УДК 661.123

С. Ф. Иванова, Н. Н. Петрова

ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛЛАГЕНА ИЗ ПЛАВАТЕЛЬНОГО ПУЗЫРЯ ОСЕТРОВЫХ (ACIPENSERIDAE) И СИГОВЫХ (COROGENIDAE) ПОРОД РЫБ

Коллаген является главным структурным белком соединительной ткани и составляет около 30 % всех белков организмов млекопитающих. Он является важным биоматериалом, применяемым в медицине, химической технологии, благодаря специфическим свойствам, таким как способность к биодеградации и слабая антигенность. В данной работе впервые был опробован новый источник коллагена – коллаген из плавательного пузыря северных пород рыб. Методами инфракрасной спектроскопии, атомно-силовой и растровой электронной микроскопии были исследованы химический состав и структура плавательных пузырей. Плавательный пузырь сибирских осетровых и сиговых пород рыб может быть перспективным биосырьем для получения материалов медицинского назначения, что показано в экспериментах in vivo на подопытных животных, позволяющих оценить влияние пленок на продолжительность заживления ран. При использовании пленок из плавательного пузыря осетра, чира и омуля сокращается площадь раны, несколько уменьшаются сроки образования грануляционной ткани и сроки заживления раны. Для дальнейшего применения в качестве медицинских материалов необходимо очистить коллаген плавательного пузыря от примесей, что было сделано с помощью щелочно-солевой обработки. Методом ИК-спектроскопии было показано, что на всех этапах обработки коллагеновая природа материала сохраняется, т. е. в ИК-спектрах образцов регистрируются полосы амид I, амид II, амид III, амид A, которые относятся к колебаниям полипептидной связи белка. Структура коллагеновых волокон плавательных пузырей осетра и омуля была изучена методом электронной микроскопии.

Ключевые слова: коллаген, соединительная ткань, щелочно-солевая обработка, биодеградация, плавательный пузырь, Acipenseridae, Corogenidae, инфракрасная спектроскопия, атомно-силовая микроскопия, растровая электронная микроскопия.

S. F. Ivanova, N. N. Petrova

Study of Collagen from Swim Bladders of Sturgeon (Acipenseridae) and White Fish (Corogenidae)

Collagen is the major structural protein in the connective tissue of animal skin. About 30 % of the total protein in animal body is collagen. Collagen is an important biomaterial in medical applications, chemical

ИВАНОВА Светлана Федоровна – аспирант каф. общей, аналитической и физической химии Института естественных наук Северо-Восточного федерального университета имени М. К. Аммосова.

E-mail: isf1990@mail.ru

IVANOVA Svetlana Fedorovna – Postgraduate Student of the Department of General, Analytical and Physical Chemistry of Institute of Natural Sciences, North-Eastern Federal University named after M. K. Ammosov.

E-mail: isf1990@mail.ru

ПЕТРОВА Наталия Николаевна – д. х. н., доцент, зав. каф. общей, аналитической и физической химии Института естественных наук Северо-Восточного федерального университета имени М. К. Аммосова.

E-mail: pnn2002@mail.ru

PETROVA Natalia Nikolaevna – Doctor of Chemical Sciences, Department of General, Analytical and Physical Chemistry of Institute of Natural Sciences, North-Eastern Federal University named after M. K. Ammosov.

E-mail: pnn2002@mail.ru

technology due to its special characteristics, such as biodegradability and weak antigenecity. In this paper a new source of collagen from the swim bladders of northern species of fish was investigated. Chemical composition and structure of the swim bladders were investigated using infrared spectroscopy, atomic force and scanning electron microscopy. The swim bladders of sturgeon and whitefish fish may be a good biomaterial for medical applications. It is shown that using films from the swim bladders of sturgeon, arctic cisco and white fish help reducing wound area, periods of formation of granulation tissue and time of wound healing. For further using as medical materials collagen should be cleaned from the swim bladders. It was done with using of alkaline-salt treatment. By IR spectroscopy, it was shown that collagen material nature is maintained at all stages of dissolution. The strips Amide I, Amide II, Amide III, Amide A, which relate to variations of the polypeptide binding of protein are recorded on IR- specters of samples. The structure of the collagen fibers of the swim bladders of sturgeon and white fish was studied by scanning electron microscopy. Thus, collagen from the swim bladders of northern species of fish may be a new type of biomaterial to creation of medical application.

Keywords: collagen, connective tissue, alkaline-salt treatment, biodegradability, swim bladder fish, Acipenseridae, Corogenidae, infrared spectroscopy, atomic force microscopy, scanning electron microscopy.

Введение

В последние годы в медицине, химической технологии большое внимание уделяется разработке биодеградируемых материалов, которые, выполняя функцию временного направляющего каркаса для регенерации, замещались бы постепенно собственными тканями организма. Наиболее перспективным в этом отношении является природный биополимер коллаген, обладающий рядом положительных свойств: отсутствием токсических и канцерогенных свойств, слабой антигенностью, высокой механической прочностью и устойчивостью к тканевым ферментам, способностью образовывать комплексы с биологически активными веществами (гепарином, хондроитинсульфатом, антибиотиками и др.), стимуляцией регенерации собственных тканей организма [1]. Установлено, что все виды органов и тканей, имеющих в своем составе соединительную ткань, содержат коллаген [2]. Его количество зависит от типа ткани или органа, возраста, вида, породы и пола животного и находится в прямой связи с функциями, выполняемыми органом в теле животного. Коллаген или белки типа коллагена встречаются у всех живых существ от губок до млекопитающих. Так, у губок находят коллагеноподобный белок – спонгин, у кишечнополостных – корнеин; коллаген плавательного пузыря, кожи и сухожилия рыб известен под названием ихтиокол, плавников – ихтулепидин. Известно, что коллаген оказывает мощное стимулирующее воздействие на развитие собственной соединительной ткани, что является определяющим фактором в лечении раневого процесса.

Коллагенсодержащие отходы могут применяться в качестве добавки при производстве формированных рыбных изделий [3]. В медицине рыбный коллаген и продукты его гидролиза широко применяют в виде различных пленок, губок, ниток, трубок, повязок, пластырей и других препаратов для лечения ран, ожогов, трофических язв, пульпитов, гипертонической болезни, остеоартрита [4-5]. В частности, известен способ получения коллагена из плавательного пузыря осетровых рыб и крупного сома в качестве пленкообразующей основы для трансдермальных лекарственных фитопленок [6]. В этом отношении имеет большой интерес создание биологического клея и других материалов медицинского назначения на основе коллагена из плавательного пузыря рыб. В качестве объектов исследования использовались пленки коллагена, полученные из плавательного пузыря сибирских осетровых и сиговых пород рыб. Целью работы является исследование качественного химического состава и структуры плавательного пузыря различных пород северных рыб и обоснование возможности его применения для получения материалов медицинского назначения.

В настоящее время существует немало способов воздействия на коллагенсодержащее сырье и получение коллагеновых препаратов для использования в медицине, пищевой, кожевенной промышленности [7-13]. Известны методы селективного разрушения

межмолекулярных связей в условиях, сохраняющих трехспиральную структуру тропоколлагена, в результате чего нерастворимый коллаген удается частично или полностью перевести в раствор – солюбилизировать – в среде органических кислот [14]. Другой способ получения медицинских препаратов на основе коллагена заключается в термической обработке плавательного пузыря, при которой происходит денатурация белка.

Исследование структуры коллагена, полученного из плавательного пузыря сибирского осетра

В проведенных ранее экспериментах исследовали возможность применения биологического клея и пленок из него на основе коллагена из плавательного пузыря сибирского осетра [15]. С целью получения биологического клея плавательный пузырь тщательно промывали и отделяли наружную оболочку (темного цвета), оставляя внутреннюю (белый слой), которую использовали для приготовления клея. Высушенный плавательный пузырь подвергали денатурации, затем из раствора были получены пленки, которые, как было показано, обладают лечебными свойствами при заживлении ран. Эффективность пленок была доказана в экспериментах in vivo на лабораторных крысах. При использовании пленок сокращается площадь раны, уменьшаются сроки образования грануляционной ткани и сроки заживления раны.

Для изучения химического состава коллагена были получены инфракрасные спектры пленок из плавательного пузыря из сибирского осетра и клея из него. При сравнении спектров плавательного пузыря (нативный коллаген) и клея из него (денатурированный коллаген) выявлено исчезновение полос поглощения амид I и амид II, т. е. происходит полное разрушение α-спирали, связанное с денатурацией нативного коллагена [15].

Изменения структуры исходного (нативного) коллагена из плавательного пузыря сибирского осетра при денатурации подтверждают данные по исследованию образцов на атомно-силовом микроскопе марки C3M Ntegra Prima. Данные в формате 3D представлены на рис. 1.

При исследовании структуры исходного коллагена и клея из него методом атомной силовой микроскопии выявлено различие поверхности изученных образцов. В случае плавательного пузыря поверхность более рельефная (рис. 1, а), что соответствует фибриллярной структуре нативного коллагена. После денатурации наблюдается аморфная структура пленки.

Поскольку сибирский осетр занесен в Красную книгу Республики Саха (Якутия) и численность популяции из года в год снижается, то представляет интерес расширение сырьевой базы для получения медицинских материалов путем использования более доступных видов рыб. С целью увеличения сырьевой базы для получения медицинских препаратов на основе коллагена впервые был применен плавательный пузырь рыб рода сиговых –

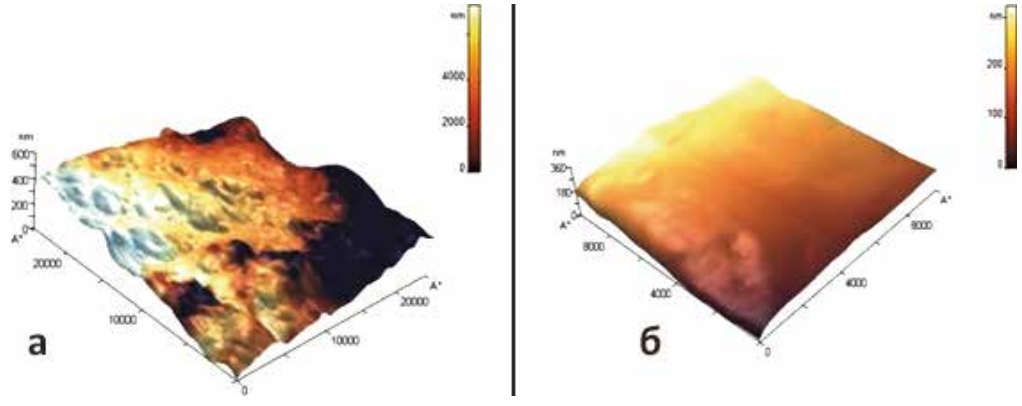

Рис. 1. Изображения поверхности плавательного пузыря сибирского осетра и пленки из клея в 3D-режиме, полученные с помощью атомно-силовой микроскопии: а – плавательный пузырь; б – пленка из клея

омуля и чира. На первом этапе была исследована структура плавательного пузыря омуля в сравнении с плавательным пузырем сибирского осетра методом электронной микроскопии.

Структура коллагеновых волокон

После биосинтеза в фибробластах молекулы коллагена агрегируют в межклеточном пространстве с образованием фибрилл, характерным признаком которых является поперечная исчерченность с периодом 64 нм, состоящая из светлой и темной полос, однако такие полосы проявляются только при очень больших увеличениях при рассмотрении отдельных фибрилл. В соединительной ткани отдельные фибриллы собираются в волокна диаметром около 2 и 20 мкм соответственно, образуя сложную морфологическую структуру [16].

С использованием низковакуумного растрового электронного микроскопа (JSM-7800F, Япония) исследована структура пленок плавательного пузыря осетра и омуля (рис. 2). На полученных электронных микрофотографиях можно наблюдать тесно прилежащие друг к другу отчетливые пучки коллагеновых волокон, ориентированные параллельно поверхности плавательного пузыря. Подобные волокна не встречаются на электронных микрофотографиях плавательного пузыря омуля. Можно предположить, что это отличие связано с различием исследованных пород рыб, возраста особей (с возрастом структура коллагена изменяется, увеличивается количество межмолекулярных сшивок), особенностями коллагена, который влияет на степень организованности фибрилл.

Исследование качественного химического состава коллагена из плавательного пузыря осетровых и сиговых пород рыб методом ИК-спектроскопии

Поскольку термические способы перевода в раствор плавательного пузыря, использованные для осетра, для сиговых пород рыб оказались не эффективными, в данной работе был применен метод щелочно-солевой обработки для солюбилизации нативного коллагена. Действие щелочи в присутствии соли сводится в основном к разрыхлению волокнистых структур, удалению

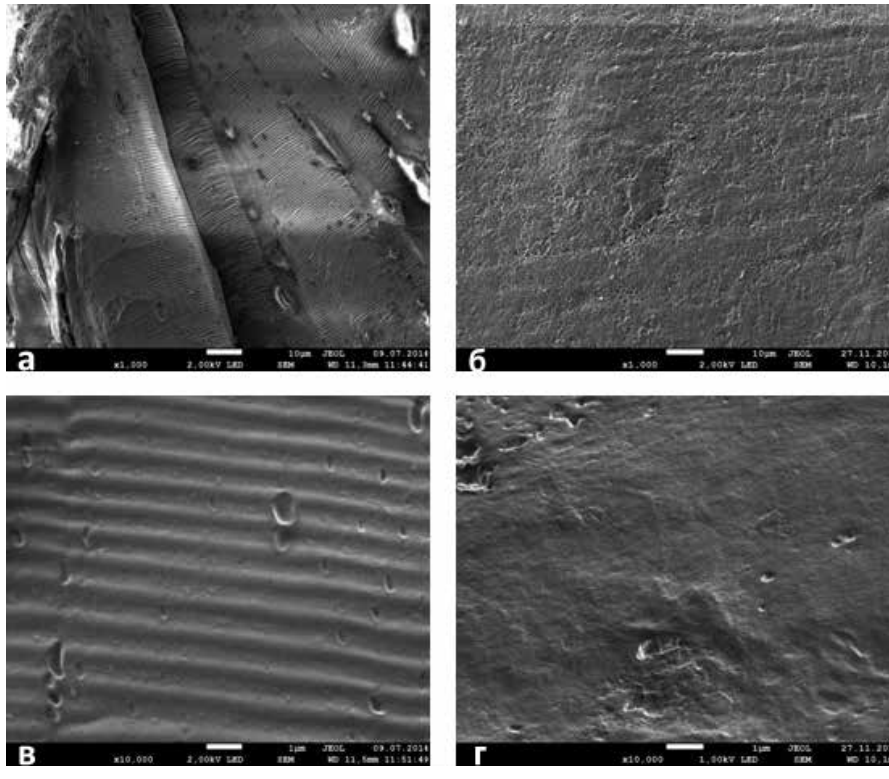

Рис. 2. Электронные микрофотографии пленок плавательного пузыря северных пород рыб при увеличении в 1000 раз: а – осетр, б – омуль; при увеличении в 10000 (1μм) раз: в – осетр, г – омуль

сопутствующих веществ, разрыву межмолекулярных связей и деполимеризации фибриллярных структур. Защитное действие солей при щелочной обработке объясняется их обезвоживающим эффектом, способствующим уплотнению структурных элементов и повышению общей стабильности белка [1]. Способ осуществляется следующим образом. Плавательные пузыри тщательно промывают проточной водой, удаляют наружные прирези жировой ткани и разрезают по форме прямоугольника. Затем плавательные пузыри подвергают щелочно-солевой обработке 10%-м раствором гидроксида натрия и 10%-м раствором сульфата натрия в течение 4 часов. Затем удаляют раствор и полученную массу нейтрализуют в 1 М уксусной кислоте в течение суток. Жидкостной коэффициент равен 2-3, что обеспечивает полное погружение массы в раствор и возможность равномерного взаимодействия сырья с растворителями. Коллагеновые пленки доводят до постоянной влажности в сушильном шкафу при температуре не выше 25 °С. По данной технологии обрабатывали как плавательный пузырь осетра, так и плавательный пузырь омуля. Полученные продукты изучали с помощью ИК-спектроскопии.

Для идентификации отдельных функциональных групп образцов коллагена омуля и осетра на всех стадиях обработки использовали ИК-Фурье-спектрометр Varian 7000FT-IR. Подобный метод исследования использовали в работах [17-19]. На рис. 3, 4 представлены результаты инфракрасной спектроскопии для исходного плавательного пузыря омуля (рис. 3, кривая 1) и осетра (рис. 4, кривая 1), после щелочно-солевой обработки и нейтрализации в уксусной кислоте омуля (рис. 3, кривые 2 и 3) и осетра (рис. 4, кривые 2 и 3) соответственно.

Сравнение химического состава исходного плавательного пузыря омуля и осетра показало, что для них на ИК-спектрах фиксируются полосы Амид I (1635-1649 $см^{-1}$), Амид II (1539-1559 $см^{-1}$) и Амид III (1234-1241$см^{-1}$), обусловленные валентными колебаниями C=O-связи (Амид I) и плоскостными деформационными колебаниями NH-связи (Амид II); а также C-N (деф.), NH-связи (Амид III) [20]. Данные полосы поглощения характеризуют колебание пептидной связи белка и подтверждают коллагеновую природу исследованных плавательных пузырей. Дополнительным свидетельством присутствия коллагена служит наличие во всех исследованных спектрах плавательного пузыря омуля и осетра полос поглощения при 3285-3305 $см^{-1}$ (Амид А), обусловленных валентными колебаниями NH-связи. Основные различия ИК-спектров исходных плавательных пузырей осетра и омуля отмечены в области 2800-3300 $см^{-1}$. На спектрах образцов на основе коллагена из плавательного пузыря сибирского осетра полосы поглощения при длинах волн 2923, 2853, 1742 $см^{-1}$, которые относятся к валентным колебаниям метиленовой (-CH_2-) и метильной (-CH_3-), ацетильной (-C=O) групп соответственно, отсутствуют, эти изменения в ИК-спектре осетра по сравнению со спектром плавательного пузыря омуля обусловлены различием исходного сырья.

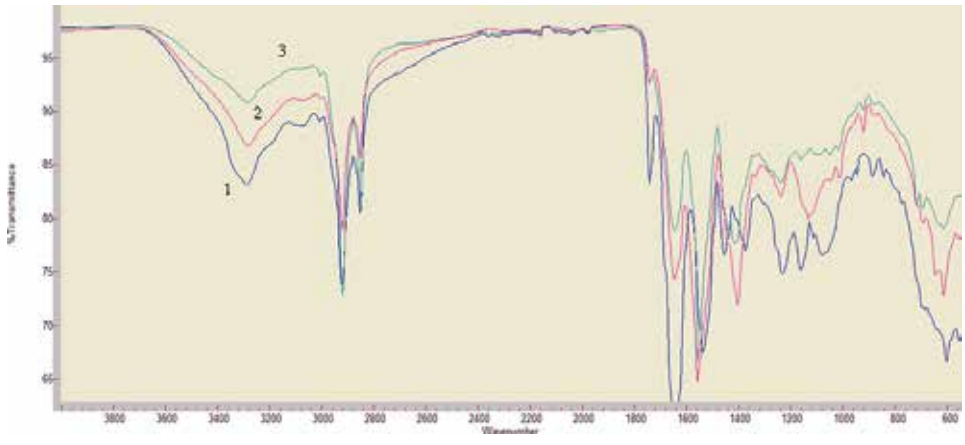

Рис. 3. ИК-спектры коллагена, полученного из плавательного пузыря омуля:
1 – исходный плавательный пузырь; 2 – плавательный пузырь после щелочно-солевой обработки; 3 – плавательный пузырь после обработки уксусной кислотой

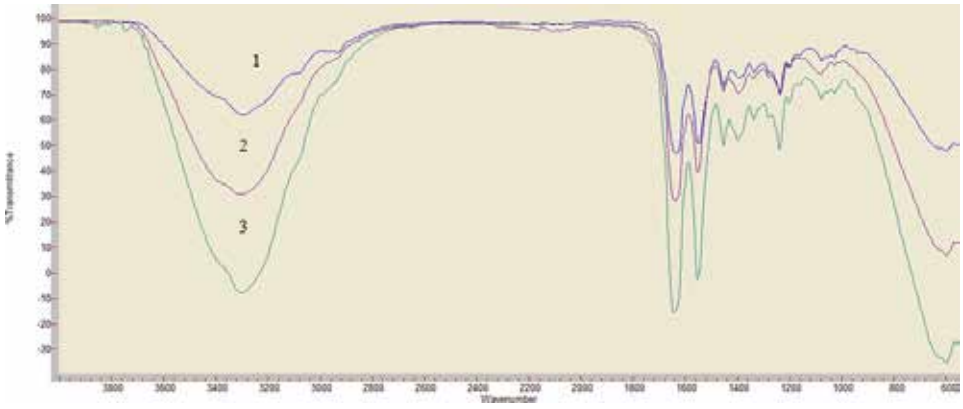

Рис. 4. ИК-спектры коллагена, полученного из плавательного пузыря осетра:
1 – исходный плавательный пузырь; 2 – плавательный пузырь после щелочно-солевой обработки; 3 – плавательный пузырь после обработки уксусной кислотой

Анализ полученных спектров коллагена из плавательного пузыря сибирского осетра показывает, что на всех этапах обработки (щелочно-солевая, последующая нейтрализация уксусной кислотой), общее количество и их интенсивность полос поглощения в целом сохраняются.

Отмечаются некоторые расхождения между спектрами плавательного пузыря омуля, полученными на различных этапах обработки. В результате щелочно-солевой обработки исчезает полоса при длине волны 1082 $см^{-1}$, которая характеризует поглощение монозамещенного бензольного кольца, исчезает полоса 1376 $см^{-1}$, которая относится к метильной группе [21]. На всех этапах гидролиза сохраняются неизменными полосы амид I, амид II, амид III, амид A, характеризующие полипептидные связи белка. Таким образом, можно предположить, что полученный в результате щелочно-солевой обработки плавательных пузырей продукт является коллагеном, сохранившим свою нативную структуру.

Эксперимент in vivo

Для подтверждения эффективности применения плавательного пузыря сиговых рыб в медицинских целях проведен эксперимент in vivo на лабораторных животных, позволяющий оценить его влияние на продолжительность заживления ран (рис. 5.) по методике, изложенной в [15]. Продолжительность эксперимента составляла 14 суток, количество экспериментальных животных (лабораторные крысы линии Wister) в каждой серии не менее 4.

При проведении экспериментов in vivo было показано, что при использовании пленок из плавательного пузыря чира и омуля, также как и при использовании пленок осетра сокращается площадь раны, несколько уменьшаются сроки образования грануляционной ткани и сроки заживления раны. По сравнению с контрольной группой для ран, обработанных пленками из плавательного пузыря, в первые сутки изменение площади несколько меньше, но заживление раны происходит на 2 суток раньше. Т. е. плавательные пузыри чира и омуля не менее эффективны в качестве медицинского средства для лечения наружных ран, чем плавательные пузыри осетра. Первые положительные результаты должны быть подтверждены опытами на большем количестве подопытных животных, однако тот факт, что применение распространенных промысловых рыб – чира и омуля – дало результаты, мало отличающиеся от использования осетра, широко употребляемого для медицинских целей, весьма обнадеживает. Т. е. сырьевая база для получения медицинских материалов на основе коллагена в будущем может быть существенно расширена, при этом будут использованы отходы переработки массовых промысловых рыб.

Заключение

В медицине рыбный коллаген и продукты его гидролиза широко применяют в виде различных пленок, губок, трубок, пластырей и других препаратов для лечения ран, ожогов,

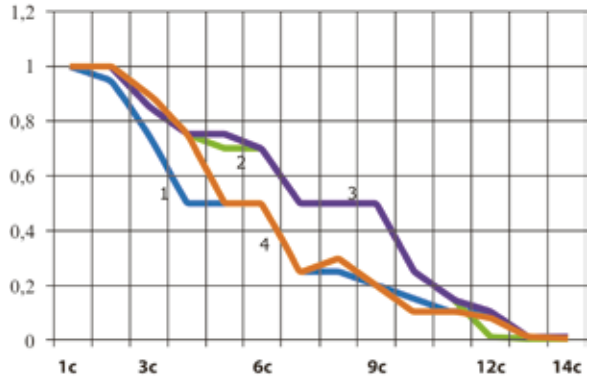

Рис. 5. Кинетика изменения площади раневой поверхности (см^2) у экспериментальных животных в зависимости от продолжительности эксперимента (в сутках):
1 – контрольная группа; 2 – пленка плавательного пузыря чира;
3 – пленка плавательного пузыря омуля; 4 – пленка плавательного пузыря осетра

трофических язв, пульпитов, гипертонической болезни, остеоартрита. В частности, коллаген из плавательного пузыря осетра используется для производства аппликационных лекарственных средств в виде фитопленок пролонгированного действия для профилактики и лечения воспалительных заболеваний слизистой и кожных покровов организма.

В данной работе впервые были изучены плавательные пузыри сибирского осетра, сиговых пород рыб с целью изучения возможности их применения для получения материалов медицинского назначения. Образцы плавательного пузыря были исследованы методами электронной микроскопии, ИК-спектроскопии. Результаты электронной микроскопии показывают, что исследованные образцы плавательного пузыря омуля и осетра существенно различаются по своей микроструктуре: для плавательного пузыря осетра характерна фибриллярная структура волокон. Для плавательного пузыря омуля она не выявлена, что объясняется особенностями морфологического строения этих рыб и различиями в аминокислотном составе коллагена.

Первые эксперименты по применению пленок коллагена из плавательного пузыря северных пород рыб в качестве медицинских средств для заживления ран подопытных животных, установленные в экспериментах in vivo, дали положительные результаты. При использовании пленок из плавательного пузыря осетра, чира и омуля сокращается площадь раны, несколько уменьшаются сроки заживления раны, пленки не вызывают раздражающего действия и оказывают стимулирующее влияние на процессы заживления кожных ран, что служит основанием для дальнейших экспериментальных работ (испытания на большем количестве подопытных животных, клинические испытания).

Для дальнейшей переработки и очистки, избирательного разрушения сетки прочных межмолекулярных связей в условиях, сохраняющих трехспиральную структуру коллагена и его выделения, биосырье обрабатывают различными химическими веществами. Нами был опробован метод щелочно-солевой обработки плавательного пузыря северных пород рыб для выделения (солюбилизации) коллагена. Действие щелочно-солевой обработки приводит к разрушению основного цементирующего вещества, в частности, гликозаминогликанов, дезорганизации и дезинтеграции структурных элементов коллагена, нарушению межмолекулярных связей, что делает возможным его полное растворение и переработку.

По данным ИК-спектроскопии на всех этапах щелочно-солевой обработки сохраняются полосы поглощения амид I, амид II, амид III, амид A, характеризующие полипептидные связи белка, что подтверждает сохранение коллагеновой природы полимера и пригодность обработанного данным способом сырья для дальнейшего получения разнообразных медицинских материалов. Таким образом, сырьевая база для получения медицинских материалов на основе коллагена в будущем может быть существенно расширена, при этом будут использованы отходы переработки массовых промысловых рыб.

Литература

1. Хилькин А. М., Шехтер А. Б., Истранов Л. П., Леменев В. Л. Коллаген и его применение в медицине. – М.: Медицина, 1976. – 256 с.

2. Гулый М. Ф., Литвиненко Л. Т., Белицер В. А., Гершензон С. М., Троицкий Г. В. Биополимеры в биологии, народном хозяйстве и медицине. – Киев: Наукова думка, 1975.

3. Югай А. В. К вопросу актуальности использования нетрадиционных видов рыб на примере бычков семейства Cottidae // Новые технологии переработки сельскохозяйственного сырья в производстве продуктов общественного питания. Сборник материалов международной конференции с элементами научной школы для молодежи. – Владивосток: ТГЭУ, 2010. – С. 56-60.

4. Киселев В. И. Применение коллагена в медицине // Морская индустрия (информационно-аналитический журнал). – 2002. – № 2 (15). – С. 32-35.

5. Югай А. В., Бойцова Т. М. К вопросу о многофункциональном использовании коллагена, получаемого из кожи рыб // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2-4. – С. 704-706.

6. Способ получения аппликационного средства: пат. Рос. Федерации. № 2179456; заяв. – 20.02.2002; опубл. 4.03.2001.

7. Способ получения полифункционального коллагенового препарата: пат. – 2059383 Рос. Федерации. № 92008487; заявл. – 26.11.1992; опубл. – 10.05.1996.

8. Способ получения пористого коллагенового материала: пат. – 2061051 Рос. Федерации. № 93049277/12; заявл. – 28.10.1993; опубл. – 27.05.1996.

9. Способ получения коллазоля: пат. – 2129805 Рос. Федерации. № 97121210/13; заявл. 30.12.1997; опубл. – 10.0.1999.

10. Способ получения белкового продукта из коллагенсодержащего сырья: пат. – 2227507 Рос. Федерации. заяв. – 05.07.2002; опуб. – 27.04.2004.

11. Способ получения закусочного продукта из свиных шкурок: пат. – 2345575 Рос. Федерации. № 2007114817/13; заявл. – 19.04.2007; опубл. – 10.02.2009.

12. Способ производства белковых препаратов из субпродуктов II категории: пат. – 2088103 Рос. Федерация. № 95120978/13; заявл. – 13.12.1995; опубл. – 27.08.1997.

13. Новикова Л. С., Шорманов В. К., Беляева Г. В., Полонская М. В., Беляева Т. В., Ахметзянова И. Г. Получение коллагена и некоторых лекарственных препаратов на его основе // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2011. – № 1. – С. 139-145.

14. Минкин Е. В., Шестакова И. С. Влияние предварительной обработки коллагена на его растворение. – Научные труды / МТИЛП, 1962. – Вып. 25. – с. 52-54.

15. Гармаева Д. К., Петрова Н. Н., Иванова С. Ф., Никифоров П. В., Аржакова Л. И. Экспериментальный опыт применения биологического клея на основе местного сырья для заживления кожных ран // Якутский медицинский журнал. – Якутск, 2013. – № 1 (41). – С. 39-43.

16. Иванова Л. А., Сыченников И. А., Кондратьева Т. С. Коллаген в технологии лекарственных форм. – М.: Медицина, 1984.

17. Onouma Kaewdang, Soottawat Benjakul, Thammarat Kaewmanee, Hideki Kishimura. Characteristics of collagen from the swim bladders of yellow fin tuna (Thunnus albacares) // Food Chemistry. – 2014. – Vol. 155. – P. 264-270.

18. Aiah A. El-Rashidy, Ahmed Gad, Abd El-Hay G. Abu-Hussein, Shaymaa I. Habib, Nadia A. Badr, Azza A. Hashem. Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (Oreochromis niloticas) fish scale collagen // International Journal of Biological Macromolecules. – 2015. – Vol. 79. – P. 618-626.

19. Anguchamy Veeruraj, Muthuvel Arumugam, Thangavel Balaasubramanian. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (Evenchelys macrura). – 2013. – Vol. 48. Iss. – 10. – P. 1592-1602.

20. Волькенштейн М. В. Биофизика. – М.: Наука, 1988.

21. Шрайнер Р., Фьюзон Р. Идентификация органических соединений. – М.: Мир, 1983.

References

1. Khil'kin A. M., Shekhter A. B., Istranov L. P., Lemenev V. L. Kollagen i ego primenenie v meditsine. – M.: Meditsina, 1976. – 256 s.

2. Gulyi M. F., Litvinenko L. T., Belitser V. A., Gershenzon S. M., Troitskii G. V. Biopolimery v biologii, narodnom khoziaistve i meditsine. – Kiev: Naukova dumka, 1975.

3. Iugai A. V. K voprosu aktual'nosti ispol'zovaniia netraditsionnykh vidov ryb na primere bychkov semeistva Cottidae // Novye tekhnologii pererabotki sel'skokhoziaistvennogo syr'ia v proizvodstve produktov obshchestvennogo pitaniia. Sbornik materialov mezhdunarodnoi konferentsii s elementami nauchnoi shkoly dlia molodezhi. – Vladivostok: TGEU, 2010. – S. 56-60.

4. Kiselev V. I. Primenenie kollagena v meditsine // Morskaia industriia (informatsionno-analiticheskii zhurnal). – 2002. – № 2 (15). – S. 32-35.

5. Iugai A. V., Boitsova T. M. K voprosu o mnogofunktsional'nom ispol'zovanii kollagena, poluchaemogo iz kozhi ryb // Fundamental'nye issledovaniia. – 2015. – № 2-4. – S. 704-706.

6. Sposob polucheniia applikatsionnogo sredstva: pat. Ros. Federatsii. № 2179456; zaiav. – 20.02.2002; opubl. 4.03.2001.

7. Sposob polucheniia polifunktsional'nogo kollagenovogo preparata: pat. – 2059383 Ros. Federatsii. № 92008487; zaiavl. – 26.11.1992; opubl. – 10.05.1996.

8. Sposob polucheniia poristogo kollagenovogo materiala: pat. – 2061051 Ros. Federatsii. № 93049277/12; zaiavl. – 28.10.1993; opubl. – 27.05.1996.

9. Sposob polucheniia kollazolia: pat. – 2129805 Ros. Federatsii. № 97121210/13; zaiavl. 30.12.1997; opubl. – 10.0.1999.

10. Sposob polucheniia belkovogo produkta iz kollagensoderzhashchego syr'ia: pat. – 2227507 Ros. Federatsii. zaiav. – 05.07.2002; opub. – 27.04.2004.

11. Sposob polucheniia zakusochnogo produkta iz svinykh shkurok: pat. – 2345575 Ros. Federatsii. № 2007114817/13; zaiavl. – 19.04.2007; opubl. – 10.02.2009.

12. Sposob proizvodstva belkovykh preparatov iz subproduktov II kategorii: pat. – 2088103 Ros. Federatsiia. № 95120978/13; zaiavl. – 13.12.1995; opubl. – 27.08.1997.

13. Novikova L. S., Shormanov V. K., Beliaeva G. V., Polonskaia M. V., Beliaeva T. V., Akhmetzianova I. G. Poluchenie kollagena i nekotorykh lekarstvennykh preparatov na ego osnove // Kurskii nauchno-prakticheskii vestnik «Chelovek i ego zdorov'e». – 2011. – № 1. – S. 139-145.

14. Minkin E. V., Shestakova I. S. Vliianie predvaritel'noi obrabotki kollagena na ego rastvorenie. – Nauchnye trudy / MTILP, 1962. – Vyp. 25. – s. 52-54.

15. Garmaeva D. K., Petrova N. N., Ivanova S. F., Nikiforov P. V., Arzhakova L. I. Eksperimental'nyi opyt primeneniia biologicheskogo kleia na osnove mestnogo syr'ia dlia zazhivleniia kozhnykh ran // Iakutskii meditsinskii zhurnal. – Iakutsk, 2013. – № 1 (41). – S. 39-43.

16. Ivanova L. A., Sychenikov I. A., Kondrat'eva T. S. Kollagen v tekhnologii lekarstvennykh form. – M.: Meditsina, 1984.

17. Onouma Kaewdang, Soottawat Benjakul, Thammarat Kaewmanee, Hideki Kishimura. Characteristics of collagen from the swim bladders of yellow fin tuna (Thunnus albacares) // Food Chemistry. – 2014. – Vol. 155. – P. 264-270.

18. Aiah A. El-Rashidy, Ahmed Gad, Abd El-Hay G. Abu-Hussein, Shaymaa I. Habib, Nadia A. Badr, Azza A. Hashem. Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (Oreochromis niloticas) fish scale collagen // International Journal of Biological Macromolecules. – 2015. – Vol. 79. – P. 618-626.

19. Anguchamy Veeruraj, Muthuvel Arumugam, Thangavel Balaasubramanian. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (Evenchelys macrura). – 2013. – Vol. 48. Iss. – 10. – P. 1592-1602.

20. Vol'kenshtein M. V. Biofizika. – M.: Nauka, 1988.

21. Shrainer R., F'iuzon R. Identifikatsiia organicheskikh soedinenii. – M.: Mir, 1983.