины, микро- и макроэлементы. Эти вещества активизируют ферменты, стимулируют биосинтез коллагена и протеогликанов. Морские водоросли фукус пузырчатый и аскофиллум узловатый, на основе которых получены (Сова, Попова, 2008) лечебно-профилактические пищевые добавки в ООО “Натив” (г. Пушкино Московской обл.), содержат полный набор витаминов, микро- и макроэлементов, требующихся для образования ВКМ. Для укрепления суставно-связочного аппарата создан состав из водорослей, витамина D и автолизата дрожжей с микро- и макроэлементами, полученными в хелатной форме (Шеховцов, 2018).

Следует отметить, что нутрицевтики других производителей, например Geladrink® (Orling, Čeština), содержат витамины и минералы, состав которых не полон для стимуляции образования фибрилл коллагена в соединительных тканях. Нашими научно-техническими разработками нутрицевтиков решается проблема профилактики болезней суставов и позвоночника. Кроме того, приемом нутриентов можно предотвратить болезни соединительных тканей на начальном этапе заболевания.

Мы разработали природоподобную технологию получения комплексов низкомолекулярных пептидов коллагена с гликозаминогликанами. Более того, мы дополнили комплексы витаминами, микро- и макроэлементами, которые специфичны для соединительных тканей и которые могут катализировать ферменты клеток и ВКМ.

Заметим, что мышечно-скелетные и суставные боли после перенесенного ковида остаются в течение одного–трех месяцев (Lauwers et al., 2022). Чтобы поддержать организм и опорно-двигательную систему в этот период желательно принимать комплексы из низкомолекулярных пептидов коллагена и гликозаминогликанов, дополненные витаминами C, B2, B6, D и минералами: железом, медью, марганцем, а также другими витаминами и минералами, входящими в структуру ВКМ соединительных тканей.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При лечении болезней опорно-двигательного аппарата лекарственные средства на основе коллагена не созданы. Для устранения создавшегося пробела в последние 10–15 лет разрабатывают нутрицевтики, которые получают из тканей

животных и гидробионтов, дополненные компонентами растительного происхождения. Нутрицевтики — это концентраты биологически активных веществ, которые используются для улучшения здоровья. В последние годы ученых и диетологов привлекает стратегия, включающая прием нутриентов для регуляции обмена веществ. В отличие от лекарств, негативно воздействующих на печень и другие внутренние органы, вещества из соединительных тканей животных, полученные после денатурации коллагена, не имеют побочного эффекта или же обладают слабым побочным эффектом. Безопасность и эффективность гидролизованного коллагена и пептидов коллагена при артритах и артрозах показаны в многочисленных клинических исследованиях.

Проектирование состава нутрицевтиков на основе коллагена и протеогликанов помогает решить проблему восполнения недостающих структурных компонентов в тканях опорно-двигательного аппарата. Одним из перспективных решений проблемы восполнения является получение комплекса низкомолекулярных пептидов коллагена с гликозаминогликанами, которые специфичны для соединительных тканей.

Отметим, что при заболеваниях опорно-двигательного аппарата в наибольшей степени разрушаются хрящи. Нарушения в тканях при артритах и артрозах происходят в гиалиновых хрящах. Поэтому в нашей работе в качестве объекта исследования взяты гиалиновые хрящи сельскохозяйственных животных.

Наш метод получения гидролизатов (низкомолекулярных пептидов) коллагена включает гомогенизацию сырья при оптимальных условиях, определение физико-химических свойств гомогенатов, а также ферментативный гидролиз гомогенатов. Для решения задач импортозамещения проводится поиск ферментов российских производителей в целях изучения их действия на соединительные ткани и применения в разработках гидролизатов коллагена. Низкомолекулярные пептиды коллагена, содержащие две–три аминокислоты, более эффективно участвуют в биосинтезе коллагена и образовании фибрилл коллагена. Пептиды с большим содержанием аминокислот могут быть структурными блоками для образования фибрилл коллагена (Ahmed et al., 2020).

Мы получили комплекс низкомолекулярных пептидов коллагена типа II и дисахаридов гликозаминогликанов, молекулярные массы которых изменяются от 240 до 720 Da. Наши образцы по молекулярным массам сравнимы с аналогом FlexiNovo (Польша) и имеют преимущества

по сравнению аналогом BioCell Collagen II (США). Комплекс низкомолекулярных пептидов коллагена с гликозаминогликанами может найти применение при лечении хронических болезней соединительных тканей, а также для укрепления тканей в восстановительный период после перенесенного ковида.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы считают своим приятным долгом выразить благодарность рецензентам за критический анализ рукописи и ценные замечания.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Экспериментальная часть работы выполнена сотрудниками в рамках бюджетного финансирования по Государственному заданию ИТЭБ РАН № 075-00224-01 по теме №5 “Физико-химические основы биомедицины” и при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, программа Старт-1, соглашение № 183ГС1/8727.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Поскольку целью данного обзора был анализ имеющихся в литературе данных по разработке низкомолекулярных пептидов коллагена, их комплексов с гликозаминогликанами, а также сравнение их по характеристикам с образцами, полученными в наших исследованиях, в небольшой по объему экспериментальной части работы мы не применяли животных в качестве объектов исследований. Сырье для экспериментов было закуплено в магазине в замороженном виде и сопровождалось ветеринарно-санитарной документацией.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Игнатьева Н.Ю., Аверкиев С.В., Соболев Э.Н., Лукин В.В. Денатурация коллагена II в хрящевой ткани при термическом и лазерном нагреве // Журн. физ. хим. 2005. Т. 79 (8). С. 1505–1513.
- Капцов В.В., Русаков Г.Н., Илларионов Ю.А. и др. Лабораторный гомогенизатор. Патент РФ № 2035855. Заявка 06.09.1989. Оpubл. 27.05.1995.
- Клиническая ревматология / Ред. В.И. Мазуров. СПб.: Фолиант, 2005. 515 с.
- Лазерная инженерия хрящей / Ред. В.Н. Багратишвили, Э.Н. Соболев, А.Б. Шехтер. М.: Физматлит, 2006. 488 с.
- Николаева Т.И., Тиктопуло Е.И., Ильясова Е.Н., Кузнецова С.М. Структурно-термодинамические аспекты упаковки коллагеновых фибрилл // Биофизика. 2007. Т. 52 (5). С. 899–911.
- Николаева Т.И., Кузнецова С.М., Рогачевский В.В. Фибриллообразование коллагена *in vitro* при температурах, близких к физиологической // Биофизика. 2012. Т. 57. С. 973–981.
- Николаева Т.И., Молчанов М.В., Лауринавичюс К.С. и др. Ферментативный гидролиз биополимеров хрящевой ткани под влиянием фитопаина // Междунар. журн. прикл. фонд. иссл. 2015. Т. 12 (7). С. 1252–1256.
- Николаева Т.И., Молчанов М.В., Лауринавичюс К.С. и др. Исследование ферментативного гидролиза коллагенов хрящевой ткани // Междунар. журн. прикл. фонд. иссл. 2016. Т. 10 (3). С. 442–447.
- Николаева Т.И., Лауринавичюс К.С., Капцов В.В. и др. Разработка комплекса низкомолекулярных пептидов коллагена с гликозаминогликановыми компонентами // Бюл. эксперим. биол. мед. 2018. Т. 165 (5). С. 571–576.
- Николаева Т.И., Лауринавичюс К.С., Капцов В.В. и др. Коллагеновые пептиды из гиалиновых хрящей для лечения и профилактики болезней суставов: получение и свойства // Бюл. эксперим. биол. мед. 2019. Т. 167 (2). С. 194–199.
- Николаева Т.И., Кузнецова С.М., Емельяненко В.И. и др. Получение коротких пептидов коллагена типа II: температурные условия гомогенизации хрящей и гидролиз коллагена // Бюл. эксперим. биол. мед. 2021. Т. 171 (1). С. 28–31.
- Николаева Т.И., Барсук Д.А., Молчанов М.В. и др. Сравнительный анализ степени гидролиза биополимеров в гомогенатах гиалиновых хрящей под воздействием протеолитических ферментов // Биофизика. 2023. Т. 68 (6). С. 1229–1236.
- Павлова В.Н., Копьева Т.Т., Слуцкий Л.И., Павлов Г.Г. Хрящ. М.: Медицина, 1988. 318 с.
- Пивненко Т.Н., Клычкова Г.Ю., Ковалев Н.Н. и др. Пищевой общеукрепляющий профилактический продукт из хрящевой ткани гидробионтов и способ его получения. Патент РФ № 2250047С1. Оpubл. 20.04.2005.
- Пивненко Т.Н., Ковалев Н.Н., Запорожец Т.С. Биологически активная добавка к пище “Артрофиш” (в помощь практическому врачу). М.: Академия Естествознания, 2015. 66 с.
- Потупчик Т., Веселова О., Эверт Л. и др. Спектр фармакологических эффектов глицина // Врач. 2015. № 12. С. 14–17.
- Сова В.В., Попова Н.Д. Способ получения лечебно-профилактической добавки. Патент РФ № 2384342. Заявка 24.11.2008. Оpubл. 20.03.2010.
- Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение. М.: Аграрная наука, 2000. 296 с.

- Тутельян В.А., Хавинсон В.Х., Малинин В.В. Физиологическая роль коротких пептидов в питании // Бюл. эксп. биол. мед. 2003. Т. 135 (1). С. 1–5.
- Хавинсон В.Х., Малинин В.В., Рыжак Г.А. Способ получения средства для поддерживающей терапии, обладающего тканеспецифичной активностью // Патент РФ № 2290936С1. Опубл. 10.01.2007.
- Шеховцов П.В. Биологически активная добавка к пище на основе бурых морских водорослей для устранения соединительнотканной недостаточности и укрепления суставно-связочного аппарата. Патент РФ № 2653001С1. Опубл. 04.05.2018.
- Ших Е.В. Клинико-фармакологические аспекты применения гидролизованного коллагена второго типа для профилактики и лечения остеоартроза // Фармакол. фармакотер. 2021. № 4. С. 10–18.
- Эдсол Д., Гатфренд Х. Биотермодинамика. М.: Мир, 1986. 296 с.
- Aghajanian P., Hall S., Wongworawat M.D., Mohan S. The roles and mechanisms of actions of vitamin C in bone: new developments // J. Bone Miner. Res. 2015. V. 30 (11). P. 1945–1955.
- Ahmed M., Verma A.K., Patel R. Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: a review // Sust. Chem. Pharm. 2020. V. 18. P. 315–328.
- Aigner T., Stöve J. Collagens — major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair // Adv. Drug Deliv. Rev. 2003. V. 55. P. 1569–1593.
- Aleman A., Gomez-Guillen M., Montero P. Identification of ACE-inhibitory peptides from squid skin collagen after *in vitro* gastrointestinal digestion // Food Res. Int. 2013. V. 54 (1). P. 790–795.
- Alkayali A. Hydrolysed collagen type II and use thereof. Patent US6025327A. Appl. 2000.02.15. Publ. 2017.08.08.
- Ameye L.G., Chee W.S. Osteoarthritis and nutrition. From nutraceuticals to functional foods: a systematic review of the scientific evidence // Arthr. Res. Ther. 2006. V. 8 (4). P. R127.
- Anderson J.W., Nicolosi R.J., Borzelleca J.F. Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy // Food Chem. Toxicol. 2005. V. 43 (2). P. 187–201.
- Asari A., Kanemitsu T., Kurihara H. Oral administration of high molecular weight hyaluronan (900 kDa) controls immune system *via* Toll-like receptor 4 in the intestinal epithelium // J. Biol. Chem. 2010. V. 285 (32). P. 24751–24758.
- Bruyère O., Zegels B., Leonori L. et al. Effect of collagen hydrolysate in articular pain: a 6-month randomized, double-blind, placebo controlled study // Comp. Ther. Med. 2012. V. 20 (3). P. 124–130.
- Chen Y., Chen J., Chen J. et al. Recent advances in seafood bioactive peptides and their potential for managing osteoporosis // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2022. V. 62 (5). P. 1187–1203.
- Choudhary A., Sahu S., Vasudeva A. et al. Comparing effectiveness of combination of collagen peptide type I, low molecular weight chondroitin sulfate, sodium hyaluronate and vitamin C versus oral diclofenac sodium in Achilles tendinopathy a prospective randomized control trial // Cureus. 2021. V. 13 (11). P. e19737.
- Clark A.G., Rohrbaugh A.L., Otterness I., Kraus V.B. The effects of ascorbic acid on cartilage metabolism in guinea pig articular cartilage explants // Matrix Biol. 2002. V. 21 (2). P. 175–184.
- Clark K.L., Sebastianelli W., Flechsenhar K.R. et al. 24-week study on the use of collagen hydrolysate as a dietary supplement in athletes with activity-related joint pain // Curr. Med. Res. Opin. 2008. V. 24. P. 1485–1496.
- Elango J., Zamora-Ledezma C., Ge B. et al. Paradoxical dual role of collagen in rheumatoid arthritis: cause of inflammation and treatment // Bioengineering. 2022. V. 9. P. 321–340.
- Fari G., Santagati D., Pignatelli G. et al. Collagen peptides, in association with vitamin C, sodium hyaluronate, manganese and copper, as part of the rehabilitation project in the treatment of chronic low back pain // Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets. 2022. V. 22 (1). P. 108–115.
- Fife R.S., Moody S., Houser D., Proctor C. Studies of copper transport in cultured bovine chondrocytes // Biochim. Biophys. Acta. 1994. V. 1201 (1). P. 19–22.
- Fox A.J.S., Bedi A., Rodeo A.S. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function // Sports Health. 2009. V. 1 (6). P. 461–468.
- Ganini D., Santos J.H., Bonini M.G., Mason R.P. Switch of mitochondrial superoxide dismutase into a prooxidant peroxidase in manganese-deficient cells and mice // Cell Chem. Biol. 2018. V. 25 (4). P. 413–425.
- Grover A.K., Samson S.E. Benefits of antioxidant supplements for knee osteoarthritis: rationale and reality // Nutr. J. 2016. V. 15 (1). P. 1–13.
- Guillerminet F., Beaupied H., Fabien-Soulé V. et al. Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: an *in vitro* and *in vivo* study // Bone. 2010. V. 46. P. 827–834.



- Hisada N., Satsu H., Mori A. et al.* Low-molecular-weight hyaluronan permeates through human intestinal Caco-2 cell monolayers via the paracellular pathway // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008. V. 72. P. 1111–1114.
- Hong H., Fan H., Chalamaiah M., Wu J.* Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): current progress, challenges, and future perspectives // *Food Chem.* 2019. V. 301. P. 222–232.
- Hong M.-H., Lee J.H., Jung H.S. et al.* Biomineralization of bone tissue: calcium phosphate-based inorganics in collagen fibrillar organic matrices // *Biomater. Res.* 2022. V. 26. P. 42–71.
- Kucharz E.J.* The collagen: biochemistry and pathophysiology. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 430 p.
- Lauwers M., Au M., Yuan S., Wen C.* COVID-19 in joint ageing and osteoarthritis: current status and perspectives // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23 (2). P. 720–737.
- León-López A., Morales-Peñaloza A., Martínez-Juárez V.M. et al.* Hydrolyzed collagen — sources and applications // *Molecules.* 2019. V. 24 (22). P. 4031–4047.
- Lopez H.L.* Nutritional interventions to prevent and treat osteoarthritis. Part II: focus on micronutrients and supportive nutraceuticals // *PM R.* 2012. V. 4. P. S155–S168.
- Mobasheri A., Mahmoudian A., Kalvaityte U. et al.* A white paper on collagen hydrolyzates and ultrahydrolyzates: potential supplements to support joint health in osteoarthritis? // *Curr. Rheumatol. Rep.* 2021. V. 23. P. 78–93.
- Moskowitz R.W.* Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease // *Semin. Arthr. Rheum.* 2000. V. 30. P. 87–99.
- Oesser S., Adam M., Babel W., Seifert J.* Oral administration of (14)C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL) // *J. Nutr.* 1999. V. 129. P. 1891–1895.
- Oesser S., Seifert J.* Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen // *Cell Tiss. Res.* 2003. V. 311. P. 393–399.
- Pabst O., Mowat A.M.* Oral tolerance to food protein // *Mucosal. Immunol.* 2012. V. 5. P. 232–239.
- Paul C., Leser S., Oesser S.* Significant amounts of functional collagen peptides can be incorporated in the diet while maintaining indispensable amino acid balance // *Nutrients.* 2019. V. 11. P. 1079–1088.
- Persikov A.V., Brodsky B.* Unstable molecules form stable tissues // *PNAS USA.* 2002. V. 99 (3). P. 1101–1103.
- Porfírio E., Fanaro G.B.* Collagen supplementation as a complementary therapy for the prevention and treatment of osteoporosis and osteoarthritis: a systematic review // *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.* 2016. V. 19 (1). P. 153–164.
- Punzi L., Schiavon F., Cavašin F. et al.* The influence of intra-articular hyaluronic acid on PGE2 and cAMP of synovial fluid // *Clin. Exp. Rheumatol.* 1989. V. 7 (3). P. 247–250.
- Schadow S., Simons V.S., Lochnit G. et al.* Metabolic response of human osteoarthritic cartilage to biochemically characterized collagen hydrolysates // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18 (1). P. 207–227.
- Schunck M., Schulze C.H., Oesser S.* P189 collagen hydrolysate supplementation stimulates proteoglycan metabolism and gene expression of articular chondrocytes // *Osteoarth. Cartilage.* 2007. V. 15. P. B136.
- Selvakumar P., Ling T.C., Covington A.D., Lyddiatt A.* Enzymatic hydrolysis of bovine hide and recovery of collagen hydrolysate in aqueous two-phase systems // *Separ. Purific. Technol.* 2012. V. 89. P. 282–287.
- Siebert H.C., Burg-Roderfeld M., Eckert T. et al.* Interaction of the  $\alpha 2A$  domain of integrin with small collagen fragments // *Protein Cell.* 2010. V. 1. P. 393–405.
- Skov K., Oxfeldt M., Thøgersen R. et al.* Enzymatic hydrolysis of a collagen hydrolysate enhances postprandial absorption rate — a randomized controlled trial // *Nutrients.* 2019. V. 11. P. 1064.
- van Vijven J.P., Luijsterburg P.A., Verhagen A.P. et al.* Symptomatic and chondroprotective treatment with collagen derivatives in osteoarthritis: a systematic review // *Osteoarthritis Cartilage.* 2012. V. 20 (8). P. 809–821.
- Walrand S., Chiotelli E., Noirt F. et al.* Consumption of a functional fermented milk containing collagen hydrolysate improves the concentration of collagen-specific amino acids in plasma // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V. 56. P. 7790–7795.
- Wang L., Wang Q., Liang Q. et al.* Determination of bioavailability and identification of collagen peptide in blood after oral ingestion of gelatin // *J. Sci. Food Agric.* 2015. V. 95. P. 2712–2717.
- Zdzieblik D., Brame J., Oesser S. et al.* The influence of specific bioactive collagen peptides on knee joint discomfort in young physically active adults: a randomized controlled trial // *Nutrients.* 2021. V. 13 (2). P. 523.
- Zhang J., Jeevithan E., Bao B. et al.* Structural characterization, *in vivo* acute systemic toxicity assessment and *in vitro* intestinal absorption properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin acid and pepsin solubilized type I collagen // *Proc. Biochem.* 2016. V. 51. P. 2017–2025.

## **Complex of Collagen Peptides and Glycosaminoglycans: Prevention and Treatment of Diseases of the Musculoskeletal System**

**T. I. Nikolaeva<sup>a,\*</sup>, K. S. Laurinavichus<sup>b</sup>, M. V. Molchanov<sup>a</sup>,  
S. M. Kuznetsova<sup>a</sup>, V. I. Emelyanenko<sup>a</sup>, P. V. Shekhovtsov<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, Russia*

<sup>b</sup>*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino,  
Moscow region, Russia*

*\*e-mail: tomivnik@yandex.ru*

Disorders of the human musculoskeletal system represent medical problem. Diseases of arthritis, arthrosis of joints, chondrodysplasia of the spine are accompanied by destruction of connective tissues, their structural components: collagen fibrils and proteoglycans. Glycosaminoglycans (chondroprotectors) have been used for a long time to treat arthritis and arthrosis, while collagen peptides (hydrolyzed collagen) are used only in the last 10–15 years to treat joint diseases. Designing the composition of nutraceuticals made of collagen and proteoglycans helps to solve the problem of replenishing missing structural components in the tissues of the musculoskeletal system. We consider that one of promising solutions of this problem is to obtain the complex of collagen peptides and glycosaminoglycans specific for connective tissues. The purpose of this review is to analyze the data available in the literature about collagen peptides, their complexes with glycosaminoglycans and to compare their characteristics with the samples obtained in our studies.

**Keywords:** collagen, low molecular weight peptides, glycosaminoglycans, mass spectrometry, NMR spectroscopy, molecular weights, complex of vitamins and minerals