

**ТЕХНОЛОГИЯ ОБРАБОТКИ ГИДРОБИОНТОВ
TECHNOLOGY OF HYDROBIONTS PROCESSING**

Научная статья

УДК 664.951.014:577.114**DOI: 10.26428/1606-9919-2022-202-946-956****EDN: LPMGXV****ХАРАКТЕРИСТИКА СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ
ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ СКАТОВ И ОСЕТРОВ****А.И. Чепкасова, Т.Н. Слуцкая, Е.П. Караулова***Тихоокеанский филиал ВНИРО (ТИНРО),
690091, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4

Аннотация. Из хрящевой ткани ската и осетра (калуги) получены сульфатированные гликозаминогликаны (ГАГ) — хондроитинсульфаты — при следующих условиях: гидротермическая обработка сырья при 50 °С; гидролиз протеолитическим ферментом (гидромуль 1 : 1; температура 45 °С; длительность 4 ч), последовательное осаждение ГАГ спиртом (2–3 объемами этилового спирта (96°) с высаливанием 2 %-ным раствором хлорида натрия. В полученных образцах определено содержание гексозаминов и сульфатированных ГАГ: установлено, что ГАГ из ската и калуги отличаются высоким содержанием сульфатированных форм, сравнимым с коммерческим препаратом, что открывает перспективы разработки технологии получения из отходов при разделке этих объектов монокомпонентных биологически активных добавок хондропротекторного действия.

Ключевые слова: скат, калуга, хрящевая ткань, хондроининсульфат, гликозаминогликаны, сульфатированные гликозаминогликаны, гексозамины, хондропротекторы

Для цитирования: Чепкасова А.И., Слуцкая Т.Н., Караулова Е.П. Характеристика сульфатированных гликозаминогликанов хрящевой ткани скатов и осетров // Изв. ТИНРО. — 2022. — Т. 202, вып. 4. — С. 946–956. DOI: 10.26428/1606-9919-2022-202-946-956. EDN: LPMGXV.

Original article

**Characteristics of sulfated glycosaminoglycans in the cartilage tissue
of skate and sturgeon****Anna I. Chepkasova*, Tatiana N. Slutskaia**, Ekaterina P. Karaulova*****

*, **, *** Pacific branch of VNIRO (TINRO),

4, Shevchenko Alley, Vladivostok, 690091, Russia

* Ph.D., leading specialist, anna.chepkasova@tinro-center.ru, ORCID 0000-0002-5643-3601

** D.Tech., professor, principal researcher, tatyana.slutskaia@tinro-center.ru,
ORCID 0000-0002-3228-3047

*** Ph.D., leading researcher, karaulova2002@yandex.ru, ORCID 0000-0001-8508-9603

* Чепкасова Анна Ивановна, кандидат технических наук, ведущий специалист, anna.chepkasova@tinro-center.ru, ORCID 0000-0002-5643-3601; Слуцкая Татьяна Ноевна, доктор технических наук, профессор, главный научный сотрудник, slutskaia@tinro-center.ru, ORCID 0000-0002-3228-3047; Караулова Екатерина Павловна, кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник, karaulova2002@yandex.ru, ORCID 0000-0001-8508-9603.

© Чепкасова А.И., Слуцкая Т.Н., Караулова Е.П., 2022

Abstract. Sulfated glycosaminoglycans (GAGs) or chondroitin sulfates were obtained from the cartilage tissue of skate (indefinite species) and sturgeon (kaluga) under the processes of hydrothermal treatment of raw materials at 50 °C, then hydrolysis with proteolytic enzyme in 4 hours under temperature 45 °C (hydromodulus 1 : 1), then sequential precipitation of GAGs in 2–3 volumes of 96° ethyl alcohol and salting out with 2 % sodium chloride solution. The content of hexosamines and sulfated GAGs was determined in the extracted samples. GAGs of both skate and sturgeon have a high content of sulfated forms, comparable to commercial preparations, that opens up prospects for development of technology for production of mono-component biologically active additives of chondroprotective action from the wastes of skates and sturgeons processing.

Keywords: skate, kaluga, cartilage tissue, chondroitin sulfate, glycosaminoglycans, sulfated glycosaminoglycans, hexosamines, chondroprotector

For citation: Chepkasova A.I., Slutskaia T.N., Karaulova E.P. Characteristics of sulfated glycosaminoglycans in the cartilage tissue of skate and sturgeon, *Izv. Tikhookean. Nauchno-Issled. Inst. Rybn. Khoz. Okeanogr.*, 2022, vol. 202, no. 4, pp. 946–956. (In Russ.). DOI: 10.26428/1606-9919-2022-202-946-956. EDN: LPMGXV.

Введение

Гликозаминогликаны (ГАГ) наземных и морских организмов представлены как несulfатированными (гиалуроновая кислота, гепарин), так и сульфатированными формами (дерматансульфат, хондроитинсульфат, гепарансульфат, кертансульфат). Хондроитинсульфаты (ХС) — сульфатированные гликозаминогликаны — входят в состав хрящевого матрикса практически всех органов, содержатся в хряще, коже, сухожилиях, связках, артериях, роговице глаза и т.д. [Панасюк, Ларионов, 2000; Volpi, 2006; Lauder, 2009].

Отходы от переработки рыбного сырья (плавники, чешуя, скелет, кости и хрящи) могут являться перспективными источниками ХС в силу доступности и невысокой стоимости, причем наиболее ценными являются хрящевые ткани [Silva et al., 2012].

Хондроитинсульфаты обладают противовоспалительной активностью и используются для облегчения симптоматики остеоартрита, характеризуются противовирусными свойствами, применяются в тканевой инженерии и косметике, что в последние годы увеличило их коммерческий спрос. В клинике сульфатированные ГАГ используются в качестве хондропротекторных препаратов при всех типах артрита у человека [Camro et al., 2004; Uebelhart et al., 2004; Reginster et al., 2017]. ХС — основные компоненты известных препаратов хондропротекторного действия, таких, например, как «Хондроитин-Акос» (Россия), «Структум» (Франция), «Глюкозаминосульфат» (США), «Хонсурид» (Россия) и др.

Известно, что с помощью белков ГАГ присоединяются к гиалуроновой кислоте и в виде солей или комплексов с коллагеном являются составной частью соединительной ткани [Volpi, 2006]. Поэтому методы, используемые для их количественного выделения, основаны на деструкции белковых компонентов протеолитическими ферментами. Как правило, проводят глубокий гидролиз протеазами широкого спектра действия, используя, например, папаин, трипсин, химотрипсин, щелочные протеолитические ферменты или их комбинации [Medeiros et al., 2000; Jo et al., 2005; Maccari et al., 2015; Abdallah et al., 2020]. Исследования, посвященные изучению действия различных ферментов на хрящевую ткань при получении хондроитинсульфата, показывают, что для ферментативного гидролиза наиболее целесообразно использовать субстратспецифичный ферментный препарат — коллагеназу [Пентин, Вилков, 2003; Сорокоумов и др., 2007]. Также установлена эффективность последовательного использования ферментов коллагенолитического и протеолитического действия [Гармашов, 2018]. Согласно данным литературы для гидролиза тканей хрящевых рыб возможно использование ферментов микробиального происхождения, обладающих протеолитической и коллагенолитической активностями, таких как протомекс [Jo et al., 2004, 2005; Суховерхова, 2006; Пат. РФ 2623738].

Следующим этапом является отделение белковой части от смеси ГАГ, которое осуществляется при помощи различных методов: осаждение спиртом, трихлоуксусной кислотой, высаливание, ионообменная хроматография [Im et al., 2010; Panagos et al., 2014; Gui et al., 2015; Maccari et al., 2015; Lin et al., 2017; Sundaresan et al., 2018].

Для получения чистых фракций хондроитинсульфатов из растворов ГАГ применяют различные препаративные методы, такие как фракционирование органическими растворителями, четвертичными солями аммония, ионообменная хроматография и др. [Volpi, 2006; Im et al., 2010; Panagos et al., 2014; Krichen et al., 2017; Lin et al., 2017].

Целью работы являлась характеристика хондроитинсульфатов, полученных из хрящевой ткани калуги и ската, а также сравнение их с препаратом хондропротекторного действия.

Материалы и методы

Объектом исследования являлась хрящевая ткань калуги культивированной *Huso dauricus* и ската *Bathyraja parmifera*.

Для исследований были взяты отходы от разделки — хвостовая часть позвоночника с прирезами мышечной ткани. В качестве протеазы использован протамекс из *Bacillus protease* (Denmark) с активностью 1,5 AU/g.

Объектом для сравнения взят фармацевтический препарат «Хондроитин-Акос», содержащий в качестве активного вещества хондроитин сульфат натрия.

С учетом известных способов выделения сульфатированных гликозаминогликанов последовательно выполняли следующие операции:

— частичное удаление жира и сопутствующих белковых компонентов проводили промывкой водой (температура — 50 °С) измельченного хряща [Пат. РФ 2061485; Tadashi, 2004];

— удаление белков (протеолиз с применением протамекса) [Medeiros et al., 2000];

— извлечение ГАГ из гидролизатов осуществляли фракционированием этанолом и высаливанием (хлорид натрия) [Medeiros et al., 2000];

— осаждение хондроитинсульфатов из суммы ГАГ осуществляли фракционированием этанолом [Volpi, 1994, 1996; Werneck et al., 2000; Theocharis et al., 2001; Martins et al., 2003].

Для количественного определения гликозаминогликанов в хрящевой ткани и выделенном из нее ХС применяли метод определения суммы гексозаминов по Элсон-Морган [Elson, Morgan, 1933], который имеет несколько модификаций [Immers, Vasseur, 1950; Jang et al., 2005]. В соответствии с методом ГАГ гидролизовали 6 М HCl в течение 8 ч при 100 °С, далее после ацетилирования проводили реакцию с реактивом Эрлиха и спектрофотометрическое определение. Количество гексозаминов определяли в соответствии с калибровочным графиком (рис. 1).

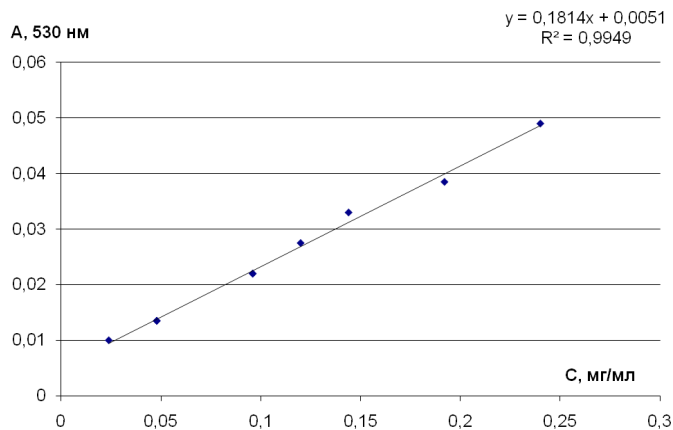


Рис. 1. Калибровочный график по методу Элсон-Морган
Fig. 1. Elson-Morgan calibration

Количественное определение ХС, основанное на реакции сульфатированных ГАГ с красителем 1,9-диметилметиленовый синий, проводили спектрофотометрическим методом после построения калибровочной [Farndale et al., 1986; Stone et al., 1994] (рис. 2). Содержание гексозаминов и сульфатированных ГАГ выражали в миллиграммах путем пересчета на массу ткани или полученного препарата.

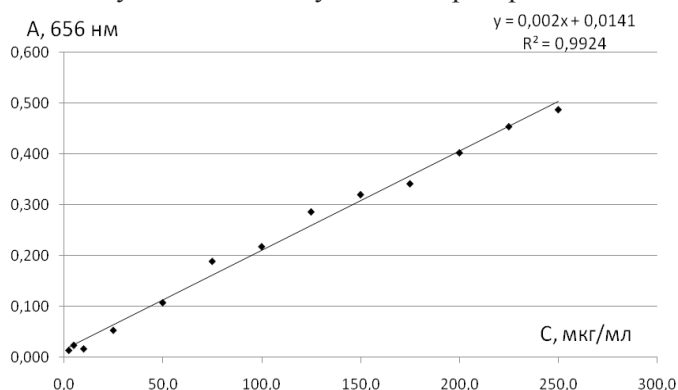


Рис. 2. Калибровочный график с красителем 1,9-диметилметиленовый синий
Fig. 2. Calibration with 1,9-dimethylmethylen blue dye

Для количественного определения, а также идентификации ХС использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию экспериментальных образцов и стандарта при следующих условиях: УФ-детектор на основе диодной матрицы SPD-M20A; дегазатор DGU-20A5; насос LC20AD; автоматический дозатор SIL-20A; термостат колонок CTO-20AC — температура анализа 40 °C; колонка: Discovery C18, 5 μm , 26,0×4,6 mm; подвижная фаза: ацетонитрил-вода 50 %; скорость потока 1 мл/мин; диапазон детектирования 190–890 нм (длина волны 280 нм).

Результаты и их обсуждение

Последовательность операций, представленных на рис. 3, была применена с учетом анализа ранее проведенных исследований, хотя не исключено, что при дальнейшей разработке технологии могут быть изменены некоторые параметры в соответствии с условиями производства.

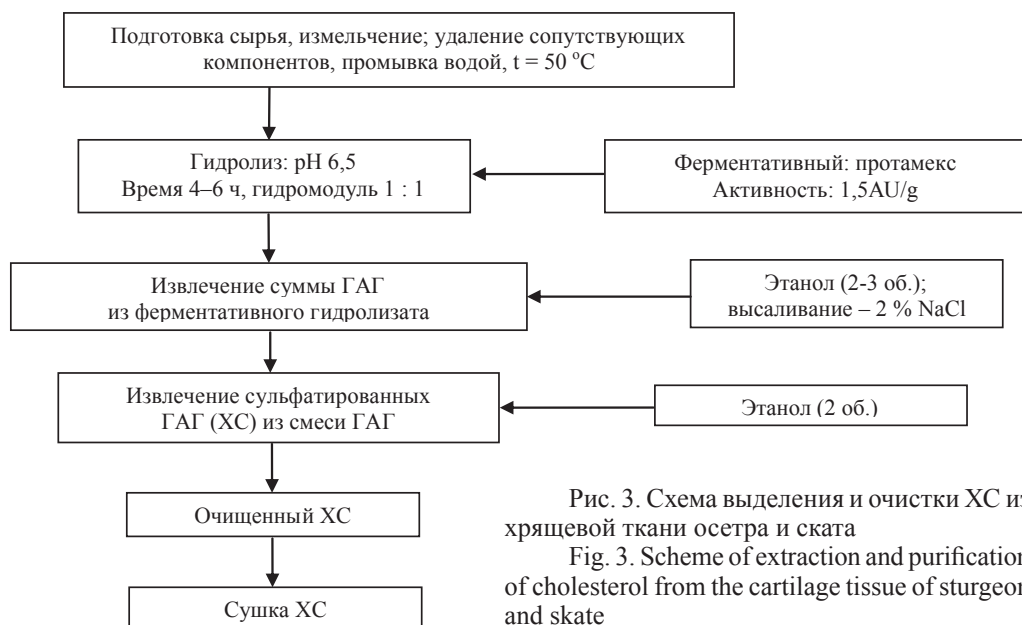


Рис. 3. Схема выделения и очистки ХС из хрящевой ткани осетра и ската

Fig. 3. Scheme of extraction and purification of cholesterol from the cartilage tissue of sturgeon and skate

В данном исследовании использованы ранее обоснованные параметры ферментативного гидролиза: гидромодуль 1 : 1; температура 45 °С; длительность 4 ч [Пат. РФ 2623738]. Осаждение ГАГ из ферментолизата проводили 2–3 объемами этилового спирта (96°) в 2 %-ном растворе хлористого натрия. Далее осуществляли переосаждение ХС из смеси ГАГ 96 %-ным этиловым спиртом (2 объема).

Как следует из данных табл. 1, содержание гексозаминов в препарате ХС из ската составляет 161,5 мг/г, из осетра — 84,8 мг/г. Процесс выделения ХС позволил сконцентрировать искомое вещество: содержание аминсахаров в препаратах ХС увеличилось в 2,5 раза по сравнению с их содержанием в хрящевой ткани осетра и ската. Содержание гексозаминов в коммерческом фармпрепарате «Хондроитин-Акос» выше, чем в ХС из ската и осетра, что является предпосылкой для уточнения параметров выделения ГАГ при дальнейшей разработке технологического процесса.

Таблица 1

Содержание гексозаминов в образцах ХС из хрящевой ткани ската, калуги и фармпрепарате, мг/г

Table 1

Hexosamines content in samples of chondroitin sulfate from the cartilage tissue of skate and sturgeon and in pharmaceutical preparation, mg/g

Источник гексозаминов	Содержание
Хрящевая ткань	
Скат	63,0
Калуга	33,6
Хондроитинсульфат	
Скат	161,5
Калуга	84,8
Коммерческий препарат	
«Хондроитин-Акос»	208,0

В образцах ХС в качестве примесей могут присутствовать другие гликозаминогликаны. Следовательно, любой аналитический метод, направленный на количественную оценку хондроитинсульфата, должен быть избирательным по отношению к ХС в присутствии других гликозаминогликанов. В качестве альтернативы рекомендовано использовать методы, основанные на метахроматической реакции сульфатированных ГАГ с красителями: толуидиновый и альциановый синий [Gold, 1979] или 1,9-диметилметиленовый синий [Farndale et al., 1986; Хабиева, 2007]. Поглощение при 656 нм пропорционально количеству сульфатированных ГАГ, присутствующих в исходном образце.

Этот метод нельзя использовать для определения ХС в хрящах и ферментализатах, однако он может применяться для очищенного ХС [Farndale et al., 1986]. Нами определена концентрация сульфатированных ГАГ в ХС, выделенном из ската и осетра (табл. 2).

Таблица 2

Содержание сульфатированных ГАГ в образцах ХС из хрящевой ткани ската и калуги, мг/г препарата

Table 2

Sulfated GAGs content in samples of chondroitin sulfate from the cartilage tissue of skate and sturgeon, mg/g

Образец хондроитинсульфата	Содержание сульфатированных ГАГ
Скат	341,42
Калуга	105,15
«Хондроитин-Акос»	354,50

Установлено (табл. 2), что в ХС из ската содержание сульфатированных ГАГ составляет 341,42 мг/г препарата, что сравнимо с содержанием ХС в коммерческом препарате, тогда как в препарате из калуги их меньше.

В табл. 3 приведены характеристики полученных из хрящей ската и осетра ХС и коммерческого препарата.

Таблица 3

Сравнительная характеристика ГАГ из хрящевой ткани, % от сухого препарата

Table 3

Comparative characteristics of GAGs from cartilage tissue, % of dry preparation

Источник ГАГ	Гексозамины	Сульфатированные ГАГ	Гексозамины : сульфатированные ГАГ
Скат	16,15	34,1	1,0 : 2,10
Калуга	8,48	10,5	1,0 : 1,24
«Хондроитин-Акос» (Россия)	20,80	35,4	1,0 : 1,70

Поскольку гексозамины содержатся как в сульфатированных, так и в несulfатированных ГАГ (гиалуроновой кислоте и хондроитине), в полученных из хрящей ската и осетра ГАГ вероятно присутствуют хондроитинсульфаты с различной степенью сульфатирования (табл. 3).

Таким образом, полученные образцы ХС из хрящей ската и калуги можно идентифицировать по содержанию и соотношению гексозаминов и сульфатных групп. В них установлено высокое содержание сульфатированных ГАГ, соотношение гексозаминов к сульфатированным формам отличается для препаратов из ската и осетра, но является средним по сравнению со степенью сульфатирования ХС в коммерческом препарате; это может свидетельствовать о видовой специфичности ХС из различных источников.

На рис. 4 представлены результаты ВЭЖХ коммерческого препарата ХС, который имеет один основной пик, его интенсивность составляет 30 mAU, время удерживания 2,5 мин. На рис. 5 (а) видно, что ХС ската содержит один пик со временем удерживания 2,7 мин, интенсивность которого составляет 80 mAU. Основной пик ХС из хрящевой ткани осетра (рис. 5, б) также характеризуется одним пиком с временем удерживания 2,7 мин. Интенсивность этого пика значительно ниже, чем у ХС ската, и составляет 6 mAU.

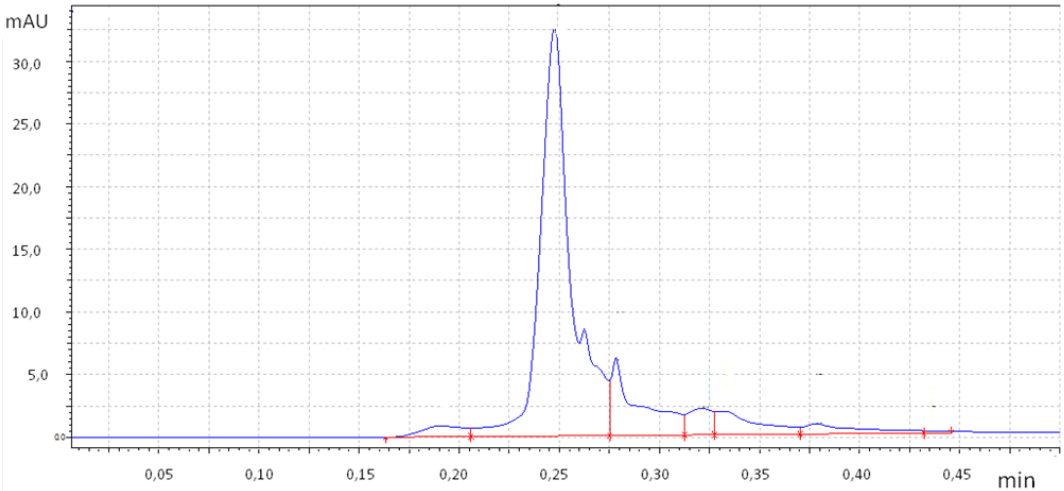


Рис. 4. ВЭЖХ коммерческого препарата хондроитинсульфата (Хондроитин-Акос, Россия)

Fig. 4. High-performance liquid chromatography for the commercial preparation of chondroitin sulfate (Chondroitin-Akos, Russia)

Таким образом, на основании анализа ВЭЖХ различных ХС можно сделать заключение о том, что коммерческий препарат хондроитинсульфата и образцы ХС, выделенные из хрящей ската и осетра, имеют в составе один основной компонент со сходными характеристиками. Для установления влияния вида исходного сырья

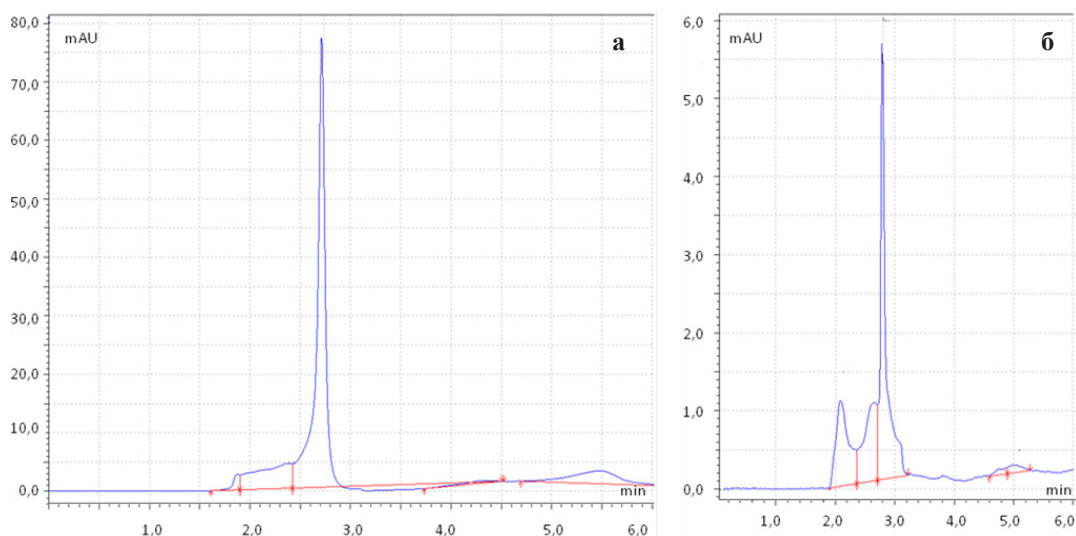


Рис. 5. ВЭЖХ хондроитинсульфата, выделенного из хрящей ската (а) и калуги (б)

Fig. 5. High-performance liquid chromatography for chondroitin sulfate extracted from skate (a) and sturgeon (б) cartilage

на количественное содержание хондроитинсульфата и его состав планируется провести дальнейшие исследования с применением различных условий выделения и хроматографического разделения.

Параметры выделения — гидротермическая обработка сырья при 50 °С; гидролиз протеолитическим ферментом (гидро модуль 1 : 1; температура 45 °С; длительность 4 ч); осаждение ГАГ 2–3 объемами этилового спирта (96°) в 2 %-ном растворе хлористого натрия с последующим переосаждением ХС из смеси ГАГ этиловым спиртом (96°) — позволили выделить из хрящевой ткани ската и калуги сульфатированный гликозаминогликан — хондроитинсульфат.

Выводы

Установлено, что ХС из ската и калуги имеют высокую степень сульфатирования, их состав позволяет позиционировать хрящевые ткани ската и калуги в качестве перспективного источника ХС.

Благодарности (ACKNOWLEDGEMENTS)

Коллектив авторов выражает глубокую благодарность сотрудникам Лучегорской НИС (ТИНРО), предоставившим образцы калуги для исследования.

The authors are deeply grateful to the staff of Luchegorsk research station of TINRO for the samples of kaluga tissues for the investigation.

Финансирование работы (FUNDING)

Исследование не имело спонсорской поддержки.

The study had no sponsor funding.

Соблюдение этических стандартов (COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS)

Все приемлемые национальные, институциональные и международные этические принципы соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

All applicable national, institutional and international ethical guidelines are implemented.

The authors declare that they have no conflict of interest.

Информация о вкладе авторов (AUTHOR CONTRIBUTIONS)

Концепция исследования — А.И. Чепкасова, Т.Н. Слуцкая; проведение экспериментов, обработка данных — А.И. Чепкасова, Е.П. Караулова; написание и редактирование статьи — А.И. Чепкасова, Т.Н. Слуцкая.

Research concept — A.I. Chepkasova and T.N. Slutskaya; experiments and data processing — A.I. Chepkasova and E.P. Karaulova; text writing and editing — A.I. Chepkasova and T.N. Slutskaya.

Список литературы

Гармашов С.Ю. Выбор условий ферментативного гидролиза коллагенсодержащего сырья // Вестн. КрасГАУ. — 2018. — № 3. — С. 268–273.

Панасюк А.Ф., Ларионов Е.В. Хондроитинсульфаты и их роль в обмене хондроцитов и межклеточного матрикса хрящевой ткани // Науч.-практ. ревматол. — 2000. — № 2. — С. 46–55.

Пат. РФ 2061485. Способ выделения хондроитинсульфата из животных тканей / С.Е. Васюков, Н.А. Кирьянов, И.В. Лукина и др. — Заявл. 28.12.1992; Оpubл. 10.06.1996. — 4 с.

Пат. РФ 2623738. Биологически активная добавка из морских гидробионтов — источник хондроитинсульфата и способ ее получения / А.Е. Карлина, А.И. Чепкасова, Т.Н. Слуцкая и др. — Заявл. 25.01.2016; Оpubл. 29.06.2017. — 11 с.

Пентин Ю.А., Вилков Л.В. Физические методы исследования в химии : моногр. — М. : Мир, 2003. — 683 с.

Сорокоумов И.М., Ежова Е.А., Быкова В.М. и др. Хондроитинсульфат из хрящей рыб // Рыбпром. — 2007. — № 3. — С. 18–22.

Суховерхова Г.Ю. Биохимическая характеристика хрящевой ткани гидробионтов и технология БАД к пище : автореф. дис. ... канд. техн. наук. — Владивосток, 2006. — 26 с.

Хабиева А.Ю. Фармакокинетическое исследование различных лекарственных форм хондроитина сульфата : автореф. дис. ... канд. фарм. наук. — М., 2007. — 25 с.

Abdallah M.M., Fernandez N., Matias A.A., Bronze M.D.R. Hyaluronic acid and Chondroitin sulfate from marine and terrestrial sources: Extraction and purification methods // Carbohydr. Polym. — 2020. — Vol. 243. 116441. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116441.

Campo G.M., Avenoso A., Campo S. et al. Hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate treatment reduces damage in carbon tetrachloride-induced acute rat liver injury // Life Sci. — 2004. — Vol. 74(10). — P. 1289–1305. DOI: 10.1016/j.lfs.2003.08.010.

Elson L.A., Morgan W.T.J. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine // Biochem. J. — 1933. — Vol. 27. — P. 1824–1933.

Farndale R.W., Buttle D.J., Barrett A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue // Biochim. Biophys. Acta. — 1986. — Vol. 883, Iss. 2. — P. 173–177.

Gold E.W. A simple spectrophotometric method for estimating glycosaminoglycan concentrations // Anal. Biochem. — 1979. — Vol. 99. — P. 183–188.

Gui M., Song J., Zhang L. et al. Chemical characteristics and antithrombotic effect of chondroitin sulfates from sturgeon skull and sturgeon backbone // Carbohydr. Polym. — 2015. — Vol. 123. — P. 454–460. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.01.046.

Im A.R., Park Y., Kim Y.S. Isolation and characterization of chondroitin sulfates from sturgeon (*Acipenser sinensis*) and their effects on growth of fibroblasts // Biol. Pharm. Bull. — 2010. — Vol. 33(8). — P. 1268–1273. DOI: 10.1248/bpb.33.1268.

Immers J., Vasseur E. Influence of sugars and amines on the colorimetric hexosamine method of Elson and Morgan and its possible elimination // Nature. — 1950. — Vol. 165. — P. 898–899.

Jang J.H., Hia H.C., Ike M. et al. Acid hydrolysis and quantitative determination of total hexosamines of an exopolysaccharide produced by *Citrobacter* sp. // Biotechnol. Lett. — 2005. — Vol. 27. — P. 13–18. DOI: 10.1007/s10529-004-6305-y.

Jo J.-H., Park D.-Ch., Do J.-R. et al. Optimization of Skate (*Raja flavirostris*) Cartilage Hydrolysis for the Preparation of Chondroitin Sulfate // Food Sci. Biotechnol. — 2004. — Vol. 13, № 5. — P. 622–626.

Jo J.-H., Do J.-R., Kim Y.-M., Kim D.-S. Optimization of shark (*Squatina oculata*) cartilage hydrolysis for the preparation of chondroitin sulfate // The Food Science and Biotechnology. — 2005. — Vol. 14(5). — P. 651–655.

Krichen F., Volpi N., Sila A. et al. Purification, structural characterization and antiproliferative properties of chondroitinsulfate/dermatansulfate from Tunisian fish skins // Intern. Journ. Biological Macromolecules. — 2017. — Vol. 95. — P. 32–39. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.108.

Lauder R. Chondroitin sulphate: A complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems // Complementary Therapies in Medicine. — 2009. — Vol. 17, № 1. — P. 56–62. DOI: 10.1016/j.ctim.2008.08.004.

Lin N., Mo X., Yang Y., Zhang H. Purification and sequence characterization of chondroitin sulfate and dermatan sulfate from fishes // Glycoconjugate Journ. — 2017. — Vol. 34, Iss. 2. — P. 241–253. DOI: 10.1007/s10719-016-9759-y.

Maccari F., Galeotti F., Volpi N. Isolation and structural characterization of chondroitin sulfate from bony fishes // Carbohydr. Polym. — 2015. — Vol. 129. — P. 143–147. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.04.059.

Martins R.C.L., Werneck C.C., Rocha L.A.G. et al. Molecular size distribution analysis of human gingival glycosaminoglycans in cyclosporin and nifedipine induced overgrowths // J. Periodont. Res. — 2003. — Vol. 38. — P. 182–189. DOI: 10.1034/j.1600-0765.2003.02004.x.

Medeiros G.F., Mendes A., Castro R.A.B. et al. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates // Biochimica et Biophysica Acta. — 2000. — Vol. 1475. — P. 287–294. DOI: 10.1016/S0304-4165(00)00079-9.

Panagos Ch.G., Thomson D., Moss C. et al. Characterisation of hyaluronic acid and chondroitin/dermatan sulfate from the lumpsucker fish, *C. lumpus* // Carbohydr. Polym. — 2014. — Vol. 106. — P. 25–33. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.01.090.

Reginster J.-Y., Dudler J., Blicharski T., Pavelka K. Pharmaceutical-grade Chondroitin sulfate is as effective as celecoxib and superior to placebo in symptomatic knee osteoarthritis: the ChONDroitin versus CElecoxib versus Placebo Trial (CONCEPT) // Ann. Rheum. Dis. — 2017. — Vol. 76(9). — P. 1537–1543. DOI: 10.1136/annrheumdis-2016-210860.

Silva T.H., Alves A., Ferreira B.M. et al. Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest // Int. Mater. Rev. — 2012. — Vol. 57(5). — P. 276–306. DOI: 10.1179/1743280412Y.0000000002.

Stone J.E., Akhtar N., Botchway S., Pennock C.A. Interaction of 1,9-dimethylmethylene blue with glycosaminoglycans // Ann. Clin. Biochem. — 1994. — № 31. — P. 147–152. DOI: 10.1177/000456329403100206.

Sundaresan G., Abraham R.J.J., Appa Rao V. et al. Established method of chondroitin sulphate extraction from buffalo (*Bubalus bubalis*) cartilages and its identification by FTIR // J. Food Sci. Technol. — 2018. — Vol. 55, Iss. 9. — P. 3439–3445. DOI: 10.1007/s13197-018-3253-4.

Tadashi E. Sodium chondroitin sulfate, chondroitin-sulfate-containing material and processes for producing the same : Pat. W0/2004/039994. — 13.05.2004.

Theocharis D.A., Papageorgacopoulou N., Vynios D.H. et al. Determination and structural characterisation of dermatan sulfate in the presence of other galactosaminoglycans // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci Appl. — 2001. — Vol. 754(2). — P. 297–309. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)00624-1.

Uebelhart D., Malaise M., Marcolongo R. et al. Intermittent treatment of knee osteoarthritis with oral chondroitin sulfate: a one-year, randomized, double-blind, multicenter study versus placebo // Osteoarthritis Cartilage. — 2004. — Vol. 12, Iss. 4. — P. 269–276. DOI: 10.1016/j.joca.2004.01.004.

Volpi N. (ed.) Chondroitin sulfate: structure, role and pharmacological activity. — San Diego : Elsevier, 2006. — 568 p.

Volpi N. Fractionation of heparin, dermatan sulfate, and chondroitin sulfate by sequential precipitation: A method to purify a single glycosaminoglycan species from a mixture // Anal. Biochem. — 1994. — Vol. 218(2). — P. 382–391. DOI: 10.1006/abio.1994.1196.

Volpi N. Purification of heparin, dermatan sulfate and chondroitin sulfate from mixtures by sequential precipitation with various organic solvents // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci Appl. — 1996. — Vol. 685(1). — P. 27–34. DOI: 10.1016/0378-4347(96)00154-5.

Werneck C.C., Oliveira dos Santos A.J., Silva L.C.F. et al. Is there a glycosaminoglycan related heterogeneity of the thymic epithelium? // J. Cell. Physiol. — 2000. — Vol. 185. — P. 68–79.

References

Garmashov, S.Yu., The choice of optimal conditions of enzymatic hydrolysis of collagen-containing raw materials, *Vestn. KrasGAU*, 2018, no. 3, pp. 268–273.

Panasvuk, A.F. and Larionov, E.V., Chondroitin sulfates and their role in the metabolism of chondrocytes and the intercellular matrix of cartilage, *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*, 2000, no. 2, pp. 46–55.

- Vasyukov, S.E., Kiryanov, N.A., Lukina, I.V., Shulgin, A.A., and Zhivotov, G.P., Pat. RU 2061485, Method for isolating chondroitin sulfate from animal tissues, *Izobret., Polezn. Modeli*, 1996.
- Karlina, A.E., Chepkasova, A.I., Slutskaya, T.N., Yakush, E.V., Kuznetsov, Yu.N., and Bocharov, L.N., Pat. RU 2623738, Biologically active additive from marine hydrobionts — a source of chondroitin sulfate and a method for its preparation, *Izobret., Polezn. Modeli*, 2017.
- Pentin, Yu.A. and Vilkov, L.V., *Fizicheskiye metody issledovaniya v khimii* (Physical research methods in chemistry), Moscow: Mir, 2003.
- Sorokoumov, I.M., Ezhova, E.A., Bykova, V.M., Nemtsev, S.V., Schmidt, E.A., and Albulov, A.I., Chondroitin sulfate from fish cartilage, *Rybprom*, 2007, no. 3, pp. 18–22.
- Sukhoverkhova, G.Yu., Biochemical characteristics of the cartilaginous tissue of aquatic organisms and the technology of dietary supplements for food, *Extended Abstract of Cand. Sci. (Tech.) Dissertation*, Vladivostok, 2006.
- Khabieva, A.Yu., Pharmacokinetic study of various dosage forms of chondroitin sulfate, *Extended Abstract of Cand. Sci. (Pharm) Dissertation*, Moscow, 2007.
- Abdallah, M.M., Fernandez, N., Matias, A.A., and Bronze, M.D.R., Hyaluronic acid and Chondroitin sulfate from marine and terrestrial sources: Extraction and purification methods, *Carbohydr. Polym.*, 2020, vol. 243, 116441. doi 10.1016/j.carbpol.2020.116441
- Campo, G.M., Avenoso, A., Campo, S., Ferlazzo, A.M., Micali, C., Zanghi, L., and Calatron, A., Hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate treatment reduces damage in carbon tetrachloride-induced acute rat liver injury, *Life Sci.*, 2004, vol. 74, no. 10, pp. 1289–1305. doi 10.1016/j.lfs.2003.08.010
- Elson, L.A. and Morgan, W.T.J., A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine, *Biochem. J.*, 1933, vol. 27, pp. 1824–1933.
- Farndale, R.W., Buttle, D.J., and Barrett, A.J., Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue, *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, vol. 883, no. 2, pp. 173–177.
- Gold, E.W., A simple spectrophotometric method for estimating glycosaminoglycan concentrations, *Anal. Biochem.*, 1979, vol. 99, pp. 183–188.
- Gui, M., Song, J., Zhang, L., Wang, Sh., Wu, R., Ma, Ch., and Li, P., Chemical characteristics and antithrombotic effect of chondroitin sulfates from sturgeon skull and sturgeon backbone, *Carbohydr. Polym.*, 2015, vol. 123, pp. 454–460. doi 10.1016/j.carbpol.2015.01.046
- Im, A.R., Park, Y., and Kim, Y.S., Isolation and characterization of chondroitin sulfates from sturgeon (*Acipenser sinensis*) and their effects on growth of fibroblasts, *Biol. Pharm. Bull.*, 2010, vol. 33, no. 8, pp. 1268–1273. doi 10.1248/bpb.33.1268
- Immers, J. and Vasseur, E., Influence of sugars and amines on the colorimetric hexosamine method of Elson and Morgan and its possible elimination, *Nature*, 1950, vol. 165, pp. 898–899.
- Jang, J.H., Hia, H.C., Ike, M., Inoue, C., Fujita, M., and Yoshida, T., Acid hydrolysis and quantitative determination of total hexosamines of an exopolysaccharide produced by *Citrobacter* sp., *Biotechnol. Lett.*, 2005, vol. 27, pp. 13–18. doi 10.1007/s10529-004-6305-y
- Jo, J.-H., Park, D.-Ch., Do, J.-R., Kim, Yo.-M., Kim, D.-S., Park, Yo.-K., Lee, T.-K., and Cho, S.-M., Optimization of Skate (*Raja flavirostris*) Cartilage Hydrolysis for the Preparation of Chondroitin Sulfate, *Food Sci. Biotechnol.*, 2004, vol. 13, no. 5, pp. 622–626.
- Jo, J.-H., Do, J.-R., Kim, Y.-M., and Kim, D.-S., Optimization of shark (*Squatina oculata*) cartilage hydrolysis for the preparation of chondroitin sulfate, *The Food Science and Biotechnology*, 2005, vol. 14, no. 5, pp. 651–655.
- Krichen, F., Volpi, N., Sila, A., Maccari, F., Mantovani, V., Galeotti, F., Ellouz-Chaabouni, S., and Bougate, A., Purification, structural characterization and antiproliferative properties of chondroitinsulfate/dermatansulfate from Tunisian fish skins, *Intern. Journ. Biological Macromolecules*, 2017, vol. 95, pp. 32–39. doi 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.108
- Lauder, R., Chondroitin sulphate: A complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems, *Complementary Therapies in Medicine*, 2009, vol. 17, no. 1, pp. 56–62. doi 10.1016/j.ctim.2008.08.004
- Lin, N., Mo, X., Yang, Y., and Zhang, H., Purification and sequence characterization of chondroitin sulfate and dermatan sulfate from fishes, *Glycoconjugate Journ.*, 2017, vol. 34, no. 2, pp. 241–253. doi 10.1007/s10719-016-9759-y
- Maccari, F., Galeotti, F., and Volpi, N., Isolation and structural characterization of chondroitin sulfate from bony fishes, *Carbohydr. Polym.*, 2015, vol. 129, pp. 143–147. doi 10.1016/j.carbpol.2015.04.059

- Martins, R.C.L., Werneck, C.C., Rocha, L.A.G., Feres-Filho, E.J., and Silva, L.C.F.,** Molecular size distribution analysis of human gingival glycosaminoglycans in cyclosporin and nifedipine induced overgrowths, *J. Periodont. Res.*, 2003, vol. 38, pp. 182–189. doi 10.1034/j.1600-0765.2003.02004.x
- Medeiros, G.F., Mendes, A., Castro, R.A.B., Bau, E.C., Nader, H.B., and Dietrich, C.P.,** Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, vol. 1475, pp. 287–294. doi 10.1016/s0304-4165(00)00079-9
- Panagos, Ch.G., Thomson, D., Moss, C., Bavington, Ch.D., Ólafsson, H.G., and Uhrin, D.,** Characterisation of hyaluronic acid and chondroitin/dermatan sulfate from the lumpsucker fish, *C. lumpus*, *Carbohydr. Polym.*, 2014, vol. 106, pp. 25–33. doi 10.1016/j.carbpol.2014.01.090
- Reginster, J.-Y., Dudler, J., Blicharski, T., and Pavelka, K.,** Pharmaceutical-grade Chondroitin sulfate is as effective as celecoxib and superior to placebo in symptomatic knee osteoarthritis: the ChONDroitin versus CELEcoxib versus Placebo Trial (CONCEPT), *Ann. Rheum. Dis.*, 2017, vol. 76, no. 9, pp. 1537–1543. doi 10.1136/annrheumdis-2016-210860
- Silva, T.H., Alves, A., Ferreira, B.M., Oliveira, J.M., Reys, L.L., Ferreira, R.J.F., Sousa, R.A., Silva, S.S., Mano, J.F., and Reis, R.L.,** Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest, *Int. Mater. Rev.*, 2012, vol. 57, no. 5, pp. 276–306. doi 10.1179/1743280412Y.0000000002
- Stone, J.E., Akhtar, N., Botchway, S., and Pennock, C.A.,** Interaction of 1,9-dimethyl-methylene blue with glycosaminoglycans, *Ann. Clin. Biochem.*, 1994, no. 31, pp. 147–152. doi 10.1177/000456329403100206
- Sundaresan, G., Abraham, R.J.J., Appa Rao, V., Babu, R.N., Govind, V., and Meti, M.F.,** Established method of chondroitin sulphate extraction from buffalo (*Bubalus bubalis*) cartilages and its identification by FTIR, *J. Food Sci. Technol.*, 2018, vol. 55, no. 9, pp. 3439–3445. doi 10.1007/s13197-018-3253-4
- Tadashi, E.,** Patent W0/2004/039994, Sodium chondroitin sulfate, chondroitin-sulfate-containing material and processes for producing the same, 2004.
- Theocharis, D.A., Papageorgacopoulou, N., Vynios, D.H., Anagnostides, S.Th., and Tsiganos, C.P.,** Determination and structural characterisation of dermatan sulfate in the presence of other galactosaminoglycans, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 2001, vol. 754, no. 2, pp. 297–309. doi 10.1016/s0378-4347(00)00624-1
- Uebelhart, D., Malaise, M., Marcolongo, R., DeVathaire, F., Piperno, M., Mailleux, E., Fioravanti, A., Matoso, L., and Vignon, E.,** Intermittent treatment of knee osteoarthritis with oral chondroitin sulfate: a one-year, randomized, double-blind, multicenter study versus placebo, *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, vol. 12, no. 4, pp. 269–276. doi 10.1016/j.joca.2004.01.004
- Volpi, N.,** Chondroitin sulfate: structure, role and pharmacological activity, San Diego: Elsevier, 2006.
- Volpi, N.,** Fractionation of heparin, dermatan sulfate, and chondroitin sulfate by sequential precipitation: A method to purify a single glycosaminoglycan species from a mixture, *Anal. Biochem.*, 1994, vol. 218, no. 2, pp. 382–391. doi 10.1006/abio.1994.1196
- Volpi, N.,** Purification of heparin, dermatan sulfate and chondroitin sulfate from mixtures by sequential precipitation with various organic solvents, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 1996, vol. 685, no. 1, pp. 27–34. doi 10.1016/0378-4347(96)00154-5
- Werneck, C.C., Oliveira dos Santos, A.J., Silva, L.C.F., Villa-Verde, D.M.S., Savino, W., and Mourão, P.A.S.,** Is there a glycosaminoglycan related heterogeneity of the thymic epithelium?, *J. Cell. Physiol.*, 2000, vol. 185, pp. 68–79.

Поступила в редакцию 11.10.2022 г.

После доработки 21.11.2022 г.

Принята к публикации 21.11.2022 г.

The article was submitted 11.10.2022; approved after reviewing 21.11.2022;
accepted for publication 21.11.2022