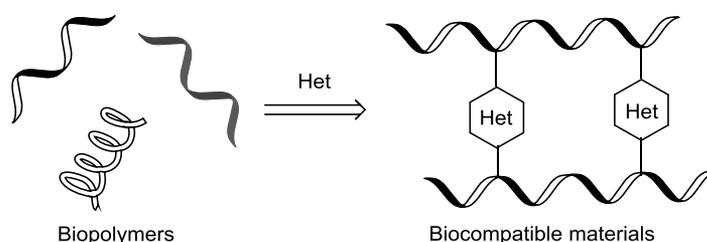


Гетероциклы природного происхождения в качестве нетоксичных реагентов для сшивки белков и полисахаридов

Мария И. Токарева¹, Мария Н. Иванцова¹, Максим А. Миронов^{1*}

¹ Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, ул. Мира, 19, Екатеринбург 620002, Россия; e-mail: m.a.mironov@urfu.ru

Поступило 6.07.2016
Принято 2.08.2016



Химическая сшивка структурообразующих биополимеров, таких как коллаген, гиалуроновая кислота, целлюлоза, играет значительную роль в получении новых материалов для биоинженерии и направленной доставки лекарственных веществ. Однако известные методы модификации биополимеров с помощью синтетических реагентов зачастую приводят к производным с заметной токсичностью. Для создания полностью совместимых с тканями человека биоматериалов в последнее время широко используют природные гетероциклические соединения, выделенные из растительного и животного сырья. Примерами подобных гетероциклов являются генипин, пищевые флавоноиды (катехины, проантоцианидины), аналоги десмозина. Использование гетероциклов в биоинженерии для сшивки природных белков и полисахаридов является новым и весьма перспективным направлением химии гетероциклических соединений, которому посвящено множество статей, опубликованных за последние десять лет.

Ключевые слова: биополимеры, генипин, десмозин, коллаген, полисахариды, проантоцианидины, хитозан, флавоноиды.

Сшивка биополимеров для получения новых биосовместимых материалов

Полимеры, выделенные из природных источников, находятся в фокусе современных биомедицинских исследований. Это связано, прежде всего, с высокой биосовместимостью и биоразлагаемостью данных материалов.¹ В то время как у искусственно полученных материалов, не имеющих аналогов в живой природе, следует опасаться выявления новых еще не известных побочных эффектов, природные материалы позволяют свести эти нежелательные эффекты к минимуму, так как за многие миллионы лет эволюции живые организмы идеально приспособились к своему окружению в виде биополимеров и малых молекул.² Поэтому природные материалы всегда будут иметь преимущество перед искусственно созданными, даже если на данный момент синтетические материалы считаются совершенно безопасными для использования в медицине. В последние десятилетия природные полимеры нашли широкое применение в таких облас-

тях медицины, как создание матриц для регенерации тканей, направленная доставка лекарственных веществ и получение искусственных тканей, например сердечных клапанов.³

Наиболее популярными для биоинженерии среди природных полимеров являются те, которые уже адаптированы эволюцией для высоких механических нагрузок. В первую очередь это фибриллярные белки, такие как коллаген и фиброин шелка, а также полисахариды из клеточных стенок растений и покровов членистоногих (целлюлоза, пектин, хитин) или внеклеточного матрикса растительных или животных тканей (гиалуроновая кислота, альгиновая кислота). Эти соединения уже обладают необходимыми структурными особенностями, которые позволяют формировать волокна, пленки, гели, являющиеся компонентами искусственных тканей и средств доставки лекарственных веществ. Кроме перечисленных выше полимеров в медицине используется широкий спектр полусинтетических биоматериалов, выделенных из различных источников. В качестве примера можно привести продукты

денатурации и частичного гидролиза коллагена (желатин), а также деацетилирования хитина (хитозан). Реже используются запасные полисахариды растений (крахмал, инулин) и растительные белки (пшеничный глютен, зеин). Все эти полимеры являются базисом для дальнейшего модифицирования и создания новых биосовместимых материалов для медицины.⁴

При использовании природных материалов следует иметь в виду, что в своем исходном состоянии в тканях организма они находятся в виде сложного комплекса соединений, который входит в состав многоуровневых иерархических структур. Эти структуры, являющиеся природными аналогами искусственных композитов, несут основную ответственность за уникальные свойства природных материалов. При выделении биополимера из растительных или животных тканей происходит разрушение этих структур, а также частичный гидролиз самого биополимера, сопровождающийся снижением молекулярной массы и увеличением растворимости. Например, при разрушении протопектинового комплекса, составляющего основу первичной клеточной стенки растений и имеющего сложную структуру, выделяется растворимый пектин, представляющий собой линейные молекулы полигалактуроновой кислоты.⁵ В большинстве случаев стадии выделения и очистки биополимера из природных источников негативно влияют и на механические свойства изготовленных из него материалов. Для получения искусственных биоматериалов нужно воссоздать исходную структуру, улучшив механические свойства конечного продукта и повысив его стабильность к различным факторам окружающей среды. При этом растворимость и проницаемость полученных в результате биоматериалов, по сравнению с исходным биополимером, также будут снижаться.²

Наиболее перспективным методом модифицирования биополимеров при получении новых биоматериалов является ковалентная и нековалентная сшивка полимерных цепей. Этот метод позволяет радикально повысить молекулярную массу биополимера и снизить его растворимость в воде. Появляется возможность формировать различные трехмерные структуры, такие как пленки, волокна, губки, микрогели.¹ В каждом конкретном случае использование сшивки биополимеров позволяет решать определенные задачи. Так, для полимерных пленок важным качеством является механическая прочность и набухаемость в воде. Сшивка позволяет значительно повысить первый параметр и понизить второй. Например, при обработке коллагеновых пленок сшивающими реагентами предел прочности на разрыв повышается до 57%, а модуль упругости увеличивается в несколько раз.⁶

Для волокон и фибрилл, полученных на основе биополимеров, особенное значение имеет стабильность в водной среде, так как из-за большой удельной поверхности они легко набухают в воде и теряют свои механические свойства. Эта проблема особенно актуальна для ультратонких волокон, полученных методом электроспиннинга.^{7,8} После обработки сшивающими

агентами подобные волокна сохраняют свою структуру спустя несколько дней после получения.⁹ Еще одной группой биоматериалов, для которых сшивка имеет определяющее значение, являются микрогели для направленной доставки лекарственных средств. В этом случае плотность сшивки позволяет контролировать скорость высвобождения лекарственного препарата в организме.^{10,11} Еще одной важной характеристикой микрогелей является скорость их биodeградации под действием ферментов. Сшивка позволяет регулировать этот параметр, обеспечивая оптимальное время нахождения микрогеля в тканях организма.^{12,13}

Проблемы стабильности выходят на первый план и в случае используемых для регенерации тканей матриц, которые представляют собой губчатые трехмерные структуры.¹⁴ Из-за своей пористой поверхности они обладают неудовлетворительными механическими свойствами, которое могут быть улучшены с помощью сшивки.¹⁵ Кроме того, плотность сшивки определяет скорость замещения матрицы клеточными структурами и ее минерализацию в случае костной ткани.¹⁶ В целом сшивка биополимеров представляет собой основной рабочий инструмент биоинженерии, который позволяет добиваться необходимых физико-химических свойств для новых биосовместимых материалов.

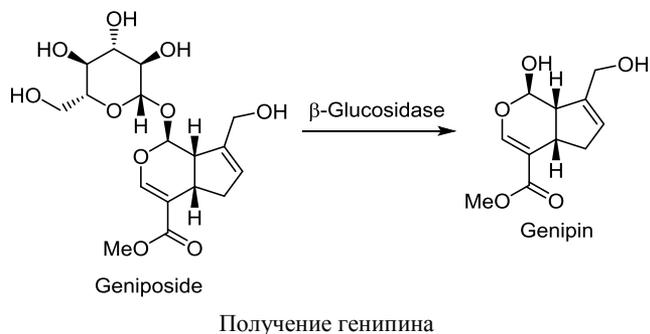
При получении химически сшитых материалов следует всегда учитывать биологические эффекты сшивающего реагента. Традиционные сшивающие реагенты, такие как глутаровый диальдегид, эпихлоргидрин, карбодиимиды, хлорангидриды дикарбоновых кислот, обладают высокой токсичностью, поэтому они негативно влияют на биосовместимость конечного материала.¹⁷ Решением этой проблемы является использование природных сшивающих реагентов, которые не имеют подобных побочных эффектов. В последние годы этот подход завоевал большую популярность, что привело к появлению большого разнообразия натуральных сшивающих реагентов. Среди этих веществ особую роль играют гетероциклические соединения: генипин, десмозин и его аналоги, флавоноиды, такие как кверцетин и проантоцианидины. Использование этих соединений будет подробно рассмотрено в следующих разделах нашего обзора.

Природные гетероциклы для ковалентной сшивки биополимеров

Генипин является наиболее популярным на сегодняшний день сшивающим реагентом, впервые выделенным в чистом виде из растения *Genipa americana*.¹⁸ В настоящее время в качестве основного природного источника генипина используются плоды растения *Gardenia jasminoides Ellis*, в которых он находится в виде гликозида – генипозида (схема 1).¹⁹

Содержание генипозида в этом сырье составляет 3.1–4.2%, что позволяет получать его в промышленных масштабах.²⁰ Метод получения генипина включает экстракцию высушенных фруктов горячей водой, ферментативный гидролиз генипозида с помощью культуры *Penicillium nigricans* и нескольких стадий

Схема 1



выделения и очистки конечного продукта путем адсорбции и колоночной хроматографии.²¹

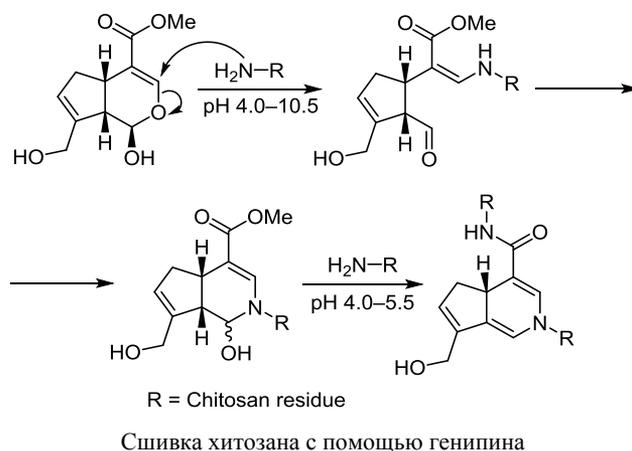
Практическое применение генипозидов имеет длинную историю, так как он входит в число ингредиентов традиционной китайской медицины, а также используется в качестве пищевого красителя в восточной кухне. За это время он показал себя как нетоксичное и безопасное вещество с высокой биосовместимостью.^{22,23} Недавние исследования показали, что генипин обладает выраженной противовоспалительной активностью,²⁴ кроме того он может использоваться в терапии диабета второго типа.²⁵

Однако наибольшее значение имеет его низкая токсичность по сравнению с традиционными сшивающими реагентами. Например, цитотоксичность генипина примерно в десять тысяч раз меньше, чем у глутарового диальдегида.²⁶ Низкой токсичностью обладают и продукты присоединения генипина к белкам и полисахаридам. Проведенные *in vivo* исследования по вживлению имплантатов, полученных на основе хитозана с помощью глутарового диальдегида и генипина, показали значительные преимущества последнего, например отсутствие воспалительной реакции.²⁷ Продукты взаимодействия генипина с белками, благодаря их ярко-голубому цвету, длительное время используются в качестве пищевых красителей.²⁸

Основной сферой применения генипина является сшивка биополимеров, содержащих аминогруппы. Он широко используется для ковалентной сшивки полисахаридов, имеющих глюкозаминные звенья, таких как хитозан и деацелированная гиалуроновая кислота.²³ Другим объектом для сшивки с помощью генипина являются разнообразные белки, содержащие лизин и аргинин, а также полилизин.²⁹

Механизм реакции генипина с аминогруппами имеет сложный характер и критически зависит от уровня pH.³⁰ Первая и наиболее изученная стадия этого процесса включает нуклеофильную атаку по положению 3 молекулы генипина (схема 2), раскрытие цикла и последующую рециклизацию с образованием дигидропиридинового цикла.³¹ В этом случае генипин ведет себя подобно диальдегидам. Эта реакция протекает в широком диапазоне pH (4.0–10.5) и характеризуется высокими выходами, вплоть до количественных, при оптимальных значениях pH (7.4–8.5).³² В слабнокислых условиях (pH 4.0–5.5) проходит более медленная

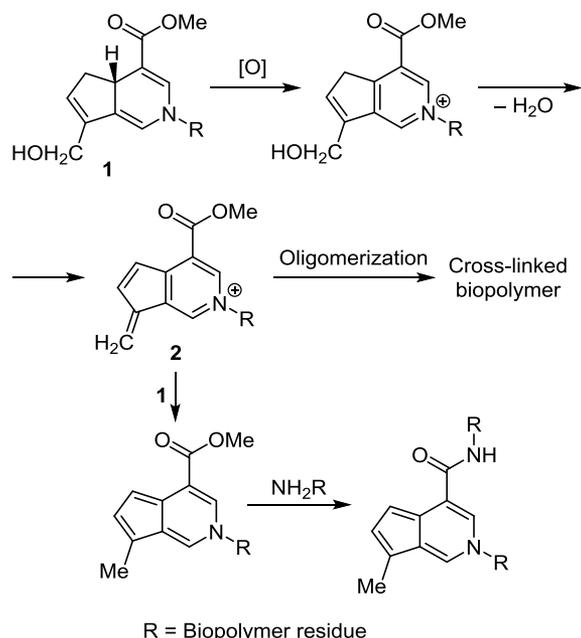
Схема 2



реакция замещения по сложноэфирной группе с отщеплением молекулы метанола. Такое направление процесса сшивки характерно для модификации хитозана, так как он становится нерастворимым при pH > 6.5, поэтому его модификацию проводят в слабнокислых растворах. При прохождении этой реакции происходит сшивка двух полимерных цепей с образованием короткого мостика, состоящего из одной молекулы генипина.

Альтернативной схемой процесса сшивки является олигомеризация остатков генипина, прикрепленных к полимерной цепи (структура 1), которая инициируется при наличии в системе окислителя, например кислорода воздуха (схема 3). Механизм олигомеризации включает ароматизацию дигидропиридинового цикла и последующее отщепление одной молекулы воды.³³ В результате образуются олигомерные продукты, окрашенные в голубой цвет, которые формируют

Схема 3



мостик, состоящий из 2–4 молекул генипина. При этом продукт **2** может выступать в качестве окислителя, поддерживая протекание процесса олигомеризации и без дополнительного введения кислорода. Вся последовательность реакций наиболее активно протекает при нейтральных или слабощелочных условиях. Следует отметить, что исходный генипин не подвергается олигомеризации при этих условиях, она начинается только после образования дигидропиридинового цикла. Другое направление процесса сшивки реализуется при высоком уровне pH (13.6) и включает альдольную конденсацию исходного генипина с образованием олигомеров, одержащих до 80 звеньев. Эти олигомеры с концевыми альдегидными группами реагируют с аминогруппами биополимеров, образуя сшивки.³⁴ Таким образом, выбор уровня pH позволяет контролировать структуру сшитого материала и его набухаемость. При низких значениях pH образуются короткие сшивки с одной молекулой генипина. В то же время в нейтральных и слабощелочных условиях формируются мостики, содержащие 2–4 остатка генипина, а в сильнощелочных – происходит олигомеризация, приводящая к еще более длинным сшивкам.

Генипин характеризуется высокой реакционной способностью по отношению к аминогруппам, поэтому его можно использовать даже в случае низкой плотности аминогрупп в полимерной цепи. Это позволяет проводить сшивку полисахаридов, имеющих небольшие примеси белка, ковалентно или нековалентно связанного с полисахаридной цепью. Этим методом был получен стабильные гели на основе образцов каппа-карагинана, содержащего всего лишь 1.8% белка в своем составе.^{35,36} После удаления белка добавление генипина уже не приводило к образованию сшитого биоматериала. Подобный подход может быть с успехом использован и для других образцов полисахаридов, содержащих значительное количество белка, таких как агар-агар или свекловичный пектин. Высокая реакционная способность генипина использовалась также для совмещения процессов сшивки и иммобилизации. Так, недавно одностадийным методом были получены наногели хитозана, содержащие иммобилизованную фолиевую кислоту, для применения в противоопухолевой терапии. В этом случае генипин одновременно служил спейсером и сшивающим реагентом, причем выходы в обоих процессах достигли 54 и 80% соответственно.³⁷

Отличительной особенностью генипина является появление голубой окраски в ходе процесса сшивки, которое обусловлено олигомеризацией продуктов присоединения генипина к аминам. Это позволяет визуально отслеживать глубину прохождения реакции, измерять кинетику процесса, определять свойства полученных материалов. Важное значение имеет и то, что полученные красители обладают заметной флуоресценцией при облучении на длине волны 590 нм.^{38,39} Данное свойство позволяет использовать генипин для окрашивания тканей организма, в том числе и для

проявления отпечатков пальцев. Кроме того, он может с успехом заменить нингидрин в качестве реагента для хроматографического определения аминокислот и красителя для колориметрии и флуориметрии.²²

Генипин широко используется для получения всех типов сшитых биоматериалов: гидрогелей, мембран, волокон, микрогелей, губок. Они применяются в медицинской практике в качестве носителей лекарственных веществ, матриц для биоинженерии и имплантатов, шовного материала и защитных покрытий.²² Наиболее широкое применение нашли системы направленной доставки лекарственных веществ, полученные путем сшивки хитозана, желатина и их смесей с другими полимерами. Так, генипин является популярным реагентом для синтеза гидрогелей на основе хитозана.²³ Сшивка полимерных цепей проходит в достаточно концентрированных растворах хитозана (обычно более 2%), причем минимальная концентрация зависит от молекулярной массы образца. Для увеличения эффективности данного процесса используют комбинацию ионного гелеобразования с помощью поликислот и ковалентной сшивки генипином. Хорошим примером такого подхода является получение гелей хитозана последовательной обработкой триполифосфатом и генипином.⁴⁰

Еще одним хорошо зарекомендовавшим себя методом является введение карбоксильных групп в структуру хитозана. Это позволяет получать более плотные гели, что, в свою очередь, повышает эффективность сшивки. Подобным методом были получены гели на основе смеси карбоксиметилхитозана и альгиновой кислоты.⁴¹ Другим ускорителем гелеобразования в физиологических условиях под действием генипина в 1.5% растворе хитозана является глицеринфосфат.⁴² Полученные подобным методом гели в виде пленок и сфер использовались для направленной доставки лекарств в желудочно-кишечном тракте, благодаря их чувствительности к уровню pH. Таким образом можно создавать лекарственные формы для перорального применения в случае белков и пептидов, чувствительных к желудочному соку. Например, сшитые генипином хитозановые матрицы были использованы для иммобилизации ферментов, например галактозидазы.⁴³

Еще одной сферой применения генипина является капсулирование клеток. Так, гелевые сферы на основе сшитого хитозана, содержащие бактериальные клетки, были предложены в качестве средства для улучшения микрофлоры желудка.⁴⁴ Белковые вещества, такие как желатин и казеин, также применялись для создания носителей лекарственных веществ.^{45,46} Изменение количества генипина влияет на плотность сшивки в этих системах и, в свою очередь, определяет профиль элиминирования лекарственного вещества из матрицы.

Гидрогели микронного и субмикронного размера обычно не удается получить обработкой генипином разбавленных растворов полисахаридов или белков. Для этого используют комбинацию гелеобразования с коацервацией, эмульгированием или различными

методами распыления. Например, обратные эмульсии "вода в масле" были выбраны в качестве реакционной среды при проведении гелеобразования в системе хитозан–генипин. Полученные в результате микросферы предложены в качестве носителей для препаратов индометацин⁴⁷ и доксорубин, ⁴⁸ а также для доставки гепарина.⁴⁹ Схожий подход был использован для получения микросфер на основе фиброина шелка.⁵⁰ Данные носители испытывались и в качестве лекарственных форм для прямого введения препаратов, например флурбипрофена, в суставную сумку.⁵¹

Недавно метод гелеобразования в обратных эмульсиях был применен для получения микрогелей с обратной связью, выделяющих инсулин при изменении концентрации глюкозы в окружающей среде.⁵² Возможно проведение реакции сшивки и на поверхности прямых эмульсий "масло в воде", стабилизированных белками. Например, обработкой генипином липидных эмульсий были получены казеиновые микрокапсулы⁵³ и желатиновые эмульгели.⁵⁴ Кроме того, генипин использовался для стабилизации казеиновых мицелл.⁵⁵

Очень популярным методом формирования полимерных микрогелей на основе хитозана является его сложная коацервация с различными отрицательно заряженными полимерами: гиалуроновой кислотой, карбоксиметилцеллюлозой, пектином, каррагинанами, альгинатами, полиакриловой кислотой.⁵⁶ Изменяя соотношения полимеров и условия проведения процесса, можно варьировать размер гелевых частиц в очень широких пределах:⁵⁷ от нескольких десятков нанометров^{58,48} до долей миллиметра.⁵⁹ Полученные таким образом гели используются в качестве носителей для направленной доставки лекарственных веществ. Гелеобразование в каплях распыленной жидкости с помощью генипина также позволяет формировать частицы размером в доли микрометра. Примером может служить метод получения казеиновых наночастиц, нагруженных препаратом альфузозином.⁶⁰

Мембраны и волокна, полученные известными методами, были дополнительно обработаны генипином для улучшения их механических свойств и понижения растворимости в воде. При этом не происходит снижения биосовместимости полученных в результате материалов, напротив, введение генипина повышает противовоспалительные свойства материала. Поэтому сшитые генипином мембраны на основе хитозана предлагаются в качестве защитных пленок при обработке раневых поверхностей и проведении оперативных вмешательств.⁶¹ Желатин также образует прочные нерастворимые в воде пленки при обработке генипином. В этом случае полученные пленки обладают способностью сорбировать фибробласты и тем самым способствовать быстрому восстановлению разрушенных тканей.^{62,63} Подобным же свойством обладают пленки, полученные на основе смеси хитозана и полилизина, обработанные генипином.⁶⁴

Недавно было показано, что изменение плотности сшивки в мембранах на основе фиброина шелка позволяет регулировать скорость утилизации этих

мембран в организме.⁶⁵ Возможность тонкой регулировки плотности сшивки в полимерных мембранах открывает также большие перспективы в конструировании трансдермальных терапевтических систем.⁶⁶ Примером может служить контролируемое высвобождение β-каротина из полимерной матрицы, состоящей из каппа-каррагинана и карбоксиметилцеллюлозы, сшитых генипином.⁶⁷ В этом случае возможность сшивки определялась наличием белка в образце каппа-каррагинана. Система желатин–хитозан–генипин была предложена для контролируемой доставки лекарственных веществ через слезистую глаза при лечении глаукомы.⁶⁸ Испытание мембран, обработанных генипином, *in vivo* показало их значительно более низкую цитотоксичность и более высокую биоразлагаемость по сравнению с мембранами, полученными с помощью других сшивающих реагентов.⁶⁹ Введение дополнительных группировок в структуру хитозана, например фрагментов катехина, позволило получить мембраны с высокими мукоадгезивными свойствами, которые тестировались в качестве буккальных лекарственных форм для введения лидокаина.⁷⁰ Генипин используется также для укрепления ультратонких коллагеновых волокон, полученных методом электроспиннинга,⁷¹ а также коллагеновых волокон, выделенных из природных источников, и желатина.⁷² Подобные нити с успехом используются для пролиферации нервной ткани.⁷³ Электроспиннинг в сочетании с обработкой генипином применялся также для формирования ультратонких волокон на основе хитозана.^{74,75}

Пористые гели, сшитые генипином, использовались в качестве матриц для пролиферации тканей в клеточных культурах и *in vivo*.^{76,77} Формирование пор в таких системах происходит путем пропускания углекислого газа,⁷⁸ лиофильной сушки или введения нерастворимых волокон в состав композиции.¹⁴ Такие системы на основе хитозана представляют собой перспективные носители клеток в новом методе регенерации межпозвоночных дисков.^{79,80} Для увеличения пористости подобных структур до 80% была использована смесь фиброина шелка и хитозана, обработанная генипином. В этом случае в реакцию вступали оба компонента: белок и полисахарид, причем первый отвечал за пористость образовавшейся структуры, а второй – за ее прочность.⁸¹ В опытах на животных показано, что пористые желатиновые гели, сшитые генипином, вызывают регенерацию нервной ткани.⁸² Генипин применялся для изготовления матриц, служащих в качестве основы для воссоздания поврежденных тканей спинного мозга с помощью культур стволовых клеток.⁸³

Обработка тканей животных генипином представляет собой одну из стадий формирования имплантатов. В качестве примера можно привести новый метод получения биоматериалов на основе бычьего перикарда.⁸⁴ Генипин рассматривается как перспективный реагент для получения протезов клапана и сосудов сердца.⁸⁵ Отмечается, что, в отличие от глутарового диальдегида, он образует более прочные сшивки и не выделяется в свободном виде из тканей.⁸⁶ В данном

случае голубая окраска полученных имплантатов не является существенным недостатком генипина. Суспензия частиц хитозана, полученных путем распылительной сушки и последующей обработки генипином, использовалась в качестве жидкого имплантата, вводимого в скелетные мышцы животных.⁸⁷ Подобные системы могут с успехом использоваться для длительного введения лекарственных веществ, так как имплантат остается в тканях в течение 20 недель.⁸⁸ Благодаря своей уникальной биосовместимости генипин может быть напрямую введен в ткани *in vivo*. Например, он тестировался в качестве вещества, способного укреплять дентин, основную составляющую ткани зубов.⁸⁹ Показано, что обработка дентина 0.635% раствором генипина при pH 7.4 способна значительно повысить предел прочности этой ткани на разрыв, что предопределяет возможность его применения в стоматологии.⁹⁰ Генипин использовался также для укрепления тканей склеры глаза⁹¹ и суставных сумок.⁹²

В целом генипин зарекомендовал себя как эффективный и безопасный сшивающий реагент для биополимеров, что предопределило его широкое использование в биоинженерии и фармацевтике. Его отличительными особенностями являются возможность тонкой регулировки плотности сшивки, в зависимости от pH, и высокая чувствительность к аминогруппам. К недостаткам генипина можно отнести окрашивание материалов при сшивке, что ограничивает его использование в некоторых областях, например в стоматологии.

Природные гетероциклы для нековалентной сшивки биополимеров

Природные экстракты, содержащие флавоноиды, издавна использовались в медицинской практике в качестве вяжущих, противовоспалительных, бактерицидных и кровоостанавливающих средств.⁹³ Они популярны как средства для укрепления десен и зубов, а также для лечения заболеваний слизистой оболочки ротовой полости и гортани. Среди сложного спектра биологической активности можно выделить антиокислительные и вяжущие свойства подобных экстрактов. Механизм действия флавоноидов как дубильных веществ основан на взаимодействии с коллагеном, сопровождающимся образованием водородных связей между гидроксильными группами фенольных фрагментов флавоноидов и боковыми группами коллагена.⁹⁴ При соприкосновении с воспаленной слизистой оболочкой или раневой поверхностью формируется защитная пленка, которая снижает раздражение нервных окончаний и защищает от проникновения инфекций. При взаимодействии биополимеров с флавоноидами по этому механизму происходит уплотнение клеточных мембран, сужение кровеносных сосудов. Эти эффекты способствуют уменьшению кровоточивости и снижению активности воспалительного процесса.⁹³ Поперечные связи между полимерными цепями возникают только в том случае, когда молекула флавоноида содержит большое количество гидроксильных групп и

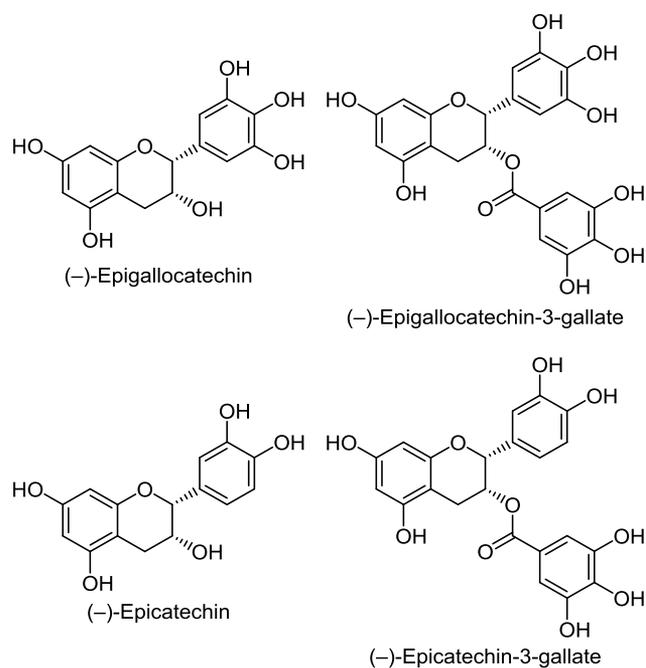


Рисунок 1. Катехины зеленого чая.

имеет высокую молекулярную массу. В противном случае они легко десорбируются с поверхности коллагеновых волокон, не образуя устойчивого комплекса. Поэтому среди множества известных флавоноидов в качестве дубильных веществ могут использоваться прежде всего проантоцианидины, содержащиеся в виноградных косточках.^{94,95} Значительно меньшей активностью обладают кверцетин из кожуры ягод и фруктов и катехины, содержащиеся в зеленом чае⁹⁶ (рис. 1).

В последние десять лет природные флавоноиды стали широко использоваться в качестве реагентов для сшивки биополимеров. Это объясняется их низкой токсичностью, хорошо изученным спектром биологической активности и легкостью в получении. Концентрированные отвары виноградных косточек, зеленого чая или сушеных ягод могут непосредственно применяться для нековалентной сшивки биополимеров.⁹⁷ Нековалентные взаимодействия биополимеров позволяют улучшить механические свойства структур на их основе, что, в свою очередь, положительно влияет на состояние соответствующей ткани организма.

Наиболее изученным на сегодняшний день является взаимодействие очищенных экстрактов виноградных косточек или зеленого чая с коллагеном и белками мышечной ткани. Так, экстракт виноградных косточек, содержащий 50.4% димеров, 16.5% тримеров, 7.1% тетрамеров проантоцианидинов и набор других биофлавоноидов, тестировался в качестве сшивающего реагента для получения пленок на основе миофибрилярных белков. Было показано, что при добавлении 5% экстракта на сухой вес пленки, ее растворимость в воде снижалась почти в два раза, в то же время прочность на разрыв увеличивалась на 25%.⁹⁸ Несколько меньшую активность в этом случае проявил экстракт зеленого

чая, который применялся также для улучшения механических свойств повязочного материала, полученного методом электроспиннинга.⁹⁹ Экстракт зеленого чая изучался также в качестве средства для укрепления сердечной мышцы при диабете *in vivo*.^{100–102} В этом случае антиоксидантный эффект превалировал над свойствами экстракта сшивать коллагеновые фибриллы, что привело к снижению механических свойств коллагена миокарда, за счет уменьшения количества естественных сшивок, катализируемых ферментами. Экстракт зеленого чая также использовался для гелеобразования муцинов желудочно-кишечного тракта. Экстракт показал более низкую активность, по сравнению с флавоноидами, выделенными в чистом виде. Наиболее высокой гелеобразующей способностью обладал эпигаллокатехин-3-галлат, имеющий большую молекулярную массу и большее количество гидроксильных групп, по сравнению с другими компонентами экстракта.¹⁰³ Таким образом, активность экстрактов флавоноидов имеет сложный и не всегда предсказуемый характер.

Большое количество работ посвящено укреплению дентина с помощью экстрактов флавоноидов.^{104–111} Во всех работах демонстрируется положительное влияние экстрактов, причем, как и в предыдущих случаях, экстракт виноградных косточек проявляет более выраженный эффект, чем экстракт зеленого чая. Сравнение отдельных ингредиентов смесей позволило установить, что за упрочнение дентина ответственны эпигаллокатехин-3-галлат и олигомерные проантоцианидины.¹¹² Для лучших образцов прочность коллагеновых волокон дентина на разрыв увеличилась более чем в два раза, при этом длительность эффекта достигала 12 месяцев. Было проведено тестирование различных природных источников, содержащих проантоцианидины, включая виноградные косточки, зерна какао, клюкву, корицу, сливу. В результате было показано, что к заметному упрочнению коллагеновых волокон дентина приводит обработка только первыми двумя экстрактами, причем эффективность экстракта виноградных косточек почти в три раза выше, чем экстракта зерен какао.¹¹³ Сравнение с другими сшивающими реагентами показало, что активность экстракта виноградных косточек по отношению к коллагену практически не уступает глутаровому диальдегиду и генипину.¹¹⁴ Высокая эффективность данного экстракта может быть объяснена наличием в нем олигомерных проантоцианидинов, которые образуют мостики между отдельными фибриллами коллагена, в то время как глутаровый диальдегид может сшивать только отдельные полимерные цепи внутри фибриллы.¹¹⁵ Кроме того, экстракт виноградных косточек положительно влияет на структуру протеогликанов, входящих в состав дентина. Поэтому он рассматривается как перспективный реагент для пломбирования зубной ткани. Однако существенным ограничением для использования экстрактов флавоноидов в стоматологии является их яркая окраска.¹¹⁶

Значимыми объектами исследования для пищевой технологии являются продукты взаимодействия флавоноидов с молочным казеином, так как они определяют

вкус и реологические свойства многих пищевых композиций. Так, анализ данных флуориметрии и колориметрии комплексов казеина с экстрактом зеленого чая показал, что основной вклад в их образование вносят гидрофобные взаимодействия между богатыми пролином участками казеина и ароматическими циклами молекул флавоноидов.¹¹⁷ Подробное исследование взаимодействия индивидуального флавоноида чая – эпигаллокатехин-3-галлата – с казеином выявило значительное уменьшение размеров казеиновых мицелл и общее сжатие молекулы белка под действием гидрофобных сил.¹¹⁸ Это свойство недавно было использовано для получения микрогелей с диаметром около 100 нм путем взаимодействия экстракта зеленого чая с желатин-декстрановыми конъюгатами.¹¹⁹

Индивидуальные флавоноиды и их смеси с определенным соотношением ингредиентов также широко используются для стабилизации биополимеров. Использование очищенных экстрактов или синтетических флавоноидов позволяет решить проблему стандартизации подобных реагентов и избежать опасности негативных эффектов минорных компонентов. Недавно было проведено исследование по влиянию размеров и конформации молекул различных полифенолов на механические свойства и биоразлагаемость коллагеновых волокон.¹²⁰ Результатом этой работы стал вывод о том, что наибольшей эффективностью обладают молекулы с размерами 1.5–2 нм, в то время как молекулы с размерами меньше 1.2 нм не проявляют заметной активности. Этому диапазону идеально соответствуют тримерные проантоцианидины (рис. 2).

Предполагалось, что это связано с размерами промежутков между микрофибриллами отдельных коллагеновых нитей, так как встраивание между микрофибриллами вносит основной вклад в упрочнение структуры коллагена.¹¹² Этот вывод косвенно подтверждается тем, что олигомеры проантоцианидинов с большой молекулярной массой также оказались малоэффективны для сшивки коллагеновых волокон. В этом случае их размеры уже значительно превосходили промежутки между микрофибриллами.¹¹² Механизм связывания основан на гидрофобных взаимодействиях полифенолов с участками цепи, богатыми пролином, и образованием водородных связей между гидроксильными группами флавоноидов и карбоксильными группами белка.¹²¹ Таким образом, выделение фракции с определенной молекулярной массой помогает увеличить способность проантоцианидинов к укреплению коллагеновых волокон.¹²² Стандартизированные экстракты и индивидуальные флавоноиды тестируются в качестве средств для укрепления дентина зубов и подготовки поверхностей при пломбировании.^{123–127}

Олигомерные проантоцианидины рассматриваются как перспективные реагенты при изготовлении имплантатов и матриц для пролиферации клеток в трансплантологии.¹²⁸ Важной стадией, определяющей механические свойства и стабильность при изготовлении этих изделий, является ковалентная или нековалентная сшивка тканей, выделенных из животного сырья.¹²⁹

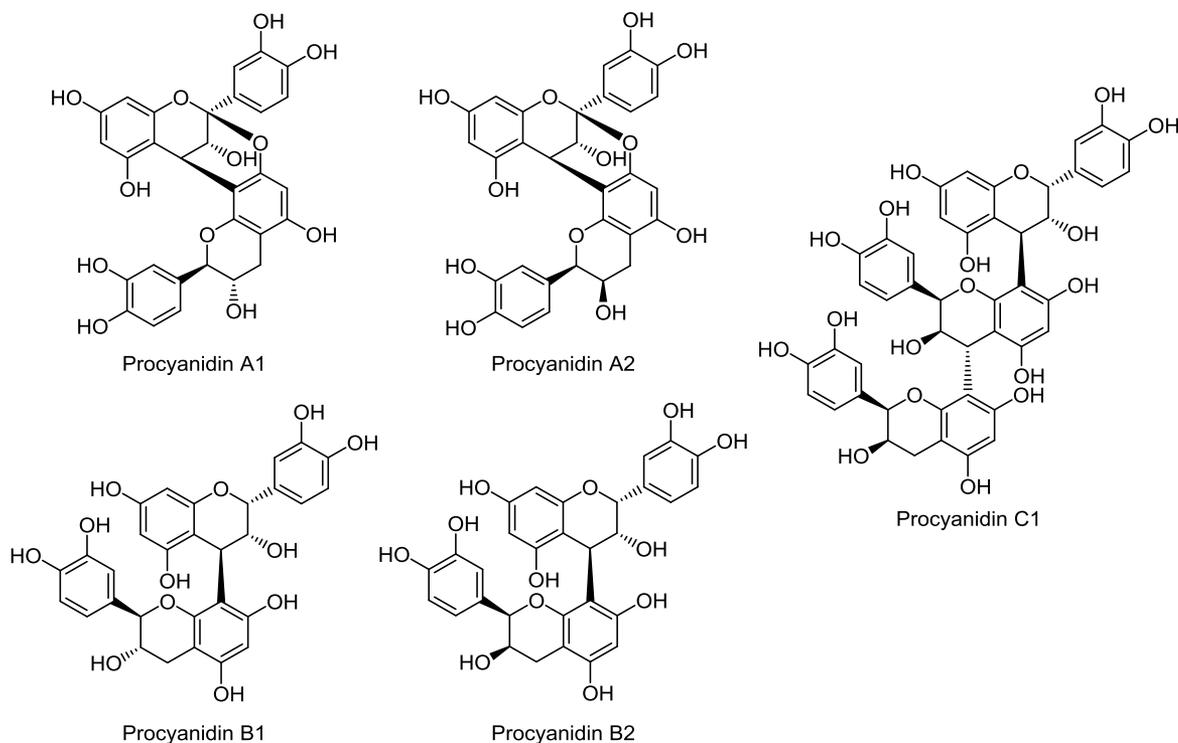


Рисунок 2. Проантоцианидины экстракта виноградных косточек.

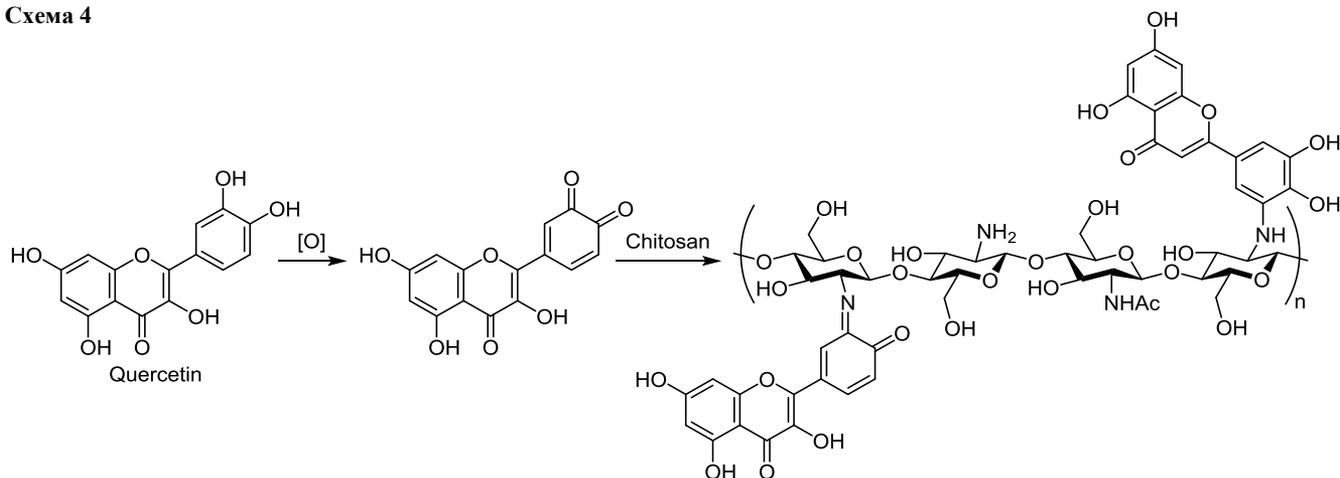
Природные флавоноиды как сшивающие реагенты имеют значительное превосходство над синтетическими, так как они обладают меньшей токсичностью (в 120 раз по сравнению с глутаровым диальдегидом),¹³⁰ а также препятствуют кальцинозу тканей после введения имплантата.¹³¹ Так, олигомерные проантоцианидины с успехом применялись для уплотнения структуры сердечных клапанов, полученных из тканей животных.^{131,132} Подчеркивается, что имплантаты, обработанные этими реагентами, хорошо сохраняют свою форму и не набухают в водной среде.¹³³ Особенно важное значение имеет антикальцинозное действие проантоцианидинов, которое может быть объяснено тем, что они хорошо связываются со всеми пролинсодержащими белками, включая эластин.^{134,135} В то же время большинство синтетических сшивающих реагентов не реагирует с эластином из-за низкого содержания свободных аминогрупп. Это приводит к тому, что структура эластина не укрепляется, и он остается подвержен кальцинозу после имплантации. Способность проантоцианидинов укреплять структуру эластина была использована для обработки препаратов аорты. В этом случае удалось увеличить пористость материала (до 75%) и размеры пор (10–300 мкм), что способствовало закреплению и пролиферации клеток на этом имплантате.¹³⁶ Недавно было показано, что проантоцианидины и, с меньшей эффективностью, эпигаллокатехин-3-галлат могут использоваться для повышения резистентности хрящевых трансплантатов к действию коллагеназы.¹³⁷ Следует отметить, что природные флавоноиды дополнительно стабилизируют структуру тканей благодаря своей антиокислительной

активности.¹³⁸ Кроме того, они обладают способностью защищать имплантаты от негативного воздействия УФ излучения.¹³⁹ Кверцетин, еще один популярный флавоноид, также использовался при изготовлении сердечных клапанов из тканей свиньи. Было показано, что обработанные кверцетином образцы имели лучшие механические свойства, чем сшитые с помощью глутарового диальдегида. Они обладали высокой устойчивостью к денатурации и длительным сроком хранения (до 30 дней). В опытах *in vitro* была продемонстрирована высокая устойчивость полученных имплантатов к кальцинозу.¹⁴⁰ Однако кверцетин обладает меньшей способностью стабилизировать структуру фибриллярных белков по сравнению с проантоцианидинами.¹⁴¹

Пористые матрицы на основе смеси коллагена и хитозана были получены обработкой большим количеством проантоцианидинов (до 30% по массе) с последующей лиофильной сушкой.¹⁴² Последующие исследования *in vitro* показали пригодность подобных структур для пролиферации клеток человеческого эндотелия. Желатиновые матрицы, содержащие 5% проантоцианидинов, тестировались в качестве матриц для регенерации нервной ткани *in vitro* и *in vivo*.¹⁴³ Интересной особенностью матриц, сформированных из ткани сердечного клапана свиньи и сшитых проантоцианидинами, является способность подавлять опухолевый ангиогенез. Авторы связывают этот эффект с формированием нековалентных сшивок флавоноидов с эластином и коллагеном.¹⁴⁴

Еще одним объектом, механические свойства которого могут быть улучшены с помощью флавоноидов, являются пленки на основе полисахаридов.

Схема 4



Ковалентное присоединение кверцетина к полимерной цепи хитозана

Полифенольные соединения связываются с полисахаридами, содержащими аминогруппу или гидрофобные заместители в боковой цепи. Примером могут служить пленки, разработанные для защиты каротинсодержащих продуктов от воздействия окружающей среды.¹⁴⁵ В этом случае пленку, полученную высушиванием водного раствора метилцеллюлозы, обрабатывали раствором эпигаллокатехин-3-галлата. Это привело к значительному снижению растворимости пленки в воде с одновременным увеличением прочности на разрыв почти в два с половиной раза. Введение катехина позволило увеличить гидрофобность полученных пленок и их устойчивость к солнечной радиации. Схожий метод использовался для получения пленок на основе таких полисахаридов, как хитозан и агар-агар.^{146–149} Устойчивые пленки были получены также на основе смеси хитозана и желатина, обработанной проантоцианидинами.^{150,151} При этом флавоноиды добавлялись не только как сшивающие реагенты, повышающие прочность пленок, но и как антиоксиданты.^{152,153} Проантоцианидины в концентрации 5% использовались для улучшения механических свойств волокнистых материалов, полученных методом электроспиннинга. Авторы другой работы отмечают, что использование проантоцианидинов оказалось эффективнее, чем генипина и глутарового диальдегида, так как при большей прочности эти материалы сохраняют волокнистую структуру и обладают высокой устойчивостью к ферментативному разложению.¹⁵⁴

Эффективность нековалентной сшивки полисахаридов может быть значительно усилена путем иммобилизации флавоноидов на полимерной цепи с помощью окислительных реакций. Так, обработка хитозановой пленки водным раствором кверцетина в присутствии оксидоредуктазы из гриба *Trametes versicolor* при pH 6.5 привела к образованию ковалентной связи между аминогруппой хитозана и ароматическим циклом кверцетина (схема 4).¹⁵⁵ Этот процесс включает окисление фенольного фрагмента кверцетина и дальнейшее взаимодействие образовавшегося хинона с аминогруппой по механизму реакции Михаэля. Второй менее

предпочтительный путь реакции заключается в образовании основания Шиффа между хиноном и аминогруппой хитозана. Подобным же образом проводилась иммобилизация катехинов зеленого чая на хитозане с помощью фермента тирозиназы.¹⁵⁶ Введение фрагментов флавоноидов в структуру хитозана позволяет изменить реологические свойства его растворов, например значительно повысить их вязкость. Благодаря своей способности к спонтанному гелеобразованию и низкой токсичности подобные производные предлагались в качестве загустителей и эмульгаторов в пищевой промышленности.¹⁵⁷

Введение флавоноидов позволяет усилить взаимодействие модифицированного хитозана с белками, что используется для изготовления смешанных пленок, обладающих хорошими механическими свойствами.¹⁵⁸ Такие пленки предлагаются в качестве биосовместимых упаковочных материалов для пищевых продуктов, так как они способствуют продлению сроков хранения и защищают от окисления под действием УФ облучения и кислорода воздуха. Интересной особенностью подобных пленок является их яркая окраска, которая зависит от типа флавоноида, например эпикатехин придает оранжевую окраску, а кверцетин – желтую. Эти окраски очень стабильны, благодаря ковалентной связи с полимером, поэтому они могут быть использованы для окрашивания пищевых пленок или нанесения рисунков.¹⁵⁷

В целом природные флавоноиды продемонстрировали высокую эффективность в качестве нековалентных сшивающих агентов для биополимеров, таких как белки и полисахариды. Во многих случаях механические свойства обработанных ими материалов сравнимы со свойствами ковалентно сшитых полимеров. В то же время флавоноиды придают дополнительные свойства, такие как защита от УФ излучения и окисления, антикальцинозные свойства, специфическое окрашивание. Кроме того, они не изменяют химический состав материала и обладают низкой токсичностью. Поэтому природные флавоноиды могут рассматриваться как достойная альтернатива химическим реагентам при модифицировании биополимеров в биоинженерии.

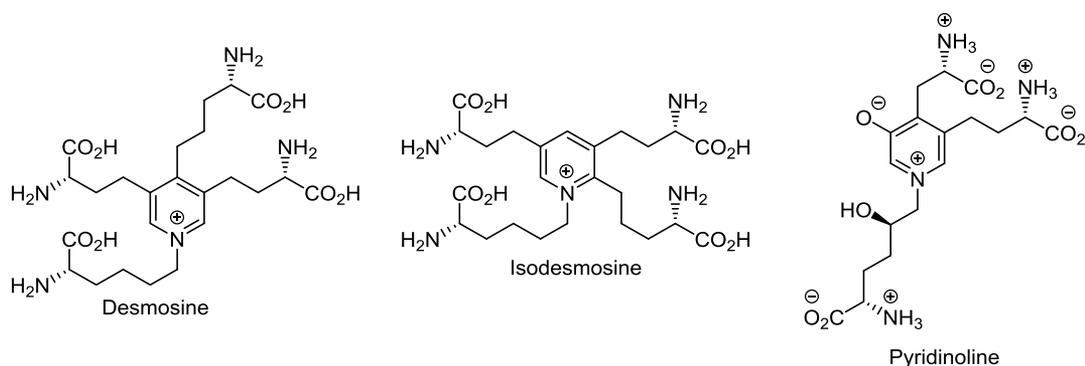


Рисунок 3. Гетероциклические аминокислоты, выделенные из соединительной ткани.

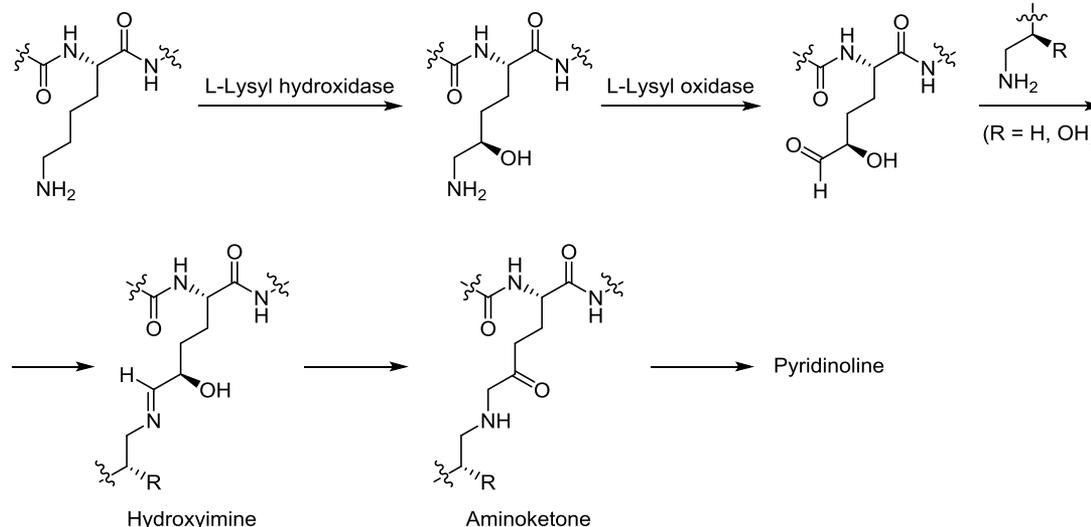
Образование гетероциклов в результате ферментативной и окислительной сшивки биополимеров

Особую группу сшивающих реагентов составляют гетероциклические соединения, образующиеся в результате ферментативного окисления боковых групп белков. Первыми из целого ряда подобных соединений в 1963 г. были открыты десмозин и изодесмозин, которые придают белку эластину его механические свойства (рис. 3).^{159,160} Десмозин также образуется при ферментативной олигомеризации некоторых глобулярных белков.¹⁶¹ Еще одной хорошо изученной группой природных сшивающих агентов являются пиридинолины, образующиеся в волокнах коллагена в процессе роста и укрепления соединительной ткани. Впервые они были выделены из бычьих сухожилий в 1977 г. и с тех пор обнаружены во многих тканях живых организмов, включая кожу, суставные хрящи, межпозвоночные диски, синовиальные оболочки и связки.¹⁶² Сшивка коллагеновых волокон с помощью пиридинолинов имеет динамический характер, ее плотность может изменяться в большую или меньшую стороны в

зависимости от возраста ткани, физиологического и механического стресса, а также других факторов.¹⁶³ Относительно недавно из суставных хрящей животных были выделены пиррололины,¹⁶⁴ кроме того предполагается наличие и других гетероциклических сшивок, например аргинолина.¹⁶⁵

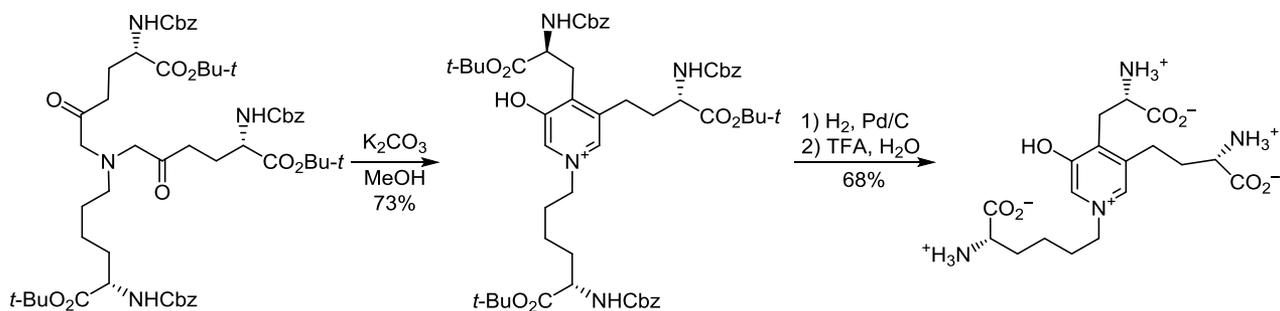
Несмотря на большое разнообразие сшивающих реагентов, механизм их образования носит общий характер и включает последовательность реакций, катализируемых двумя ферментами: L-лизин оксидазой¹⁶⁶ и L-лизин гидроксилазой.¹⁶⁷ Эти ферменты окисляют боковые группы лизина, запуская длинную цепочку превращений. Первой стадией этого процесса является образование альдегидов, которые затем вступают в реакции с боковыми группами белков, формируя сшивки. Во многих случаях точный механизм формирования гетероциклов в результате сшивки до сих пор не известен. Предполагается, что последовательность стадий в этом синтезе пиридинолинов напоминает механизм получения дигидропиридинов по Ганчу (схема 5).¹⁶⁸ Установлено, что ключевым соединением, участвующем в построении всех типов гетероциклов, является аминокетон, образующийся при

Схема 5



Общий механизм формирования сшивок в фибриллярных белках.

Схема 6



Химический синтез пиридинолинов

реакции гидроксильного остатка лизина с аминогруппой другого остатка молекулы лизина или гидроксильного остатка лизина.¹⁶⁹ Затем аминокетон димеризуется с отщеплением одной пептидной цепи. Протеканию реакции способствует то обстоятельство, что в структуре эластина области, богатые лизином, образуют домены, перемежающиеся гидрофобными областями, которые богаты пролином. Таким образом, участки микрофибрилл, вовлеченные в процесс сшивки, соприкасаются друг с другом, ускоряя скорость реакции.¹⁷⁰

При разрушении тканей в результате различных заболеваний сшивающие реагенты выделяются в свободном виде и попадают в кровь, где их концентрация может быть определена с помощью хроматографических и флуоресцентных методов.^{171,172} Таким образом гетероциклические аминокислоты (десмозин и пиридинолины) служат биомаркерами различных патологических состояний организма.^{173,174} Данные гетероциклические соединения находятся в тканях организма в следовых количествах, поэтому их выделение методом экстракции не имеет практической ценности.¹⁷⁵ Следовательно, наиболее рациональным подходом к получению этих соединений является химический синтез.

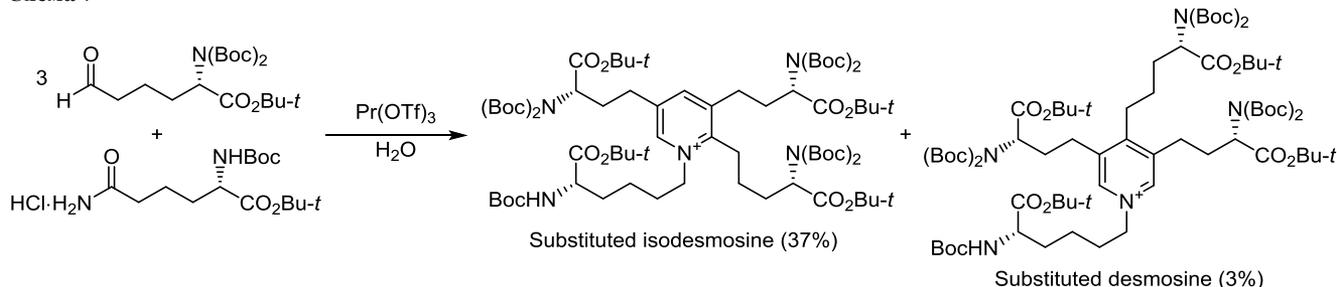
В настоящее время отмечается значительный интерес к синтезу пиридинолинов, что отражается в большом количестве публикаций, посвященных этой теме.¹⁶⁹ Первый и наиболее распространенный на сегодняшний день подход к синтезу этих соединений заключается во внутримолекулярной циклизации Кнёвенагеля третичных аминов, содержащих кетогруппы в положении 2, с последующей окислительной ароматизацией. Пример

построения пиридинового цикла по этому пути приведен на схеме 6. Этот синтез в общих чертах напоминает природный механизм образования гетероциклических сшивок в коллагене.¹⁷⁶ Альтернативный подход базируется на использовании витамина В6 в качестве исходного соединения.¹⁷⁷ Эти синтезы проходят в 3-4 стадии и отличаются достаточно высокими выходами (до 40%). Наиболее сложной проблемой при получении пиридинолинов является селективное образование энантимерно чистых продуктов.¹⁶⁹

Полный синтез десмозина предложен лишь относительно недавно, его ключевой стадией является региоселективное кросс-сочетание Соногаширы. Синтез начинается с относительного простого соединения 4-гидрокси-пиридина и включает 13 стадий с общим выходом 11%.¹⁷⁸ Более эффективный метод синтеза изодесмозина и десмозина базируется на реакции Чичибабина, катализируемой трифлатами лантаноидов (схема 7).¹⁷⁹

Этот синтез уникален тем, что протекает в одну стадию в водных растворах при комнатной температуре, причем выход достигает 40% при тщательной оптимизации условий реакции. Он повторяет процесс, реализуемый в тканях при сшивке эластина с образованием десмозина и изодесмозина. Следует отметить, что исходный альдегид получен из коммерчески доступного производного глутаминовой кислоты в восемь стадий, что несколько снижает возможность практического применения данного синтеза.¹⁷⁹ В то же время использование более доступных альдегидов в этой реакции позволит получить широкий ряд аналогов десмозина, которые могут быть использованы как сшивающие реагенты.

Схема 7



Химический синтез изодесмозина и десмозина

В последнее время растет интерес к применению аналогов десмозина в качестве реагентов для сшивки белков и полисахаридов. Это позволяет получать разветвленные структуры, обладающие целым рядом полезных свойств, например повышенной эластичностью.¹⁸⁰ Так, синтетические аналоги десмозина были использованы для получения устойчивых гелей производных гиалуроновой кислоты, содержащей тиогруппы. В данном случае сшивка цепей этого полусинтетического полисахарида проходила в результате алкилирования по атому серы. В результате были получены гели, не уступающие по своим свойствам природным аналогам и способные нести положительный заряд.¹⁸¹

Еще один подход, позволяющий копировать природные механизмы сшивки с образованием гетероциклов, заключается в использовании 2-гидроксиальдегидов.¹⁸² Как было показано выше, реакция 2-гидроксиальдегидов с боковыми группами лизина запускает процесс формирования гетероциклических сшивок. Поэтому при смешении их с белками могут самопроизвольно формироваться гетероциклы, связанные с боковыми группами аминокислот. Так, при инкубации рибонуклеазы в растворе 2-гидроксигептанола в результате реакции с лизином образовывались производные гидроксипиридина, которые использовались в качестве флуоресцентной метки. Схожий механизм приводил к формированию сшивок между полимерными цепями этого фермента.¹⁸²

Таким образом, сшивающие реагенты, образующиеся при ферментативном окислении структурных белков, могут рассматриваться в качестве прообраза для синтеза целого ряда аналогов и дизайна структурно схожих веществ. Эти соединения, в свою очередь, представляют значительный интерес для проведения сшивки биополимеров благодаря своей биосовместимости, хорошей растворимости в воде и разветвленной структуре. Аналоги десмозина и пиридинолина уже в настоящее время используются для получения гелей, обладающих уникальными свойствами, и в будущем мы ожидаем дальнейшего развития этой тенденции.

Природные гетероциклические соединения нашли широкое применение в качестве реагентов для сшивки белков и полисахаридов. Это можно объяснить уникальной биосовместимостью этих соединений, позволяющей получать различные материалы для использования в медицинской практике. Многочисленные исследования *in vivo* показали, что природные гетероциклы обладают в сотни раз меньшей токсичностью, по сравнению с традиционными сшивающими реагентами, такими как глутаровый диальдегид. Кроме того, реакции этих соединений с биополимерами также приводят к нетоксичным и биосовместимым производным. В то же время механические свойства полученных материалов не отличаются от аналогов на основе химических сшивающих реагентов. Подобные преимущества открывают огромные возможности для прямого введения природных гетероциклов в ткани организма и изготовления имплантатов.

В настоящее время используются три основные группы природных сшивающих реагентов. Для ковалентной сшивки биополимеров, содержащих первичные аминогруппы, таких как хитозан и коллаген, широкое применение нашел генипин. Нековалентная сшивка различных по строению биополимеров, содержащих гидрофобные домены, с успехом осуществляется с помощью флавоноидов, выделенных из природного сырья. Перспективной группой сшивающих реагентов являются аналоги десмозина и пиридинолина, гетероциклических аминокислот, ответственных за уникальные механические свойства фибриллярных белков.

Следует отметить, что каждый представитель природных гетероциклов обладает уникальным набором свойств, которые можно применить в биоинженерии и направленной доставке лекарственных веществ. Так, генипин позволяет проводить тонкое регулирование плотности сшивки, а также идентификацию полученных материалов с помощью флуориметрии и колориметрии. Флавоноиды защищают ткани от УФ излучения и окисления и, кроме того, препятствуют развитию кальциноза в имплантатах. Нековалентная сшивка с помощью этих соединений не изменяет химической структуры биополимеров, что имеет большое значение для применения их в имплантологии. Аналоги десмозина и пиридинолина открывают возможности для синтеза разветвленных сшивок, обеспечивающих высокую эластичность конечных продуктов. Таким образом, существует богатый выбор гетероциклических сшивающих реагентов, позволяющих решать самые сложные практические задачи.

Применение природных гетероциклов в качестве сшивающих реагентов сдерживается доступностью этих соединений. Так, генипин выделяется из достаточно экзотической культуры, которая культивируется в ограниченном числе стран. Флавоноиды, несмотря на широкое распространение в природе, обычно доступны в виде сложных смесей многих соединений. Поэтому выделение и оценка активности индивидуальных компонентов представляет собой нетривиальную задачу. Аминокислоты, образующиеся при ферментативном окислении фибриллярных белков, могут быть выделены из природных источников только в следовых количествах, что также ограничивает их практическое применение. Таким образом, развитие этой новой области использования гетероциклов будет определяться прогрессом в химических и биотехнологических методах их получения. В последние годы были предложены новые подходы к синтезу десмозина и пиридинолина, а также выделению генипина и флавоноидов. Полученные продукты становятся доступными из коммерческих источников. Все это обеспечивает стабильный рост популярности гетероциклических соединений как сшивающих реагентов для биополимеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке министерства образования и науки Российской Федерации (государственное задание 4.1626.2014/К).

Список литературы

- Reddy, N.; Reddy, R.; Jiang, Q. *Trends Biotechnol.* **2015**, 33, 362.
- Reddy, N.; Yang, Y. *Trends Biotechnol.* **2011**, 29, 490.
- Santos, E.; Hernández, R. M.; Pedraz, J. L.; Orive, G. *Trends Biotechnol.* **2012**, 30, 331.
- Пономарева, О. А.; Федорченко, К. Ю.; Филимонов, И. С.; Легонькова, О. А.; Королева, О. В. *Все материалы. Энциклопедический справочник* **2014**, (9), 18.
- Vincken, J.-P.; Schols, H. A.; Oomen, R. J. F. J.; McCann, M. C.; Ulvskov, P.; Voragen, A. G. J.; Visser, R. G. F. *Plant Physiol.* **2003**, 132, 1781.
- Mitra, T.; Sailakshmi, G.; Gnanamani, A.; Mandal, A. B. *Thermochim. Acta* **2011**, 525, 50.
- Meng, L.; Arnoult, O.; Smith, M.; Wnek, G. E. *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 19412.
- Lu, W.; Sun, J.; Jiang, X. *J. Mater. Chem. B* **2014**, 24, 2369.
- Shi, L.; Le Visage, C.; Chew, S. Y. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **2011**, 22, 1459.
- Oh, J. K.; Lee, D. I.; Park, J. M. *Prog. Polym. Sci.* **2009**, 34, 1261.
- Pichayakorn, W.; Boonme, P. *Mater. Sci. Eng., C* **2013**, 33, 1197.
- Lee, B. K.; Yun, Y. H.; Park, K. *Chem. Eng. Sci.* **2015**, 125, 158.
- Serban, M. A.; Knight, T.; Payne, R. G.; Basu, J.; Rivera, E. A.; Robbins, N.; McCoy, D.; Halberstadt, C.; Jain, D.; Bertram, T. A. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2014**, 61, 75.
- Joddar, B.; Hoshiba, T.; Chen, G.; Ito, Y. *Biomater. Sci.* **2014**, 2, 1595.
- Ma, L.; Gao, C.; Mao, Z.; Zhou, J.; Shen, J. *Biomaterials* **2004**, 25, 2997.
- Gorver, C. N.; Cameron, R. E.; Best, S. M. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2012**, 10, 62.
- Martinez, A. W.; Caves, J. M.; Ravi, S.; Li, W.; Chaikof, E. L. *Acta Biomater.* **2014**, 10, 26.
- Djerassi, C.; Gray, J. D.; Kincl, F. A. *J. Org. Chem.* **1960**, 25, 2174.
- Fujikawa, S.; Yokota, T.; Koga, K.; Kumada, J. *Biotechnol. Lett.* **1987**, 9, 697.
- Cao, J. P.; Wang, Y. L.; Jia, Y. J.; Jiang, M. N. *J. Dalian Med. Univ.* **2001**, 23, 61.
- Xu, M.; Sun, Q.; Su, J.; Wang, J.; Xu, C.; Zhang, T. *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, 42, 440.
- Manickam, B.; Sreedharan, R.; Elumalai, M. *Curr. Drug Delivery* **2014**, 11, 139.
- Muzzarelli, R. A. A. *Carbohydr. Polym.* **2009**, 77, 1.
- Koo, H.-J.; Song, Y. S.; Kim, H.-J.; Lee, Y.-H.; Hong, S.-M.; Kim, S.-J.; Kim, B.-C.; Jin, C.; Lim, C.-J.; Park, E.-H. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, 495, 201.
- Zhang, C. Y.; Parton, L. E.; Ye, C. P.; Krauss, S.; Shen, R.; Lin, C. T.; Porco, J. A.; Lowell, B. B. *Cell Metab.* **2006**, 3, 417.
- Sung, H. W.; Huang, R. N.; Huang, L. L. H.; Tsai, C. C. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **1999**, 10, 63.
- Lai, J.-Y. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13, 10970.
- Touyama, R.; Inoue, K.; Takeda, Y.; Yatsuzuka, M.; Ikumoto, T.; Moritome, N.; Shingu, T.; Yokoi, T.; Inouye, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42, 1571.
- Wanga, S. S. S.; Hsieh, P.-L.; Chen, P.-S.; Chen, Y.-T.; Jan, J.-S. *Colloids Surf., B* **2013**, 111, 423.
- Delmar, K.; Bianco-Peled, H. *Carbohydr. Polym.* **2015**, 127, 28.
- Butler, M. F.; Ng, Y.-F.; Pudney, P. D. A. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2003**, 41, 3941.
- Sung, H. W.; Chang, Y.; Liang, I. L.; Chang, W. H.; Chen, Y. C. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, 52, 77.
- Mi, F. L.; Sung, H.; Shyu, S. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2000**, 38, 2804.
- Mi, F. L.; Shyu, S. S.; Peng, C. K. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2005**, 43, 1985.
- Meena, R.; Prasad, K.; Siddhanta, A. K. *Food Hydrocolloids* **2009**, 23(2), 497.
- Hezaveh, H.; Muhamad, I. I. *Chem. Eng. Res. Des.* **2012**, 91, 508.
- Arteche Pujana, M.; Pérez-Álvarez, L.; Cesteros Iturbe, L. C.; Katime, I. *Carbohydr. Polym.* **2014**, 101, 113.
- Almog, J.; Cohen, Y.; Azoury, M.; Hahn, T. R. *J. Forensic Sci.* **2004**, 49, 255.
- Levinton-Shamulov, G.; Cohen, Y.; Azoury, M.; Chaikovsky, A.; Almog, J. *J. Forensic Sci.* **2005**, 50(6), 1367.
- Mi, F. L.; Sung, H. W.; Shyu, S. S.; Su, C. C.; Peng, C. K. *Polymer* **2003**, 44, 6521.
- Chen, S. C.; Wu, Y. C.; Mi, F. L.; Lin, Y. H.; Yu, L. C.; Sung, H. W. *J. Controlled Release* **2004**, 96, 285.
- Moura, M. J.; Figueiredo, M. M.; Gil, M. H. *Biomacromolecules* **2007**, 8(12), 3823.
- Klein, M. P.; Hackenhaar, C. R.; Lorenzoni, A. S. G.; Rodrigues, R. C.; Costa, T. M. H.; Ninow, J. L.; Hertz, P. F. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 137, 184.
- Chen, H.; Ouyang, W.; Martoni, C.; Afkhami, F.; Lawuyi, B.; Lim, T.; Prakash, S. *Int. J. Polym. Sci.* **2010**, ID 985137, DOI: 10.1155/2010/985137.
- Thakur, G.; Mitra, A.; Rousseau, D.; Basak, A.; Sarkar, S.; Pal, K. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2011**, 22, 115.
- Song, F.; Zhang, L. M.; Yang, C.; Yan, L. *Int. J. Pharm.* **2009**, 373, 41.
- Mi, F. L.; Sung, H. W.; Shyu, S. S. *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, 81, 1700.
- Choubey, J.; Bajpai, A. K. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2010**, 21, 1573.
- Kamiński, K.; Zazakowny, K.; Szczubiałka, K.; Nowakowska, M. *Biomacromolecules* **2008**, 9, 3127.
- Imsombut, T.; Srisuwan, Y.; Srihanam, P.; Baimark, Y. *Powder Technol.* **2010**, 203, 603.
- Kaeadkar, J.; Chauhan, M. K. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, 81, 563.
- Yin, R.; Wang, K.; Du, S.; Chen, L.; Nie, J.; Zhang, W. *Carbohydr. Polym.* **2014**, 103, 369.
- Hu, B.; Zhang, L.; Liang, R.; Chen, F.; He, L.; Hu, B.; Zeng, X. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63(7), 2033.
- Mallick, S. P.; Sagiri, S. S.; Singh, V. K.; Behera, B.; Thirugnanam, A.; Pradhan, D. K.; Bhattacharya, M. K.; Pal, K. *AAPS PharmSciTech* **2015**, 16(6), 1254.
- Nogueira Silva, N. F.; Saint-Jalmes, A.; de Carvalho, A. F.; Gaucheron, F. *Langmuir* **2014**, 30, 10167.
- Nath, S. D.; Abueva, C.; Kim, B.; Lee, B. T. *Carbohydr. Polym.* **2015**, 115, 160.
- Moura, M. J.; Martins, S. P.; Duarte, B. P. M. *Biochem. Eng. J.* **2015**, 104, 82.
- Arteche Pujana, M.; Pérez-Álvarez, L.; Cesteros Iturbe, L. C.; Katime, I. *Carbohydr. Polym.* **2013**, 94, 836.
- Barek, K.; Butler, M. F. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, 98, 1581.
- Elzoghby, A. O.; Samy, W. M.; Elgindy, N. A. *Pharm. Res.* **2013**, 30, 512.
- Liu, B. S.; Yao, C. H.; Fang, S. S. *Macromol. Biosci.* **2008**, 8, 432.
- Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S.; Roveri, N.; Rubini, K. *Biomaterials* **2002**, 23, 4827.
- Chiono, V.; Pulieri, E.; Vozi, G.; Ciardelli, G.; Ahluwalia, A.; Giusti, P. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2008**, 19, 889.
- Mekhail, M.; Jahan, K.; Tabrizian, M. *Carbohydr. Polym.* **2014**, 108, 91.
- You, R.; Xu, Y.; Liu, G.; Liu, Y.; Li, X.; Li, M. *Polym. Degrad. Stab.* **2014**, 109, 226.

66. Abbasi, A.; Eslamian, M.; Heyd, H.; Rousseau, D. *Pharm. Dev. Technol.* **2008**, 13, 549.
67. Hezaveh, H.; Muhammad, I. I.; Noshadi, I.; Shu, F. L.; Ngadi, N. *J. Microencapsul.* **2012**, 29, 368.
68. Almeida, J. F.; Fonseca, A.; Batista, C. M. S. G.; Leite, E.; Gil, M. H. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2007**, 18, 2309.
69. Mi, F.-L.; Tan, Y.-C.; Liang, H.-C.; Huang, R.-N.; Sung, H.-W. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **2001**, 12(8), 835.
70. Xu, J.; Strandman, S.; Zhu, J. X. X.; Barralet, J.; Cerruti, M. *Biomaterials* **2015**, 37, 395.
71. Mekhail, M.; Wong, K. K. H.; Padavan, D. T.; Wu, Y.; O'Gorman, D. B.; Wan, W. *J. Biomater. Sci.* **2011**, 22, 2241.
72. Xu, B.; Chow, M.-J.; Zhang, Y. *Int. J. Biomater.* **2011**, ID 172389, DOI: 10.1155/2011/172389.
73. Chang, C. J. *Biomed. Mater. Res., Part A* **2009**, 91A, 586.
74. Li, Q.; Wang, X.; Lou, X.; Yuan, H.; Tu, H.; Li, B.; Zhang, Y. *Carbohydr. Polym.* **2015**, 130, 166.
75. Mirzaei, E.; Faridi-Majidi, R.; Shokrgozar, M. A.; Paskiabi, F. A. *Nanomed. J.* **2014**, 1, 137.
76. Cui, L.; Jia, J.; Guo, Y.; Liu, Y.; Zhu, P. *Carbohydr. Polym.* **2014**, 99, 31.
77. Siddiqui, N.; Pramanik, K.; Jabbari, E. *Mater. Sci. Eng., C* **2015**, 54, 76.
78. Gorczyca, G.; Tylingo, R.; Szweda, P.; Augustin, E.; Sadowska, M.; Milewski, S. *Carbohydr. Polym.* **2014**, 102, 901.
79. Mwale, F.; Iordanova, M.; Demers, C. N.; Steffen, T.; Roughley, P.; Antoniou, J. *Tissue Eng.* **2005**, 11, 130.
80. Roughley, P.; Hoemann, C.; DesRosiers, E.; Mwale, F.; Antoniou, J.; Alini, M. *Biomaterials* **2006**, 27, 388.
81. Silva, S. S.; Motta, A.; Rodrigues, M. T.; Pinheiro, A. F. M.; Gomes, M. E.; Mano, J. F.; Reis, R. L.; Migliaresi, C. *Biomacromolecules* **2008**, 9, 2764.
82. Chen, Y.-S.; Chang, J.-Y.; Cheng, C.-Y.; Tsai, F.-J.; Yao, C.-H.; Liu, B.-S. *Biomaterials* **2005**, 26, 3911.
83. Jiang, T.; Ren, X. J.; Tang, J. L.; Yin, H.; Wang, K. J.; Zhou, C. L. *Mater. Sci. Eng., C* **2013**, 33, 3514.
84. Liang, H. C.; Chang, Y.; Hsu, C. K.; Lee, M. H.; Sung, H. W. *Biomaterials* **2004**, 25, 3541.
85. Sung, H.-W.; Chang, Y.; Chiu, C.-T.; Chen, C.-N.; Liang, H.-C. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, 47, 116.
86. Sung, H.-W.; Liang, I.-L.; Chen, C.-N.; Huang, R.-N.; Liang, H.-F. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 55, 538.
87. Parker, A. C.; Jennings, J. A.; Bumgardner, J. D.; Courtney, H. S.; Lindner, E.; Haggard, W. O. *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **2013**, 101B, 110.
88. Mi, F.-L.; Tan, Y.-C.; Liang, H.-F.; Sung, H.-W. *Biomaterials* **2002**, 23, 181.
89. Nagaoka, H.; Nagaoka, H.; Walter, R.; Boushell, L. W.; Miguez, P. A.; Burton, A.; Ritter, A. V.; Yamauchi, M. *BioMed. Res. Int.* **2014**, ID 702821, DOI: 10.1155/2014/702821.
90. Bedran-Russo, A. K.; Pereira, P. N.; Duarte, W. R.; Drummond, J. L.; Yamauchi, M. *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **2007**, 80B, 268.
91. Wang, M.; Corpuz, C. C. C. *BMC Ophthalmol.* **2015**, 15, 89.
92. McGann, M. E.; Bonitsky, C. M.; Jackson, M. L.; Ovaert, T. C.; Trippel, S. B.; Wagner, D. R. *J. Orthop. Res.* **2015**, 33, 1571.
93. Haslam, E. *Phytochem.* **2007**, 68, 2713.
94. Ou, K.; Gu, L. *J. Funct. Foods* **2014**, 7, 43.
95. Ferreira, D. Slade, D. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 517.
96. Afzal, M.; Safer, A. M.; Menon, M. *Inflammopharmacology* **2015**, 23, 151.
97. Dixon, R. A.; Xie, D.-Y.; Sharma, S. B. *New Phytologist* **2005**, 165, 9.
98. Nie, X.; Gong, Y.; Wang, N.; Meng, X. *LWT-Food Sci. Technol.* **2015**, 64, 1042.
99. Sadri, M.; Arab-Sorkhi, S.; Vatani, H.; Bagheri-Pebdeni, A. *Fibers Polym.* **2015**, 16, 1742.
100. Babu, P. V. A.; Sabitha, K. E.; Shyamaladevi, C. S. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46, 280.
101. Chen, R.; Wang, J.-B.; Zhang, X.-Q.; Ren, J.; Zeng, C.-M. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, 507, 343.
102. Babu, P. V. A.; Sabitha, K. E.; Shyamaladevi, C. S. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2006**, 33, 351.
103. Georgiades, P.; Pudney, P. D. A.; Rogers, S.; Thomson, D. J.; Waigh, T. A. *PLoS One* **2014**, 9, e105302. DOI: 10.1371/journal.pone.0105302.
104. Strano Castellan, C.; Nobrega Pereira, P.; Miranda Grande, R. H.; Bedran-Russo, A. K. *Dent. Mater.* **2010**, 26, 968.
105. Seseogullari-Dirihan, R.; Mutluay, M. M.; Vallittu, P.; Pashley, D. H.; Tezvergil-Mutluay, A. *Dent. Mater.* **2015**, 31, 941.
106. Franco Pinto, C.; Bittencourt Berger, S.; Cavalli, V.; Bedran-Russo, A. K.; Giannini, M. *Int. J. Adhes. Adhes.* **2015**, 60, 117.
107. Strano Castellan, C.; Nóbrega Rodrigues Pereira, P.; Viana, G.; Chen, S.-N.; Pauli, G. F.; Bedran-Russo, A. K. *J. Dent. (Oxford, U. K.)* **2010**, 38, 431.
108. Fang, M.; Liu, R.; Xiao, Y.; Li, F.; Wang, D.; Hou, R.; Chen, J. *J. Dent. (Oxford, U. K.)* **2012**, 40, 458.
109. Islam, S.; Hiraishi, N.; Nassar, M.; Yiu, C.; Otsuki, M.; Tagami, J. *J. Dent. (Oxford, U. K.)* **2012**, 40, 1052.
110. Macedo, G. V.; Yamauchi, M.; Bedran-Russo, A. K. *J. Dent. Res.* **2009**, 88, 1096.
111. Liu, Y.; Dusevich, V.; Wang, Y. *J. Dent. Res.* **2014**, 93, 821.
112. Liu, Y.; Bai, X.; Li, S.; Liu, Y.; Keightley, A.; Wang, Y. *Dent. Mater.* **2015**, 31, 814.
113. Strano Castellan, C.; Bedran-Russo, A. K.; Karol, S.; Nóbrega Rodrigues Pereira, P. *J. Mechan. Behav. Biomed. Mater.* **2011**, 4, 1343.
114. Al-Ammar, A.; Drummond, J. L.; Bedran-Russo, A. K. *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **2009**, 91B, 419.
115. Bedran-Russo, A. K. B.; Castellan, C. S.; Shinohara, M. S.; Hassan, L.; Antunes, A. *Acta Biomater.* **2011**, 7, 1735.
116. Ma, S.; Niu, L.; Li, F.; Fang, M.; Zhang, L.; Tay, F. R.; Imazato, S.; Chen, J. *Curr. Oral Health Rep.* **2014**, 1, 213.
117. Yuksel, Z.; Avci, E.; Erdem, Y. K. *Food Chem.* **2010**, 121, 450.
118. Jöbstl, E.; Howse, J. R.; Fairclough, J. P. A.; Williamson, M. P. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 4077.
119. Zhou, H.; Sun, X.; Zhang, L.; Zhang, P.; Li, J.; Liu, Y.-N. *Langmuir* **2012**, 28, 14553.
120. Vidal, C. M. P.; Leme, A. A.; Aguiar, T. R.; Phansalkar, R.; Nam, J.-W.; Bisson, J.; McAlpine, J. B.; Chen, S.-N.; Pauli, G. F.; Bedran-Russo, A. *Langmuir* **2014**, 30, 14887.
121. Hagerman, A. E.; Butler, L. G. *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 4494.
122. Nishad Fathima, N.; Baias, M.; Blumich, B.; Ramasami, T. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, 47, 590.
123. Liu, R.; Fang, M.; Xiao, Y.; Li, F.; Yu, L.; Zhao, S.; Shen, L.; Chen, J. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2011**, 22, 2403.
124. He, L.; Mu, C.; Shi, J.; Zhang, Q.; Shi, B.; Lin, W. *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, 48, 354.
125. Phansalkar, R. S.; Nam, J.-W.; Chen, S.-N.; McAlpine, J. B.; Napolitano, J. G.; Leme, A.; Vidal, C. M. P.; Aguiar, T.; Bedran-Russo, A. K.; Pauli, G. F. *Fitoterapia* **2015**, 101, 169.
126. Liu, Y.; Dusevich, V.; Wang, Y. *J. Dent. Res.* **2013**, 92, 746.
127. Ravikanth Reddy, R.; Phani Kumar, B. V. N.; Shanmugam, G.; Madhan, B.; Mandal, A. B. *J. Phys. Chem. B* **2015**, 119, 14076.

128. Ma, B.; Wang, X.; Wu, C.; Chang, J. *Regener. Biomater.* **2014**, 81.
129. Courtman, D. W.; Errett, B. F.; Wilson, G. J. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 55, 576.
130. Han, B.; Jaurequi, J.; Tang, B. W.; Nimni, M. E. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2003**, 65A, 118.
131. Zhai, W.; Chang, J.; Lü, X.; Wang, Z. *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **2009**, 90B, 913.
132. Schoen, F. J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, 22, 698.
133. Zhai, W.; Chang, J.; Lin K.; Wang, J.; Zhao, Q.; Sun, X. *Biomaterials* **2006**, 27, 3684.
134. Paule, W. J.; Bernick, S.; Strates B.; Nimmi, M. E. *J. Biomed. Mater. Res.* **1992**, 26, 1169.
135. Isenburg, J. C.; Simionescu, D. T.; Vyahavare, N. R. *Biomaterials* **2004**, 25, 3293.
136. Wang, X.; Zhai, W.; Wu, C.; Ma, B.; Zhang, J.; Zhang, H.; Zhu, Z.; Chang, J. *Acta Biomater.* **2015**, 16, 81.
137. Pinheiro, A.; Cooley, A.; Liao, J.; Prabhu, R.; Elder, S. J. *Orthop. Res.* **2016**, 34, 1037.
138. Bagchi, D.; Sen, C. K.; Ray, S. D.; Das, D. K.; Bagchi, M.; Preuss, H. G.; Vinson, J. A. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2003**, 523–524, 87.
139. Fathima, N. N.; Ansari, T.; Rao, J.; R. Nair, B. U. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, 106, 3382.
140. Zhai, W.; Lü, X.; Chang, J.; Zhou, Y.; Zhang, H. *Acta Biomater.* **2010**, 6, 389.
141. Epasinghe, D. J.; Yiu, C. K. Y.; Burrow, M. F.; Tsoi, J. K. H.; Tay, F. R. *J. Dent. (Oxford, U. K.)* **2014**, 42, 1178.
142. Zhang, J.; Deng, A.; Yang, Y.; Gao, L.; Xu, N.; Liu, X.; Hu, L.; Chen, J.; Yang, S. *Mater. Sci. Eng., C* **2015**, 56, 555.
143. Liu, B.-S. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2008**, 87A, 1092.
144. Zhai, W.-Y.; Jia, C.-P.; Zhao, H.; Xu, Y.-S. *Chin. J. Cancer Res.* **2011**, 23, 99.
145. Yu, S.-H.; Tsai, M.-L.; Lin, B.-X.; Lin, C.-W.; Mi, F.-L. *Food Hydrocolloids* **2015**, 44, 491.
146. Wang, L.; Dong, Y.; Men, H.; Tong, J.; Zhou, J. *Food Hydrocolloids* **2013**, 32, 35.
147. Peng, Y.; Wu, Y.; Li, Y. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, 59, 282.
148. Siripatrawan, U.; Noipha, S. *Food Hydrocolloids* **2012**, 27, 102.
149. López de Lacey, A. M.; Giménez, B.; Pérez-Santín, E. R.; Faulks, R.; Mandalari, G.; López-Caballero, M. E. *Food Res. Int.* **2012**, 48, 462.
150. Kim, S.; Nimni, M. E.; Yang, Z.; Han, B. *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **2005**, 75B, 442.
151. Benbettaieb, N.; Karbowiak, T.; Brachais, C.-H.; Debeaufort, F. *Eur. Polym. J.* **2015**, 67, 113.
152. Li, J. H.; Miao, J.; Wu, J. L.; Chen, S. F.; Zhang, Q. Q. *Food Hydrocolloids* **2014**, 37, 166.
153. Helal, A.; Tagliazucchi, D.; Conte, A.; Desobry, S. *Int. Dairy J.* **2012**, 25, 10.
154. Chen, Z.; Wang, L.; Jiang, H. *Biofabrication* **2012**, 4, 035007.
155. Božič, M.; Gorgieva, S.; Kokol, V. *Carbohydr. Polym.* **2012**, 89, 854.
156. Wu, L. Q.; Embree, H. D.; Balgley, B. M.; Smith, P. J.; Payne, G. F. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, 36, 3446.
157. Aljawish, A.; Chevalot, I.; Jasniewski, J.; Scher, J.; Muniglia, L. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, 112, 25.
158. Di Pierro, P.; Chico, B.; Villalonga, R.; Mariniello, L.; Damiao, A. E.; Masi, P.; Porta, R. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 744.
159. Partridge, S.M.; Elsdén, D. F.; Thomas, J. *Nature* **1963**, 197, 1297.
160. Davis, N. R.; Anwar, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 3778.
161. Liu, S. *Int. J. Prec. Eng. Manuf.* **2015**, 16, 2731.
162. Fujimoto, D.; Akiba, K.; Nakamura, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, 76, 1124.
163. Robins, S. P.; Duncan, A. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1987**, 914, 233.
164. Hanson, D. A.; Eyre, D. R. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 26508.
165. Eyre, D. R.; Weis M. A.; Wu, J. J. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 16675.
166. Kagan, H. M.; Li, W. *J. Cell. Biochem.* **2003**, 88, 660.
167. Mercer, D. K.; Nicol, P. F.; Kimbembe, C.; Robins, S. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 307, 803.
168. Robins, S. P. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, 35, 849.
169. Anastasia, L.; Rota, P.; Anastasia, M.; Allevi, P. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 5747.
170. Ahsan, T.; Harwood, F.; McGowan, K. B.; Amiel, D.; Sah, R. L. *Osteoarthritis Cartilage* **2005**, 13, 709.
171. Eyre, D. R.; Weis, M. A.; Wu, J.-J. *Methods* **2008**, 45, 65.
172. Kaga, N.; Soma, S.; Fujimura, T.; Seyama, K.; Fukuchi, Y. *Anal. Biochem.* **2003**, 318, 25.
173. Christenson, R. H. *Clin. Biochem.* **1997**, 30, 573.
174. Saito, M.; Marumo, K. *Osteoporosis Int.* **2010**, 21, 195.
175. Umeda, H.; Aikawa, M.; Libby, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, 411, 281.
176. Allevi, P.; Longo, A.; Anastasia, M. *Chem. Commun.* **1999**, 559.
177. Adamczyk, M.; Akireddy, S. R.; Reddy, R. E. *Tetrahedron* **2000**, 56, 2379.
178. Usuki, T.; Yamada, H.; Hayashi, T.; Yanuma, H.; Koseki, Y.; Suzuki, N.; Masuyama Y.; Lin, Y. Y. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3233.
179. Usuki, T.; Sugimura, T.; Komatsu, A.; Koseki, Y. *Org. Lett.* **2014**, 16, 1672.
180. Wang, Q.; Mynar, J. L.; Yoshida, M.; Lee, E.; Lee, M.; Okuro, K.; Kinbara, K.; Aida, T. *Nature* **2010**, 463, 339.
181. Hagel, V.; Mateescu, M.; Southan, A.; Wegner, S. V.; Nuss, I.; Haraszti, T.; Kleinhans, C.; Schuh, C.; Spatz, J. P.; Kluger, P. J.; Bach, M.; Tussetschläger, S.; Tovar, G. E. M.; Laschat, S.; Boehm, H. *Sci. Rep.* **2013**, 3, 2043.
182. Liu, Z.; Sayre, L. M. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, 16, 232.