

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С.
Ениколопова Российской академии наук

На правах рукописи



Демина Татьяна Сергеевна

**Материалы биомедицинского назначения на
основе механохимически модифицированного
ХИТОЗАНА**

1.4.7. Высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора химических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в лаборатории твердофазных химических реакций Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова Российской академии наук (ИСПМ РАН)

Научный консультант:	Акопова Татьяна Анатольевна , доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории твердофазных химических реакций ИСПМ РАН
Официальные оппоненты:	Варламов Валерий Петрович , доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией инженерии биополимеров
	Дебердеев Рустам Якубович , доктор технических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО КНИТУ), г. Казань, кафедра технологии переработки полимеров и композиционных материалов
	Дятлов Валерий Александрович , доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», г. Москва, профессор кафедры химической технологии пластических масс
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения Российской академии наук (ИХТТМ СО РАН), г. Новосибирск

Защита состоится «18» ноября 2021 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.116.01 (Д 002.085.01) при ИСПМ РАН по адресу: 117393, г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 70.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИСПМ РАН и на сайте института: <https://ispm.ru/>

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат химических наук



А.Н. Солодухин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Разработка биodeградируемых полимерных материалов – одна из сложнейших задач, решаемых методами полимерной химии. Она долгие годы привлекает внимание исследователей, а в последнее время интерес к полимерным материалам, находящимся в контакте с живыми клетками, возрос многократно. К таковым относятся все типы имплантатов, а так же подложки, гели и среды для культивирования клеток. Потенциальная опасность применения для этих целей биоматериалов животного происхождения вызвала в странах ЕС, Японии и США ряд законодательных запретов и, соответственно, интерес к использованию изделий из биосовместимых синтетических полимеров. Однако многолетний опыт применения полимеров в данной области убедительно показал, что для успешного роста клеток и тканей недостаточно одной биоинертности подложки; весьма важными являются химический состав, надмолекулярная структура, физико-химические свойства материалов и качество поверхности. Для отдельных приложений требования усложняются необходимостью введения в состав стимуляторов роста, антибиотиков, морфогенетических белков.

Хитозан – поли(1→4)-β-2-глюкозамин – не является полностью синтетическим полимером. Однако безопасность медицинских изделий на основе этого полимера связана с тем, что природный хитин в процессе деминерализации и депротенирования подвергается весьма жестким воздействиям, а его деацетилирование при получении хитозана существенно меняет основные химические и биологические свойства объекта. К настоящему времени ни у одного из продуктов на основе хитозана, независимо от способа получения, не было зарегистрировано наличие следов вирусных либо прионных инфекций.

Выбор хитозана в качестве основы для биodeградируемых полимерных материалов также связан с наличием у него уникального набора физико-химических свойств, к которым следует отнести расщепление под действием ферментов внутри организма и амфифильность макромолекулы, обуславливающую способность к управляемым гидрофильно-гидрофобным взаимодействиям с мембранными белками. Это позволяет клеткам самых разных типов успешно прикрепляться к поверхности матриксов из хитозана. Значительным достоинством хитозана как глюкозамина – является наличие в структуре основного повторяющегося звена макромолекулы первичной аминогруппы – нуклеофильного центра, удобного для химического

модифицирования, в том числе разнообразными физиологически активными фрагментами.

Химические свойства и биологическая активность хитозана являются необходимыми, но не достаточными факторами для получения функциональных материалов на его основе. Не менее важны механические характеристики материалов и возможность получения изделий традиционными способами с использованием серийного промышленного оборудования. Это остается нерешенной проблемой для большинства неплавких полисахаридных полимеров, включая немодифицированный хитозан. Немодифицированный хитозан не может удовлетворить существующим весьма жестким требованиям, предъявляемым к полимерным матрицам для биомедицины. При решении этих многочисленных материаловедческих задач наиболее перспективным подходом является химическое модифицирование структуры полимера, которое может решить если не все, то большую часть задач, придать хитозану новые свойства и расширить диапазон методов формования, применимых для создания материалов на его основе.

Таким образом, хитозан, а также его производные и сополимеры, являются подходящей основой для создания биodeградируемых полимерных матриц, разработке основных научных подходов к получению которых и посвящено настоящее исследование. В рамках диссертации получен ряд функциональных производных хитозана, а также его сополимеров, которые обладают повышенной биосовместимостью, регулируемой скоростью биodeградации и способностью к переработке с использованием методов, которые для немодифицированного хитозана невозможны, в том числе методов аддитивных технологий. Для модифицирования химической структуры хитозана использован в основном метод твердофазного механохимического синтеза в условиях реакционного смешения компонентов при сдвиговом деформировании в двухшнековом экструдере, который позволяет эффективно проводить полимераналогичные превращения и синтез сополимеров на основе неплавких полисахаридов без применения токсичных катализаторов и растворителей.

Степень разработанности темы исследования

В последние десятилетия активно развиваются механохимические подходы к модифицированию химической структуры высокомолекулярных соединений. В России исследования в этом направлении традиционно проводят в Институте химии твердого тела и механохимии СО РАН, ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН и в ИСПМ РАН. Также в последние десятилетия в научной литературе

наблюдается рост публикаций по исследованиям механохимического модифицирования полимеров, проводимых в отдельных группах в мире. Значительные усилия российских и зарубежных ученых направлены на исследование механохимических процессов в синтетических полимерах, на лабораторном оборудовании и на установление фундаментальных закономерностей протекания механохимических процессов. Активное развитие механохимии и необходимость в переходе химической промышленности на более эффективные и экологичные технологии определяют необходимость в разработке фундаментальных основ применения механохимии для решения конкретных материаловедческих задач.

Настоящая диссертационная работа является развитием работ по механохимическому модифицированию полисахаридов и посвящена систематическому исследованию влияния закономерностей протекания полимераналогичных реакций в условиях механохимической обработки хитозана с бромистым аллилом, гидроксикарбоновой кислотой, лактидом, олиголактидами и высокомолекулярными сложными полиэфирами молочной, гидроксикапроновой и гликолевой кислот и химической структуры получаемых продуктов реакции на способность к формированию материалов различной морфологии с использованием ряда современных технологий, а также на структуру и свойства получаемых материалов с фокусом на их дальнейшее применение в регенеративной медицине.

Цели и задачи

Общей целью диссертационной работы является разработка научных основ получения биodeградируемых материалов различной архитектуры с заданным набором свойств путем целенаправленного регулирования химической структуры хитозана, а также путем создания многофункциональных композитов на его основе для развития здравоохранения в области персонализированной медицины. Кроме того, целью работы является выявление закономерностей влияния химической структуры производных хитозана и привитых сополимеров на его основе на особенности формирования материалов биомедицинского назначения и на структуру и свойства объема и поверхности материалов.

Достижение указанных целей потребовало решения следующих задач:

- разработка и совершенствование механохимических способов синтеза функциональных производных хитозана;
- осуществление твердофазного синтеза сополимеров на основе хитозана, содержащих привитые цепи различной природы и длины (степени полимеризации);

– разработка способов формирования пленочных материалов и покрытий на основе хитозана, его производных и привитых сополимеров с применением технологий, использование которых для немодифицированного хитозана невозможно, а также оценка влияния структуры хитозана на целевые свойства материалов;

– разработка способов получения многокомпонентных сополимерных систем, способных к образованию стабильных ультрадисперсных суспензий, пригодных для создания нано-/микроволокнистых нетканых материалов;

– выявление закономерностей формирования сферических самоорганизующихся микрочастиц на основе привитых сополимеров хитозана, исследование динамики процессов формирования частиц, а также способов регулирования их химического состава, размера, морфологии поверхности и объема путем оптимизации химической структуры сополимеров;

– разработка методов синтеза полимерных систем для получения трехмерных материалов заданной архитектуры с использованием методов лазерной микростереолитографии и поверхностно-селективного лазерного спекания;

– разработка подходов к формированию макропористых гидрогелей на основе хитозана и хитозансодержащих композиций, сшитых как ионно, так и ковалентно; выявление взаимосвязи химической структуры, морфологии гидрогелей и их биологических свойств, таких как скорость ферментативного гидролиза и цитосовместимость.

Научная новизна

Впервые синтезированы функциональные производные хитозана при его взаимодействии с бромистым аллилом в условиях механохимической обработки и выявлены условия, позволяющие регулировать соотношение N- и O-замещенных производных с суммарным содержанием заместителей от 5 до 50 на каждые 100 звеньев полимера.

Выявлена взаимосвязь структуры, химической природы и количества заместителей в боковой цепи с гидрофильно-гидрофобным балансом и растворимостью производных и сополимеров хитозана, синтезированных путем его механохимического взаимодействия с гидроксикарбоновой кислотой, бромистым аллилом, лактидом, олиголактидами и высокомолекулярными сложными полиэфирами молочной, гидроксикапроновой и гликолевой кислот.

Впервые выявлено влияние химической структуры механохимически модифицированного хитозана на способность к формированию материалов различной

морфологии с использованием современных технологий, а также на структуру и свойства получаемых материалов.

Выявлена взаимосвязь химической структуры амфифильных сополимеров хитозана с характеристиками самоорганизующихся микрочастиц, полученных методом испарения растворителя из эмульсий масло/вода без использования эмульгаторов в дисперсионной среде; изучен их химический состав и морфология поверхности и объема.

Впервые выявлена взаимосвязь между химической структурой производных и сополимеров хитозана с характеристиками микрочастиц из полилактида, формируемых методом испарения растворителя из эмульсий масло/вода с применением модифицированного хитозана в качестве эмульгатора в дисперсионной среде; показана возможность использования производных хитозана для стабилизации эмульсий Пикеринга.

Впервые показана пригодность полученных аллилзамещенных производных хитозана и его сополимеров с олиголактоидом для создания гидрогелей методом лазерно-индуцированной стереолитографии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в выявлении основных закономерностей механохимического синтеза функциональных производных хитозана и привитых сополимеров на его основе без использования растворителей и катализаторов. Установлены закономерности влияния степени деацетилирования и молекулярно-массовых характеристик хитозана и его сополимеров на химический состав, морфологию и свойства поверхности материалов на их основе. Показано, что варьирование природы заместителя у С-2 пиранозного кольца хитозана позволяет регулировать скорость ферментативного гидролиза в сторону как увеличения скорости ферментативной деградации, так и ее замедления. Выявленные закономерности влияния химической структуры на способность к переработке, структуру и свойства получаемых изделий имеют важное значение при разработке полимерных материалов различного назначения.

Практическая значимость работы заключается в разработке методов получения многокомпонентных хитозансодержащих сополимерных систем, которые можно перерабатывать в материалы по расплавленным технологиям или из их стабильных ультрадисперсных растворов в хлорсодержащих растворителях. Показана возможность введения биоактивных компонентов в сополимерные системы и их пригодность для формования нетканых нано/микроволокнистых материалов с

повышенной цитосовместимостью для регенеративной медицины. Разработана и экспериментально подтверждена концепция создания методом испарения растворителя из эмульсий масло/вода самостабилизирующихся микроносителей для доставки клеток для тканевой инженерии на основе амфифильных сополимеров хитозана с олиго/полиэфирами. Показана возможность создания таким методом микрочастиц для формирования на их основе трехмерных материалов с помощью поверхностно-селективного лазерного спекания. Разработана методика формирования композиционных макропористых гидрогелей на основе ионно и ковалентно сшитого хитозана и его производных/сополимеров с использованием методик, дающих возможность регулирования состава и морфологии гидрогелей.

Методология и методы исследования

Твердофазный механохимический синтез хитозана, его производных и привитых сополимеров; физические спектральные методы анализа, в том числе ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C ; УФ- и ИК-спектроскопия; методы визуализации морфологии материалов – флуоресцентная, сканирующая электронная, конфокальная лазерная сканирующая и атомно-силовая микроскопии; динамическое светорассеяние; методы определения механических свойств полимеров; методы химического анализа; *in vitro* исследования скорости биodeградации, оценка биосовместимости материалов на основе производных/привитых сополимеров хитозана; оценка *in vivo* биосовместимости различных форм материалов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Способ синтеза функциональных производных и сополимеров хитозана, содержащих аллильные фрагменты или остатки полимолочной кислоты в боковой цепи, которые могут быть использованы для получения гидрогелей методом лазерно-индуцированной стереолитографии;
2. Применение амфифильных сополимеров хитозана с олиго/полиэфирами в дисперсной фазе позволяет формировать самоорганизующиеся микрочастицы на их основе методом испарения растворителя из эмульсий масло/вода без использования эмульгатора в дисперсионной среде;
3. Способ регулирования морфологии объема и поверхности микрочастиц, а также химического состава их поверхности путем оптимизации длины блоков в сополимерах хитозана с олиго/полиэфирами;

4. Способ получения микрочастиц с обогащенным хитозаном и его производными поверхностным слоем, пригодных для создания трехмерных структур методом поверхностно-селективного лазерного спекания.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационной работы определяется использованием современных методов исследования химической структуры полимеров и материалов на их основе; соответствием результатов, полученных различными методами.

Результаты работы апробировались на I-V Всероссийской школе-конференции для молодых ученых «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокompозиты» (Московская область 2009, 2010, 2011, 2012 и 2015); на X и XI Международных конференциях "Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана" (Нижний Новгород, Россия, 2010 и Мурманск, Россия, 2012); XVIII, XX и XXIII International Conferences on Bioencapsulation (Португалия 2010, Канада 2012, Нидерланды 2015); X и XI Всероссийской Каргинской конференций «Полимеры-2010/2014/2017» (Москва, Россия, 2010, 2014, 2017); 1st, 2nd, 3rd, 6th, 7th, 8th, 9th Russian-Hellenic Symposium "Biomaterials and bionanomaterials: Recent Advances and Safety – Toxicology issues" (Греция 2010, 2011, 2012, 2015, 2016, 2017, 2018); XIII, XIV and XXI Annual Conferences "YUCOMAT" (Черногория 2011, 2012, 2019); VI и VII International conference on Mechanochemistry and mechanical alloying "INCOME 2011" (Черногория 2011, Индия 2009); III, IV and V International Conference Fundamental Bases of Mechanochemical Technologies, (Новосибирск, Россия, 2009, 2013, 2018); European Live Science Summit "BioMedica" (Бельгия 2012, Германия 2013, Германия 2016); International Meeting of the German Society for Cell Biology (Германия 2015); X International Conference on Hyaluronan (Италия 2015); International Symposium on amphiphilic polymers, networks, gels and membranes (Венгрия, 2015).

Основные результаты исследования по теме диссертации представлены в виде 37 статей в реферируемых журналах, из которых 32 индексируются в базах данных Scopus и Web of Science, а также рекомендованы ВАК.

Личный вклад автора

Работа выполнена в лаборатории твердофазных химических реакций ИСПМ РАН в рамках проведения исследований, включенных в план ИСПМ РАН, грантов РФФИ.

Выбор темы, постановка задач и целей исследования, интерпретация и обобщение результатов, полученных как лично автором, так и в соавторстве, формулирование научных положений и выводов, которые выносятся на защиту, принадлежат лично автору настоящей работы. Экспериментальная синтетическая работа выполнена лично автором, либо при участии. Материалы на основе хитозана и его производных/сополимеров в виде пленок методом полива из раствора, сферических микрочастиц, макропористых гидрогелей методом лиофильной сушки получены лично автором. Нетканые образцы по методу фильерного электроформования получали в Институте регенеративной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. Структурирование гидрогелей на основе хитозана, содержащего в боковой цепи остатки молочной кислоты и аллильные фрагменты, методом лазерной стереолитографии, а также трехмерных структур методом поверхностно-селективного лазерного спекания из полученных автором микрочастиц выполнено во ФНИЦ «Фотоники и кристаллографии» РАН. Сканирующая электронная микроскопия выполнена к.х.н. А.И. Гайдар в ФГБНУ "НИИ ПМТ", к.х.н. Е.С. Оболонковой в ИСПМ РАН и лично автором в Centre Interfacultaire des Biomatériaux (CEIB) de l'Université de Liège (Льеж, Бельгия) и во ФНИЦ «Фотоники и кристаллографии» РАН. УФ-спектрофотометрия выполнена Е.А. Свидченко и к.ф.-м.н. Н.М. Суриным в ИСПМ РАН. Спектры ЯМР сняты к.х.н. Г.В. Черкаевым в ИСПМ РАН и лично автором в CEIB de l'Université de Liège (Льеж, Бельгия). Биологические исследования *in vitro* выполнены в сотрудничестве с Институтом биоорганической химии РАН, Первым МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России и в Нижегородской государственной медицинской академии Минздрава России. Биологические испытания полученных матриц *in vivo* выполнены в.н.с. к.м.н. В.В. Зайцевым (ЦИТО им. Н.Н. Приорова).

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 2 глав обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка использованной литературы и приложения. Работа изложена на 307 страницах, содержит 82 рисунков и 28 таблиц. Список цитируемой литературы включает 398 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы

исследования, приведены положения, выносимые на защиту, личный вклад автора, а также степень достоверности и апробация работы.

В обзоре литературы проведен анализ публикаций по теме диссертации. Рассмотрены основные подходы к модифицированию химической структуры хитозана путем синтеза его производных и сополимеров; особое внимание уделено литературе по механохимическому модифицированию полимеров; отмечены методы получения материалов на основе различных полимеров, приведены основные направления в области создания материалов для регенеративной медицины.

В главе результаты и их обсуждение представлены оригинальные результаты по теме диссертации, а также приведено их обсуждение с точки зрения современных представлений о полимераналогичных превращениях, физико-химических процессах, протекающих при формировании материалов; влиянии химической структуры полимеров на особенности формирования.

В экспериментальной части описана методология получения производных и привитых сополимеров хитозана твердофазным механохимическим методом; описаны методики получения различных форм материалов, в том числе композиционных, на основе хитозана, его производных и привитых сополимеров; описаны различные подходы к получению и регулированию структуры и свойств пленочных и нано-/микроволокнистых материалов, сферических микрочастиц, гидрогелей и трехмерных материалов, сформированных с помощью методов аддитивных технологий.

Раздел 1. Полимераналогичные превращения хитозана и синтез привитых сополимеров на его основе

В работе широко использовали механохимический подход к модифицированию химической структуры хитозана методом реакционного смешения твердых реагентов под действием давления и сдвиговых напряжений в двушнековом экструдере. Выбор степени модифицирования определялся конкретной материаловедческой задачей, то есть набором требуемых свойств, предъявляемых к хитозансодержащему материалу и изделию на его основе. Были применены два основных подхода:

1. Функционализация макромолекул хитозана низкомолекулярными соединениями способом полимераналогичных превращений.

2. Твердофазный синтез привитых сополимеров хитозана, содержащих в качестве боковых заместителей блоки олигомеров и высокомолекулярных модификаторов, а также получение многокомпонентных сополимерных систем на основе хитозана.

1.1. Синтез функциональных производных хитозана

В работе методом твердофазного синтеза получены различные типы N- и O-замещенных производных хитозана (рис. 1) с варьируемой степенью замещения (СЗ) функциональных групп хитозана и степенью полимеризации (СП) боковых заместителей.

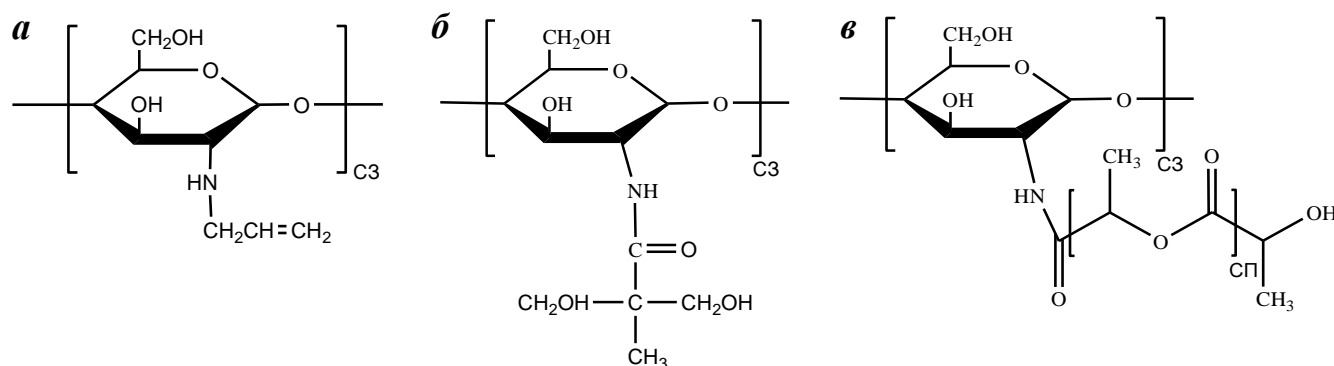


Рисунок 1 – Структура элементарного звена хитозана, N-замещенного аллилом (а), гидроксипропионовой кислотой (б) и лактидом (в)

Функциональных групп, существующих в нативном хитозане, может быть недостаточно для получения материалов с использованием специфических методов формования, и требуется дополнительная функционализация макромолекул. Например, один из наиболее эффективных подходов аддитивных технологий для создания трехмерных материалов с заданной морфологией – лазерная стереолитография – основан на способности полимера отверждаться с образованием сшитых нерастворимых структур под воздействием лазерного излучения. Соответственно, это требует введения в химическую структуру полисахарида функциональных групп, содержащих двойные связи способные к фотополимеризации инициируемой лазерным излучением. В рамках диссертации впервые получены *аллилированные производные хитозана* (образец АХ) методом твердофазного синтеза.

При механохимической обработке хитозана с бромистым аллилом взаимодействие может приводить к образованию как O- так и N-замещенных производных (рис. 2). Исследование химического строения продуктов реакции и оценку степени замещения проводили методами ЯМР на ядрах ¹H и ¹³C, и с помощью ¹³C-¹H АРТ (attached proton test) анализа. Было обнаружено, что в отсутствие щелочи реакция аллилирования протекает избирательно по аминогруппам хитозана и приводит к получению аллилхитозана (рис. 2, путь 1) с невысокой СЗ аминогрупп

хитозана (образец АХ-1). Проведение процесса в щелочной среде приводит к образованию неизбирательно O- и N-замещенных производных (рис. 2, путь 2).

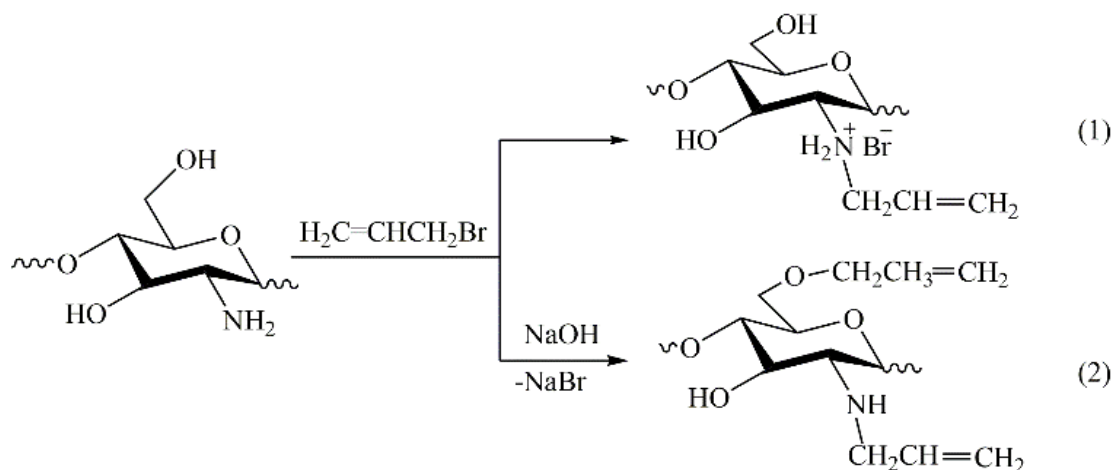


Рисунок 2 – Схема реакции между хитозаном и аллилбромидом без использования NaOH (путь 1) и в присутствии щелочи (путь 2)

Суммарное содержание аллильных заместителей в образцах составляет от 5 до 50 в расчете на 100 звеньев хитозана (образцы АХ-2-5) и зависит от исходного соотношения компонентов в реакционных смесях (таблица 1). Все полученные производные были растворимы в традиционном для хитозана растворителе – кислых водных средах.

Таблица 1 – Степень замещения (СЗ) и полимеризации (СП) боковых заместителей хитозана в образцах, полученных при твердофазном механохимическом взаимодействии хитозана с аллилбромидом (образцы серии АХ), гидроксикарбоновой кислотой (образцы серии ХК) и L,D-лактидом (образцы серии ХЛ) при варьировании соотношения компонентов реакционных смесей и температуры синтеза

Образец	Количество молей модифицирующего агента на 1 осново-моль хитозана в исходных смесях	Температура, °С	СЗ N-/O-	Средняя СП заместителя
АХ-1	0.5	-5	0.10/0	–
АХ-2	0.5	-5	0.02/0.03	–
АХ-3	1	-5	0.06/0.11	–
АХ-4	1.5	-5	0.08/0.13	–
АХ-5	2	-5	0.20/0.30	–
ХК-1	1	100	0.18/0	–
ХК-2	3	100	0.43/0	–
ХЛ-1	0.5	120	0.19/0	3.0
ХЛ-2	1	90	0.41/0	4.1
ХЛ-3	3	120	0.37/0	9.7

Твердофазное реакционное смешение *хитозана с гидроксикарбоновой кислотой* приводит к получению соответствующих N-ацелированных производных (образцы серии ХК) со СЗ аминогрупп хитозана до 0.43 (рис. 1б, таблица 1). Частичное ацелирование хитозана приводит к приданию ему растворимости в нейтральных и щелочных водных средах и изменяет характер поведения растворимых фракций продуктов при их дробном осаждении с увеличением рН среды. Основная часть полимера осаждается только при рН 10 (нативный хитозан при рН 6.9 – 7.2).

Введение в химическую структуру хитозана боковых заместителей в виде коротких фрагментов полимера другой химической природы осуществляли путем твердофазного реакционного смешения *хитозана с L,D-лактидом*, что приводит к получению амфифильных макромолекул (образцы серии ХЛ), структура замещенного элементарного звена которых представлена на рис. 1в. Степень замещения аминогрупп хитозана, рассчитанная по данным ИК-спектроскопии и элементного анализа, составляет 0.19 – 0.41, а СП боковых заместителей 3-10 (таблица 1). Синтезированные образцы ХЛ сохраняют присущую хитозану растворимость в водных средах, но также обладают способностью набухать в органических растворителях. Синтезированные образцы ХЛ можно также отнести к разряду сополимеров хитозана с короткими привитыми цепями олиго(L,D-лактида).

Таким образом, полученные N-замещенные производные хитозана обладают дополнительными функциональными группами, которые могут обеспечить способность полимера к переработке по нетрадиционным технологиям, а также регулировать свойства формируемых материалов.

1.2. Синтез привитых сополимеров хитозана с олиго/полилактидами с различной длиной боковой цепи

Получение сополимеров позволяет комбинировать свойства полимеров, входящих в состав макромолекулы, и существенно расширить диапазон технологических приемов, доступных при формировании из них материалов. В отличие от полимераналогичных превращений, сополимеризация обеспечивает более существенное изменение химических свойств хитозана и, как следствие, технологические преимущества, характерные для прививаемых фрагментов.

В качестве полимера, который может придать материалам на основе хитозана дополнительные функциональные свойства был выбран полилактид. По химической природе полилактид – гидрофобный полимер, и введение его фрагментов в структуру хитозана должно придавать синтезируемым макромолекулам амфифильные свойства.

Привитые *сополимеры хитозана и олиголактида со средней СП цепи* получали твердофазным реакционным смешением хитозана с олиго(L-(или L,D-)лактидом) со средневязкостной молекулярной массой (ММ) 5 кДа (соответствующая СП ≤ 70). Взаимодействие хитозана с олиголактидом может проходить или с вовлечением концевых карбоксильных групп олиголактида или по сложноэфирным связям основной цепи олиголактида путём их аминолита и алкохолиза соответствующими группами хитозана. Так как взаимодействие хитозана с олиголактидом в условиях твердофазного синтеза носит статистический характер, все указанные направления реакции равновероятны. Степень прививки зависит от молекулярной массы хитозана (см. образцы на основе X-80 с ММ 80 кДа и X-320 с ММ 350 кДа в табл. 2) и стереохимического состава олиголактида.

Таблица 2 – Условия процесса и выход продуктов реакции

Образец	Состав и соотношение компонентов, мас.%	Тэкструзии (°С) / количество циклов	Степень прививки, %
ХЛЛ-т	X-80 /олиго(L,L-лактид)40/60	55 / 1	35
ХЛД-т	X-80 /олиго(L,D-лактид)40/60	55 / 1	37
ХЛЛ-к	X-350 /олиго(L,L-лактид)50/50	55 / 1	5

Полученные сополимеры обладают наилучшей растворимостью в кислых водных растворах с образованием опалесцирующего коллоидного раствора; доля нерастворимого продукта не превышает 12-20 мас.%. Средство сополимеров к органическим растворителям зависит от количества цепей привитого олиголактида (т.е. количества узлов прививки) и от СП исходного олигомера. Если образцы хитозана с короткими (СП ≤ 10) привитыми цепями олиголактида, лишь слабо набухают в хлороформе, то сополимеры, полученные с использованием полилактида со средней СП ≤ 70 , хотя и не образуют истинный раствор, набухают значительно сильнее и практически полностью диспергированы в объеме хлороформа на коллоидном уровне.

Для существенного изменения свойств хитозана требуется *прививка высокомолекулярных блоков* с образованием привитых сополимеров, у которых сравнимы молекулярные массы основной полиглюкозаминовой цепи и привитых полиэфирных блоков. Твердофазное реакционное смешение хитозана с поли(L-лактидом) (ММ 160 кДа) и поли(лактид-со-гликолидом) (ММ 53 кДа) приводит к образованию привитых сополимеров, способных хорошо набухать в органических растворителях (CHCl_3 и CH_2Cl_2) с образованием стабильных субмикронных

дисперсий. Исследование дисперсий методом динамического светорассеяния показало, что средний размер макромолекулярных ассоциатов колеблется в пределах от 200 нм до 2.5 мкм. Способность подобных гибридных макромолекул к агрегации в органических растворителях определяется в значительной степени конформационной подвижностью и способностью к упаковке боковых привитых цепей, т.е. их химическим, энантиомерным составом и длиной. В ЯМР ^1H спектрах суспензий полученных сополимеров в дейтерохлороформе присутствуют только сигналы протонов полиэфиров, причем наблюдается уширение сигналов, связанное с гетерогенностью образцов. Подобное уширение типично для коллоидных растворов, образованных ассоциатами макромолекул в которых гидрофильные нерастворимые в хлороформе фрагменты хитозана окружены гидрофобной оболочкой из привитых цепей полиэфиров. Вероятно, именно эта оболочка и удерживает сополимеры в нетрадиционном для нативного хитозана растворителе. При фракционировании образцов в 4% HCOOH и изучении фракций методом элементного анализа обнаружено, что нерастворимые в кислых водных средах фракции содержат до 17 мас.% хитозана. В целом, результаты фракционного анализа в сочетании с данными ДСК образцов, указывают на образование фракции привитых сополимеров с относительно высокой СП привитых полиэфирных цепей, препятствующих их растворению в традиционных для хитозана растворителях.

Для повышения биосовместимости материалов на основе полученных сополимеров разработан ряд *многокомпонентных сополимерных систем на основе хитозана: с олиго(L-лактидом) и коллагеном (образец ХО-К); с поли(L-лактидом) и желатином (образец ХП-Ж); с поликапролактоном, олиго(L-лактидом), поли(L-лактидом) и желатином (образец ППХОЖ)*. Также как и бинарные системы такие образцы обладают амфифильными свойствами и способны образовывать стабильные субмикронные дисперсии в хлорсодержащих органических растворителях. Стабильные дисперсии тройных систем в дихлорметане визуальнее более прозрачны и устойчивы по сравнению с ненаполненными бинарными сополимерными системами: средний размер дисперсной фазы по данным динамического светорассеяния составляет 100-300 нм; в случае более сложной многокомпонентной системы он несколько выше – ~550 нм.

Таким образом, можно сделать вывод, что полученные при твердофазном реакционном смешении хитозана с олиго/полиэфирами сополимерные системы сочетают свойства синтетических и природных компонентов, в том числе обладают сродством к хлорсодержащим растворителям, что позволяет использовать для создания материалов на их основе технологические приемы, которые для

немодифицированного хитозана неприменимы. Использование механохимического подхода также предполагает возможность введения дополнительных биоактивных компонентов (в исследованных системах это белки) для придания материалам специфических биологических свойств.

Раздел 2. Формование материалов на основе хитозана, его производных и привитых сополимеров

Формование биodeградируемых материалов с заданной структурой и свойствами, способных в полной мере временно замещать биоткань, является одной из сложных задач, сдерживающих развитие регенеративной медицины. Выбор методики получения материала является поиском компромисса между двумя основными критериями: способностью полимера подвергаться формованию с использованием выбранной технологии и возможностями данного метода формования обеспечить требуемые для материала структуру и свойства объема и поверхности. При получении материалов для регенеративной медицины существуют серьезные ограничения при выборе метода формования, набор полимеров, которые могут быть использованы не очень широк, а критерии к свойствам материалов очень высоки. В приведенном разделе показана возможность контролировать структуру и свойства материалов путем варьирования характеристик полимера и описаны различные подходы к получению дву- и трехмерных материалов на основе хитозана.

2.1. Пленочные материалы

Пленочные материалы являются одним из основных типов материалов, применяемых в регенеративной медицине в качестве подложек для роста клеток и тканей, разделительных мембран, раневых покрытий и т.д. Регулирование их объемных и поверхностных свойств, в том числе деформационно-прочностных характеристик, биосовместимости и скорости биодеградации, является важным направлением в создании эффективных материалов для восстановительной хирургии.

Несмотря на то, что объемные свойства традиционно считаются наиболее важными с точки зрения материаловедения, свойства поверхности играют значительную роль для поставленных в диссертационном исследовании целей, так как взаимодействие полимерного материала с клетками/тканями *in vitro* и *in vivo* начинается с поверхности. Показано, что пленки, полученные по единой методике из двух образцов хитозана, различающихся методом деацетилирования, ММ, молекулярно-массовым распределением, степенью ацилирования (СА) и степенью кристалличности, обладают различной структурой, морфологией и свойствами

поверхности. В работе исследовали пленки из двух образцов хитозана, полученные формованием из раствора в 2% уксусной кислоте и переведенные в основную форму.

Пленка, сформованная из хитозана X-350 (ММ 350 кДа, СА 0.14), полученного методом суспензионного деацетилирования, обладает более гидрофобной поверхностью, чем из хитозана X-60 (ММ 60 кДа, СА 0.08), полученного твердофазным деацетилированием: угол смачивания по воде составляет 89° и 68° , соответственно. Очевидно, когда образцы хитозана различаются основными свойствами макромолекул, гидрофильно/гидрофобный баланс поверхности является суперпозицией всех параметров, ответственных за морфологию и химическую структуру поверхностного слоя. Исследование морфологии пленок хитозана методом СЭМ показало, что поверхность пленки из хитозана с меньшей ММ обладает более развитой поверхностью, состоящей из более крупных надмолекулярных структурных образований, чем пленка из хитозана, полученного суспензионным деацетилированием (рис. 3).

Исследование пленок хитозана с различным химическим составом методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) показало, что состав поверхности различается в зависимости от используемого хитозана, из которого она формировалась, и отличается от теоретического, рассчитанного исходя из химического состава хитозана. Поверхность пленки, сформованной из хитозана X-60, содержит почти в два раза меньше азота, чем у пленки из хитозана X-350: 3.5 и 6.1 ат.%, соответственно. Различия в структуре, морфологии и гидрофильности поверхности, несомненно, влияют на биосовместимость материалов. Исследование жизнеспособности клеток мышечных фибробластов L929, культивируемых на поверхности пленок, сформованных из разных образцов хитозана, показало, что

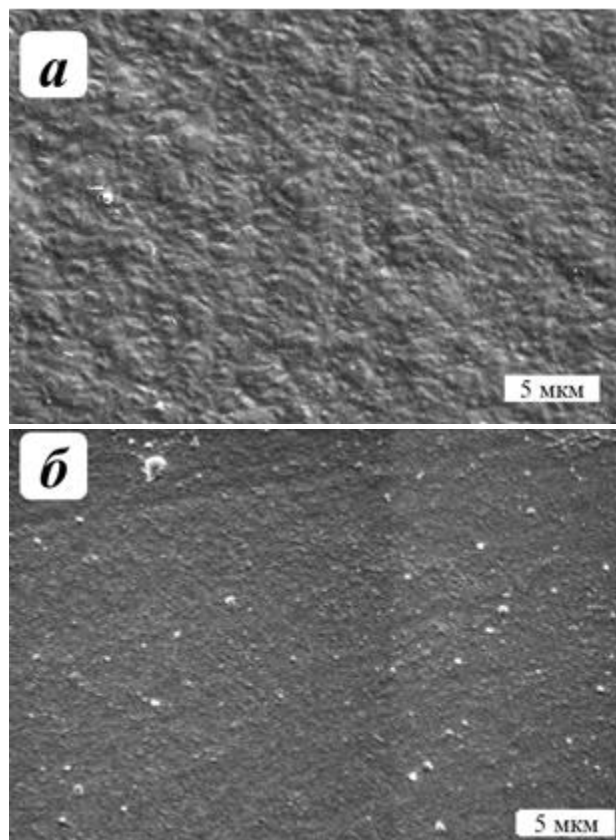


Рисунок 3 – Электронные микрофотографии пленок, сформованных из хитозана X-60 (а) и хитозана X-350 (б)

пленки из хитозана X-350 обладают более высокой способностью поддерживать адгезию и рост клеток, чем пленки из хитозана X-60.

Введение функциональных заместителей в химическую структуру хитозана позволяет в более широком диапазоне варьировать структуру и свойства как объема, так и поверхности. Пленки, полученные методом полива из водного раствора хитозана, ацилированного гидроксикарбоновой кислотой, и сополимеров хитозана с привитыми цепями олиголактоидов с СП ≤ 10 , в отличие от модельных пленок из немодифицированного хитозана с относительно низкой ММ (60 кДа) обладают повышенными деформационно-прочностными характеристиками. Прочность при разрыве пленочных образцов из ХК составляет 14 ± 0.5 МПа, а из ХЛ 106 ± 4 МПа, что сопоставимо с прочностью пленок из высокомолекулярного хитозана. Более детальные исследования влияния макромолекулярных характеристик основной цепи хитозана и привитых цепей олиголактоида на деформационно-прочностные характеристики пленок на основе сополимеров со средней СП привитой цепи показали, что прививка на хитозан X-80 аморфно-кристаллического олиго(L-лактоида) приводит к незначительному снижению напряжения при разрыве (σ), тогда как прививка аморфного олиго(L,D-лактоида) повышает σ на 40%. Разница в деформационно-прочностных характеристиках пленок в зависимости от типа привитых фрагментов олиголактоида связана со структурой пленок, которая в свою очередь определяется разным вкладом привитых цепей во внутри-/межмолекулярные взаимодействия полимерных цепей в формовочных растворах, что также отражается на морфологии пленочных материалов.

Прививка на хитозан высокомолекулярных полиэфиров с одной стороны препятствует возможности формовать пленки из кислых водных растворов из-за гидрофобных свойств сополимеров, но с другой стороны, позволяет формовать пленки с применением технологий, не характерных для немодифицированного хитозана. Так, пленки из ХП-Ж были получены методом полива из стабильных в дихлорметане дисперсий. Исследование структуры и свойств таких пленок показало, что их поверхность обогащена полиэфирными фрагментами, что подтверждается данными ЯМР анализа об образовании стабилизирующей оболочки для фрагментов хитозана/желатина в органических растворителях. Величина краевого угла смачивания по воде (θ_B) соответствует значениям, полученным для пленки на основе немодифицированного полилактоида ($\theta_B \sim 75^\circ$). Исследование химической структуры поверхностного слоя пленки методом РФЭС показало, что соотношение О/С составляет 0.85 и близко к 0.89, величине, рассчитанной исходя из химической структуры полилактоида; атомы же азота, характерные для хитозана и желатина, не

обнаружены. Исследование морфологии поверхности и зарядовых состояний, свидетельствует о большей гомогенности пленки из сополимера, что, вероятно, и определяет ее повышенную цитосовместимость. Так, относительная жизнеспособность клеток L929 при росте в течение 1 недели на пленках из ХП-Ж в два раза выше, чем при росте на пленке из немодифицированного полилактида.

Исследование пленок, полученных методом полива из растворов в дихлорметане нативного поли(L-лактида), бинарного сополимера хитозан/поли(L-лактид) (40/60 мас.%, $T_{\text{синтеза}} = 130^{\circ}\text{C}$) и тройной системы ХП-Ж, в модели подкожной имплантации *in vivo* показало принципиально разные типы их взаимодействия с животной тканью (результаты данного эксперимента представлены в Приложении диссертации). Пленка из гомополимера не вызывает воспаления, не замещается соединительной тканью, но наблюдается отчетливое образование фиброзной капсулы, сросшейся с поверхностью самой пленки, что делает ее непригодной в качестве разделительной мембраны. Пленка из бинарной системы так же не вызывает интенсивного воспаления, не замещается и не прорастает собственной соединительной тканью, но наблюдается отчетливое образование отграничивающей капсулы, не вросшей в полимерную матрицу, что указывает на возможность ее использования в качестве противоспаечной мембраны. Пленки из ХП-Ж, обладающие высокой цитосовместимостью по данным *in vitro* исследований, показали только начальное образование отграничивающей капсулы, что определяет, с одной стороны, их непригодность в качестве отграничивающей противоспаечной мембраны, а с другой – возможность применения в качестве биоразлагаемой матрицы для замещения тканей, выращивания клеточных культур и в качестве специфических мембран (например, стоматологических).

Прививка на хитозан высокомолекулярных полиэфиров также позволяет получать пленки из сополимеров методом горячего прессования. При этом прочностные характеристики полученных таким способом пленок, сравнимыми с характеристиками пленок из немодифицированного поли(L-лактида): σ составляет 48 и 51 МПа, соответственно, для полилактида и пленок из сополимера с содержанием хитозана 40 мас. %.

Важным направлением в создании материалов для регенеративной медицины является создание покрытий из хитозана на полимерных материалах другой природы с целью повышения их биосовместимости. В работе оценены различные подходы к нанесению тонких покрытий из хитозана на поверхность пленок из полилактида: иммобилизация хитозана в субповерхностный слой полиэфира, предварительно активированный в смеси растворителей, и электростатическое напыление

(электрогидродинамическое распыление), которое основано на распылении жидкости под действием высокого электрического напряжения. Исследование влияния метода нанесения покрытия на химический состав и свойства поверхности, а также толщину покрытия, однородность его нанесения и морфологию, показало, что электростатическое напыление позволяет создать покрытие толщиной $\sim 3.2 \pm 0.2$ мкм, в то время как иммобилизация хитозана в субповерхностный слой, выдержанный в смеси растворителей, приводит только к обогащению поверхности макромолекулами хитозана и несущественно меняет ее свойства.

Таким образом, показано, что варьирование молекулярно-массовых характеристик хитозана и его химической структуры позволяет регулировать как свойства объема, так и поверхности, а также расширять доступные методы формирования двухмерных материалов на его основе. Возможно также формирование тонких покрытий из хитозана на полимерные подложки иной природы, но свойства поверхности материала в этом случае существенно зависят от способа нанесения покрытия.

2.2. Нетканые нано-/микроволокнистые материалы

В отличие от пленок нетканые материалы уже относят к трехмерным материалам, обладающим достаточной пористостью и развитой поверхностью. Они могут применяться как в качестве разделительных мембран, так и тканезамещающих имплантатов. Хитозансодержащие нетканые нано-/микроволокнистые материалы в большинстве случаев получают методом электроформования из растворов хитозана в концентрированных кислотах, а также из смесевых растворов с другими полимерами, что требует использования токсичных растворителей и приносит технологические трудности. Способность сополимеров хитозана с олиго/полилактидами образовывать стабильные субмикронные дисперсии в органических растворителях позволяет получать микро-/нановолокна методом электроформования неводных растворов, что более технологично для данного способа формирования материалов.

Введение в раствор полилактида в хлороформе ультратонких дисперсий тройных систем ХО-К и ХП-Ж приводит к увеличению его электропроводности, снижению вязкости и поверхностного натяжения. Электроформование из таких дисперсий приводит к получению микроволокон с более развитой морфологией, чем при формовании из немодифицированного полилактида (рис. 4).

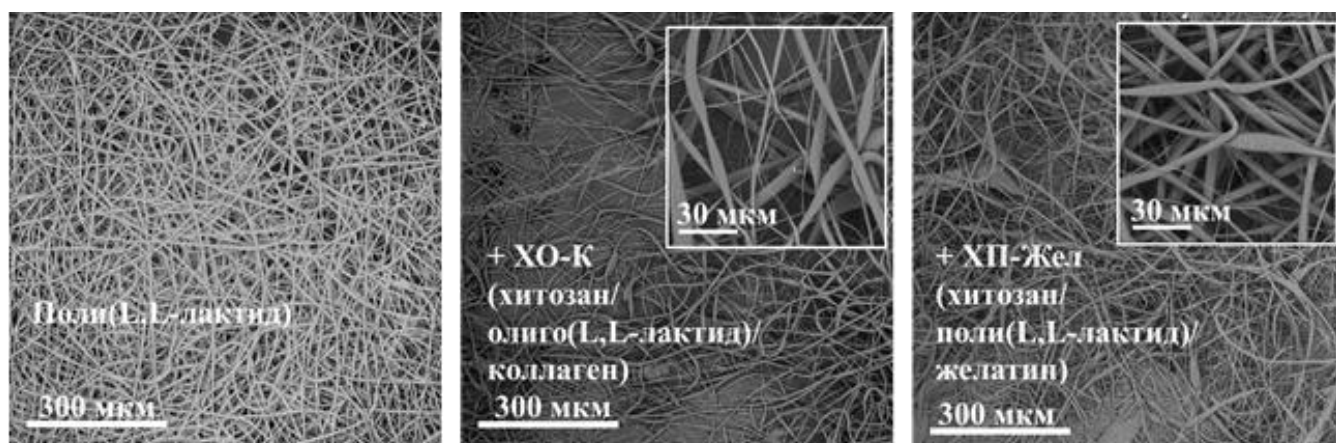


Рисунок 4 – Электронные микрофотографии нетканых материалов из поли(L,L-лактида) (а) и содержащих тройные сополимеры хитозана с олиго/полилактидом и коллагеном/желатином

Многокомпонентную сополимерную систему ППХОЖ использовали для формирования нетканых материалов без добавления гомополимеров в формовочный раствор, что позволило получить бездефектные материалы со средним диаметром волокон ~ 7 мкм, характеризующихся развитой поверхностью, обогащенной фрагментами биополимеров. По сравнению с неткаными материалами из гомополимера полилактида образцы из ППХОЖ имеют более гидрофильную поверхность и улучшенные деформационно-прочностные характеристики в увлажненном состоянии, что важно для их применения в условиях среды организма.

Исследование биосовместимости нетканых материалов из ППХОЖ *in vitro* в процессе культивирования мезенхимальных стромальных клеток человека в течение 7-ми дней показало, что они цитосовместимы. При культивировании клеток на микроволоконистых материалах из ППХОЖ наблюдается формирование значительного количества межклеточных контактов, а клетки растут не только на поверхности материала, как это в основном наблюдается на образце из гомополимера полилактида, но также и в объеме. Двуслойные микро-/нановолоконистые нетканые материалы, содержащие ХП-Ж, также можно успешно использовать в качестве полимерной основы для регенерации трахеального эпителия. Исследования *in vivo* нетканых материалов из ХП-Ж показали, что они не вызывают интенсивного воспаления и замещаются соединительной тканью без образования отграничивающей капсулы, т.е. является перспективным для замещения мягких тканей организма, а также для выращивания клеточных культур.

Таким образом, прививка на хитозан олиго/полилактида обеспечивает возможность формирования на основе таких сополимеров нетканых материалов из апротонных органических растворителей методом электроформования. По данным *in*

vitro и *in vivo* исследований полученные материалы перспективны для использования в качестве матриц для восстановительной хирургии.

2.3. Сферические микрочастицы на основе хитина, хитозана, его производных и сополимеров с олиго/полиэфирами

Биодеградируемые полимерные микрочастицы являются одним из наиболее перспективных видов материалов для применения в регенеративной медицине, так как могут использоваться в качестве инъектируемых многофункциональных микроносителей клеток/биоактивных веществ и являться исходным материалом для формирования из них 3D структур заданной морфологии с помощью аддитивных технологий. В обоих случаях для эффективного применения микрочастиц требуется оптимизация структуры и свойств их объема и поверхностного слоя. Одним из наиболее простых и удобных для оптимизации методов формирования микрочастиц является испарение растворителя из эмульсий масло/вода. Варьирование состава дисперсионной среды в основном влияет на структуру поверхности получаемых микрочастиц, а состав дисперсной фазы определяет структуру и морфологию их объема.

В рамках оптимизации состава дисперсионной среды использовали или водные растворы производных/сополимеров хитозана или дисперсии наночастиц на их основе. Хитозан, ацилированный гидроксикарбоновой кислотой, а также его сополимеры с привитыми цепями олиго(L,D-

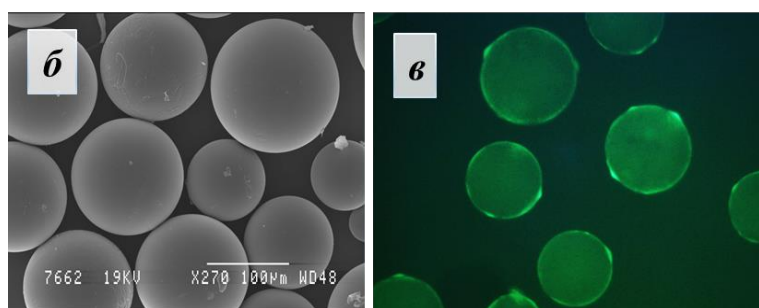
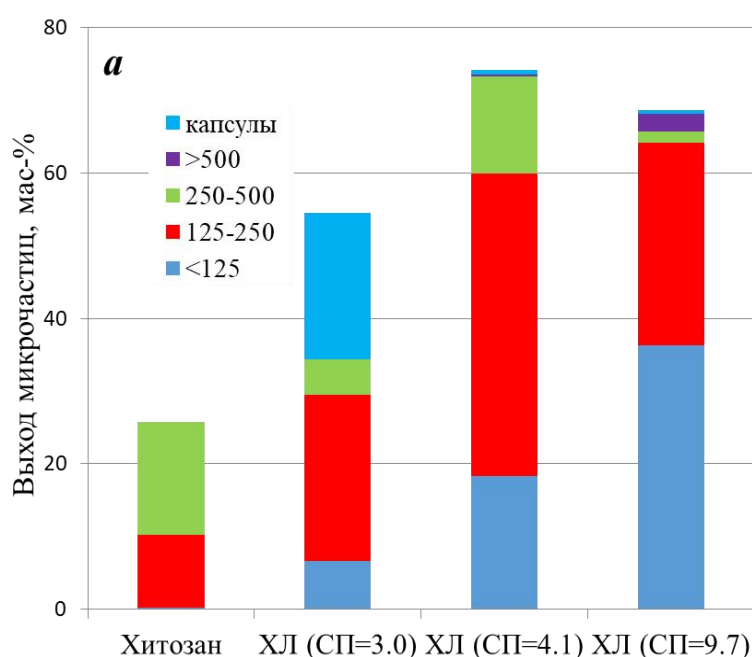


Рисунок 5 – Выход микрочастиц и их распределение по размерам в зависимости от образца ХЛ, используемого в дисперсионной среде (а); сканирующая электронная (б) и флуоресцентная микроскопия (в) получаемых микрочастиц

лактида) с $СП \leq 10$ сохраняют способность растворяться в водных средах и могут быть использованы в качестве эмульгаторов в дисперсионной среде. Увеличение СЗ аминогрупп хитозана в случае ацилированного хитозана, а также СП в случае его сополимеров с олиго(L,D-лактидом) приводит к увеличению выхода микрочастиц и уменьшению их среднего размера (рис. 5). Выход микрочастиц достигает значений сопоставимых с выходом микрочастиц, полученных при тех же условиях с применением поливинилового спирта в качестве эмульгатора. Полученные микрочастицы обладают сферической формой и гладкой морфологией поверхности, которая обогащена фрагментами хитозана, что подтверждено как качественно с использованием флуоресцентных меток, так и с помощью энергодисперсионной спектроскопии.

В качестве компонента дисперсионной среды можно также использовать наночастицы из хитина, хитозана и его производных, которые могут адсорбироваться на границе раздела фаз и стабилизировать ее. Водные дисперсии нанокристаллического хитина, полученного методом «сверху-вниз», то есть кислотным гидролизом аморфных областей полисахарида, или наночастицы хитозана и его производных, сформованные методом «снизу-вверх», то есть контролируемым осаждением из водных растворов, использовали в качестве дисперсионной среды. Размер, морфология и состав наночастиц определяются их химической структурой и методом получения, что в свою очередь определяет их способность стабилизировать границу раздела фаз масло/вода и формировать микрочастицы из полилактида с оболочкой из хитозансодержащих наночастиц (рис. 6).

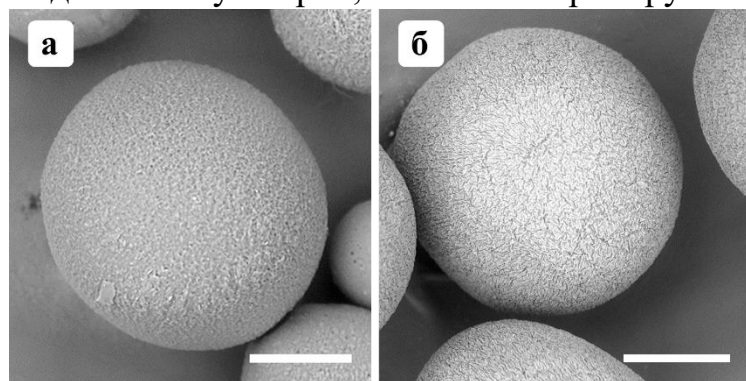


Рисунок 6 – СЭМ изображения поверхности микрочастиц, стабилизированных нанокристаллическим хитином, (а) или наночастицами хитозана, полученными осаждением из растворов. Масштаб 100 мкм

Сополимеры хитозана, содержащие привитые гидрофобные фрагменты олиго/полиэфиров, приобретают ярко выраженное сродство к хлорсодержащим растворителям, что определяет возможность их введения в качестве дополнительного или основного полимера в дисперсной фазе. Даже использование образцов сополимеров хитозана с привитыми цепями олиго(L,D-лактида) с $СП \leq 10$ в качестве дополнительного компонента (30 мас.%) дисперсной фазы, состоящей из раствора

полилактида, позволяет получать самоорганизующиеся микрочастицы без применения какого-либо эмульгатора в водной фазе. Как видно из рис. 7 полученные микрочастицы имеют однородную поверхность, но СЭМ изображения их срезов показывают формирование макропористой структуры. Прививка на хитозан фрагментов олиголактида с СП ≤ 70 позволяет формировать микрочастицы без использования гомополимера полилактида в дисперсной фазе, что приводит к получению макропористых микрочастиц (рис. 7). Использование сополимерных систем хитозана с поли(лактид-со-гликолидом) и с поли(L-лактидом), содержащих желатин, позволяет достигать выхода 79%. Исследование влияния соотношения гомополимер/сополимер в дисперсной фазе показало, что увеличение содержания сополимеров приводит к увеличению выхода микрочастиц и снижению их среднего размера, кроме случая 100% замены полилактида на сополимер, когда наблюдается формирование микрочастиц неправильной формы. С точки зрения выхода микрочастиц и морфологии их поверхности оптимальное соотношение сополимер/поли(L,D-лактид) во всех случаях 30/70. Исследование срезов микрочастиц показало, что, несмотря на однородную морфологию поверхности, для них характерна пористая внутренняя структура, состоящая из полого «ядра» и микропористой «оболочки».

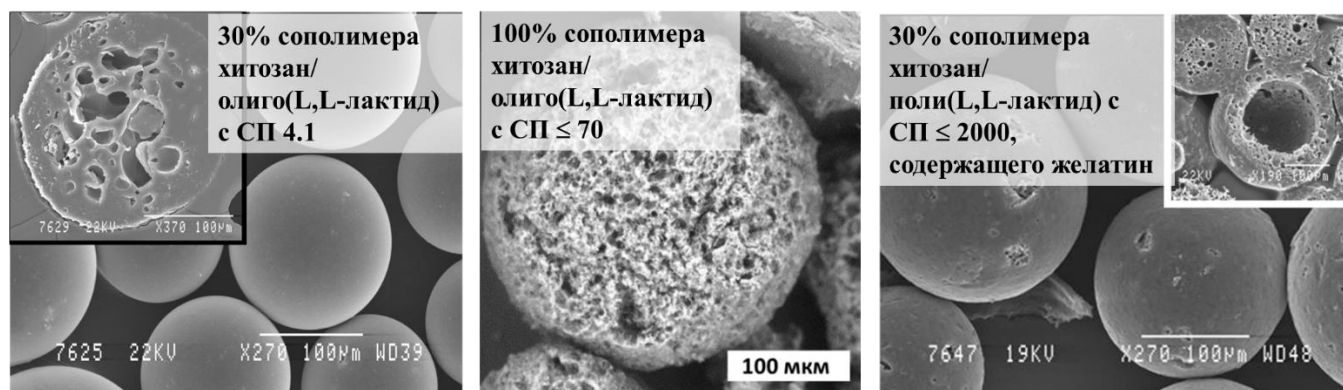


Рисунок 7 – СЭМ изображения поверхности и срезов микрочастиц, содержащих сополимеры хитозана с олиго/полилактидами с различной СП привитых цепей

В отличие от микрочастиц, полученных с использованием эмульгатора в дисперсионной среде, стабилизация границы раздела фаз при введении сополимеров в дисперсную фазу, вероятно, происходит за счет миграции их гидрофильных фрагментов к поверхности, что подтверждается данными исследования химического состава поверхностного слоя микрочастиц с помощью энергодисперсионной и ИК-МНПВО-спектроскопии. Содержание атомов азота на поверхности прямо пропорционально выходу микрочастиц. Наблюдаются логичные для такого

механизма зависимости между химической структурой и выходом микрочастиц: уменьшение ММ основной цепи и аморфная природа привитых цепей облегчают процесс миграции и, соответственно, стабилизации микрочастиц. При этом увеличение СП привитых цепей обеспечивает необходимые сополимеру амфифильные свойства, но при высоких значениях СП затрудняет процесс миграции гидрофильных фрагментов и стабилизацию границы раздела фаз.

Таким образом, модифицирование химической структуры хитозана позволяет получать микрочастицы методом испарения растворителя из эмульсий масло/вода с высоким выходом, требуемым распределением по размерам и регулируемой морфологией и структурой объема и поверхности. В зависимости от химической структуры производных и сополимеров хитозана они могут применяться или в качестве эмульгатора в дисперсионной среде или в качестве компонента материала микрочастиц путем введения их в дисперсную фазу, что позволяет получать «самостабилизирующиеся» микрочастицы без применения эмульгатора в дисперсионной среде. Перераспределение фрагментов сополимеров, обладающих различной гидрофильностью, в дисперсной фазе определяет способность таких микрочастиц к самоорганизации.

2.4. Поверхностно-селективное лазерное спекание микрочастиц, стабилизированных хитозаном и его сополимером

Поверхностно-селективное лазерное спекание (ПСЛС) является одним из методов аддитивных технологий и позволяет получать трехмерные структуры заданной архитектуры путем спекания поверхностного слоя полимерных частиц за счет поглощения лазерного излучения среднего ИК диапазона (~ 1.9 см) компонентом, нанесенным на поверхность частиц. При этом разогрева объема микрочастиц не происходит, а плавление их поверхностного слоя обеспечивается передачей тепла от нанесенного на поверхность компонента. Микрочастицы из полилактида, полученные методом испарения растворителя из эмульсий, стабилизированных производными и сополимерами хитозана, обладают поверхностью, обогащенной гидрофильными фрагментами, что позволяет использовать в качестве компонента, чувствительного к ИК лазерному излучению, адсорбированную воду. Оценено влияние состава дисперсионной среды на удельную площадь поверхности микрочастиц и адсорбцию на нее воды. Микрочастицы, стабилизированные сополимером, образуют более тонкий слой спекания и пригодны для получения трехмерных структур методом ПСЛС в широком диапазоне режимов (рис. 8).

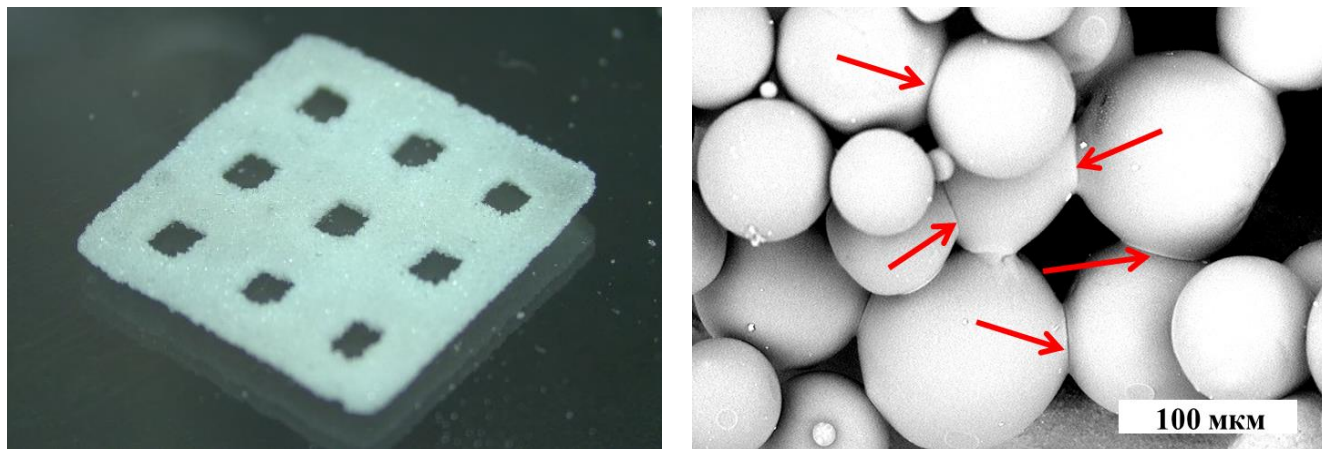


Рисунок 8 – Фотография и СЭМ изображение поверхности 3D материала, полученного методом ПСЛС из микрочастиц поли(L,L-лактида), стабилизированных сополимером ХО-К. Красными стрелками помечены области контактов микрочастиц

2.5. Макропористые гидрогели на основе хитозана, формируемые методом лиофильной сушки

Макропористые гидрогели являются одной из наиболее распространенных форм полимерных материалов для биомедицины и к их архитектуре предъявляются особо жесткие требования: должен быть обеспечен свободный ток питательных веществ и продуктов метаболизма, пространство для васкуляризации. Размер и морфология пор подбираются по типу клеток, для культивирования которых предназначен матрикс. На основе хитозана и его производных/сополимеров получен ряд макропористых гидрогелей, сшитых как ионно – через формирование полиэлектролитных комплексов, так и ковалентно. Структуру гидрогелей задавали оптимизацией режимов лиофильной сушки растворов полимеров.

Макропористые композиционные гидрогели на основе полиэлектролитного комплекса хитозана и гиалуроновой кислоты (ГК), содержащие равномерно распределенные наночастицы гидроксиапатита (нГА), получали в несколько этапов. нГА распределяли в растворе ГК с помощью ультразвуковой обработки; полученные дисперсии замораживали, сушили лиофильно и инкубировали в уксуснокислом водном растворе хитозана для образования полиэлектролитного комплекса ГК/хитозан. Для подтверждения формирования однородной химической структуры полимерной матрицы и расчета ее композиции был проведен элементный анализ, который показал, что вне зависимости от содержания нГА в образцах присутствует ~ 50 мас.% хитозана. Морфологию гидрогелей в сухом состоянии, а также наличие атомов Са и Р, принадлежащих нГА, оценивали методом СЭМ, совмещенным с

энергодисперсионной спектроскопией. Исследование степени резорбции полученных гидрогелей на основе хитозан/ГК в различных водных средах, показало высокую степень резорбции в условиях, имитирующих среду организма, то есть такие материалы могут быть пригодны для решения только отдельных задач регенеративной медицины.

Для получения более стабильных гидрогелей использовали сшивающие агенты (глутаровый альдегид или дженипин). Варьирование характеристик хитозана (X-190: ММ 190 кДа, СА 0.13 или X-320: ММ 320 кДа, СА 0.11) и природы сшивающего агента позволило сформировать макропористые гидрогели с различным размером пор и степенью их анизотропии. Исследование цитотоксичности полученных матриксов из сшитого хитозана методом экстракт-теста и поведения фибробластов мыши L929 после 4 сут. культивирования в гидрогелях не выявило значительных различий в образцах. Однако, МТТ-тест после 7 сут. культивирования показал, что количество жизнеспособных клеток на образцах гидрогелей на основе X-320 было выше, чем на гидрогелях из X-190. Для модифицирования свойств и увеличения цитосовместимости сшитых гидрогелей использовали дополнительное введение в состав матрикса гиалуроновой кислоты (рис. 9).

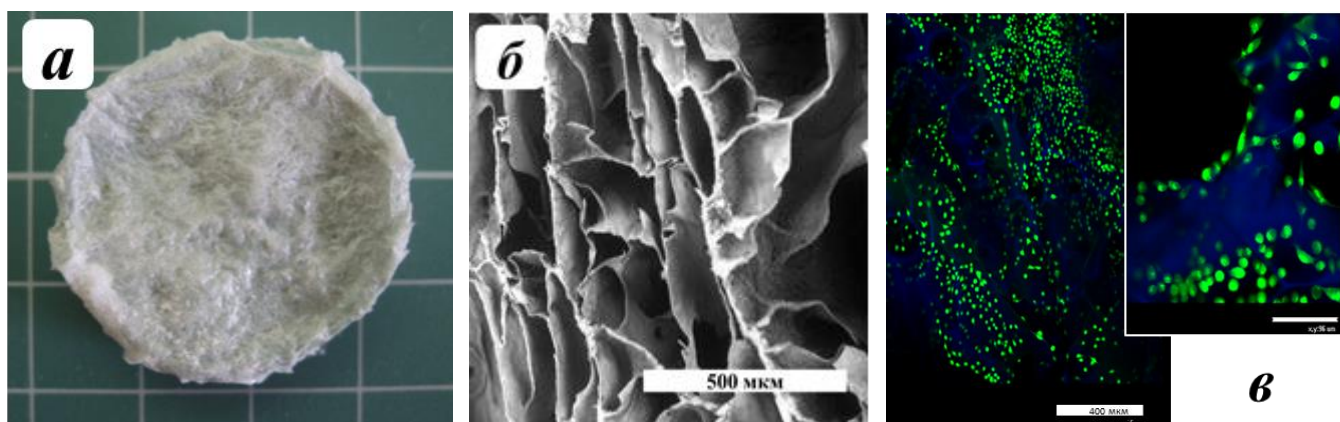


Рисунок 9 – Фотография (а), электронная микрофотография среза (б) и конфокальная микрофотография макропористого гидрогеля хитозан/гиалуроновая кислота, сшитого дженипином после 4 суток культивирования (в): синий цвет – стенки пор, зеленый - жизнеспособные клетки L929

Иммобилизацию ГК проводили двумя методами: предварительно полученные макропористые гидрогели из хитозана, сшитого дженипином, инкубировали в растворе ГК или смесь растворов хитозана с ГК сшивали дженипином и сушили лиофильно. На рис. 9 приведена фотография и микрофотография среза образца на основе X-320, сшитого дженипином, с ГК, введенной по второй методике (соотношение хитозан/ГК 5/1). Наличие ГК в составе гидрогелей способствовало

увеличению относительной жизнеспособности L929 при введении в образец на основе X-320 по первой методике на 16 % и на 30% при введении по второй методике для образца X-320. Для образца на основе X-190 такой зависимости не выявлено. Создание многокомпонентных материалов требует нескольких этапов формирования материала и может быть сопряжено с технологическими трудностями. Более простым и эффективным подходом к регулированию свойств гидрогелей на основе хитозана является модифицирование его химической структуры.

Использование *хитозана, ацилированного гидроксикарбоновой кислотой и сополимеров с привитыми цепями олиголактоидов* позволило получить макропористые гидрогели с требуемым размером пор, регулируемой скоростью биодеградации и повышенной цитосовместимостью. Гидрогели получали путем лиофильной сушки замороженных кислых водных растворов хитозана и его производных/сополимеров с последующей термической обработкой для перевода в нерастворимую в воде форму. Средний размер пор, их распределение по размерам, а также толщина стенок пор зависят от химической структуры полимера, используемого для получения гидрогеля, и связано с разницей в упаковке макромолекул. Расчет площади стенок пор в срезе набухших образцов показал, что стенки пор, сформованные в гидрогеле из немодифицированного хитозана и ХЛ-2, характеризуются практически одинаковой площадью, тогда как образец из ХК-2 обладает более плотной структурой. Гидрогели из немодифицированного хитозана имеют наибольший средний размер пор (123 мкм), в то время как образцы на основе производных хитозана имеют средний размер пор 75–77 мкм. В случае гидрогелей из сополимеров хитозана с олиголактоидами значительную роль играют характеристики основной цепи и привитых цепей. Межмолекулярные взаимодействия привитых боковых цепей олиго(L-лактоидов) приводят к снижению эффективности сшивания материалов при термической обработке и более высокой степени влагопоглощения макропористых гидрогелей, чем в случае гидрогелей из немодифицированного хитозана и его сополимеров с олиго(L,D-лактоидом). Образцы на основе хитозана с высокой ММ и его сополимеров имеют больше вторичных пор в составе первичных по сравнению с образцами на основе низкомолекулярного хитозана, что может быть следствием различной упаковки макромолекул в растворе и особенностей кристаллизации воды при замораживании растворов.

Важным параметром, влияющим на возможность применения полученных гидрогелей в качестве подложки для прикрепления и роста клеток и зависящим от структуры полимера, является заряд поверхности, который определяет адсорбцию белков на поверхности матриксов. Исследование ξ -потенциала и сорбции альбумина

показало, что замещение аминогрупп хитозана приводит к снижению положительного ξ -потенциала и уменьшению адсорбции белка на поверхности материалов из производных/сополимеров хитозана.

Исследование способности полученных гидрогелей поддерживать адгезию и рост животных клеток изучали *in vitro* с использованием линии мышечных фибробластов L929. Модифицирование химической структуры хитозана приводило к существенному увеличению цитосовместимости образцов: относительная жизнеспособность клеток при культивировании в гидрогелях из производных хитозана была выше на 20–80%, чем при культивировании в гидрогеле из немодифицированного хитозана (рис. 10).

Введение в химическую структуру хитозана объемного заместителя (образец ХК-2) приводит к снижению скорости биодеградации гидрогеля в присутствии фермента лизоцима по сравнению с немодифицированным хитозаном, в то время как гидрогели на основе сополимера хитозана с олиго(L,D-лактидом) (ХЛ-2) характеризуются повышенной скоростью деградации.

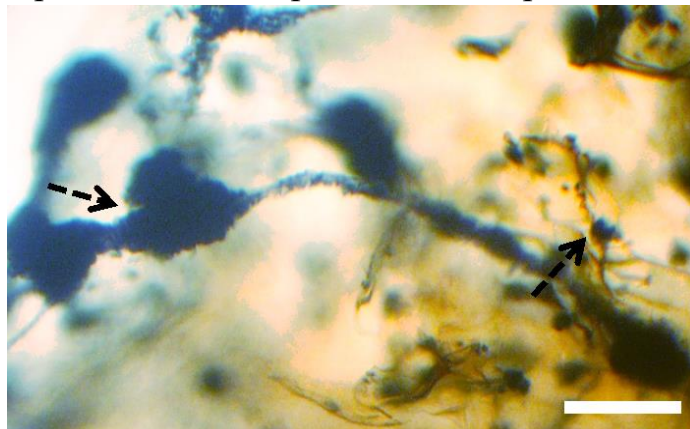


Рисунок 10 – Микрофотографии клеток фибробластов мыши L929 после их культивирования на гидрогелях из ХК-2 в течение 2-х недель. Масштабная линейка 200 мкм

Таким образом, разработаны способы получения композиционных макропористых гидрогелей на основе хитозана, сшитого как ионно, так и ковалентно. Показана возможность направленного регулирования скорости биодеградации и цитосовместимости путем варьирования химической структуры хитозана. Использование производных/сополимеров хитозана позволяет более точно и в широком диапазоне регулировать свойства гидрогелей без дополнительных компонентов и стадий формования.

2.6. Гидрогели с заданной архитектурой на основе производных и сополимеров хитозана, полученные методом лазерно-индуцированной стереолитографии

Для создания гидрогелей с четко заданной архитектурой использовали метод лазерно-индуцированной стереолитографии функционализированных производных/сополимеров хитозана – аллилхитозан и сополимеры хитозана с привитыми цепями олиголактида. Эффективность синтезированных производных и

сополимеров в качестве основы фоточувствительной композиции для получения структурированных гидрогелей методом лазерной стереолитографии можно оценить по соответствию трем основным параметрам: (1) фоточувствительная композиция должна сшиваться/отверждаться под воздействием лазерного излучения; (2) все элементы цифровой модели должны воспроизводиться в натуре без искажений; (3) полученная структура должна сохранять монолитность/целостность при очистке от несшитых фрагментов и обладать достаточными механическими характеристиками для проведения дальнейших исследований.

Использование аллилхитозана в качестве полимерной основы для одно- и двухфотонной лазерной стереолитографии позволило получить ряд материалов различной структуры (рис. 11). Гидрогели, полученные двухфотонной стереолитографией, были исследованы с точки зрения совместимости с различными клеточными линиями, в том числе с клетками нервной ткани. Показано, что структура материалов обеспечивает адгезию первичных культур клеток гиппокампа, а гидрогели, сформованные на основе смеси аллилхитозана и метакрилированной гиалуроновой кислоты, стимулируют образование отростков нервных клеток и поддерживают формирование нейронных сетей.

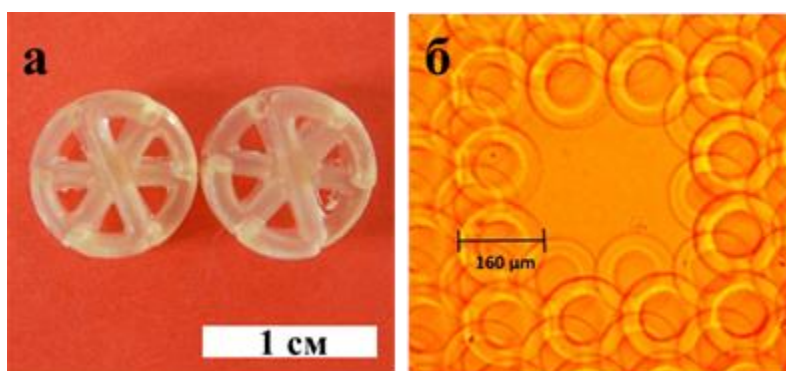


Рисунок 11 – Структуры, полученные однофотонной (а) и двухфотонной (б) лазерной стереолитографией с использованием аллилхитозана в качестве полимерной основы фоточувствительной композиции

Исследование возможности получения структурированных гидрогелей методом двухфотонной лазерной стереолитографии из сополимеров хитозана с короткими привитыми цепями олиго(D,L-лактида) показало, что стабильные трехмерные структуры после очистки от несшитых фрагментов можно получить только из образца со СП 9.7. Увеличение СЗ аминогрупп хитозана и СП привитых цепей олиголактида в сополимерах благоприятствует протеканию фотоиницированной сшивки. Увеличение СП не только позволило получить более длинные гибкие спейсеры между макромолекулами и большее количество сшивок, но и сместило баланс в сторону гидрофобной составляющей.

Пригодность сополимеров хитозана со привитыми цепями олиголактида с СП ≤ 70 для проведения процесса была оценена не только с точки зрения эффективности сшивания под воздействием лазера, воспроизведения цифровой модели и достаточной прочности полученных структур, но и возможности оптимизации параметров прохождения лазера, определяемых расстоянием между линиями (параметр XY) и слоями (параметр Z). На рис. 12 обозначены оптимальные параметры получения гидрогелей из полимеров, которые могут быть использованы в качестве основы фоточувствительной композиции. Использование нативного хитозана X-350 позволяет получать гидрогели с очень низкими механическими характеристиками. При использовании композиции на основе его сополимера с олиголактидом (образец ХЛЛ-к) полученные в процессе стереолитографии структуры разрушаются при очистке от несшитых фрагментов. Использование образцов ХЛЛ-т и ХЛД-т в качестве основы фоточувствительной композиции позволяет получать гидрогели методом лазерной стереолитографии, которые обладают меньшей степенью набухания и достаточно высокими прочностными характеристиками. Однако пригодность сополимеров для лазерной стереолитографии зависит не только от СП привитых цепей олиголактида, но и от стереохимического состава: введение аморфного олиго(L,D-лактида) приводит к более эффективному сшиванию композиции при выбранных параметрах проведения процесса с высокой воспроизводимостью заданной структуры, чем аморфно-кристаллического олиго(L-лактида). Вероятно, это связано с разным вкладом привитых цепей во внутри-/межмолекулярные взаимодействия в растворах сополимеров и, как следствие, большей гетерогенностью материалов,

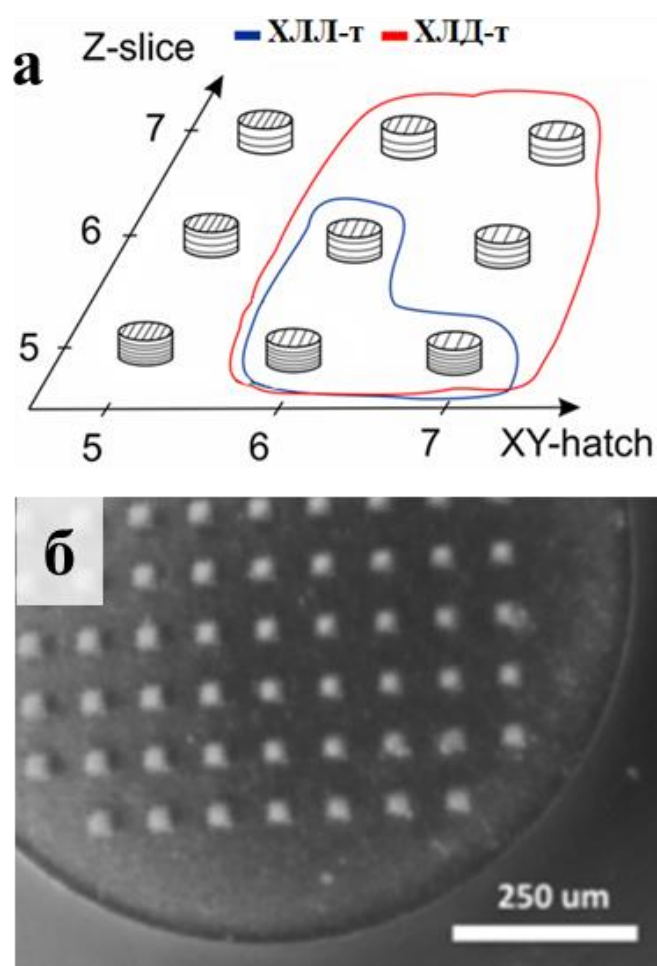


Рисунок 12 – Оптимальные параметры получения гидрогелей на основе сополимеров хитозана со средней СП привитых цепей олиголактидов (а); микрофотография получаемых структур (б)

как было показано ранее для пленочных материалов и гидрогелей, сформованных методом лиофильной сушки.

Гидрогели на основе производных и сополимеров хитозана перспективны в качестве матриц для регенерации нервных тканей, создание которых требует регулирования многих параметров материала (цитосовместимость, скорость биодеградации, деформационно-прочностные характеристики, трехмерная архитектура и т.д.). Исследования по возможности применения гидрогелей на основе сополимеров хитозана с олиголактидами в качестве подложки для адгезии и роста различных клеточных линий, в том числе нейрональных, показали их соответствие требуемым параметрам.

Таким образом, модификации хитозана, содержащие в боковой цепи остатки полимолочной кислоты и аллильные фрагменты, могут быть успешно использованы в качестве полимерной основы фоточувствительной композиции для структурирования гидрогелей методом лазерно-индуцированной стереолитографии. Полученные структурированные гидрогели перспективны в качестве материалов для тканевой инженерии, в частности для регенерации нервной ткани.

Основные результаты и выводы

1. Разработана методология создания новых функциональных полимерных материалов биомедицинского назначения путем твердофазного механохимического модифицирования хитозана введением заместителей, позволяющих придать полисахариду набор регулируемых свойств и расширить его способность к переработке.

2. Реакции алкилирования и ацилирования хитозана в условиях механохимической обработки приводят к получению избирательно и неизбирательно замещенных производных хитозана. Твердофазная реакция нуклеофильного присоединения бромистого аллила к хитозану в отсутствие щелочи протекает избирательно по аминогруппам хитозана, в то время как проведение процесса в щелочной среде приводит к образованию как O-, так и N-замещенных алкилпроизводных. Суммарное содержание аллильных заместителей в образцах составляет от 5 до 50 в расчете на 100 звеньев хитозана и зависит от исходного соотношения компонентов в реакционных смесях. В реакциях ацилирования хитозана гидроксикарбоновой кислотой и циклическим димером молочной кислоты в условиях механохимического модифицирования в отсутствие катализа образуются преимущественно N-замещенные производные со степенью замещения аминогрупп до 0.41-0.43.

3. Механохимическое взаимодействие хитозана с олигомерами, полимерами и сополимерами лактида позволяют получать привитые сополимеры с различной молекулярной массой основной цепи хитозана, стереохимическим строением, количеством и степенью полимеризации привитых цепей, которые определяют их растворимость в водных и/или органических средах, морфологию и свойства материалов на их основе.

4. Механохимический подход позволяет получать в одностадийном процессе многокомпонентные сополимерные системы с возможностью одновременного введения в них дополнительных биоактивных компонентов, например, белков для придания материалам специфических биологических свойств.

5. Методами, которые для немодифицированного хитозана не могут быть применены, такими как расплавные технологии, лазерная стереолитография, формование и электроформование из хлорсодержащих растворителей, на основе синтезированных амфифильных производных и сополимерных систем хитозана получен ряд дву- и трехмерных полимерных материалов с заданной структурой и свойствами, необходимыми для их применения в качестве биodeградируемых имплантов.

6. Эффективность лазерно-индуцированного сшивания полимерных композиций возрастает с увеличением степени замещения функциональных групп хитозана и степени полимеризации олиголактида в сополимерах, а также в случае прививки аморфного олиго(L,D-лактида) на хитозан по сравнению с аморфно-кристаллическим стереоизомером, что определяется разным характером взаимодействия привитых цепей в растворах.

7. Разработаны способы формирования макропористых гидрогелей с регулируемой скоростью биodeградации на основе хитозана и его производных и сополимеров; композиционных гидрогелей на основе хитозана и гиалуроновой кислоты. Изучение взаимосвязи структуры, физико-химических и биологических свойств макропористых гидрогелей показало, что степень влагопоглощения, скорость ферментативного гидролиза и цитосовместимость гидрогелей, определяются природой и строением заместителей в боковой цепи хитозана.

8. Характеристики основной цепи и привитых фрагментов в сополимерах хитозана с олиго/полиэфирами определяют их способность к использованию в качестве компонента дисперсной фазы при получении самоорганизующихся микрочастиц без применения эмульгаторов в дисперсионной среде. При применении производных и сополимеров хитозана в качестве эмульгаторов в дисперсионной среде их способность стабилизировать границу раздела фаз возрастает с увеличением

степени замещения функциональных групп хитозана гидрофобными заместителями и степени полимеризации олиголактида в сополимерах.

9. Наночастицы, полученные из хитозана и его производных, служат эффективными стабилизаторами границы раздела фаз в эмульсиях Пикеринга при получении микрочастиц; степень анизотропии, размер и однородность распределения наночастиц по размеру существенно влияют на выход микрочастиц, их форму, распределение по размерам и морфологию поверхности. Состав и свойства поверхности микрочастиц позволяют использовать их в качестве исходных материалов при получении трехмерных структур методом поверхностно-селективного лазерного спекания.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы

Основные результаты настоящей диссертационной работы можно использовать для дальнейшего расширения фундаментальных основ процессов, протекающих при механохимическом модифицировании высокомолекулярных соединений. Данное направление химии имеет значительные перспективы, что показывает включение механохимических технологий в десятку передовых направлений, которые будут определять будущее химии согласно выводам Всемирного химического конгресса ИЮПАК в 2019 г. Важным результатом проведенных в диссертационной работе исследований является расширение спектра доступных методик формирования материалов из модифицированного хитозана, что открывает перспективы для его применения в различных областях. Полученные результаты перспективны для использования в области регенеративной медицины, одной из ключевых проблем которой является сложность формирования полимерных материалов для создания биodeградируемых тканеинженерных конструкций и искусственных органов. Полученные результаты показывают перспективность развития темы в направлениях механохимического модифицирования других полимеров, в том числе предназначенных для смежных областей материаловедения.

Статьи, опубликованные в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

1. Demina T.S. Biodegradable cell microcarriers based on chitosan/polyester graft-copolymers / T.S. Demina, M.G. Drozdova, C. Sevrin, P. Compère, T.A. Akopova, E. Markvicheva, C. Grandfils // *Molecules* – 2020. – V. 25. – P. 1949.
2. Demina T.S. Multicomponent non-woven fibrous mats with balanced processing and functional properties / T.S. Demina, A.S. Kuryanova, P.Y. Bikmulina, N.A. Aksenova,

- Y.M. Efremov, Z.I. Khaibullin, P.L. Ivanov, N.V. Kosheleva, P.S. Timashev, T.A. Akopova // *Polymers* – 2020. – V. 12 – P. 1911.
3. Минаев Н.В. Развитие метода поверхностно-селективного лазерного спекания: модификация и формирование 3D структур для тканевой инженерии / Н.В. Минаев, Т.С. Демина, С.А. Минаева, А.А. Дулясова, Е.Д. Минаева, С.А. Гончуков, Т.А. Аكوпова, П.С. Тимашев // *Известия РАН. Серия физическая* – 2020. – Т. 84. – № 11. – С. 1530-1536;
 4. Revkova V.A. Chitosan-g-oligo(L,L-lactide) copolymer hydrogel potential for neural stem cell differentiation / V.A. Revkova, E.A. Grebenik, V.A. Kalsin, T.S. Demina, K.N. Bardakova, B.S. Shavkuta, P.A. Melnikov, E.M. Samoilova, M.A. Konoplyannikov, Y.M. Efremov, C. Zhang, T.A. Akopova, A.V. Troitsky, P.S. Timashev, V.P. Baklaushev // *Tissue Engineering Part A* – 2020. – V. 26. – № 17-18. – P. 953-963;
 5. Demina T.S. Materials based on protein-contained chitosan-g-oligo-/polylactide copolymers synthesized through mechanochemical approach / T.S. Demina, T.N. Popyrina, A.S. Kuryanova, E.V. Istranova, C. Grandfils, P.S. Timashev, T.A. Akopova // *Materials Today: Proceedings.* – 2020. – V. 25. – P. 490-492.
 6. Grebenik E. Chitosan-g-oligo(L,L-lactide) copolymer hydrogel for nervous tissue regeneration in glutamate excitotoxicity: In vitro feasibility evaluation / E. Grebenik, A. Surin, K. Bardakova, T. Demina, N. Minaev, N. Veryasova, M. Artyukhova, I. Krasilnikova, Z. Bakaeva, E. Sorokina, D. Boiarkin, T. Akopova, V. Pinelis, P. Timashev // *Biomedical Materials.* – 2020. – V. 15. – № 1. – P. 015011.
 7. Demina T.S. Chitosan-g-oligo/polylactide copolymer non-woven fibrous mats containing protein: from solid-state synthesis to electrospinning / T.S. Demina, A.S. Kuryanova, N.A. Aksenova, A.G. Shubnyy, T.N. Popyrina, Y.V. Sokovikov, E.V. Istranova, P.L. Ivanov, P.S. Timashev, T.A. Akopova // *RSC Advances.* – 2019. – V. 9. – P. 37652 - 37659.
 8. Demina T.S. Coating of polylactide films by chitosan: comparison of methods / T.S. Demina, A.A. Frolova, A.V. Istomin, S.L. Kotova, M.S. Piskarev, K.N. Bardakova, M.Yu. Yablokov, V.A. Altynov, L.I. Kravets, A.B. Gilman, T.A. Akopova, P.S. Timashev // *Journal of Applied Polymer Science.* – 2020. – V. 137. – № 3. – P. 48287;
 9. Demina T.S. Chitosan-g-polyester microspheres: effect of length and composition of grafted chains / T.S. Demina, C. Sevrin, C. Kapchiekue, T.A. Akopova, C. Grandfils // *Macromolecular Materials and Engineering.* – 2019. – V. 304. – P. 1900203.
 10. Demina T.S. Solid-state modified polylactides for processing of 3D materials with enhanced biocompatibility / T.S. Demina, Ch. Grandfils // *Materials Today: Proceedings.* – 2019. – V. 12. – P. 93–96.

11. Akopova T.A. Solvent-free synthesis and characterization of allyl chitosan derivatives / T.A. Akopova, T.S. Demina, G.V. Cherkaev, M.A. Khavpachev, K.N. Bardakova, A.V. Grachev, L.V. Vladimirov, A.N. Zelenetskii, P.S. Timashev // RSC Advances. – 2019. – V. 9. – P. 20968-20975.
12. Romanova O.A. Non-woven bilayered biodegradable chitosan-gelatin-poly lactide scaffold for bioengineering of tracheal epithelium / O.A. Romanova, T.H. Tenchurin, T.S. Demina, E.A. Sytina, A.D. Shepelev, S.G. Rudyak, O.I. Klein, S.V. Krashennnikov, E.I. Safronova, R.A. Kamyshinsky, V.G. Mamagulashvili, T.A. Akopova, S.N. Chvalun, A.A. Panteleyev // Cell Proliferation. – 2019. – V. 52. – № 3 – P. 12598.
13. Bardakova K.N. 3D printing biodegradable scaffolds with chitosan materials for tissue engineering / K.N. Bardakova, T.S. Demina, E.A. Grebenik, N.V. Minaev, T.A. Akopova, V.N. Bagratashvili, P.S. Timashev // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. – 2018. – V. 347. – P. 012009.
14. Demina T.S. Preparation of poly(L,L-Lactide) microparticles via Pickering emulsions using chitin nanocrystals / T.S. Demina, Yu.S. Sotnikova, A.V. Istomin, Ch. Grandfils, T.A. Akopova, A.N. Zelenetskii // Advances in Materials Science and Engineering. – 2018. – P. 1-8.
15. Demina T.S. Two-photon-induced microstereolithography of chitosan-g-oligolactides as a function of their stereochemical composition / T.S. Demina, K.N. Bardakova, N.V. Minaev, E.A. Svidchenko, A.V. Istomin, G.P. Goncharuk, L.V. Vladimirov, A.V. Grachev, A.N. Zelenetskii, P.S. Timashev, T.A. Akopova // Polymers. □ 2017. – V. 9. – № 7. – P. 302.
16. Demina T.S. Macroporous hydrogels based on chitosan derivatives: preparation, characterization and in vitro evaluation / T.S. Demina, D.S. Zaytseva-Zotova, T.A. Akopova, A.N. Zelenetskii, E.A. Markvicheva // Journal of Applied Polymer Science. – 2017. – V. 134. – № 13. – P. 44651.
17. Демина Т.С. Получение микроструктурированных материалов на основе сополимеров хитозана и D,L-лактида методом лазерно-индуцированной микростереолитографии / Т.С. Демина, К.Н. Бардакова, Е.А. Свидченко, Н.В. Минаев, Г.И. Пудовкина, М.М. Новиков, Д.В. Бутнару, Н.М. Сурин, Т.А. Акопова, В.Н. Баграташвили, А.Н. Зеленецкий, П.С. Тимашев // Химия высоких энергий. – 2016. – Т. 50. – №5. – С. 411-416.
18. Кильдеева Н.Р. Биодеградируемые матриксы на основе хитозана: получение, свойства, использование для культивирования животных клеток / Н.Р. Кильдеева, М.А.Касаткина, М.Г. Дроздова, Т.С. Демина, С.А. Успенский, С.Н. Михайлов, Е.А.

- Марквичева // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016. – Т. 52. – № 5. – С. 504-512.
19. Тимашев П.С. Совместимость клеток нервной системы и структурированных биodeградируемых гидрогелевых матриц на основе хитозана / П.С. Тимашев, К.Н. Бардакова, Н.В. Минаев, Т.С. Демина, Т.А. Мищенко, Е.В. Митрошина, А.А. Акованцева, А.В. Королева, Д.С. Асютин, Л.Ф. Пименова, Н.А. Коновалов, Т.А. Акопова, А.Б. Соловьева, И.В. Мухина, М.В. Ведунова, Б.Н. Чичков, В.Н. Баграташвили // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016. – Т. 52. – № 5. – С. 495-503.
20. Cherkasova A.V. Chitosan impregnation with biologically active tryaryl imidazoles in supercritical carbon dioxide / A.V. Cherkasova, N.N. Glagolev, A.I. Shienok, T.S. Demina, S.L. Kotova, N.L. Zaichenko, Т.А. Аkopova, P.S. Timashev, V.N. Bagratashvili, A.B. Solovieva // Journal of Material Science: Materials in Medicine. – 2016. – V. 27. – № 9. – P. 141.
21. Demina T.S. Polylactide-based microspheres prepared using solid-state copolymerized chitosan and D,L-lactide / T.S. Demina, Т.А. Аkopova, L.V. Vladimirov, A.N. Zelenetskii, E.A. Markvicheva, Ch. Grandfils // Materials Science and Engineering: C. – 2016. – V. 59. – P. 333-338.
22. Demina T.S. Chitosan-g-lactide copolymers for fabrication of 3D scaffolds for tissue engineering / T.S. Demina, D.S. Zaytseva-Zotova, P.S. Timashev, V.N. Bagratashvili, K.N. Bardakova, Ch. Sevrin, E.A. Svidchenko, N.M. Surin, E.A. Markvicheva, Ch. Grandfils, Т.А. Аkopova // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. – 2015. – V. 87 – P. 012074.
23. Аkopova Т.А. Solid state synthesis of chitosan and its unsaturated derivatives for laser microfabrication of 3D scaffolds / Т.А. Аkopova, T.S. Demina, V.N. Bagratashvili, K.N. Bardakova, M.M. Novikov, I.I. Selezneva, A.V. Istomin, E.A. Svidchenko, G.V. Cherkaev, N.M. Surin, P.S. Timashev // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. – 2015. – V. 87 – P. 012079.
24. Тимашев П.С. Новый биосовместимый материал на основе модифицированного твердофазным методом хитозана для лазерной стереолитографии / П.С. Тимашев, К.Н. Бардакова, Т.С. Демина, Г.И. Пудовкина, М.М. Новиков, М.А. Марков, Д.С. Асютин, Л.Ф. Пименова, Е.А. Свидченко, А.М. Ермаков, И.И. Селезнева, В.К. Попов, Н.А. Коновалов, Т.А. Акопова, А.Б. Соловьева, В.Я. Панченко, В.Н. Баграташвили // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7. – № 3. – С. 20-31.

25. Akopova T.A. Solid-state synthesis of unsaturated chitosan derivatives to design 3D structures through two-photon-induced polymerization / T.A. Akopova, P.S. Timashev, T.S. Demina, K.N. Bardakova, N.V. Minaev, V.F. Burdukovskii, G.V. Cherkaev, L.V. Vladimirov, A.V. Istomin, E.A. Svidchenko, N.M. Surin, V.N. Bagratashvili // *Mendeleev Communications*. – 2015. – V. 25. – P. 280-282.
26. Тимашев П.С. Получение микроструктурированных материалов на основе хитозана и его производных методом двухфотонной полимеризации / П.С. Тимашев, Т.С. Демина, Н.В. Минаев, К.Н. Бардакова, А.В. Королева, О.А. Куфельт, Б.Н. Чичков, В.Я. Панченко, Т.А. Аكوпова, В.Н. Баграташвили // *Химия высоких энергий*. – 2015. – Т. 49. – № 4. – С. 337-340.
27. Demina T.S. DC discharge plasma modification of chitosan films: an effect of chitosan chemical structure / T.S. Demina, M.G. Drozdova, M.Yu. Yablokov, A.I. Gaidar, A.B. Gilman, D.S. Zaytseva-Zotova, E.A. Markvicheva, T.A. Akopova, A.N. Zelenetskii // *Plasma Processing and Polymers*. – 2015. – V. 12. – № 8. – P. 710-718.
28. Demina T. DC discharge plasma modification of chitosan/gelatin/PLLA films: surface properties, chemical structure and cell affinity / T. Demina, D. Zaytseva-Zotova, M. Yablokov, A. Gilman, T. Akopova, E. Markvicheva, A. Zelenetskii // *Surface & Coatings Technology*. – 2012. – V. 207. – P. 508–516.
29. Akopova T.A. A novel approach to design chitosan-polyester materials for biomedical applications / T.A. Akopova, T.S. Demina, A.N. Shchegolikhin, T.S. Kurkin, Ch. Grandfils, N.S. Perov, A.S. Kechekyan, A.N. Zelenetskii // *International Journal of Polymer Science*. – 2012. – P. 827967.
30. Демина Т.С. Влияние обработки в разряде постоянного тока на свойства поверхности композитных пленок хитозан/поли(L,L-лактид)/желатина / Т.С. Демина, М.Ю. Яблоков, А.Б. Гильман, Т.А. Аكوпова, А.Н. Зеленецкий // *Химия высоких энергий*. – 2012. – Т. 46. – №1. – С. 64-69.
31. Аكوпова Т.А. Амфифильные системы на основе полисахаридов, полученные методом твердофазного синтеза / Т.А. Аكوпова, Т.С. Демина, А.Н. Зеленецкий // *Химические волокна*. – 2012. – №4. – С. – 18-22.
32. Демина Т.С. Исследование взаимодействия хитозана и 2,2-бис(гидроксиметил)пропионовой кислоты в условиях твердофазного синтеза / Т.С. Демина, Т.А. Аكوпова, Л.В. Владимиров, А.Н. Щеголихин, А.С. Кечекьян, Н.С. Перов, А.О. Чернышенко, А.Н. Зеленецкий // *Высокомолекулярные соединения Серия Б*. – 2011. – Т. 53. – № 6. – С. 995–1008.