

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

Диссертация на соискание ученой степени
доктора химических наук

Научный консультант:
доктор химических наук
Акопова Татьяна Анатольевна

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	20
1.1. Хитозан, его производные и привитые сополимеры.....	20
1.1.1. Получение и структура хитина и хитозана.....	20
1.1.2. Влияние структуры хитозана на его свойства.....	24
1.1.3. Модифицирование химической структуры хитозана.....	25
1.1.3.1. Синтез производных и привитых сополимеров хитозана.....	25
1.1.3.2. Привитые сополимеры хитозана с олиго/полилактидом.....	28
1.1.3.3. Механохимический метод синтеза производных и привитых сополимеров хитозана.....	33
1.2. Материалы для регенеративной медицины на основе хитозана, его производных и сополимеров.....	37
1.2.1. Регенеративная медицина: материалы, типы и основные методы формирования матриц.....	37
1.2.2. Пленки и покрытия на основе хитозана.....	41
1.2.3. Нетканые материалы на основе хитозана.....	43
1.2.4. Хитозансодержащие нано-/микрочастицы.....	45
1.2.5. Гидрогели на основе хитозана.....	50
1.2.6. Аддитивные технологии при создании хитозансодержащих материалов.....	56
1.3. Краткие выводы и постановка задач исследования.....	61
2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	64
2.1. Полимераналогичные превращения хитозана и синтез привитых сополимеров на его основе.....	64
2.1.1. Синтез функциональных производных хитозана.....	64
2.1.1.1. Аллилхитозан.....	64
2.1.1.2. N-ацилированный гидроксикарбоновой кислотой хитозан.....	70
2.1.2. Синтез привитых сополимеров хитозана с олиго/полилактидами с	

различной длиной боковой цепи.....	75
2.1.2.1. Сополимеры хитозана с короткими привитыми цепями олиго(L,D-лактида).....	76
2.1.2.2. Сополимеры хитозана со средней степенью полимеризации привитых цепей олиголактида.....	81
2.1.2.3. Сополимеры хитозана с высокомолекулярными полиэфирами.....	90
2.1.2.4. Привитые сополимеры хитозана, наполненные коллагеном и желатином.....	94
2.2. Формование материалов на основе хитозана, его производных и привитых сополимеров.....	100
2.2.1. Пленочные материалы.....	100
2.2.1.1. Влияние основных характеристик хитозана, его производных и сополимеров на структуру и свойства пленок.....	100
2.2.1.2. Формование пленок с использованием методов, переработка по которым невозможна для немодифицированного хитозана.....	109
2.2.1.3. Получение покрытий и тонких пленок из хитозана.....	113
2.2.2. Нетканые нано-/микроволокнистые материалы.....	122
2.2.3. Сферические микрочастицы на основе хитина, хитозана, его производных и сополимеров с олиго/полиэфирами.....	130
2.2.3.1. Модифицирование состава дисперсионной среды.....	132
2.2.3.1.1. Использование растворов производных и сополимеров хитозана в качестве эмульгаторов в дисперсионной среде.....	133
2.2.3.1.2. Использование наночастиц хитина, хитозана и его производных в качестве эмульгаторов в дисперсионной среде.....	138
2.2.3.1.2.1. Использование наночастиц, полученных методом «сверху-вниз».....	138
2.2.3.1.2.2. Использование наночастиц, полученных методом «снизу-вверх».....	142

2.2.3.2. Модифицирование состава дисперсной фазы.....	145
2.2.3.2.1. Получение сферических микрочастиц с использованием сополимеров хитозана с короткими цепями олиго(L,D-лактида) в дисперсной фазе.....	145
2.2.3.2.2. Получение сферических микрочастиц с использованием сополимеров хитозана со средней длиной привитых цепей олиго(L,L-/L,D-лактида) в дисперсной фазе.....	149
2.2.3.2.3. Получение сферических микрочастиц с использованием сополимеров хитозана с высокомолекулярными полиэфирами.....	154
2.2.3.3. Особенности формирования микрочастиц с использованием сополимеров хитозана с олиго/полиэфирами.....	159
2.2.3.4. Оценка технологичности процесса получения микрочастиц на основе сополимеров: возможности масштабирования, варьирования природы полимера в дисперсной фазе и параметров процесса.....	167
2.2.4. Поверхностно-селективное лазерное спекание микрочастиц, стабилизированных хитозаном и его сополимером.....	169
2.2.5. Макропористые гидрогели на основе хитозана, формируемые методом лиофильной сушки.....	174
2.2.5.1. Макропористые гидрогели на основе ионно и ковалентно сшитого хитозана.....	175
2.2.5.2. Макропористые гидрогели на основе производных и сополимеров хитозана.....	185
2.2.6. Гидрогели с заданной архитектурой на основе производных и сополимеров хитозана, полученные методом лазерно-индуцированной стереолитографии.....	194
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	202
3.1. Характеристики исходных соединений.....	202
3.2. Синтез и исследование производных и привитых сополимеров	

хитозана.....	205
3.2.1. Синтез производных и привитых сополимеров хитозана.....	205
3.2.2. Методы исследования производных и сополимеров хитозана.....	209
3.3. Методы получения материалов на основе хитозана, его производных и привитых сополимеров.....	214
3.4. Методы исследования материалов из хитозана, его производных и сополимеров.....	224
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	228
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	233
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	234
БЛАГОДАРНОСТИ.....	280
ПРИЛОЖЕНИЕ «Отчет по гистологическим исследованиям биосовместимости матриксов из привитых сополимеров хитозана с полилактидом, на модели подкожной имплантации крысам».....	281

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования связана с необходимостью создания функциональных полимерных материалов, удовлетворяющих жестким критериям, предъявляемым к изделиям биомедицинского назначения и пригодных для использования в качестве матриц для регенеративной медицины. Для увеличения продолжительности жизни и повышения ее качества необходимо развивать персонализированную медицину, которая включает в себя разработку биodeградируемых материалов для культивирования субстрат-зависимых клеток, пригодных для использования в качестве полимерной основы при создании искусственных биотканей или органов. Отсутствие функциональных материалов, которые бы поддерживали процесс регенерации и со временем полностью замещались нативной тканью, является одной из основных проблем, тормозящих переход регенеративной медицины в клиническую практику. Ограниченный набор подходящих полимеров, строгие требования к составу, морфологии и свойствам материалов на их основе, необходимость разработки технологических подходов для создания персонализированных под конкретных пациентов изделий определяет сложность задачи.

Модифицирование химической структуры полимера является одним из наиболее перспективных инструментов для создания высокотехнологичных материалов, так как она определяет способность к формированию материалов заданной морфологии с использованием современных подходов и, в частности, аддитивных технологий, а также определяет свойства материала, в том числе скорость биodeградации, биосовместимость и биоактивность. В качестве базового полимера в диссертационной работе выбран хитозан – продукт деацетилирования природного полисахарида хитина – который обладает набором перспективных свойств, но его применение в медицине ограничено использованием в качестве раневых покрытий и т.д. Целевое модифицирование химической структуры хитозана позволит увеличить диапазон доступных методов для формирования

материалов на его основе, целенаправленно регулировать их свойства и, таким образом, расширить возможности его применения в медицине. Значительной проблемой при модифицировании химической структуры хитозана является низкая эффективность растворных и расплавных подходов, необходимость использования многостадийных схем синтеза с применением растворителей и катализаторов, что может быть небезопасно для дальнейшего применения таких полимеров в медицине. В диссертационной работе использован механохимический подход, который отличается высокой экологичностью, производительностью и эффективностью.

Разработка научных основ создания материалов для регенеративной медицины является целью настоящей диссертации, но разделение подходов к получению хитозансодержащих материалов для разных применений и, в частности, для биомедицины достаточно условно. Полученные материалы можно использовать при создании подложек для культивирования клеток *in vitro*, а также систем с пролонгированным выделением биоактивных соединений. Во-вторых, выявленные зависимости модифицирования химической структуры и ее влияния на способность к формированию материалов различной архитектуры и на свойства этих материалов также имеют практическую ценность в смежных областях химической технологии и материаловедения. Разработанные в рамках диссертационной работы методики получения функциональных материалов позволят расширить практическое применение хитозана, который является производным второго по распространенности в природе полисахарида хитина.

Степень разработанности темы исследования подробно рассмотрена в литературном обзоре. 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.

Цель и задачи работы

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 содержащим 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 олиголактидом 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/микроволоконистых 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 лазерное 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.

Личный вклад автора

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. Работа выполнена в лаборатории твердофазных химических реакций ИСПМ РАН; часть исследований по оценке биосовместимости полученных материалов проводилась в отделе современных биоматериалов ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). 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 нано-/микроволокнистые материалы, структурированные гидрогели методом лазерной стереолитографии, трехмерные структуры методом поверхностно-селективного лазерного спекания из полученных автором микрочастиц сформованы в рамках сотрудничества с коллегами из Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России и ФНИЦ «Фотоники и кристаллографии» РАН. Исследования химической структуры хитозана, его производных и сополимеров различными физико-химическими методами анализа, а также морфологии и свойств материалов на их основе проведены лично автором или в рамках сотрудничества с коллегами.

Степень достоверности и апробация работы

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

Результаты работы опубликованы в тезисах более 100 докладов и представлены на российских и международных научных конференциях: I-V Всероссийская школа-конференция для молодых ученых «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты» (Московская область 2009, 2010, 2011, 2012 и 2015); X и XI Международная конференция "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

Всероссийская Каргинская конференция «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 рекомендованны 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-polylactide 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 / 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. Аكوпова, В.Н. Баграташвили, А.Н. Зеленецкий, П.С. Тимашев // *Химия высоких энергий*. – 2016. – Т. 50. – №5. – С. 411-416.
18. Кильдеева Н.Р. Биодegradируемые 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 биодegradируемых 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. Аكوпова, 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, T.A. Akopova, 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, T.A. Akopova, 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, T.A. Akopova // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. – 2015. – V. 87 – P. 012074.
23. Akopova T.A. Solid state synthesis of chitosan and its unsaturated derivatives for laser microfabrication of 3D scaffolds / T.A. Akopova, 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 / 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. Аكوпова, 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.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Хитозан, его производные и привитые сополимеры

1.1.1. Получение и структура хитина и хитозана

Хитин – поли- β -2-ацетоамидо-2-дезоксид- β -D-глюкопираноза – является вторым по распространенности полисахаридом, который находится в наибольшем количестве в составе экзоскелета членистоногих, моллюсков, стенках грибов, водорослей и т.д. [1–7]. Наличие в структуре хитина ацетамидных и гидроксильных групп приводит к образованию сильных внутри- и межмолекулярных водородных связей и упорядочению макромолекул в сложной надмолекулярной структуре, которая и определяет структурные функции этого полисахарида [8,9]. Одним из основных препятствий к широкому применению хитина является растворимость в ограниченном наборе растворителей (гексафторизопропанол, гексафторацетон, смеси хлорсодержащих спиртов с водными растворами минеральных кислот и т.д.) [8]. Нерастворимость хитина определяет и способ его получения из природного сырья, которым в большинстве случаев является панцирь членистоногих – крабы и креветки. Сырье подвергают нескольким циклам деминерализации и депротенирования с помощью концентрированных щелочей и кислот с одновременной механической обработкой, чтобы удалить все компоненты кроме хитина [6,10]. В настоящее время активно развиваются биотехнологические подходы к получению хитина [11]. Полученный аморфно-кристаллический полимер имеет несколько полиморфных модификаций: α -, β - и γ -, но последнюю иногда считают вариантом α -формы [10]. α -Хитин является наиболее распространенной полиморфной формой; степень кристалличности хитина достигает 70%. Из-за сложностей с подбором растворителей хитин в промышленности используют редко, но в последние десятилетия возрос интерес к выделению его нанокристаллических форм [9,12–14]. Селективный гидролиз аморфных областей приводит к получению нанокристаллического хитина – высококристаллических

анизометричных наночастиц, которые можно использовать в том числе в качестве биodeградируемого и биосовместимого функционального наполнителя, для стабилизации границы раздела фаз, получения мембран и структурированных гибридных материалов [14–16]. Размер (диаметр до нескольких десятков, а длина до нескольких сотен нанометров) и свойства частиц нанокристаллического хитина существенно различаются в зависимости от источника полисахарида и способа выделения [12].

В подавляющем большинстве случаев хитин используют в качестве исходного полимера для получения его деацетилированного производного хитозана – поли (1→4)-β-2-глюкозамина, в котором содержится более 50% звеньев с первичной аминогруппой [10]. В исходном хитине часть структурных звеньев также является глюкозамином, но их количество всегда меньше, чем звеньев хитина. Переход от хитина к хитозану условный и в литературе приводятся разные значения степени ацетилирования (СА, доля остаточных звеньев хитина), при которой хитин становится хитозаном [8,17]. В промышленности хитозан получают в результате щелочного деацетилирования хитина, путем его обработки в гетерогенных условиях 50%-ным раствором NaOH при 70-100 °С продолжительностью до 10 часов и более (Рисунок 1) [3]. Степень ацетилирования ≤ 0.25 достаточна для получения хитозана с высокой растворимостью, хотя многократным щелочным деацетилированием хитина получены образцы со СА 0.01.

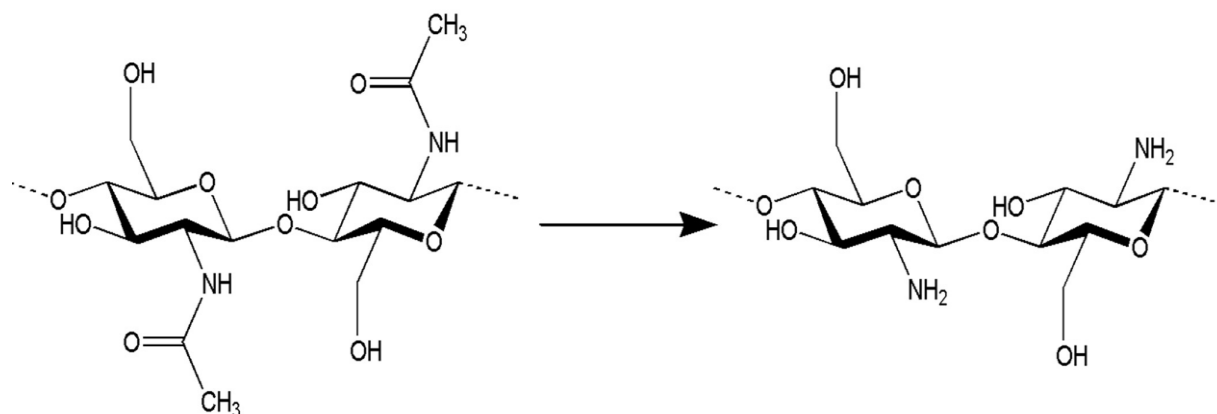


Рисунок 1 – Деацетилирование хитина с образованием хитозана

За счет протонирования первичных аминогрупп хитозан хорошо растворяется в разбавленных водных растворах одноосновных органических и неорганических кислот. Растворимость хитозана в основном определяется его СА и распределением структурных звеньев в цепи полисахарида: при высоких СА и микро-блочном расположении остаточных звеньев хитина полисахарид склонен к агрегированию в растворах. Реацилированный хитозан имеет лучшую растворимость в водных средах даже при высокой СА (0.5) за счет статистического характера распределения звеньев N-ацетилглюкозамина в полимерной цепи [10]. Гидродинамический радиус макромолекул хитозана в растворах может варьироваться от нескольких десятков до нескольких сотен нанометров [18]. В зависимости от молекулярных характеристик хитозан начинает осаждаться при значении pH среды в диапазоне 6-6.5 и эта способность используется для перевода материалов на его основе в нерастворимую форму, а также для создания наноразмерных частиц методом снизу-вверх, то есть с помощью контролируемого осаждения (Рисунок 2).

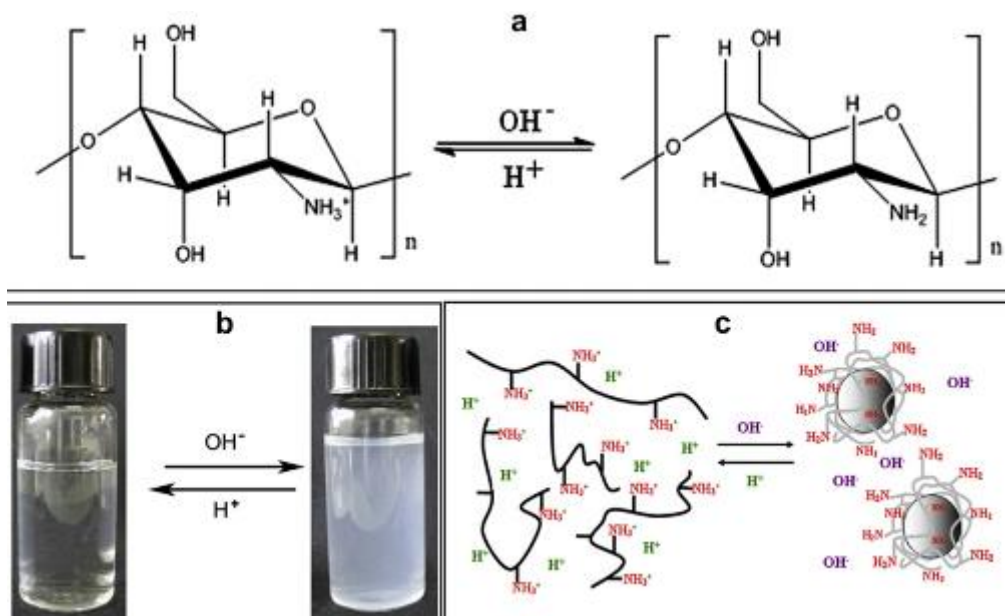


Рисунок 2 – Схема перевода хитозана в депротонированную форму с образованием наночастиц [19]

Также как и в хитине макромолекулы хитозана образуют прочную систему внутри- и межмолекулярных водородных связей. Содержание (достигает 60%) и тип кристаллической фазы хитозана зависят от исходного хитина, способа его деацетилирования, молекулярная масса (ММ) и СА полисахарида. Температура стеклования хитозана находится в диапазоне 140-150°C [20]; температура плавления хитозана превышает температуру его разложения (200-400°, процессы деацетилирования и деполимеризации), поэтому формование материалов возможно только из его растворов [21].

Благодаря высокими сорбционными способностями по отношению к активным радикалам, ионам тяжелых металлов и т.д., областями применения хитозана являются экология, процессы водоподготовки и сельское хозяйство [22–27]. Бактериостатическая активность хитозана определяет интерес к нему со стороны пищевой упаковочной промышленности [6,28–32]. Но наиболее широко в литературе представлены работы по использованию хитозана в биомедицине в качестве компонентов систем доставки и/или пролонгированного выделения лекарств, перевязочных материалов или матриц для тканевой инженерии [17,33–45]. Способность хитозана к биодegradации *in vivo* за счет ферментативного гидролиза лизоцимом, неспецифическим протеолитическим ферментом, присутствующим во всех тканях организма, а также хорошая биосовместимость объясняет неослабевающий интерес к нему со стороны биомедицины. Однако на практике из-за проблем со стандартизацией и низкой гемосовместимостью хитозан пока используют в основном в качестве перевязочных материалов [46,47]. Хитозан обладает хорошими пленко- и волокнообразующими свойствами, успешно применяется для формования гидрогелей различной морфологии, микро-/наноразмерных частиц и т.д. [37,48–54]. Предпринимаются значительные усилия по регулированию и улучшению свойств хитозансодержащих материалов за счет его комбинирования с другими компонентами или модифицирования химической структуры.

1.1.2. Влияние структуры хитозана на его свойства

Основным фактором, препятствующим широкому практическому применению хитозана в области биомедицины является зависимость его химической структуры и, соответственно, свойств от источника и условий получения полисахарида. Сформировать материал с воспроизводимыми характеристиками, используя различные партии полимера, становится практически невозможно. Можно выделить три основные причины, которые вызывают опасения при использовании хитозана: (1) значительные вариации в структуре исходного хитина в зависимости от источника его выделения; (2) вероятность недостаточной очистки хитинсодержащего сырья от минеральных и белковых остатков; (3) разница в эффективности протекания реакции деацетилирования в зависимости от источника хитина и условий его деацетилирования [4]. К дополнительным факторам, которые осложняют стандартизацию хитозана, можно отнести возможность присутствия в структуре исходного хитина звеньев глюкозы; различных полиморфных форм, которые влияют на эффективность реакции деацетилирования и, соответственно, свойства полимера.

Как и для большинства полимеров, одним из важных параметров хитозана является его ММ и молекулярно-массовое распределение, которые зависят от источника и способа получения полисахарида. ММ хитозана может достигать 10^6 Да и она влияет на растворимость хитозана, прочность материалов на его основе; но на биологические свойства (цито-, гемосовместимость) полисахарида влияет в меньшей степени, чем СА [45,55]. Для фармацевтической промышленности и биомедицины предпочитают использовать хитозан с ММ до 100 кДа и во многих случаях применяют олигохитозаны, которые способны к растворению при достаточно высоких значениях рН, приближающихся к физиологическому [56].

Содержание и распределение по основной цепи остаточных звеньев N-ацетилглюкозамина определяет не только растворимость хитозана в водных средах, физико-химические свойства, в том числе степень кристалличности, но и

такие характеристики как бактерицидная/бактериостатическая/антивирусная активность, скорость ферментативной деградации т.д. [3,28,29,45,57]. Растворимость и вязкость растворов увеличиваются с уменьшением СА. В литературе представлено значительное количество работ по исследованию биологических свойств хитозана, из которых можно выделить основные зависимости: цитосовместимость и скорость биodeградации хитозана как *in vitro*, так и *in vivo* увеличивается с увеличением СА [58]. Наличие первичных аминогрупп практически в каждом элементарном звене определяет высокую плотность заряда и поликатионные свойства; флокулирующую и адсорбционную способности. СА хитозана также влияет на эффективность загрузки и скорость высвобождения биоактивных соединений при его использовании в качестве систем доставки [59,60]. Хитозан разрешен к применению в качестве раневых повязок, но вопрос о применении материалов на его основе в качестве имплантируемых изделий осложняется его низкой гемосовместимостью, которую можно регулировать в том числе за счет модифицирования химической структуры [46]. Биологическая активность хитозана в виде растворов значительно выше, чем при их применении в виде материалов [55,61].

1.1.3. Модифицирование химической структуры хитозана

1.1.3.1. Синтез производных и привитых сополимеров хитозана

В хитозане есть три реакционноспособные функциональные группы – две гидроксильные группы (вторичная у С-3 и первичная у С-6) и первичная амино группа у С-2 – которые являются основными центрами для синтеза его производных и сополимеров [62–71]. Амино и гидроксильные группы могут реагировать с электрофильными реагентами с образованием как избирательно, так и неизбирательно замещенных N- и O-замещенных производных и сополимеров. Аминогруппа является более сильным нуклеофилом, поэтому при проведении реакций нуклеофильного замещения или присоединения по гидроксильным группам необходимо обеспечивать защиту аминогрупп во время реакции, либо

специально подбирать реагенты и условия реакции (Рисунок 3). Реакции N-замещения можно проводить без защиты гидроксильных групп.

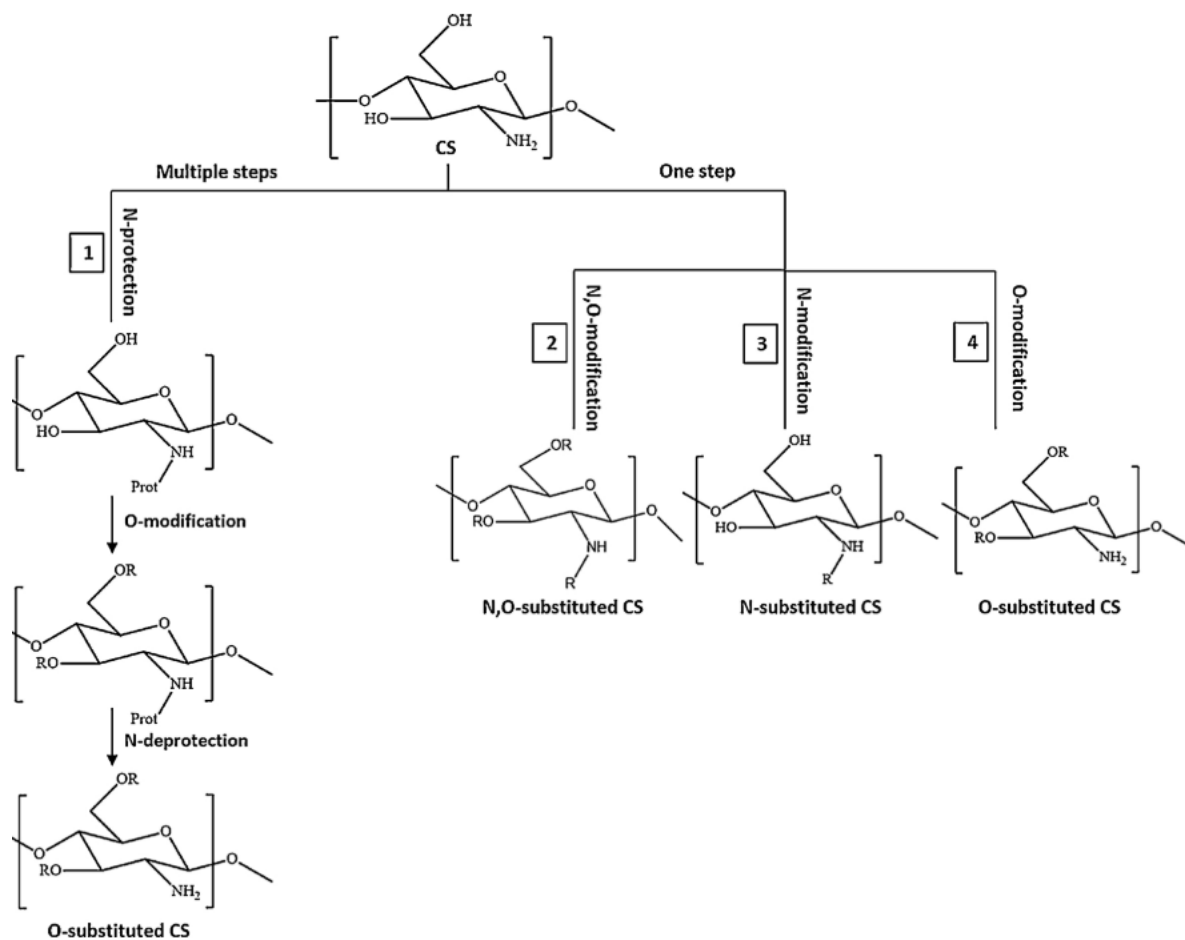


Рисунок 3 – Основные подходы к модифицированию химической структуры хитозана [64]

В литературе представлено значительное количество экспериментальных и обзорных статей, посвященных синтезу производных и сополимеров хитозана (Рисунок 4) [30,63–65,71–74]. С учетом цели и задач настоящей диссертации можно выделить три основных аспекта модифицирования химической структуры хитозана: (1) основные направления модифицирования для целенаправленного регулирования свойств хитозана для его биомедицинского применения; (2) необходимость применения катализаторов и растворителей, которые могут негативно повлиять на безопасность продуктов; (3) производительность метода синтеза. Одним из основных ограничений хитозана для применения в биомедицине является его нерастворимость в водных средах при нейтральных и

щелочных рН, поэтому значительное количество работ посвящено кватернизации, сульфированию, алкилированию и ацилированию хитозана [36]. Для этих же целей применяют прививку на хитозан водорастворимых полимеров [73,75].

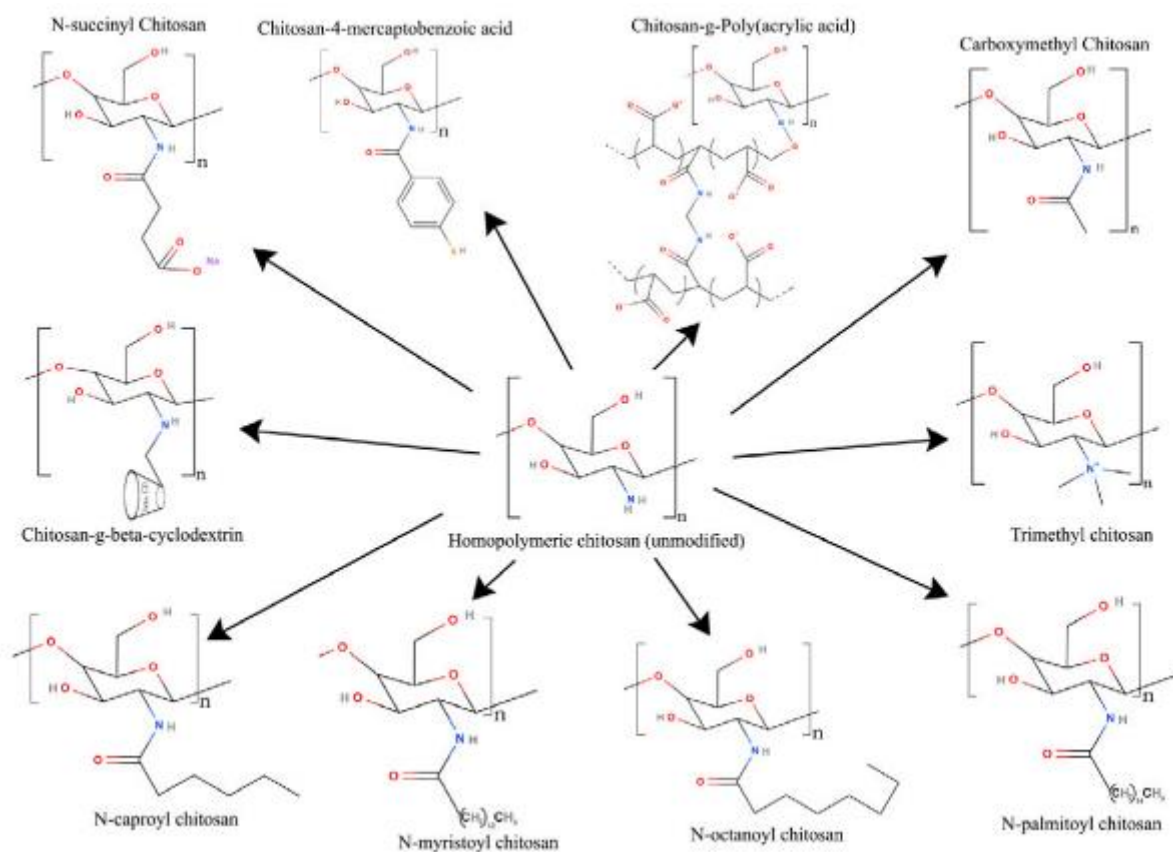


Рисунок 4 – Производные и привитые сополимеры хитозана [65]

С другой стороны, для применения хитозана в качестве систем пролонгированной доставки лекарств/клеток или материалов для регенеративной медицины во многих случаях требуется его гидрофобизация, введение функциональных групп или привитых фрагментов для обеспечения его самосборки и расширения доступных методов формования. Введение ненасыщенных функциональных групп перспективно для получения фотоотверждаемых материалов на основе хитозана. Алкилирование хитозана аллилбромидом в изопропанол в присутствии избытка щелочи осложняется гетерогенными условиями реакции [76,77]. Аллихитозан также можно получать в гомогенных условиях, если использовать водорастворимые олигомеры хитозана

(со степенью полимеризации 12) и аллилглицидиловый эфир. В этом случае степень замещения составляла 0.33 при 2-х кратном мольном избытке алкилирующего агента по отношению к аминогруппам хитозана [78]. Для синтеза производных хитозана используют гомогенные или гетерогенные условия с применением растворителей или органических разбавителей. Основной проблемой является низкая растворимость полимера и, соответственно, низкая эффективность проведения процесса. Аналогичные проблемы возникают при синтезе привитых сополимеров хитозана с олиго/полилактидами, которые являются одним из самых перспективных типов фрагментов для комбинирования с хитозаном.

1.1.3.2. Привитые сополимеры хитозана с олиго/полилактидом

Природные полимеры из-за своей химической структуры обладают рядом ценных биологических свойств, но природное происхождение также лимитирует их применение в некоторых областях биомедицины. Синтетические биodeградируемые и биосовместимые полимеры являются более воспроизводимыми и надежными с точки зрения их химической структуры, которую можно контролировать и задавать на стадии синтеза полимера. Одним из наиболее распространенных полимеров для биомедицины является полилактид (ПЛА) и его сополимеры, изделия из которого одобрены Food & Drug Administration для применения *in vivo* в качестве шовных материалов, систем доставки лекарств и материалов для регенеративной медицины [79]. Но при использовании ПЛА в регенеративной медицине возникает другая проблема: инертность его поверхности, что приводит к плохой адгезии субстрат-зависимых клеток при их культивировании *in vitro* или при имплантировании материалов из ПЛА в организм [80]. Тем не менее, материалы из полилактида широко применяют в медицине в качестве средств адресной и/или пролонгированной доставки биоактивных веществ [81–84] и материалов для регенеративной медицины волокнистых материалов [85–90]. Современные функциональные

материалы на основе ПЛА в большинстве случаев являются композиционными [91–95].

Синтезу полилактида и его сополимеров, а также получению и применению материалов на их основе посвящен ряд статей, обзоров и книг [96–102]. Полилактид получают поликонденсацией молочной кислоты или полимеризацией лактида с раскрытием цикла [96]. Молочная (2-гидроксипропановая) кислота содержит асимметрический атом С и может существовать в виде двух оптически активных энантиомеров (D(R)- и L(S)-форм) и оптически неактивной рацемической смеси. Молочную кислоту можно получать химическим или ферментативным способом [96,103,104]. Циклический димер молочной кислоты – лактид – также может существовать в виде оптически активных D- и L-форм и двух неактивных: стехиометрический комплекс L- и D-лактида и мезо-форма. Для каждой формы характерна своя температура фазового перехода: 97°C (D-лактид, мезо-лактид), 52°C (L-лактид) и 127-128°C (стехиометрический комплекс L- и D-лактида) [96]. Синтез ПЛА из различных стереоизомеров позволяет получать полимеры с различной стереорегулярностью и, соответственно, свойствами. Поликонденсация молочной кислоты приводит в основном к синтезу низкомолекулярных олигомеров, которые в дальнейшем используют для синтеза лактида (Рисунок 5). Полимеризация лактида с раскрытием цикла приводит к получению высокомолекулярного ПЛА. Использование катализаторов, азеотропных растворителей и дополимеризации также позволяет осуществлять синтез высокомолекулярного ПЛА ($M_n \geq 300$ кДа) непосредственно из молочной кислоты [105]. Совершенствование технологий синтеза позволяет наращивать производство полилактида и снижать его стоимость.

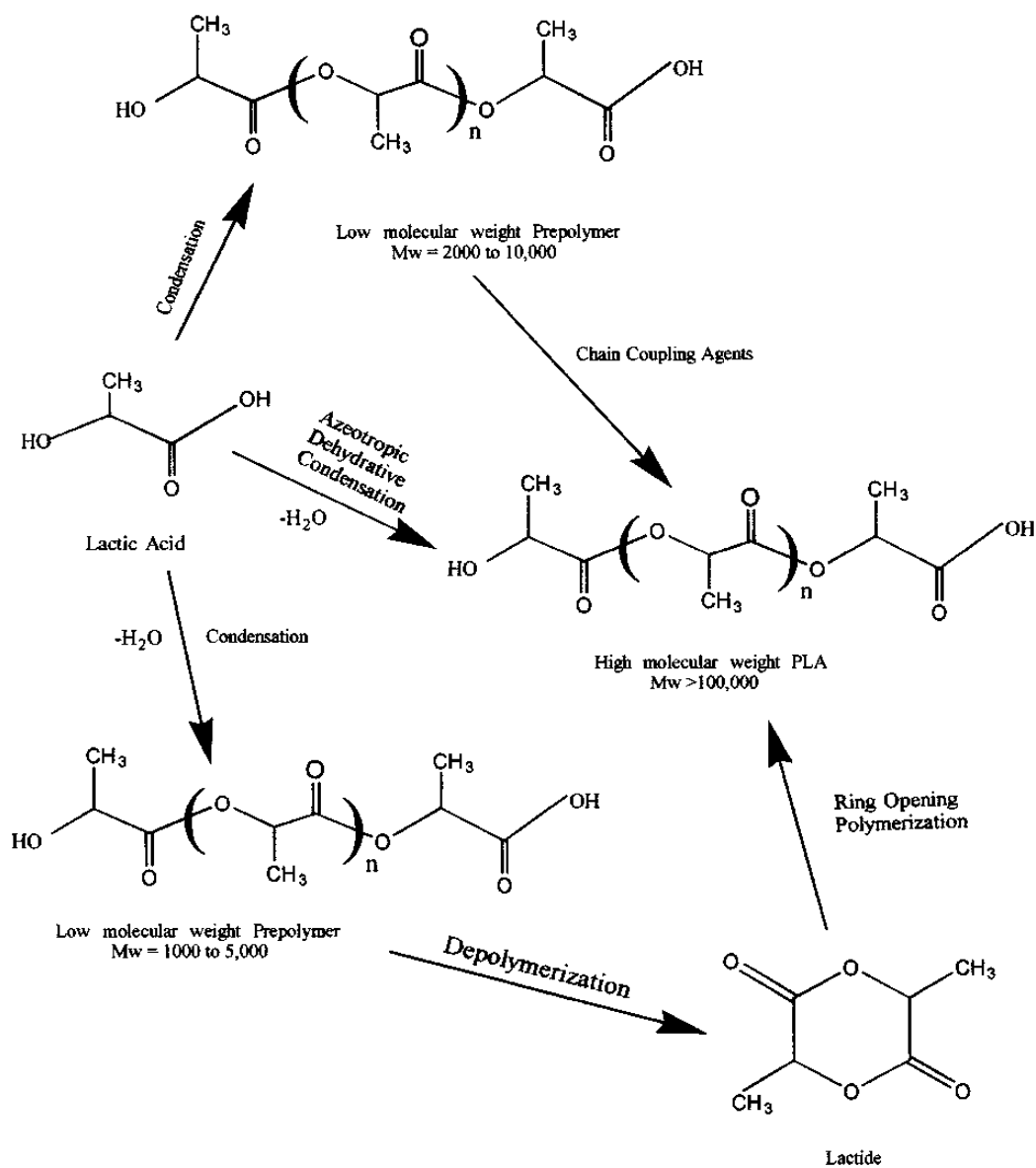


Рисунок 5 – Методы синтеза ПЛА [96]

Полимеризация L- и D-лактида приводит к получению стереорегулярных изотактических поли(L-лактида) и поли(D-лактида), а мезо- и D,L-лактида – атактического поли(L,D-лактида). Аморфно-кристаллический ПЛА имеет температуру плавления $155\text{-}180^\circ\text{C}$, что подходит для большинства расплавных технологий получения материалов: литье под давлением, экструзионно-раздувное формование и и т.д. [97]. Температура стеклования ПЛА варьируется в диапазоне $55\text{-}60^\circ\text{C}$, что не совсем удобно для применения в упаковочной промышленности [106]. Аморфно-кристаллический поли(L-лактид) применяют более широко по сравнению с аморфным D,L-изомером, что связано с возможностью получения

прочных материалов с достаточно длительным сроком деградации, который может составлять несколько лет и варьироваться в широких пределах в зависимости от структуры материала и условий деградации. Но для ряда применений способность к кристаллизации целенаправленно подавляют. Это может быть важно, если высокая степень кристалличности ограничивает переработку полимера, в том числе для использования в аддитивных технологиях [87]. В этом случае наиболее простым и эффективным способом является введение пластификаторов (полиэтиленгликоль, глицерин, мономеры/олигомеры ПЛА и т.д.). Введение дополнительных функциональных групп в структуру ПЛА может потребоваться для получения материалов с помощью специфических методов аддитивных технологий (например, для лазерной стереолитографии) [107].

Аморфный ПЛА предпочтителен для решения биомедицинских задач, так как срок службы биodeградируемых материалов (от саморассасывающихся шовных нитей до матриц для тканевой инженерии) составляет от нескольких дней до месяцев. Время гидролиза аморфно-кристаллического ПЛА может составлять несколько лет, а аморфные образцы деградируют за недели, поэтому для биомедицины используют аморфный поли(L,D-лактид) или его сополимеры с полигликолидом или поликапролактоном [98]. Такой подход к регулированию скорости биodeградации не решает проблемы при имплантировании материалов из ПЛА, связанной с возможными воспалительными реакциями из-за закисления окружающих тканей при деградации полимера до молочной кислоты [108]. Хитозан, с другой стороны, является полиоснованием и мог бы эффективно нейтрализовать высвобождающуюся молочную кислоту. Это одна из причин перспективности комбинации ПЛА и хитозана в одном материале.

Свойства ПЛА и хитозана удачно сочетаются: полилактид удобен с технологической точки зрения, но высокая гидрофобность и низкая биоактивность, ограничивает его применение для решения медицинских задач, что может возместить хитозан при комбинировании этих полимеров в одном изделии. В случае применения материалов в регенеративной медицине для

повышения биосовместимости ПЛА часто ограничиваются нанесением покрытия из биополимеров, в том числе из хитозана, что тем не менее практически всегда требует модифицирования поверхности материалов из сложных полиэфиров перед нанесением биоактивных покрытий, в том числе с помощью методов химии высоких энергий [109,110]. Вторым подходом является смешение хитозана с полилактидом [111–116]. Смешение хитозана и полилактида требует использования или токсичных растворителей (гексафторизопропанол) или смеси растворителей (хитозан в уксуснокислым водным растворов с полилактидом в ацетоне/диметилсульфоксиде/хлороформе), что приводит к фазовому разделению компонентов [117]. Совместить оба компонента в условиях расплава затруднительно из-за неплавкости хитозана, поэтому их смешение в расплаве приводит к получению неоднородного композиционного материала, в котором частицы хитозана остаются неизменными по размеру [118]. Более перспективным подходом является синтез привитых сополимеров хитозана с олиго/полилактидами.

Прививка на хитозан олиголактида по растворным технологиям требует проведения процесса в несколько стадий с выделением промежуточных продуктов и использованием растворителей и катализаторов процессов (изоцианаты, дилауринат дибутилолова, $Ti(OBu)_4$, $SnCl_4$, $LiCl$ и т.д.) [119–125].

Полимеризация лактида с раскрытием цикла в присутствии хитозана в растворе диметилсульфоксида с использованием катализатора $Ti(OBu)_4$ в атмосфере азота приводит к получению коротких боковых цепей олиголактида со степенью полимеризации 1-5 на аминогруппах хитозана [120]. Использование триэтиленамина в качестве катализатора в аналогичных условиях позволило получить привитые цепи со степенью полимеризации (СП) 7 [123]. Описан синтез сополимеров с предварительной защитой аминогрупп хитозана с помощью фталевого ангидрида и с использованием в качестве катализатора 4-диметиламинопиридина [126]. Степень прививки в процессе аналогичного двухстадийного синтеза не превышает 14 [127]. Прогрев раствора хитозана в молочной кислоте без использования катализаторов использовали для получения

гидрогелей на основе хитозана [128]. Интересными представляются работы по проведению процесса при воздействии ультразвука [129]. Полимеризация лактида в присутствии хитозана с использованием $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ в качестве катализатора при воздействии сверхвысокочастотного излучения позволила получить сополимеры со СП привитых цепей до 24 [130].

Таким образом, несмотря на то, что синтез привитых сополимеров хитозана с ПЛА является актуальной задачей, общая производительность и экологические перспективы существующих расплавных и растворных подходов недостаточны для масштабирования процессов получения материалов на основе синтезированных сополимеров.

1.1.3.3. Механохимический метод синтеза производных и привитых сополимеров хитозана

Согласно определению ИЮПАК механохимические реакции – химические реакции, которые инициируются поглощением механической энергии [131]. Возможность проводить реакции с высоким выходом без использования растворителей в качестве реакционной среды определяет экономические и экологические перспективы механохимических технологий, которые были названы в десятке передовых технологий в химии на Всемирном химическом конгрессе ИЮПАК в 2019 г. [132]. Механохимия также позволяет проводить реакции, которые затруднены с использованием растворных и расплавных подходов, что характерно в том числе для полисахаридов.

Основные закономерности механохимии, изменение физических и химических свойств твердых тел при механических воздействиях были в основном исследованы на неорганических соединениях, но механизмы активации имеют общие закономерности с процессами, происходящими в высокомолекулярных соединениях в условиях давления и сдвиговых деформаций [133–138]. Механическая активация твердых тел сопровождается релаксацией внутренних напряжений, которая выражается в измельчении (образование новой поверхности), изменении в кристаллической структуре образцов (аморфизация,

образование новых полиморфных форм) и изменении химической структуры. На начальном этапе механического воздействия будет наблюдаться активное образование новой поверхности, но при достижении критического размера дальнейшее измельчение невозможно. Последующее механохимическое воздействие будет приводить к накоплению дефектов и активных центров, сопровождающееся разупорядочением системы и при контакте сореагентов возможно протекание химических реакций: разрыв химических связей и образование новых. Механохимические превращения проходят во время механической обработки, поэтому значительным отличием механохимии высокомолекулярных соединений от неорганических является необходимость использования аппаратов, обеспечивающих длительное деформирование. Низкая термостойкость полимеров также определяет необходимость использования устройств, позволяющих более точно регулировать температуру.

В настоящее время в научной литературе наблюдается значительный рост публикаций в области механохимии, которые подчеркивают основные преимущества такого подхода: (1) экологические и экономические перспективы; (2) возможность проведения реакций, которые затруднены в иных условиях; (3) возможность масштабирования процесса [139]. Наблюдается активный рост интереса к механохимии органических соединений и полимеров в частности [140–147].

Значительным преимуществом механохимии является производительность процессов, что особенно важно для модифицирования полимеров с целью создания материалов на их основе. Многие модельные реакции были изучены на наковальнях Бриджмена, которые позволяли проводить исследования с использованием 100 мг вещества [133]. Основными аппаратами для проведения механохимических реакций в настоящее время являются мельницы различных типов с широким диапазоном загрузки [148,149]. Еще одним шагом в сторону промышленного применения механохимии является переход на твердофазные экструзионные технологии, что наиболее характерно для органического синтеза [138,150–152].

С точки зрения применения механохимии в биомедицине, самым разработанным направлением является фармацевтика [153–157]. Механохимическая обработка используется для экстракции биоактивных соединений или как способ получения новых лекарственных форм с высокой биодоступностью, растворимостью и фармакологической эффективностью. Применение механохимических подходов с позиций формования материалов биомедицинского назначения рассматривается или как технология создания композиционных материалов [137,158] или для целенаправленного модифицирования химической структуры полимеров [159,160]. Механохимические подходы наиболее перспективны именно для природных полимеров, так как их модифицирование с использованием других методов затруднено [138].

Механохимия природных соединений активно развивается и в литературе наблюдается переход от рассмотрения их механохимической обработки с позиций только измельчения или переработки биомассы до изменений в химической структуре природных полимеров [161]. Отмечается влияние происхождения природных полимеров на параметры механохимической обработки и изменения в надмолекулярной структуре полисахаридов [162]. Механохимическую обработку в планетарной мельнице АГО-2 хитозана с пироксикамом использовали для повышения растворимости лекарства [157]. В этом случае наблюдалось образование комплексов без изменения химической структуры хитозана. Твердофазное смешение хитозана с различными синтетическими полимерами описано в [163]. Механохимическая обработка смеси хитина и хитозана с целлюлозой в устройствах различного типа (смеситель Брабендера, экструдер, наковальня Бриджмена) приводит к смешению компонентов на молекулярном уровне с образованием полисахаридного комплекса; наблюдается частичное деацетилирование хитина [164]. Подчеркивается, что для обеспечения активного протекания химических реакций необходимы более жесткие условия обработки (увеличить давление, время обработки, температуру). Планомерные исследования протекания механохимических реакций в полисахаридах, начатые под

руководством Николая Сергеевича Ениколопова, были суммированы в многочисленных работах [68,138,159,160,165–172].

Механохимический подход, основанный на твердофазном реакционном смешении в двухшнековом экструдере хитина со щелочью в соотношении 5 моль NaOH на осново-моль хитина, позволяет получить хитозан со $CA \leq 0.1$ [173]. Такой процесс требует меньшего количества едкого натра, чем традиционно используется в суспензионном процессе деацетилирования, а продолжительность обработки сокращается от часов до нескольких минут [68,169]. Хитозан, деацетилированный механохимическим методом обладает более низкой ММ (~ 100 кДа) и степенью кристалличности (~ 25%) [174].

Механохимическая обработка хитозана с фталевой, малоновой, стеариновой, янтарной и малеиновой кислотами приводит к получению ацилированных производных хитозана со степенью замещения (СЗ) до 0.4 [172,175]. Карбоксиметилированные эфиры хитина и хитозана были получены механохимической обработкой хитина, щелочи и монохлоруксусной кислоты [176]. Замещение проходило преимущественно по гидроксильным группам; СЗ гидроксильных и аминогрупп хитозана достигала 0.4-1.4. Механохимический подход позволил получить ряд сополимеров хитозана с поливиниловым спиртом [177] и малеинизированным полиэтиленом [178]. Показано, что водорастворимый при нейтральных значениях pH сополимер хитозана с поливиниловым спиртом, имеет перспективы для медицины для создания полиэлектролитных микрокапсул для культивирования клеток [179], а также может быть успешно использован для стабилизации наноразмерных частиц TiO_2 [180,181]. Были начаты предварительные работы по возможности применения синтезированных производных и сополимеров для формования материалов на их основе.

Таким образом, механохимический подход к модифицированию химической структуры хитозана представляется наиболее перспективной технологией с точки зрения синтеза производных и сополимеров полисахарида. Настоящая работа нацелена на развитие и систематическое изучение влияния химической структуры механохимически модифицированного хитозана на возможность формования

материалов на его основе, а также на поиск закономерностей между химической структурой полисахарида и морфологией и свойствами материалов на его основе.

1.2. Материалы для регенеративной медицины на основе хитозана, его производных и сополимеров

Материалы на основе хитозана в виде гелей, порошков, гранул, пленок, капсул, губок, нетканых и тканых микро/нановолокон применяются в различных областях. Высокие сорбционные способности хитозана по отношению к активным радикалам, ионам тяжелых металлов определяют интерес к использованию хитозана в экологии, в том числе в процессах водоподготовки [22,24–27]. Бактериостатическая активность хитозана определяет интерес к нему в упаковочной промышленности [6,28–32]. Но наибольшие перспективы связаны с его использованием в биомедицине, в том числе в качестве компонентов систем доставки и/или пролонгированного выделения биоактивных соединений, перевязочных материалов или матриц для тканевой инженерии [17,33,42–45,34–41]. Несмотря на то, что получение материалов для регенеративной медицины на основе хитозана является главной целью настоящей диссертации, разделение типов и подходов к получению хитозансодержащих материалов для разных применений, в том числе для биомедицины в целом, достаточно условно, так как методология формирования материалов универсальна. Материалы для регенеративной медицины можно рассматривать как один из наиболее высокотехнологичных типов материалов, так как к ним предъявляются очень строгие требования.

1.2.1. Регенеративная медицина: материалы, типы и основные методы формирования матриц

Для восстановления, замены или регенерации тканей, потерянных или поврежденных в результате болезни или травмы можно использовать ткань того же пациента (аутологичная трансплантация) или ткань другого донора (аллотрансплантация). Оба подхода имеют свои ограничения. В первом случае,

когда реципиент и донор одно лицо, забор тканей/органов лимитируется состоянием его здоровья, возможностью изъятия достаточного количества ткани без риска инфицирования, гематом и т.д. Во втором случае можно выделить три лимитирующих фактора: недостаток донорских тканей/органов, серьезный риск отторжения имплантата иммунной системой реципиента и возможность передачи инфекции/заболеваний через донорскую ткань [182]. Регенеративная медицина обеспечивает третий подход к решению этой проблемы. Термин "регенеративная медицина" определяет различные клеточные технологии, которые направлены на частичное или полное восстановление функций поврежденных или утраченных тканей [183]. В регенеративную медицину входят, как клеточная регенеративная терапия, которая направлена на стимулирование регенерации тканей/органов с помощью трансплантации клеток (как правило, стволовых), так и тканевая инженерия, которая и является областью, на решение одной из проблем которой направлена настоящая диссертация. Даже в случае клеточной регенеративной медицины необходимо применение материалов для культивирования на них субстрат-зависимых клеток и доставки в организм.

Создание биodeградируемых материалов, так называемых матриксов (scaffolds), которые могут служить имплантируемой временной подложкой для роста тканей/органов, является одной из ключевых задач в области тканевой инженерии. Матрикс должен выполнять роль подложки для адгезии и роста клеток, которые в свою очередь должны формировать ткань. Соответственно, формирование ткани можно выполнять как *in vitro*, наращивая клетки на материале в лабораторных условиях в биореакторе, стимулируя процесс формирования ткани с помощью химических или физических методов воздействия, или имплантировать матрикс без клеток *in vivo*, давая возможность организму самому нарастить ткань на введенной подложке. Можно выделить два основных пути получения матриксов, одним из которых является использование децеллюляризированных тканей, то есть внеклеточного матрикса после удаления клеток (Рисунок 6) [184]. Такие материалы обладают «натуральной» морфологией, но возможны проблемы с их биосовместимостью из-за остаточных

реагентов после децеллюляризации и сшивания, а также риск сильного иммунного ответа, поэтому безопаснее их использовать для *in vitro* применений.

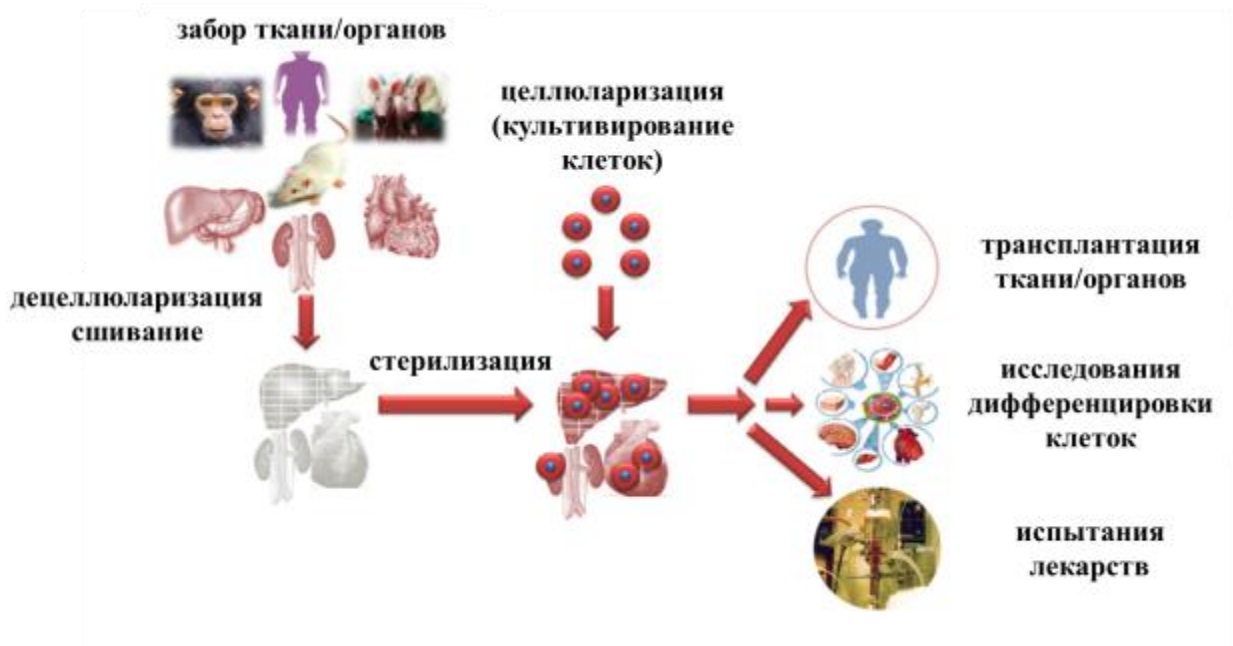


Рисунок 6 – Схема получения и применения тканеинженерных конструкций на основе децеллюляризованных тканей [184]

Второй вариант основан на создании искусственного, материала, который будет более безопасным, но при этом будет максимально имитировать внеклеточный матрикс. Материал как не содержащий, так и содержащий дифференцированные или стволовые клетки, без дополнительных биоактивных компонентов или содержащий цитокины, в любом случае должен соответствовать очень жесткому набору требований, которые даже в минимальном варианте выдержать при создании матрикса достаточно трудно [88,89,182,185,186].

Как минимум, матрикс должен быть:

1. Биосовместимым. Клетки должны прикрепляться к поверхности материала, нормально функционировать и расти. После имплантации матрикс не должен вызывать воспалительной реакции, которая могла бы затормозить процесс регенерации или вызвать отторжение импланта.
2. Биodeградируемым. В отличие от обычного импланта, матрикс должен служить временной подложкой для роста ткани и со временем должен полностью заместиться ей, то есть биорезорбировать и обеспечить клеткам

возможность сформировать их собственный внеклеточный матрикс. Продукты деградации также должны быть не токсичны и выводиться из тела не нанося ущерба другим органам. Важным моментом в деградации матрикса является временной фактор, так как материал должен биорезорбировать с той же скоростью, с какой формируется новообразующаяся ткань.

3. Обладать достаточными механическими свойствами. В данном пункте важно выделить как механические свойства, необходимые для хирургических манипуляций во время имплантирования, так и их соответствие механическим характеристикам ткани, которую матрикс должен заместить. Жесткий матрикс может травмировать окружающие мягкие ткани. С другой стороны, высокие механические характеристики особенно важны в ортопедии и кардиоваскулярной хирургии. Например, при восстановлении хрящевой и костной ткани имплантат должен обладать достаточными деформационно-прочностными характеристиками до того момента, когда новообразующаяся ткань сможет выполнять свои функции. При этом важно принимать во внимание возраст пациента, так как от этого зависит скорость восстановления тканей и, соответственно, время в течение которого имплантат должен нести нагрузку.

4. Обладать требуемой архитектурой. Трехмерная структура матрикса является одним из наиболее важных параметров, так как она должна быть пористой для обеспечения свободной миграции клеток, диффузии питательных веществ, продуктов метаболизма и деградации матрикса. Невозможность обеспечить высокую пористость матрикса, предназначенного для замещения тканей, которые должны обладать высокой прочностью, является одной из наиболее сложных проблем в тканевой инженерии. Также важным параметром является размер пор в матриксе: они должны быть достаточно большими для свободной миграции клеток и васкуляризации, но, с другой стороны, их размер должен обеспечивать большую площадь для адгезии клеток. В зависимости от типа клеток и ткани, которая должна регенерироваться, требуемый размер пор может варьироваться.

5. Технологичным. Матрикс должен быть, во-первых, экономически оправданным с точки зрения производства, а, во-вторых, его получение должно быть воспроизводимым, масштабируемым и персонализированным, исходя из нужд конкретного пациента. Немаловажным фактором являются условия его стерилизации и хранения до использования.

Требования к иным материалам биомедицинского назначения могут быть менее жесткими и более специфическими. В рамках настоящей работы подходы к модифицированию химической структуры хитозана и созданию материалов на его основе будут рассмотрены исходя из этого базового набора требований. Создание матриксов для тканевой инженерии, удовлетворяющих всем вышеуказанным характеристикам, является сложной задачей, которая лимитирует применение регенеративной медицины в клинической практике. Решение этой задачи лежит на стыке нескольких дисциплин и в основном зависит от успехов в химии полимеров, так как технология создания и свойства материалов во многом определяются именно химической структурой.

1.2.2. Пленки и покрытия на основе хитозана

Пленки являются одной из базовых форм материалов и их исследование имеет значительный теоретический и практический интерес. Основной областью исследований пленок из хитозана являются работы по созданию биodeградируемых (в том числе съедобных) пленок с противомикробными свойствами для пищевой промышленности [187–189]. Хитозансодержащие пленочные материалы также важны для биомедицины. Во-первых, пленки являются основной формой материалов для культивирования клеток *in vitro* или применения хитозана *in vivo* в качестве мембран и раневых повязок, чему способствуют его гемостатические и антибактериальные свойства [190–193]. Для варьирования свойств, пленки из хитозана структурируют, наполняют или модифицируют его химическую структуру, что широко описано в литературе [190,193–196]. Во-вторых, покрытия из хитозана являются частным случаем пленочных материалов и также имеют практическую ценность. Применительно к

хитозану последний пункт имеет особое значение, так как ограниченная способность к переработке и относительно низкие деформационно-прочностные свойства материалов на его основе лимитируют применение хитозана в качестве матричного полимера и во многих случаях хитозан, как и другие биополимеры, используют в качестве покрытий, улучшающих биосовместимость полимерных материалов из других полимеров, в том числе из сложных полиэфигов [197–199].

Структура и свойства поверхности играют одну из важнейших ролей при имплантировании любого материала в организм, так как его взаимодействие с окружающими тканями начинается с процессов, происходящих на границе материал/биоткань. Можно выделить два основных способа регулирования структуры и свойств поверхности: (1) на стадии формования материала, что в свою очередь задается характеристиками полимера и методом формования материала; (2) модифицированием поверхности сформированного материала.

В связи со сложной химической структурой хитозана, морфология, химический состав и свойства поверхности пленок на его основе могут сильно различаться при варьировании даже «базовых» характеристик (ММ, СА) полисахарида. Согласно литературным данным краевые углы смачивания по воде для пленок из различных образцов немодифицированного хитозана варьируются в пределах 65-100° [200–202]. Объемные свойства пленок из хитозана зависят от целого ряда факторов и могут варьироваться в очень широком диапазоне. В рамках диссертационной работы приведены экспериментальные результаты по исследованию влияния основных характеристик хитозана, модифицирования его химической структуры и варьирования метода формования на структуру и свойства объема и поверхности.

Вторым подходом к регулированию структуры и свойств поверхности материалов является нанесение покрытий. Существует достаточно широкий спектр методов получения пленок на поверхности субстратов иной природы, которые позволяют получать покрытия различной толщины [203–206]. Часть методов направлена на модифицирование поверхности путем иммобилизации хитозана в приповерхностный слой. В этом случае ключевым этапом является

предварительная активация поверхности для обеспечения адгезии между подложкой и покрытием [207]. Покрытия из хитозана можно наносить или путем погружения субстрата в раствор полимера [197,199], используя специальные автоматизированные системы нанесения [208], методы послойного нанесения [198]. Предварительная активация поверхности в смеси растворителей позволяет иммобилизовать хитозан в субповерхностных слой полимерной подложки [209].

При формировании пленок и нанесении покрытий из хитозана для биомедицинского назначения можно выделить несколько проблем: (1) зависимость свойств от химической структуры полисахарида; (2) необходимость формирования пленок/покрытий из кислых водных растворов, что требует их дальнейшего перевода в нерастворимую в воде форму.

1.2.3. Нетканые материалы на основе хитозана

Одним из важных критериев пригодности материалов в качестве полимерной основы для создания тканеинженерных конструкций является их трехмерная структура, которая должна максимально имитировать нативную биоткань и способствовать васкуляризации, поэтому нано/микроволокнистые нетканые изделия стали основной формой материалов для регенерации полых органов [210]. Среди различных методов получения микроволокнистых материалов электроформование является самой широко используемой технологией [210–212]. Электроформование основано на подаче раствора (реже расплава) полимера через фильеру (реже со свободной поверхности), к которой также как и к коллектору подведено напряжение [213]. Под действием внешнего электрического поля струя полимера расщепляется на более мелкие потоки, образуя так называемый конус Тейлора, растворитель испаряется и полимер осаждается на поверхности коллектора в виде волокон (Рисунок 7). Пригодность полимера к электроформованию определяется электропроводностью, вязкостью, поверхностным натяжением его растворов, природе растворителя и т.д. В литературе представлено значительное количество модификаций электроформования, которые различаются типом коллектора, количеством и

формой фильер, что позволяет получать композиционные материалы со сложной структурой [211].

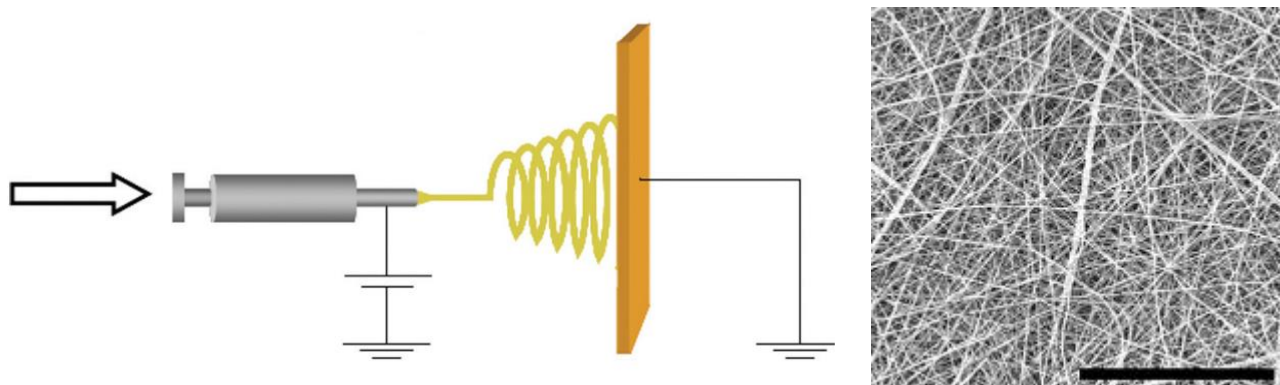


Рисунок 7 – Принципиальная схема устройства для получения волокнистых нетканых материалов методом электроформования (а) и СЭМ микрофотография получаемого нетканого материала (б). Масштабная линейка на СЭМ микрофотографии 100 мкм [213]

Нетканые материалы биомедицинского назначения методом электроформования в подавляющем большинстве случаев получают из сложных полиэфиров (полилактид, поликапролактон и их сополимеры), которые хорошо растворяются в легколетучих растворителях [86,213]. Получение нетканых материалов из природных полимеров методом электроформования технологически более сложно, в том числе из-за необходимости тщательно подбирать растворитель. Электроформование белков и полисахаридов во многих случаях требует использования таких растворителей как гексафторизопропанол [213,214]. Хитозан также сложен для электроформования из-за ограниченного набора растворителей, высокой вязкости растворов, и т.д, поэтому нетканые волокна из немодифицированного хитозана можно сформировать из его растворов в концентрированной уксусной кислоте (70-90%), трифтоуксусной кислоте и т.д. [53,214]. Для преодоления технологических трудностей нетканые материалы на основе хитозана получают из его смесей с другими водорастворимыми полимерами: полиэтиленгликолем, поливиниловым спиртом и т.д. [215,216]. Такой подход не снимает необходимости переводить полученные

нетканые материалы в нерастворимую форму с помощью сшивающих агентов (глутаровый альдегид, дженипин), которые можно вводить или в формовочных раствор или сшивать уже готовый нетканый материал [215–217]. Более подробно сшивающие агенты для хитозана и методы перевода хитозансодержащих материалов в нерастворимую в воде форму рассмотрены в разделе 1.2.5.

Создание композиционных нетканых материалов из сложных полиэфиров и хитозана широко представлено в литературе как подход для преодоления технологических трудностей и повышения биосовместимости материалов. Хитозан можно вводить в объем материала, но это требует его формирования из смесей хитозан/полилактид в трифторуксусной кислоте [114,218] или из эмульсий, состоящих из раствора полилактида в хлороформе и хитозана в концентрированной уксусной кислоте [117,219]. Вторым подходом к комбинированию сложных полиэфиров и хитозана является нанесение покрытий из хитозана на уже сформованные нетканые материалы, что может потребовать предварительной активации поверхности подложки [220].

Таким образом, нетканые волокнистые материалы являются одной из наиболее востребованных форм материалов для биомедицины. Распространенным и развитым подходом к получению нетканых материалов является электроформование, применение которого для немодифицированного хитозана сопряжено с технологическими трудностями или требует использования токсичных растворителей.

1.2.4. Хитозансодержащие нано-/микрочастицы

Полимерные частицы – одна из наиболее перспективных форм материалов, используемых в биомедицине. Основное их применение связано с фармацевтической промышленностью, где их используют в качестве систем для контролируемого (пролонгированного) выделения или систем адресной доставки биоактивных соединений (лекарств). Наноразмерные частицы широко применяются в качестве систем пролонгированного выделения, но их важной чертой является и возможность использования в качестве систем адресной

доставки активных компонентов в клетку [81,221–223]. Адресность доставки задается, в основном, наличием специфических лигандов (антитела, пептиды и т.д.) на поверхности наночастиц, а способ проникновения в клетку ее размером и структурой [224]. Частицы относительно большого диаметра не проникают в большинство клеток и могут быть абсорбированы только специализированными клетками и в большинстве случаев используются только для пролонгированного (замедленного) высвобождения активного вещества из частицы, что обеспечивает его постоянную концентрацию в организме [225]. Механизм высвобождения задается структурой микрочастицы и способом иммобилизации биоактивного компонента, но чаще всего высвобождение происходит в результате диффузии активного вещества в процессе разрушения полимерной основы микрочастицы. Микрочастицы с большим диаметром (до 200 мкм) широко применяют в тканевой инженерии, что может быть связано как с их дальнейшей переработкой в импланты, например, прессованием, так и с их прямым использованием в качестве клеточных микроносителей (100 – 300 мкм) [226,227]. Именно такие клеточные микроносители в виде сферических микрочастиц являются одним из перспективных и динамично развивающихся направлений в области создания матриц для регенеративной медицины. В этом случае микрочастицы используют в качестве инъектируемых подложек для прикрепления и роста клеток, что позволяет обеспечить эффективную доставку субстрат-зависимых линий клеток малоинвазивным методом имплантирования [228].

Изначально микроносители были предложены для мультипликации субстрат-зависимых клеток *in vitro*: клетки растут монослоем на поверхности микрочастиц, суспендированных в среде для культивирования, что позволяет обеспечить достаточную поверхность для их роста и проводить, таким образом, их мультипликацию [228,229]. Однако в настоящий момент такие клеточные микроносители рассматриваются как многофункциональные системы для тканевой инженерии [227,230–234]. Использование биodeградируемых полимеров в качестве основы определяет возможность их использования в качестве замещаемых матриц для *in vivo* применения. Такие микроносители обладают

целым рядом преимуществ перед остальными средствами доставки клеток. Во-первых, их размер и способность к суспендированию в водных средах позволяет вводить их в поврежденные участки тканей инъекционно. Во-вторых, микрочастицы обладают большой поверхностью доступной для адгезии и роста клеток. В-третьих, можно комбинировать различные линии клеток, в зависимости от типа ткани, регенерация которой желательна. В-четвертых, классическая для микрочастиц способность к пролонгированному выделению активных компонентов делает их одновременно и средством доставки биоактивных компонентов. Такие многофункциональные микрочастицы являются эффективным инструментом для целенаправленной регенерации поврежденных тканей.

Вне зависимости от размера и конечного применения полимерных частиц их классификация и принципы получения, в основном, универсальны. Полимерная микрочастица может представлять собой или микросферу или микрокапсулу (ядро или полое или заполненное жидкостью, а стенка состоит из полимерной оболочки). Отдельно можно выделить нано-/микрогидрогели на основе хитозана, которые являются одной из форм гидрогелей, описанных в разделе 1.2.5 [179,235]. В настоящее время разработаны методы получения микрочастиц с более сложной структурой, в том числе частицы Януса, многослойные микрокапсулы, микрочастицы с контролируемым количеством ядер, микрочастицы с ядрами различной природы и т.д. [225].

Основными методами формирования микрочастиц являются: распылительная сушка, фазовое разделение (коацервация) и экстракция/испарение растворителя [54,81,225,236–238]. Реже используют механические методы получения микрочастиц (с использованием вращающегося диска, микроинкапсулирование в псевдооживленном слое, экструзия и др.) и методы получения частиц, основанные на синтезе полимера в процессе формирования [225,239].

Клеточные микроносители в виде сферических микрочастиц в подавляющем большинстве случаев получают методом экстракции/испарения растворителя, который основан на получении различных типов эмульсий с

последующим удалением растворителя [225]. Метод основан на эмульгировании дисперсной фазы, содержащей полимер, в другой несмешивающейся фазе, которая образует дисперсионную среду (Рисунок 8). Как правило, дисперсная фаза состоит из раствора полимера в легколетучем растворителе и в процессе длительного эмульгирования этот растворитель удаляется и эмульсия «жидкость в жидкости» переходит в суспензию «твердое в жидком» с образованием твердых сферических микрочастиц. В зависимости от желаемого состава и структуры микрочастиц можно получать различные типы эмульсий, но в основном это определяется необходимостью иммобилизовать биоактивный компонент и, соответственно, его гидрофильно-гидрофобными свойствами. Важной особенностью такого метода получения микрочастиц является его гибкость с точки зрения контроля размера, морфологии и свойств микрочастиц. Варьирование таких факторов как природа/характеристики полимера, соотношение компонентов/фаз, геометрия реактора и параметры регулирования позволяет получать микрочастицы с требуемыми характеристиками [238].

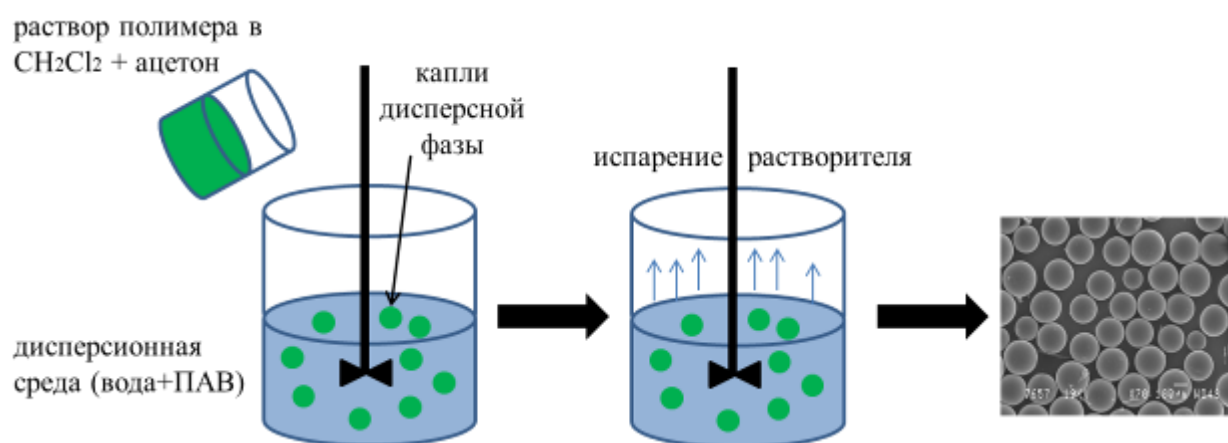


Рисунок 8 – Схема получения микрочастиц методом испарения растворителя из эмульсий масло/вода

В качестве полимерной основы микрочастиц и, соответственно, полимера, растворенного в дисперсной фазе используют различные типы полимеров, способных к биодеструкции. Нано/микрочастицы из хитозана также получают из

эмульсий, в том числе с использованием микрофлюидных технологий, но такие частицы во многом являются одной из форм гидрогелей, которые рассмотрены в разделе 1.2.5 [235]. В большинстве случаев микрочастицы формируют из сложных полиэфигов (полилактид и его сополимеры). Соответственно, в качестве растворителя в дисперсной фазе используют дихлорметан или его смеси с другими растворителями, а в качестве дисперсионной среды водные растворы, содержащие поверхностно-активные вещества (наиболее часто поливиниловый спирт; реже: полисорбат, желатин, метилцеллюлоза и др.). Такие микрочастицы имеют недостатки, которые связаны с отсутствием специфических сайтов для прикрепления и роста клеток на поверхности микрочастиц и с наличием остаточного синтетического эмульгатора на поверхности микрочастиц после их получения [240]. Для решения этих проблем поверхность уже сформированных микрочастиц модифицируют хитозаном [199,234,241,242]. Более совершенным подходом является использование хитозана в качестве эмульгатора в дисперсионной среде [237,243,244]. Способность хитозана стабилизировать границу раздела фаз существенно зависит от его характеристик (ММ и СА) [245–247]. Целенаправленное модифицирование химической структуры хитозана позволит регулировать его способность стабилизировать границы раздела фаз и, соответственно, выход и характеристики получаемых микрочастиц. Второй подход к повышению биосовместимости микрочастиц из полилактида основан на их наполнении хитозаном, что не снимает необходимости использовать поливиниловый спирт в качестве эмульгатора в дисперсионной среде [248].

В последнее десятилетие в научной литературе наблюдается рост интереса к получению эмульсий, стабилизированных наночастицами, то есть так называемых эмульсий Пикеринга [249–251]. Такие эмульсии более устойчивы к коалесценции и для стабилизации границы раздела фаз требуется меньшая концентрация наночастиц. Современные работы по эмульсиям Пикеринга во многом направлены на поиск и исследование биосовместимых и биodeградируемых наночастиц, способных выступать в качестве эмульгаторов, в том числе в процессе получения полимерных микрочастиц для пищевой промышленности и

биомедицины [237,252–254]. Наночастицы из хитозана также можно успешно использовать для стабилизации эмульсий [19,255,256].

Существует несколько подходов к получению наночастиц из полисахаридов и хитозана в частности: (1) «снизу-вверх», то есть самосборка за счет контролируемого осаждения или модифицирования химической структуры хитозана, а также комплексообразование; (2) «сверху-вниз» селективный гидролиз аморфных областей полисахарида с выделением нанокристаллических частиц [12,13,257]. В первом случае получают набухшие наноразмерные гели, а во втором – анизометричные наночастицы, которые можно использовать для формирования полимерных микрочастиц методом испарения растворителя из эмульсий Пикеринга.

1.2.5. Гидрогели на основе хитозана

Гидрогели являются одним из наиболее перспективных и широко исследуемых типов материалов для адресной доставки биоактивных компонентов и создания матриц для тканевой инженерии. Гидрогели – сшитые гидрофильные полимеры, которые стабильны при набухании в воде и способны удерживать объем жидкости в тысячи раз превышающий объем самого гидрогеля. В набухом состоянии гидрогели имеют физические характеристики сходные с животными мягкими тканями и, поэтому при их имплантации не вызывают повреждений окружающих нативных тканей организма. Гидрогели легко деформируются и принимают нужную форму. В литературе представлено огромное количество обзорных статей по получению и применению гидрогелей в различных областях биомедицины [50,51,258–264]. Однако, несмотря на большое количество научных статей и патентов, реально коммерциализованных гидрогелей для доставки лекарств и тканевой инженерии очень мало. На практике гидрогели в медицине используют в виде контактных линз, гигиенических продуктов и раневых покрытий [265].

Гидрогели можно применять или в виде достаточно крупных объемных материалов, например, в качестве инъектируемых гидрогелей или

структурированных матриц; или в виде нано-/микроразмерных частиц (нано-/микрогели) [179,223,235]. Инжектируемые гидрогели в основном применяются в качестве систем для доставки биоактивных/лекарственных компонентов [266], в том числе в тканевой инженерии [267,268]. Основной областью применения нано-/микрогелей являются системы адресной доставки лекарственных веществ или клеток, в то время как структурированные гидрогели в основном применяют в качестве матриц для тканевой инженерии. Физические свойства гидрогелей в набухшем состоянии в основном зависят от природы полимера, его молекулярной массы и заряда, природы связей между макромолекулами и плотностью сшивки между ними. Например, увеличение плотности сшивки приводит к увеличению прочности и жесткости получаемого гидрогеля [269]. При использовании высокомолекулярных полимеров на одну макромолекулу приходится, как правило, большее количество узлов сшивок, что приводит к получению более плотного гидрогеля, в то время, как сшивка более низкомолекулярных макромолекул требует повышенной концентрации полимера для получения гидрогеля сопоставимой жесткости [270]. В зависимости от состава и структуры гидрогели могут обладать чувствительностью к ряду факторов и менять свои свойства при изменении pH, температуры, света, химического состава среды и т.д. [271,272].

Гидрогели на основе хитозана могут быть получены за счет: (1) межмолекулярных взаимодействий; (2) ковалентной сшивки [49,273–277]. Гидрогели, основанные на межмолекулярных взаимодействиях, могут обратимо разрушаться при изменении внешних факторов, поэтому именно такой подход используют для получения pH- и термочувствительных гидрогелей. Дополнительным преимуществом таких гелей является отсутствие сшивающих агентов, что снижает риск при дальнейшем использовании в медицине. На рисунке 9 схематически представлены основные виды межмолекулярных взаимодействий, которые приводят к гелированию растворов хитозана: ионные взаимодействия, образования полиэлектролитных и интерполимерных комплексов. Во всех случаях взаимодействия должны быть достаточно сильны

для образования стабильных связей между макромолекулами, но, в то же время, обеспечивать доступ/присутствие воды в полимерной сетке. Межмолекулярные взаимодействия в гидрогелях на основе хитозана в основном связаны с наличием первичных аминогрупп, что обеспечивает возможность его взаимодействия с отрицательно заряженными молекулами и анионами. В литературе описано получение гидрогелей хитозана с сульфатами, цитратами и фосфатами [278–280]. Возможно также образование координационно-ковалентных связей между анионами металлов (Pt(II), Pd(II), Mo(VI)) и аминогруппами хитозана, что обеспечивает более прочные связи [281,282].

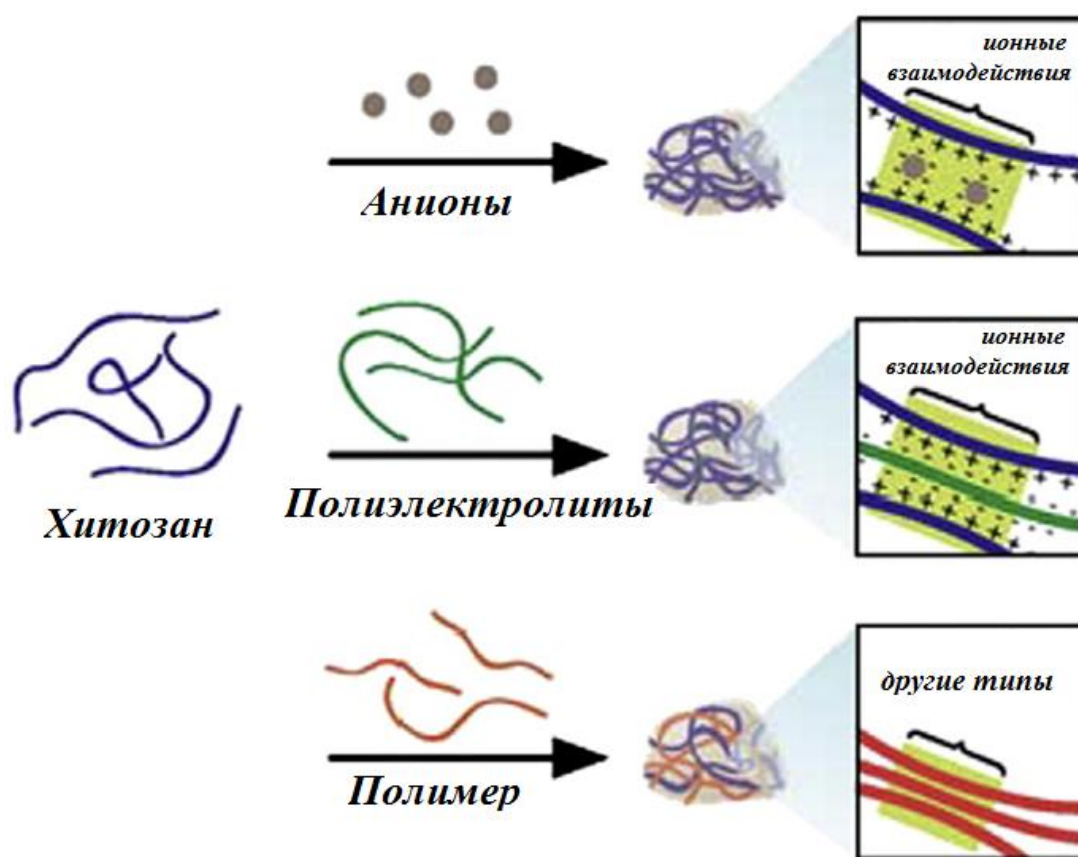


Рисунок 9 – Типы гидрогелей на основе хитозана в зависимости от взаимодействия с ионами, нейтральными макромолекулами и содержащими ионогенные группы [274]

Получение гидрогелей также возможно за счет взаимодействий с другими макромолекулами, то есть через образование интерполимерных, в том числе полиэлектролитных комплексов с полисахаридами, белками и синтетическими

полимерами. В литературе описано получение полиэлектролитных комплексов хитозана с синтетическими полимерами [283], но в большинстве случаев используют природные полимеры, в том числе желатин, альбумин, фиброин, альгинат, каррагинан, гиалуроновая кислота [179,284–288]. Возможно также получение интерполимерных комплексов, содержащих хитозан и другой неионогенный полимер, за счет формирования совместных кристаллитов и иных видов взаимодействия. Наиболее часто такие композиционные гидрогели получают с использованием поливинилового спирта в качестве второго полимера путем лиофилизации или циклических замораживаний или при электроформовании из смесевых растворов [273,289,290].

Гидрогели на основе хитозана, полученные за счет ковалентной сшивки, как правило, не только более стабильны, но и обладают улучшенными свойствами (механические характеристики, степень набухания, термическая стабильность и т.д.), которые путем подбора сшивающего агента и его концентрации можно варьировать в достаточно широких пределах. Существенными недостатками получения гидрогелей хитозана с применением сшивающих агентов являются (1) возможный токсичный эффект самих сшивающих агентов; (2) изменение химической структуры хитозана, что может повлиять на его свойства, в том числе биосовместимость и скорость биodeградации.

Основными сшивающими агентами, которые используют для получения гидрогелей на основе хитозана и его модификаций, являются: глутаровый альдегид [291–293], глиоксаль [294], формальдегид [295], дженипин [48,292]. Применение глутарового альдегида для получения гидрогелей биомедицинского назначения в последнее десятилетие неуклонно снижается из-за возможного цитотоксического эффекта [296]. Возможно, это связано с достаточно сложным механизмом его реакции с хитозаном, который сопровождается образованием олигомерных фрагментов глутарового альдегида [297]. Несмотря на то, что литературные данные по токсичности глутарового альдегида, как сшивающего агента для получения гидрогелей из хитозана, неоднозначны, в последнее время

интенсивно проводятся работы по получению гидрогелей хитозана, сшитых дженипином.

Дженипин (Дж) – сшивающий агент природного происхождения и его биосовместимость подтверждена исследований ряда материалов, в том числе на основе хитозана [298–300]. В этих же обзорах суммированы основные достижения в области получения и возможного применения сшитых дженипином хитозансодержащих гидрогелей. По сравнению с гидрогелем, сшитым дженипином, образцы, полученные с использованием глутарового альдегида, обладают более высокой цитотоксичностью [301]. Сравнительные исследования морфологии, степени набухания и механических характеристик хитозансодержащих гидрогелей, сшитых глутаровым альдегидом и дженипином показали, достаточную эффективность обоих типов сшивающих агентов. Вне зависимости от типа сшивающего агента характеристики получаемых гидрогелей могут варьироваться в широких пределах путем изменения условий проведения реакции [302,303].

Перевести материалы из хитозана в нерастворимую форму также с помощью их термической обработки [304] или нейтрализацией в разбавленных растворах щелочей [305,306], но такие материалы обладают более низкими механическими характеристиками, а хитозан в основной депротонированной форме также плохо набухает в воде.

Основными подходами к регулированию свойств гидрогелей является подбор условий сшивания, создание композиционных гидрогелей или предварительное модифицирование химической структуры полисахарида, что во многих случаях направлено на их перевод в нерастворимую форму. При создании композиционных гидрогелей возможно использование разных полимеров и сшивающих агентов. В литературе представлены работы по получению сшитых гидрогелей на основе хитозана и гиалуроновой кислоты, с использованием дополнительного сшивающего агента (дженипина) [307] или путем предварительной функционализации обоих полисахаридов [308]. Гиалуроновая кислота широко применяется в биомедицине, в том числе в тканевой инженерии

и, поэтому является частым компонентом в гидрогелях на основе хитозана [309,310]. Для обеспечения дополнительной функциональности гидрогелей возможно также введение минеральных компонентов в хитозансодержащие гидрогели. Например, гидроксиапатит – основной минеральный компонент костной ткани – вводят для повышения остеогенности материала и увеличения пролиферации остеобластов [311–314].

Структурирование гидрогелей также позволяет регулировать их свойства и его можно проводить с применением различных технологий, но одними из наиболее популярных и перспективных являются лиофильная сушка и аддитивные технологии. В настоящем разделе будет рассмотрено получение макропористых гидрогелей из хитозана методом лиофильной сушки, а получение структурированных гидрогелей с помощью аддитивных технологий в разделе 1.2.6. Формование макропористых гидрогелей методом сушки растворов полимеров из замороженного состояния под вакуумом (лиофильная сушка) является одним из наиболее распространенных и универсальных методов получения пористых материалов [315,316]. При замораживании растворов полимеров растворитель кристаллизуется и в процессе сушки под вакуумом подвергается сублимации, оставляя пустое пространство (пору), окруженное стенками из полимера. Соответственно, структуру получаемого образца можно регулировать с помощью двух основных параметров проведения процесса: (1) скорость замораживания, которая задает количество центров кристаллизации, то есть количество пор; (2) концентрацию раствора, которая вместе с первым параметром определяет размер пор, а также толщину стенок пор, то есть опосредовано механические характеристики образца. Учитывая целевое назначение гидрогелей средний размер пор варьируют в диапазоне 50-150 мкм для обеспечения свободного тока питательных веществ и метаболитов, роста клеток и тканей, а также пространства для васкуляризации. Сшивающие агенты вводят или в раствор полимера или применяют пост-обработку полимерных губок.

Гидрогели являются одной из основных форм материалов для регенеративной медицины, но для их успешного применения в качестве матриц для тканевой инженерии необходимо более четко регулировать их архитектуру.

1.2.6. Аддитивные технологии при создании хитозансодержащих материалов

Аддитивные технологии являются одним из наиболее перспективных подходов к получению материалов биомедицинского назначения, так как позволяют создавать персонализированные изделия с четко заданной на микронном уровне структурой, то есть материалы, отвечающие нуждам конкретного пациента (размер, форма и т.д.) [317,318]. Среди огромного разнообразия методов аддитивных технологий для получения материалов для биомедицины наиболее разработанными и перспективными являются лазерная стереолитография, селективное лазерное спекание и 3D-печать, но их применение для немодифицированного хитозана затруднительно или невозможно [319].

Лазерная стереолитография была разработана в 1986 году и с тех пор прочно заняла позицию наиболее распространенного и, в то же время, динамично развивающегося метода аддитивных технологий [320]. Стереолитография основана на локальном отверждении фоточувствительной композиции под воздействием лазерного излучения, движения которого задаются программой (Рисунок 10). После отверждения первого слоя платформа опускается и процесс повторяется. Финальный материал отмывают от несшитых фрагментов и, в некоторых случаях, доотверждают под УФ-лампой. Моделью для получения структуры могут служить в том числе и данные компьютерной томографии реального пациента.

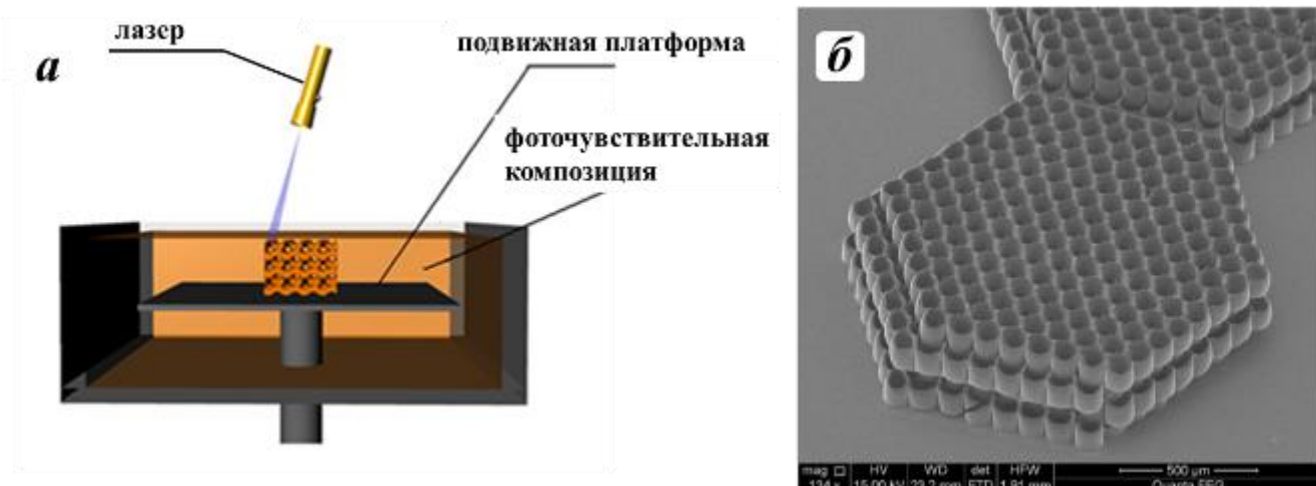


Рисунок 10 – Принципиальная схема установки для стереолитографии (а) [320] и микрофотография трехмерной структуры, полученной методом двухфотонной лазерной стереолитографии из метакрилированного олиголактоида (б) [321]

Два основных компонента лазерной стереолитографии, которые постоянно совершенствуются и определяют ее применимость в различных областях: источники лазерного излучения и состав фоточувствительной композиции [322–325]. Характеристики лазера позволяют реализовывать процесс методом одно- или мультифотонной стереолитографии, которые с практической точки зрения различаются размером единичного структурного элемента. Коммерческие установки для однофотонной лазерной стереолитографии позволяют работать с разрешением около 20 мкм, а лабораторные установки, основанные на принципе мультифотонной стереолитографии, обеспечивают возможность формировать материалы без локального перегрева и с разрешением до субмикронного уровня, что более перспективно для создания материалов для регенерации, например, нервных тканей [320,321].

Состав фоточувствительной композиции является второй важной составляющей успешного применения лазерной стереолитографии в медицине. К базовым требованиям можно отнести следующие характеристики: (1) фоточувствительная композиция должна быть жидкой; (2) отверждаться под воздействием лазерного излучения в течение достаточно короткого времени; (3) иметь низкий коэффициент объемного сжатия [323]. Если финальный материал

планируется использовать в качестве материала для тканевой инженерии, то все компоненты фоточувствительной композиции должны быть биосовместимыми. Особенные требования предъявляются при получении материалов, содержащих термочувствительные биоактивные компоненты и/или клетки. В этом случае необходимо использование установок для стереолитографии, основанных на эффекте двухфотонного поглощения, и, соответственно, требуется соблюдение следующих условий: (1) композиция должна быть прозрачной при основной длине волны лазера, чтобы обеспечить пропускание лазерного излучения и его фокусировку в объеме; (2) основа композиции должна быть прозрачной при рабочей длине волны ($\lambda/2$), чтобы предотвратить перегрев в процессе отверждения.

Фотоотверждаемая композиция состоит из двух основных компонентов: фотоинициатора и основы. Фотоинициатор должен поглощать излучение при рабочей длине лазера, генерировать достаточное количество активных компонентов, запускающих процесс отверждения и растворяться в среде основы. Однако, наверное, самым важным и лимитирующим компонентом лазерной стереолитографии применительно к биомедицине является основа фоточувствительной композиции, то есть сам материал, который должен отверждаться под действием лазера. Наиболее распространены коммерчески доступны акриловые, эпоксицированные (SU-8, MicroChem Corp., США) и кремнийорганические (ORMOCER, Microresist Technologies, Германия) фотополимеры, но материалы на их основе не обладают достаточной функциональностью для успешного применения в качестве материалов для биомедицины [323,326]. В настоящее время активно разрабатываются биосовместимые и биodeградируемые основы для фоточувствительных композиций. В большинстве случаев это фоточувствительные модификации синтетических полимеров: полиэтиленгликоль [327,328], поликапролактон [329,330] и полилактид [321,331–333]. Однако значительные усилия в разработке биосовместимых и биodeградируемых основ фоточувствительных композиций для лазерной стереолитографии направлены на исследования в области

природных полимеров, в том числе хитозана. Для получения хитозансодержащих материалов методом лазерной стереолитографии в качестве фоточувствительной композиции используют или смеси хитозана с акрилатами [334] или его производные, содержащие винильные группы [335,336].

Другие широко распространенные методы аддитивных технологий – 3D-печать и селективное лазерное спекание – не подходят для немодифицированного хитозана. Биопечать с использованием жидких композиций (inkjet printing) очень требовательна к «чернилам», поэтому требует создания смесевых систем, где хитозан выступает в качестве наполнителя [337]. 3D-печать, основанная на технологии FDM (fused deposition modeling), то есть послойного наплавления, недоступна в силу неплавкости хитозана. Для переработки хитозана в материалы по такой технологии используют композиционные стренги на основе термопластов (в основном, полилактид), наполненные хитозаном [338,339]. Аналогичная проблема возникает при создании хитозансодержащих материалов с помощью селективного лазерного спекания (СЛС). Трехмерные материалы методом СЛС получают при послойном спекании порошкового материала лазерным излучением [340]. Слой порошка термопласта разравнивают на поверхности зоны обработки и с помощью лазерного излучения спекают требуемый контур; далее, насыпают и разравнивают новый слой порошка и процесс повторяется (Рисунок 11). После получения изделия излишки порошка удаляют. Таким образом можно получать трехмерные структуры с заданной архитектурой, что более технологично, чем горячее прессование порошков в формах [248,341]. В качестве исходных компонентов для СЛС используют порошки из термопластов (полилактид в случае применения для биомедицины), к которым предъявляются достаточно жесткие требования относительно их формы, размера и распределения по размерам.

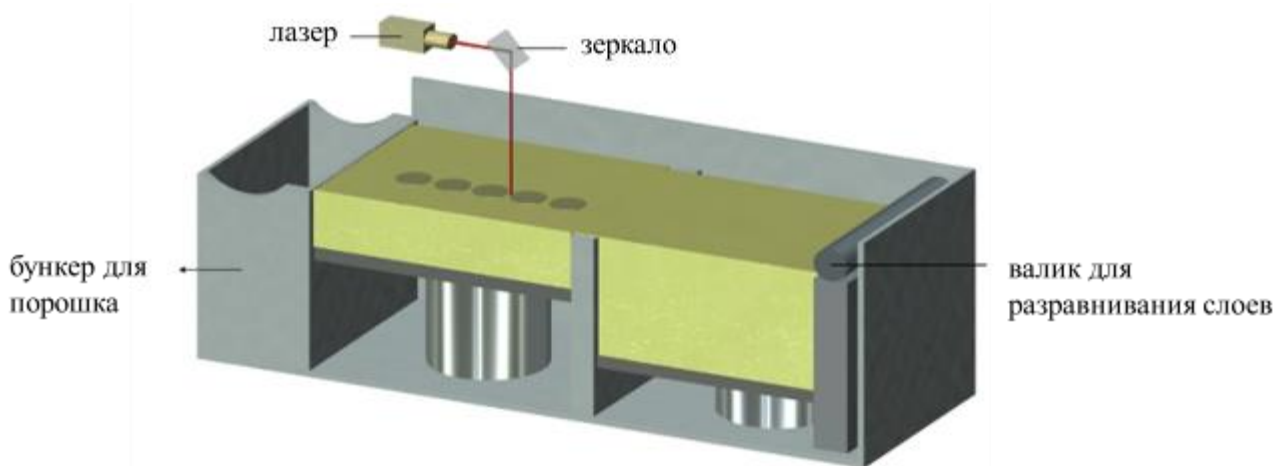


Рисунок 11 – Принципиальная схема установки для селективного лазерного спекания [340]

Существенным ограничением применения СЛС в биомедицине является перегрев материала при воздействии лазерного излучения и возможная деградация биоактивных соединений (лекарств) в процессе формирования материала [340]. При создании матриксов для тканевой инженерии во многих случаях необходимо их наполнять факторами роста или другими активными соединениями, которые бы способствовали формированию заданного типа ткани. Для сохранения термочувствительных соединений в процессе формирования трехмерных структур спекание можно проводить в режиме поверхностно-селективного лазерного спекания (ПСЛС), разработанном д.ф.-м.н. В.Н. Баграташвили в ИПЛИТ РАН (филиал ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН) [342–345]. ПСЛС позволяет проводить спекание полимерных частиц под воздействием лазерного излучения среднего ИК диапазона, который слабо поглощается самим полимером. На порошок наносят сенсibilизатор нагрева в виде мелкодисперсного аэрозоля воды, который поглощает лазерное излучение, передает часть тепла поверхности полимерного порошка и обеспечивает его спекание только в поверхностном слое. Ограничением такого подхода является необходимость нанесения аэрозоля воды на поверхность порошка для спекания, который представляет из себя частицы из термопластичных полимеров (в основном, полилактид), которые имеют гидрофобную поверхность. Для создания

гидрофильного покрытия на размолотый порошок полилактида можно методом пост-обработки наносить покрытие из гиалуроновой кислоты, что недостаточно технологично [346].

Аддитивные подходы обладают значительными преимуществами при создании материалов для регенеративной медицины. Однако в связи с жестким набором требований к полимерам, пригодным для биомедицины и формуемым с использованием методов аддитивных технологий, во многих случаях требуется модифицирование химической структуры полимера.

1.3. Краткие выводы и постановка задач исследования

Разработка полимерных материалов биомедицинского назначения является одним из наиболее динамично развивающихся направлений современного материаловедения. Такие материалы очень востребованы в различных областях биомедицины и их отсутствие во многом лимитирует трансляцию регенеративной медицины в клиническую практику. Биосовместимые полимеры необходимы для *in vitro* и *in vivo* применений, в том числе для культивирования субстрат-зависимых клеток, биотехнологии, генной инженерии; биodeградируемые биосовместимые полимеры требуются для создания искусственных биотканей/органов. Предъявляемые к таким материалам жесткие критерии (морфология, скорость биodeградации, биосовместимость и т.д.) определяют необходимость междисциплинарного подхода к их созданию, так как требуют контроля над химической структурой полимера, технологией формирования материалов на их основе, а также оценки пригодности изделия к применению в биомедицине.

Химическая структура полимера является одним из ключевых факторов при разработке материалов биомедицинского назначения, так как во многом определяет доступность различных технологий формирования и свойства изделия. В качестве «базового» полимера для создания материалов для биомедицины перспективным представляется хитозан – продукт деацетилирования природного полисахарида хитина, который обладает

биосовместимостью, способность к биодegradации под действием неспецифического фермента лизоцима, а также биоактивностью из-за своего природного происхождения. Химическая структура хитозана играет важную роль как с точки зрения его свойств, в том числе биосовместимости, биоактивности и скорости биодegradации, так и способности к переработке с использованием различных подходов. Диссертационная работа посвящена разработке фундаментальных основ механохимического модифицирования химической структуры хитозана для регулирования его способности к переработке с помощью различных технологий формования, принятых для создания материалов биомедицинского назначения, а также для регулирования свойств получаемых материалов. Широкий спектр форм материалов, необходимых для регенеративной медицины, определяет ряд технологических приемов к их получению, которые для немодифицированного хитозана не всегда применимы. При выборе метода и направления модифицирования химической структуры руководствовались несколькими критериями: (1) глубина модифицирования структуры хитозана исходя из конкретной материаловедческой задачи, то есть набора требуемых свойств, предъявляемых к хитозансодержащему материалу; (2) эффективность метода синтеза производных и сополимеров хитозана и минимизация дополнительных реагентов и катализаторов, которые могут быть потенциально цитотоксичными; (3) производительность способа модифицирования химической структуры хитозана, так как для создания материалов необходимы значительные количества полимера.

С учетом двух последних критериев в работе широко использовали твердофазное механохимическое модифицирование хитозана. Механохимия высокомолекулярных органических соединений является интенсивно развивающимся направлением, которое благодаря переходу на оборудование экструзионного типа позволяет получать достаточное для создания материалов количество целевых продуктов реакции при сохранении высокой эффективности и без использования дополнительных реагентов. Применительно к полисахаридам твердофазное реакционное смешение особенно перспективно, так как

использование расплавных и растворных технологий для модифицирования их химической структуры затруднено. Настоящая работа является развитием направления по разработке механохимических подходов к модифицированию химической структуры полисахаридов и нацелена на систематическое изучение различных факторов механохимического модифицирования и химической структуры хитозана на способность к формированию материалов, а также на структуру и свойства получаемых изделий.

Выбор пути модифицирования химической структуры хитозана определялся конкретной задачей и основывался на двух подходах: (1) для модифицирования целевого свойства применяли дополнительную функционализацию макромолекул хитозана низкомолекулярными соединениями способом полимераналогичных превращений; (2) при решении более сложных материаловедческих задач использовали твердофазный механохимический синтез привитых сополимеров хитозана содержащих олигомерные и высокомолекулярные фрагменты в качестве боковых заместителей, а также синтез многокомпонентных сополимерных систем.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Полимераналогичные превращения хитозана и синтез привитых сополимеров на его основе

2.1.1. Синтез функциональных производных хитозана

2.1.1.1. Аллилхитозан

Наличие в хитозане двух гидроксильных групп (вторичной у С-3 и первичной у С-6) и аминогруппы у С-2 обеспечивает ему как минимум три потенциальных центра для ковалентного и ионного связывания физиологически активных веществ. Однако, для получения на его основе высокотехнологичных материалов со специальными свойствами может потребоваться дополнительная функционализация макромолекул. Например, одна из наиболее перспективных технологий создания трехмерных материалов с заданной морфологией – лазерная стереолитография – основана на способности полимера отверждаться с образованием сшитых нерастворимых структур под воздействием лазерного излучения. Соответственно, это требует введения в химическую структуру полисахарида функциональных групп, способных к иницируемой лазерным излучением фотополимеризации. В рамках диссертации рассмотрен твердофазный синтез непердельного производного хитозана, содержащего аллильные фрагменты. Основные результаты по синтезу и исследованию структуры и свойств аллилхитозана изложены в соавторстве [347–350].

Условия твердофазного синтеза образцов аллилхитозана представлены в разделе 3.2.1.1. Образец аллилхитозана АХ-1 был получен реакционным смешением очищенного от щелочи хитозана Х-80 (ММ 80 кДа, СА 0.15) и аллилборонида. Образцы АХ-2 – АХ-5 получали проведением реакции между аллилборонидом и хитозаном Х-АХ, который по своим характеристикам был аналогичен Х-80, но не очищен после деацетилирования от избытка щелочи и ацетата натрия, то есть находился в неравновесном состоянии [68,174]. В таблице

1 приведены данные по степени замещения функциональных групп хитозана, рассчитанные по ^1H ЯМР-спектрам (Рисунок 12).

Таблица 1 – Степень замещения функциональных групп образцов аллилхитозана по данным ЯМР-спектроскопии

Образец	Соотношение интегральных интенсивностей сигналов протонов в структурных фрагментах I и V	ΣC3	Соотношение N- и O-замещенных групп
AX-1	0.7	0.10	–
AX-2	0.3	0.05	1 : 2
AX-3	1.1	0.17	1 : 1.8
AX-4	1.4	0.21	1 : 1.7
AX-5	3.3	0.50	1 : 1.5

На спектрах указаны области сигналов протонов в структурных фрагментах $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-$ и $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NR}-$ (5.8 ppm), R = H или All (I); $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NR}-$ (от 5.3 до 5.6 ppm) (II); $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-$ (от 5.0 до 5.2 ppm) (III); $>\text{CH}-\text{NH}_2$ (3.0-3.1 ppm) (IV); $\text{H}_3\text{C}-\text{CONH}-$ (1.9 ppm) (V); H-OD – остаточный сигнал протонов воды (Рисунок 12). Сравнение их интегральных интенсивностей позволило оценить как общее содержание аллилзамещенных групп хитозана, так и смещение пути реакции в сторону O- или N-алкилирования в зависимости от выбранных условий проведения процесса (Таблица 1).

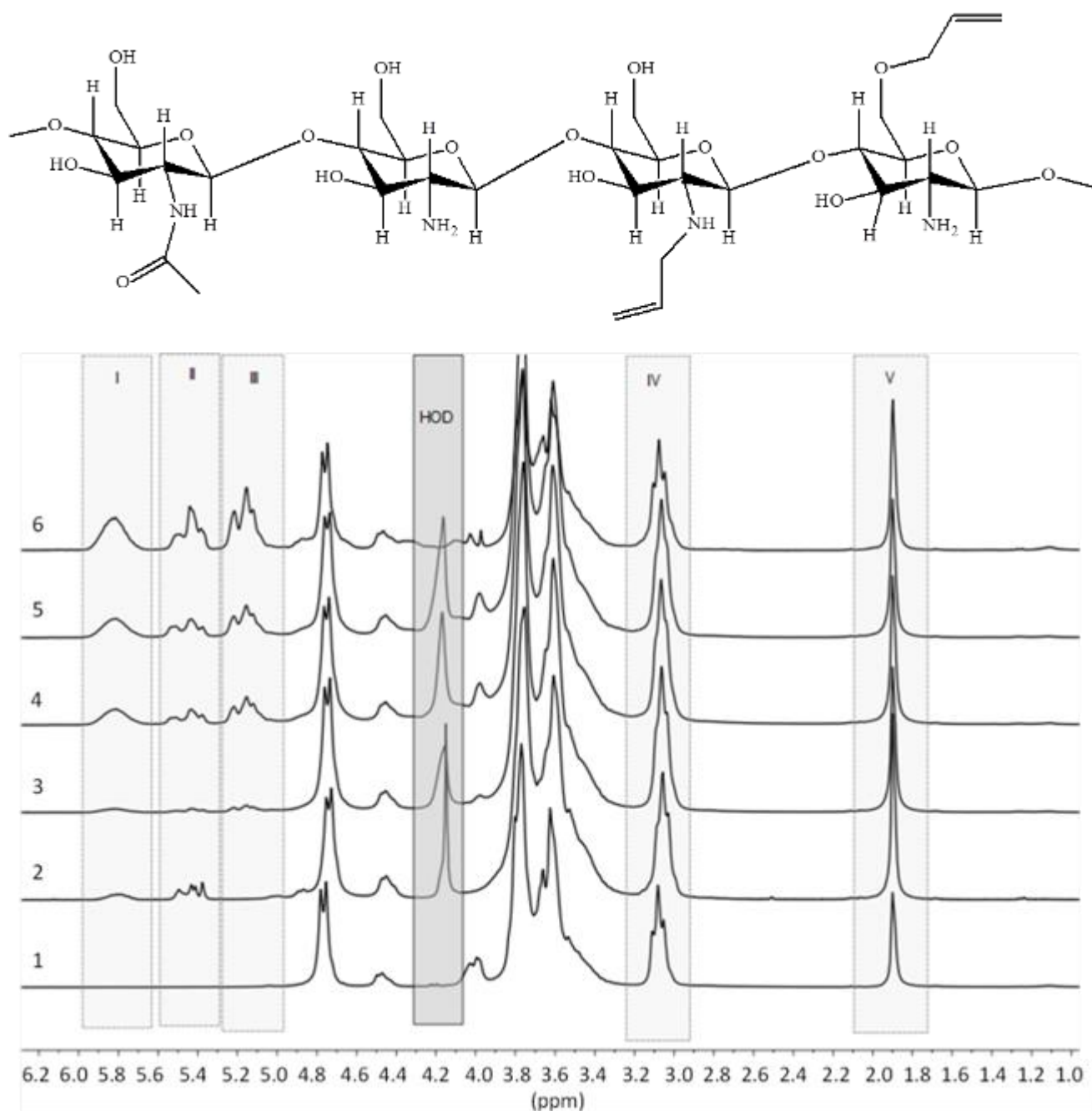


Рисунок 12 – Предположительная химическая структура аллилхитозана и ¹H ЯМР спектры исходного хитозана X-AX (спектр 1) и его аллильных производных (спектры 2-6) (образцы AX-1 – AX-5)

Анализ ЯМР-спектров показал, что в отсутствие NaOH в реакционной системе процесс алкилирования проходит исключительно по аминогруппам хитозана (Рисунок 13, путь 1). При проведении реакции в щелочной среде образуются неселективно O- и N-замещенные производные хитозана, в которых

количество О-замещенных фрагментов в 1.5-2 раза выше, чем N-замещенных. Щелочь не только активирует гидроксильные группы полисахарида для нуклеофильного замещения, но и связывает бромид ионы в процессе реакции (Рисунок 13, путь 2). В отсутствие щелочи ионы брома могут связываться с аминогруппами хитозана (Рисунок 13, путь 1). Суммарная степень замещения функциональных групп возрастает с увеличением содержания аллилбромида в реакционной смеси и достигает 0.50 при двойном мольном избытке реагента в пересчете на осново-моль хитозана.

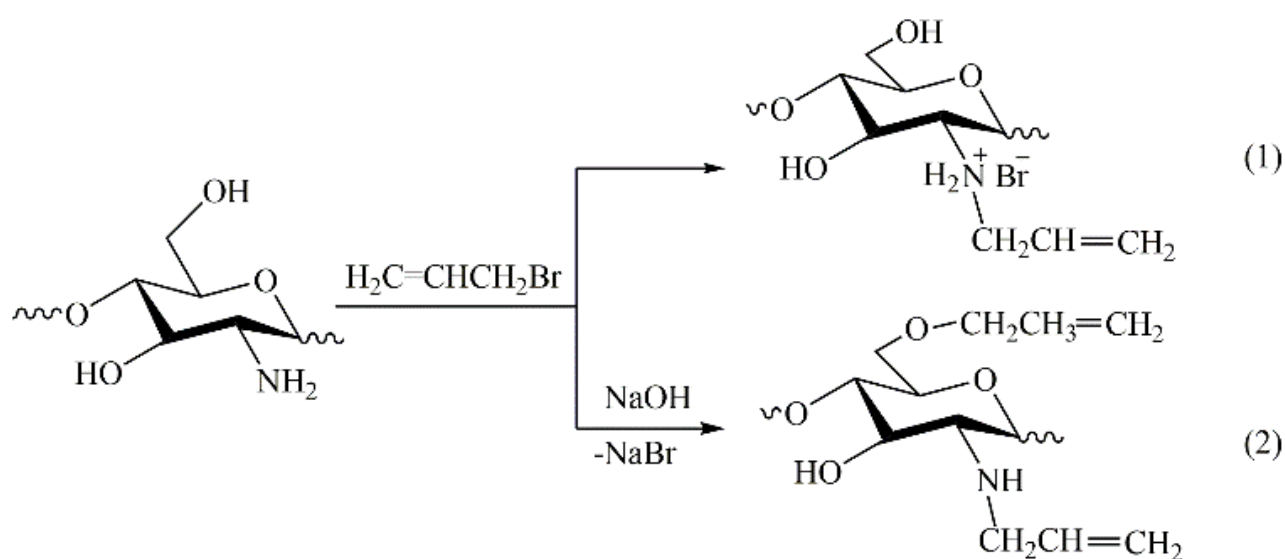


Рисунок 13 – Схема реакции между хитозаном и аллилбромидом без использования NaOH (путь 1) и в присутствии щелочи (путь 2)

На рисунке 14 представлены ИК-спектры исходного хитозана и продуктов его реакционного смешения с аллилбромидом в присутствии NaOH. В области $3700-2500\text{ см}^{-1}$ наблюдается широкая полоса поглощения валентных колебаний О-Н групп, которая перекрывает дублет валентных колебаний NH_2 и CH_2 . В результате полосы ассиметричных и симметричных валентных колебаний N-H проявляются в спектре в виде плеч при 3356 и 3295 см^{-1} , в то время как дублет валентных колебаний C-H присутствует как пик с максимумом при 2870 см^{-1} и плечо 2997 см^{-1} . Относительная интенсивность $[\text{OH}]/[\text{CH}_2]$ уменьшается с увеличением содержания аллилбромида в реакционной смеси при синтезе

полимера, что указывает на участие О-Н групп в реакции. Наблюдается появление дополнительных алкильных групп в полимере, проявляющееся в увеличении интенсивности полосы валентных колебаний С-Н. Одновременно с этим интенсивность валентных колебаний =С-Н аллильных групп при 3085 см^{-1} значительно возрастает. При этом значительных изменений в полосе поглощения аминогрупп хитозана не наблюдается.

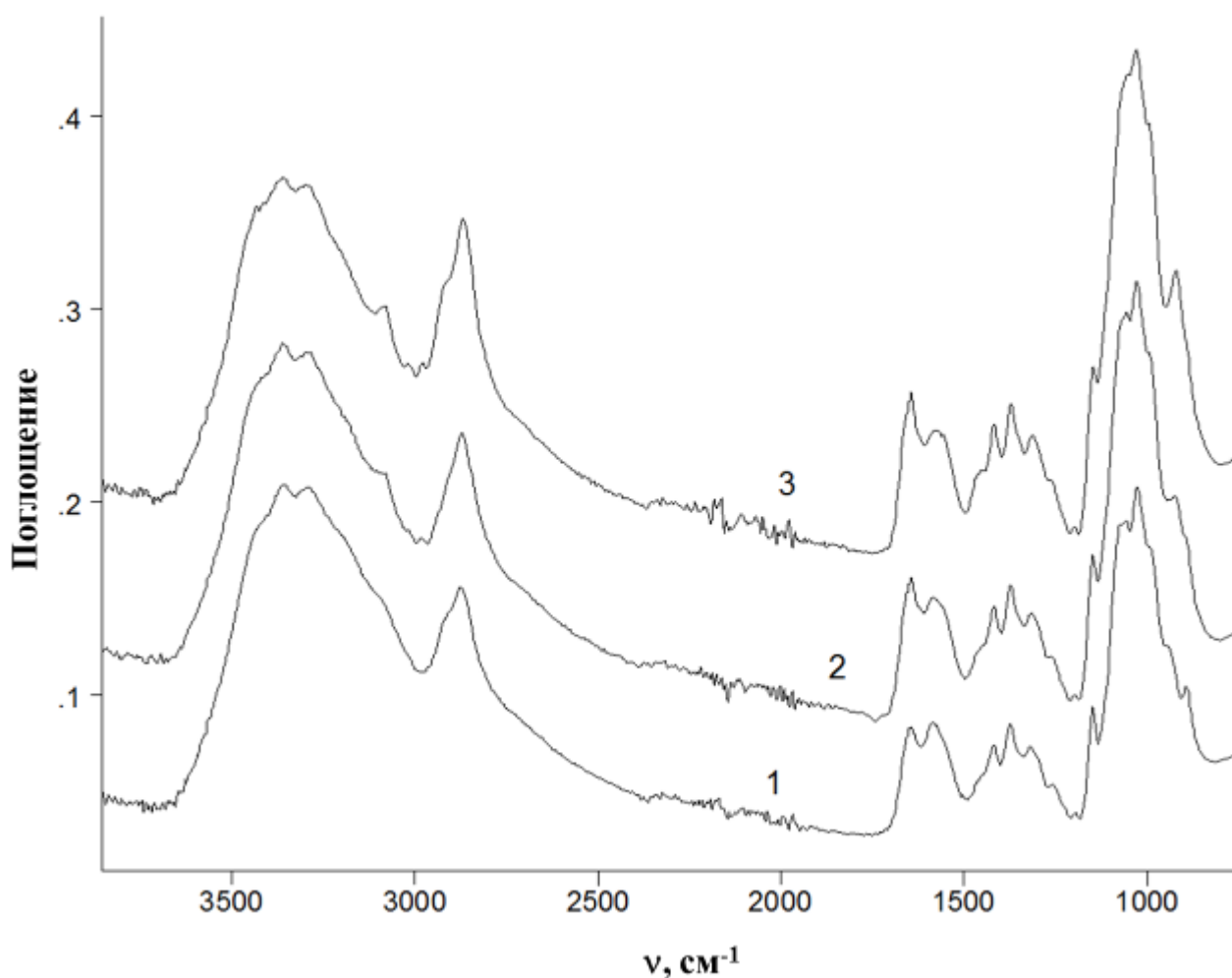


Рисунок 14 – ИК-спектр исходного хитозана X-AX (спектр 1) и образцов аллилхитозана со СЗ 0.2 (спектр 2) и 0.5 (спектр 3), то есть образцов AX-4 и AX-5, соответственно

Другие характерные для аллильных групп полосы могут наблюдаться при 1645 см^{-1} (валентные колебания двойных связей) и при 922 см^{-1} (деформационные

колебания =C-N) [351]. Учитывая наличие полосы поглощения Амида I при 1645 см^{-1} (остаточные ацетамидные группы хитина) в хитозане, наиболее рационально использовать интенсивность полосы при 922 см^{-1} для оценки содержания аллильных групп в производных хитозана. В исходном аллилбромиде аналогичный пик наблюдается при 927 см^{-1} . Сравнение спектров 2 (образец АХ-4) и 3 (образец АХ-5) в этой области спектра показывает, что изменение мольного соотношения между аллилбромидом и хитозаном с 1.5 до 2 раз приводит к удвоению степени замещения, что хорошо согласуется с данными ЯМР-спектроскопии. Подобные данные получены из соотношения относительных интенсивностей [C-O]/[OH], где [C-O] – огибающая полос с максимумом 1030 см^{-1} (валентные колебания C-O(H) групп) и других полос C-O связей, в том числе валентных колебаний гликозидных связях хитозана.

Деформационные колебания NH_2 групп в спектре исходного хитозана наблюдаются при 1590 см^{-1} , то есть между полосами Амид I и Амид II. Участие аминогрупп в реакции аллилирования выражается в уширении и смещении полос в область более низких волновых чисел до 1574 см^{-1} . Приблизительная оценка доли аминогрупп, участвующих в реакции с аллилбромидом была вычислена по относительной интенсивности $D[\text{NH}_2]/D[1375]$, где полоса при 1375 см^{-1} может быть использована в качестве внутреннего стандарта, так как согласно литературным она данным относится к огибающей полос валентных C-N и деформационных CH_2 колебаний [351]. Полученные данные хорошо коррелируют с выводом о преимущественном замещении гидроксильных групп при проведении твердофазного синтеза в присутствии щелочи.

Электронные спектры поглощения раствора аллилхитозана в 0.1 М HCl имеют одну интенсивную полосу поглощения при 301 нм и две полосы при 264 и 351 нм с меньшей экстинкцией (соотношение экстинкций полос 1/0.3/1) (Рисунок 15). Спектр поглощения исходного хитозана имеет те же полосы, однако весовая экстинкция полосы при 301 нм в два раза ниже, чем в аллилхитозане, а две остальные полосы имеют большую интенсивность (соотношение экстинкций полос 1/1/0.4). Оптическая плотность растворов хитозана и аллилхитозана при

разных концентрациях в максимуме полос поглощения линейно зависит от концентрации раствора, таким образом, выполняется закон Бугера-Ламберта-Бера и агрегация макромолекул в растворе отсутствует.

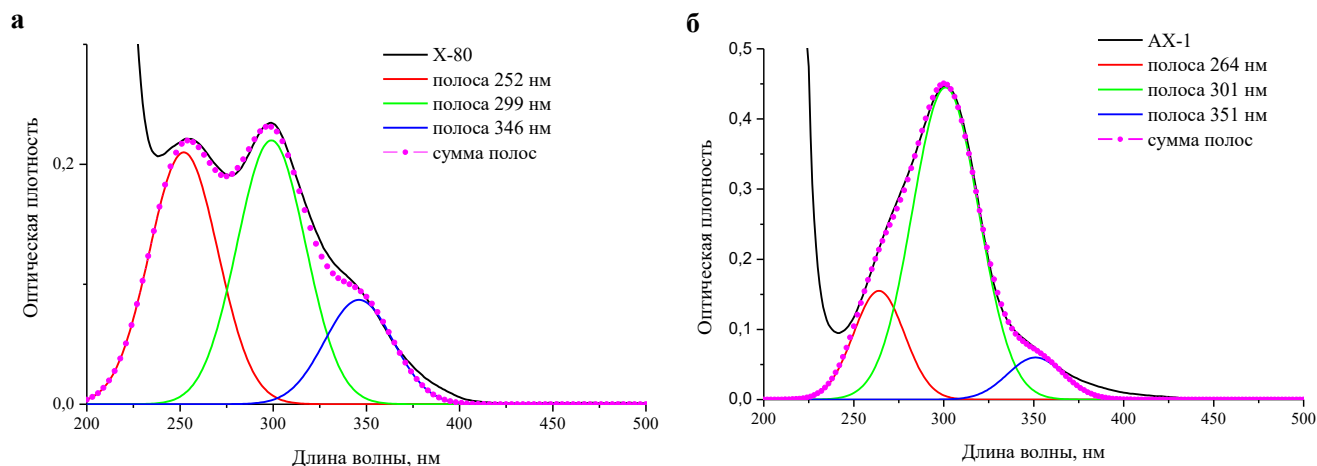


Рисунок 15 – Электронные спектры поглощения 1% растворов хитозана X-80 (а) и аллилхитозана AX-1 (б) в 0.1 М HCl

Таким образом, методом твердофазного реакционного смешения получены аллилированные производные хитозана. Варьирование условий твердофазного синтеза позволяет получать как N-, так и неселективно N-/O-замещенные аллилхитозаны. Во всех случаях не наблюдается значительной потери растворимости хитозана в уксуснокислых водных средах, что обеспечивает возможность применения традиционных для него методов формования материалов. С другой стороны, введение ненасыщенных связей позволяет использовать полученные производные в качестве фоточувствительной композиции для лазерной стереолитографии.

2.1.1.2. N-ацилированный гидроксикарбоновой кислотой хитозан

Первичная аминогруппа в хитозане – не только нуклеофильный центр, удобный для химического модифицирования, но и главный структурный элемент, ответственный за наличие у этого полисахарида физиологической активности, обусловленной его способностью связываться с белками,

дезоксирибонуклеиновыми кислотами, мембранами клеток и другими биополимерами и поверхностями несущими общий отрицательный заряд. Соответственно, получение N-замещенных производных хитозана является одним из наиболее удобных и эффективных способов регулирования как его биологической активности, так и физико-химических свойств, обусловленных изменением нуклеофильности и химического строения основной цепи. Для уменьшения количества нуклеофильных центров в макромолекулах в работе использовано твердофазное N-ацилирование хитозана гидроксикарбоновой кислоты (ГКК) – (2,2-бис-(гидрокси-метил)пропионовой) кислотой. Выбор ацилирующего агента обусловлен целым рядом причин:

– практически полным отсутствием токсичности, что позволяет использовать полученные ацилпроизводные в биомедицинских целях.

– ГКК, содержит две гидроксильные группы и это делает ацилированные производные хитозана сходными по химической структуре с классическими полиспиртами - полисахаридами производными целлюлозы и декстрана. Это делает более корректным сравнение их биологических свойств.

– ГКК весьма удобна для проведения ацилирования в условиях твердофазного синтеза. В отличие от уксусной кислоты она находится в твердом агрегатном состоянии (температура плавления 159°C). Это обеспечивает возможность проведения реакции в твердом состоянии в широком диапазоне температур.

– благодаря своему химическому строению ГКК является прекрасным объектом для количественной оценки возможности протекания реакций ацилирования как амино-, так и гидроксильных групп хитозана, а также вкладов автополиконденсации самой гидроксикислоты и ее привитой формы, что перспективно с точки зрения дальнейшей работы по твердофазному синтезу амфифильных систем на основе хитозана и олиго/полиэфиров.

Основные результаты по синтезу и исследованию структуры и свойств хитозана, ацилированного ГКК, опубликованы в соавторстве [352]. Совместное

деформирование хитозана с ГКК при повышенной температуре приводит к получению ацилированных производных хитозана. Данные фракционного и элементного анализа продуктов реакционного смешения хитозана и ГКК показали, что реакция хитозана с ГКК в твердом состоянии чувствительна к соотношению реагентов и температуре (Таблица 2). Наибольшая степень замещения (СА 0.43) продукта получена при 3-х кратном мольном избытке кислоты и температуре соэкструдирования 100°C. Снижение количества кислоты до эквимольного по отношению к аминогруппам хитозана приводит к увеличению количества прореагировавшей кислоты, но степень ацилирования невысока.

Таблица 2 – Условия синтеза и степень замещения аминогрупп в ацилированных ГКК производных хитозана

Образец	Соотношение хитозан/ГКК, мольное (г/г)	Температура соэкструдирования	Относительное количество прореагировавшей кислоты, %	СА
ХК-1	1/1 (55/45)	100	49	0.18
ХК-2	1/3 (29/71)	100	41	0.43

В спектре продуктов соэкструдирования хитозана с ГКК (образцы серии ХК) отсутствуют полосы поглощения сложноэфирной связи, что свидетельствует об образовании преимущественно N-ацилированных производных в условиях твердофазного синтеза и полностью согласуется с различием в нуклеофильности гидроксильных и аминогрупп хитозана в отсутствие катализа (Рисунок 16). На ИК-спектре образца ХК-2 наблюдаются обе полосы амидных групп при 1662 см⁻¹ и 1555 см⁻¹ (Амид I и Амид II, соответственно) и полоса деформационных колебаний аминогрупп (1600 см⁻¹). Из соотношения интенсивности полос

поглощения амидных связей и полосы деформационных колебаний аминогрупп видно, что степень ацилирования хитозана с помощью ГКК соответствует рассчитанному по данным элементного анализа для образца ХК-2 значению 0.43 (без учета содержания в исходном хитозане 10 мол.% остаточных ацетамидных звеньев хитина).

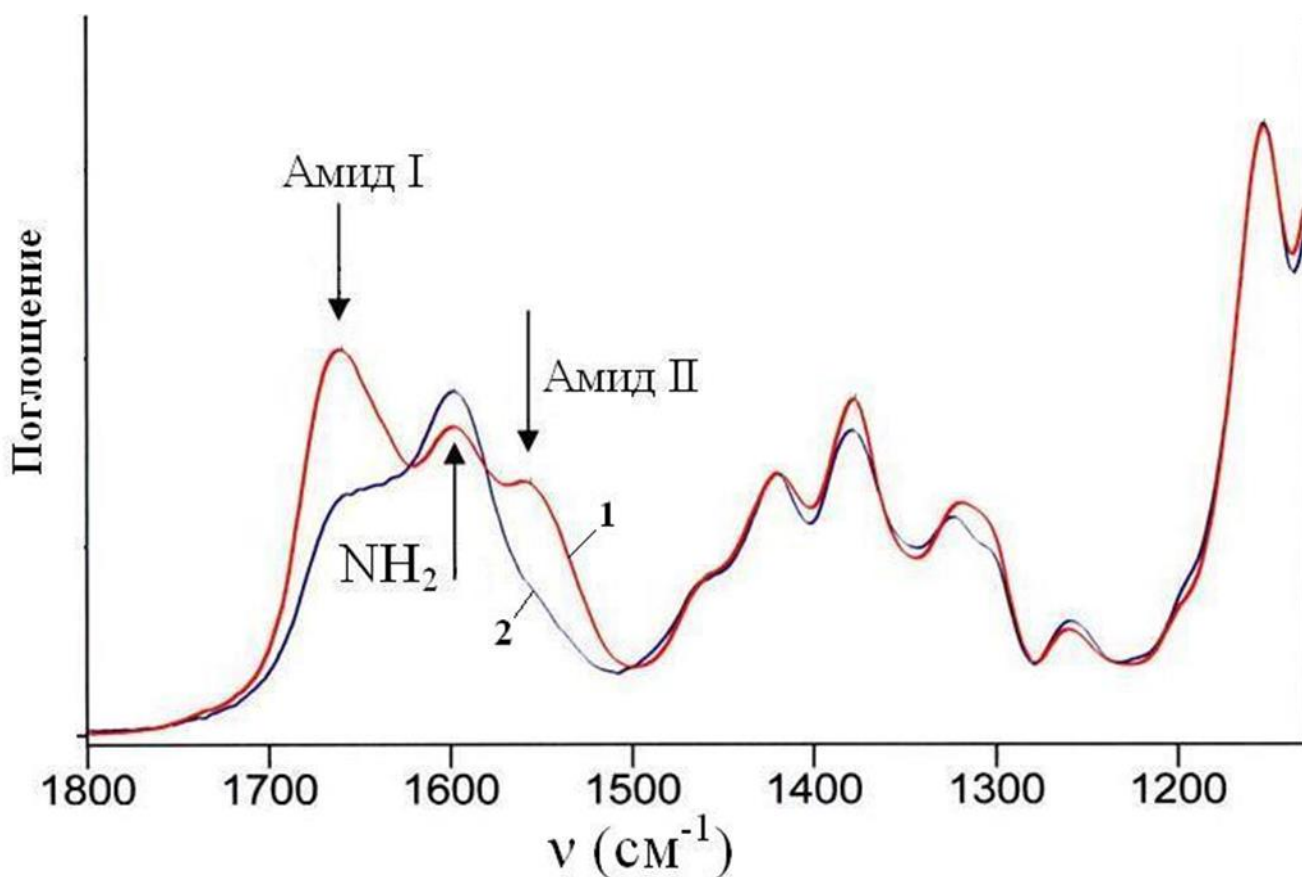


Рисунок 16 – ИК-спектры переосажденной из раствора фракции образца ХК-2 (1) и исходного хитозана (2)

Введение стерически затрудненного гидроксисодержащего заместителя меняет характер упаковки полисахаридной цепи и растворимость полимера. Образцы, полученные как при эквимольном (ХК-1), так и трехкратном мольном избытке ГКК в реакционной системе (ХК-2), частично теряют растворимость (нерастворимая фракция ~ 8 мас.%) по сравнению с исходным хитозаном, который растворяется почти полностью (нерастворимая фракция ~ 2 мас.%). Небольшая потеря растворимости может быть как результатом целевой реакции

ацилирования, так и побочных реакций самого хитозана под действием давления и сдвига, приводящих к разветвлению за счет взаимодействия его концевой альдегидной группы и аминогрупп звеньев основной цепи, протекающих при каталитическом действии кислоты в ходе обработки в экструдере. Кроме того, частичная потеря растворимости в воде может являться результатом сшивания полимера при повышенной температуре [160].

В то же время частичное ацилирование хитозана приводит к улучшению растворимости в нейтральных и щелочных растворах, в которых исходный хитозан растворим плохо. Изменяется характер поведения растворимых фракций продуктов при их дробном осаждении с увеличением рН среды. Немодифицированный хитозан полностью осаждается при рН 6.9-7.2, а ацилированные производные осаждаются при рН 7.5-10 только частично. Часть образца не удается выделить из раствора и это именно хитозан, что подтверждалось качественной реакцией на аминогруппы (нингидриновым тестом) растворов после отделения осадка. Наличие хитозана во всех фракциях, даже растворимых в щелочных средах, может быть связано как с образованием в ходе синтеза олигомерных фракций (продуктов кислотного гидролиза основной цепи полимера), так и со статистическим характером замещения аминогрупп хитозана достаточно объемным ацильным заместителем, который препятствует образованию водородных связей между макромолекулами хитозана и усиливает их взаимодействие со средой. На основании данных фракционного анализа можно сделать вывод о том, что растворимость полученных ацилпроизводных хитозана в воде в щелочных условиях зависит в основном от степени ацилирования.

Таким образом, твердофазное реакционное смешение хитозана с гидроксикарбоновой кислотой приводит к образованию ацилированных производных хитозана со степенью замещения аминогрупп хитозана до 0.43. Полученные производные демонстрируют большую стабильность растворов при изменении рН среды в сторону щелочных значений по сравнению с исходным хитозаном, что расширяет возможности его использования для получения материалов из водных растворов.

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

Получение привитых сополимеров позволяет комбинировать свойства полимеров, входящих в их состав в единой макромолекуле, и существенно расширять диапазон технологических приемов, доступных при формировании из них материалов со специальными свойствами. В качестве перспективных фрагментов, которые способны придать материалам на основе хитозана дополнительные полезные свойства, были выбраны олиго/полилактиды, в первую очередь, из-за безопасности обоих компонентов при их разложении как во внешней среде, так и в организме. Также полимеры и олигомеры лактида обладают рядом свойств, которые хитозану изначально не присущи (пластичность, технологичность переработки). Кроме того, полилактид – гидрофобный полимер, способный придать материалу на основе хитозана амфифильные свойства. Механические смеси хитозан – олиго/полилактид успешно используются при формировании композиционных матриц для тканевой инженерии, их свойства гармонично друг друга дополняют. В литературе описаны многочисленные попытки получить сополимеры на их основе, однако одним из наиболее перспективных подходов, на наш взгляд, является твердофазный синтез, так как позволяет осуществлять синтез сополимеров в крупных масштабах за короткое время. В настоящей работе методом твердофазного реакционного смешения получены и исследованы привитые сополимеры хитозана с различной длиной привитой цепи олиго/полилактида. Основные результаты по синтезу и исследованию структуры и свойств привитых сополимеров хитозана опубликованы в соавторстве в статьях [353–358].

2.1.2.1. Сополимеры хитозана с короткими привитыми цепями олиго(L,D-лактида)

Прививку коротких цепей олиго(L,D-лактида) на хитозан проводили методом твердофазного синтеза путем соэкструдирования хитозана и L,D-лактида в опытно-промышленном двухшнековом экструдере при различных соотношениях компонентов и температурных режимах. Несмотря на наличие как минимум трех реакционных центров разной активности возможного присоединения лактида к основной цепи хитозана, в отсутствие катализа взаимодействие функциональных групп полисахарида с циклическим димером молочной кислоты проходит, как и в случае с ГКК, по пути N-ацилирования. Таким образом, наблюдается химический контроль региоселективности замещения при механохимическом модифицировании. Прививка L,D-лактида на хитозан проходит как многостадийный процесс, который начинается с нуклеофильного присоединения первичной аминогруппы к лактидному циклу (Рисунок 17). Последующая полимеризация с раскрытием цикла дилактона возможна за счет нуклеофильного присоединения гидроксильной группы заместителя к энергетически напряженному циклу мономера.

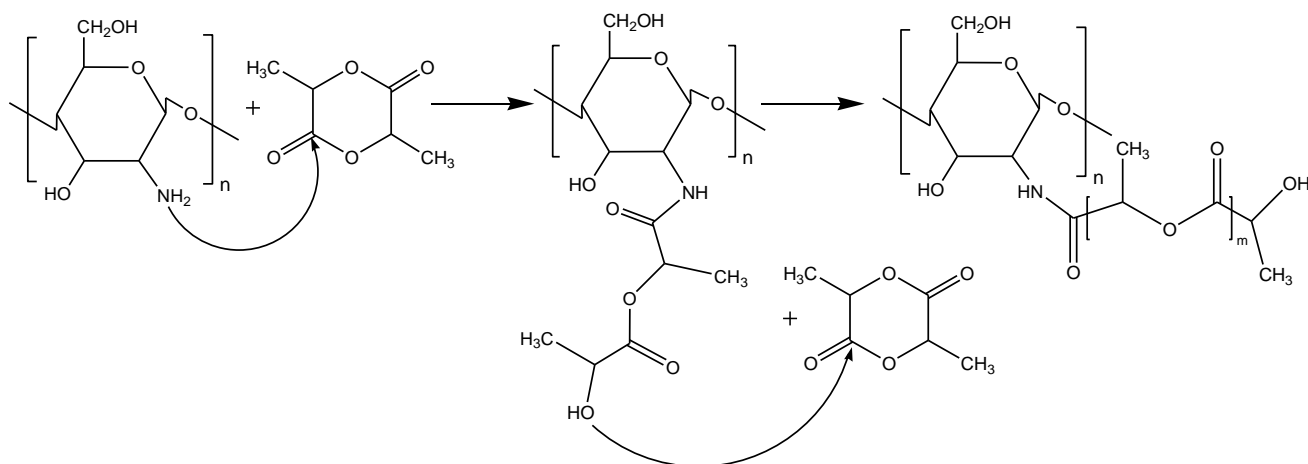


Рисунок 17 – Схема взаимодействия L,D-лактида с хитозаном

Оценка содержания прореагировавшего лактида показала, что, в зависимости от условий соэкструдирования, степень прививки олиголактида на

хитозан варьируется в пределах 26-160 мас.% (Таблица 3). При очистке образцов сополимера от непрореагировавшего лактида хлороформом, традиционно используемым растворителем для полиэфиров, их поведение отличалось от немодифицированного хитозана, который в хлороформе не растворяется и не набухает. Образцы хитозана с небольшой степенью полимеризации ($СП \leq 10$) привитыми цепями олиголактида образовывали собственную набухшую в хлороформе фазу, сконцентрированную на поверхности раствора. Изменение растворимости образцов в гидрофобной среде указывает на глубокое модифицирование макромолекул хитозана. Очевидно, что прививка олигомерных цепей лактида приводит к проявлению амфифильных свойств образцов. Гидрофобизация хитозана должна закономерно снижать его растворимость в водных средах. Образец, полученный при недостатке лактида (образец ХЛ-1), содержит нерастворимую в воде фракцию, которая растворяется при подкислении среды. Образец ХЛ-2 растворяется практически нацело, тогда как доля нерастворимой фракции образца ХЛ-3 составляет 62 мас.% (с пересчетом на содержание хитозана в образцах).

Таблица 3 – Условия синтеза и характеристики продуктов реакционного смешения хитозана с L,D-лактидом

Образец	Условия синтеза		Характеристики		
	Мольное и весовое соотношение лактид/хитозан, моль (г/г)	Температура, °С	Относительное содержание прореагировавшего лактида, %	Степень прививки, %	Мольное содержание звеньев молочной кислоты
ХЛ-1	0.5 (31:69)	120	57.1	26	0.58
ХЛ-2	1 (47:53)	90	85.3	76	1.69
ХЛ-3	3 (73:27)	120	59.3	160	3.58

На рисунке 18 представлены ИК-спектры исходных хитозана и L,D-лактида, а также образца ХЛ-1 после очистки от непрореагировавшего лактида хлороформом и длительного диализа против дистиллированной воды. На спектре очищенного от непрореагировавшего лактида образца ХЛ-1 имеются полосы поглощения сложноэфирных групп при 1755 см^{-1} , относящиеся к колебаниям карбонильных групп сложноэфирных фрагментов в боковых лактидных цепях, что указывает на то, что связанный с хитозаном лактид находится в виде как минимум димера. Область поглощения амино-амидогрупп перекрывается огибающими, образованными наложением полос Амид I и II (1650 и 1550 см^{-1} соответственно), полос деформационных колебаний аминогрупп хитозана (1600 см^{-1}) и валентных колебаний карбоксилат-ионов. Симметричные колебания групп COO^- видны при 1383 см^{-1} . Для расчета степени замещения аминогрупп хитозана образцы сополимеров подвергали длительному диализу против дистиллированной воды, что привело к гидролизу привитых фрагментов олиголактида и удалению солей. На ИК-спектрах образцов после длительного диализа наблюдается только слабое плечо в области сложноэфирных групп (при 1735 см^{-1}), которое отсутствует в спектре исходного хитозана и свидетельствует о частичном протекании вторичной реакции O-ацилирования. Однако вклад этой реакции в образование продуктов синтеза незначителен. Наличие интенсивной полосы Амид I в спектрах продуктов не позволяет полосе сложноэфирных связей разрешаться полностью. Таким образом, выбранные условия очистки привели к практически селективному гидролизу сложноэфирных групп привитых цепей, что позволило рассчитать содержание амидных связей, представляющих собой основные узлы прививки.

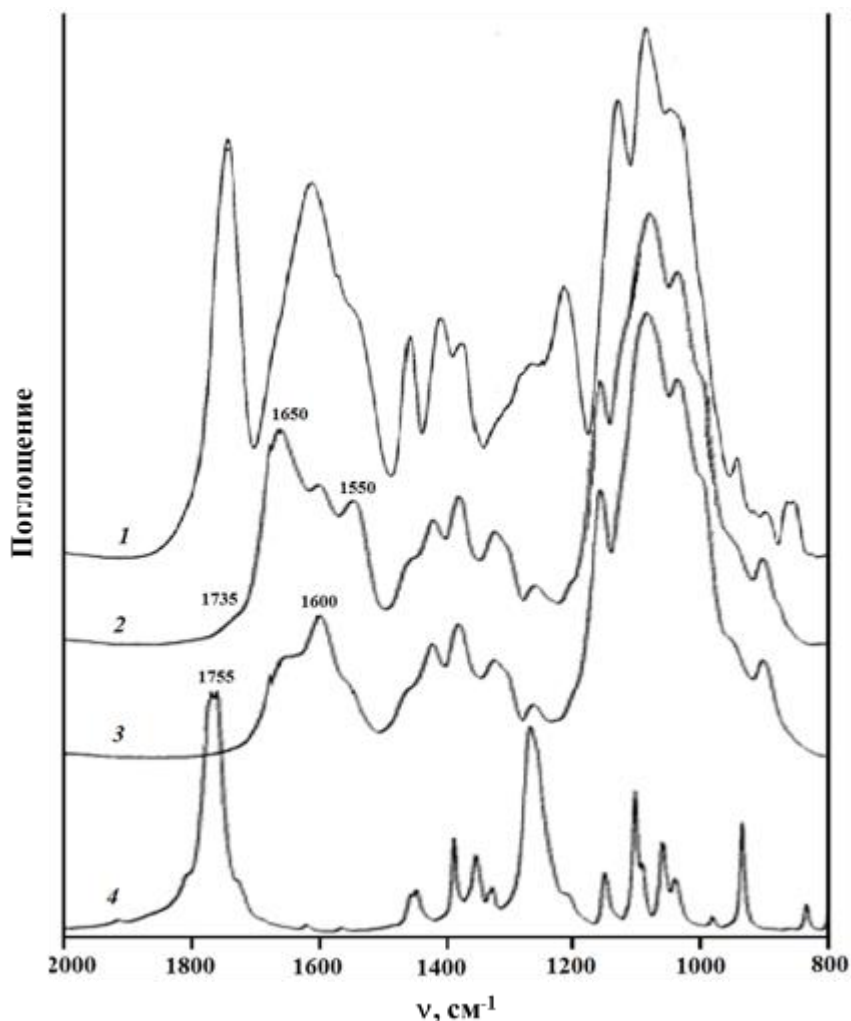


Рисунок 18 – ИК-спектры (1) ХЛ-1 после экстракции непрореагировавшего лактида хлороформом; (2) ХЛ-1 после длительного диализа против воды; (3) исходного хитозана и (4) L,D-лактида

Расчет степени ацилирования по данным элементного анализа образцов после длительного диализа показал, степень замещения аминогрупп хитозана варьируется от 0.19 до 0.41, а СП привитых цепей достигает 10 (Таблица 4). Увеличение концентрации лактида приводит к увеличению степени замещения (образцы ХЛ-1 и ХЛ-2), но чрезмерное увеличение содержания деформационно мягкого, пластифицирующего компонента (лактида) также приводит к снижению эффективности механохимического процесса, с точки зрения степени ацилирования, как это видно в случае образца ХЛ-3.

Таблица 4 – Данные элементного анализа и основные характеристики полученных производных хитозана

Образец	Атомные концентрации, %			Отношение С / N	Степень ацилирования аминогрупп хитозана	Средняя СП привитых цепей
	С	Н	N			
ХЛ-1	44.39	6.87	7.91	5.61	0.19	3.0
ХЛ-2	41.92	6.79	6.65	6.30	0.41	4.1
ХЛ-3	44.66	6.75	6.84	6.53	0.37	9.7

На рисунке 19 представлены электронные спектры поглощения растворов хитозана, сополимеров ХЛ и полилактида. В целом спектры поглощения всех образцов ХЛ близки к сумме спектров хитозана и полилактида, что подтверждает их предполагаемую структуру. В электронных спектрах поглощения ХЛ по сравнению с нативным хитозаном, появляется дополнительное поглощение в области 370–500 нм. Основные различия в спектрах исходного хитозана и образцов ХЛ проявляются в коротковолновой области спектра (200–310 нм): полоса поглощения с максимумом короче 200 нм усиливается симбатно с возрастанием доли лактида в сополимере, одновременно наблюдается размывание полос поглощения в области 250–300 нм. Усиление самой коротковолновой полосы поглощения в ХЛ можно отнести к присутствию привитых звеньев олиголактида. Слабая полоса полилактида (275 нм), очевидно, скрыта под полосами хитозана. Небольшое усиление поглощения в области 320–360 нм для образца ХЛ-3 может быть связано с агрегацией за счет присутствия достаточно длинных гидрофобных олиголактидных звеньев в водном растворе. Слабые длинноволновые полосы (с максимумами 414 и 480 нм) принадлежат, видимо, хромофорным группам, образовавшимся в процессе твердофазного синтеза.

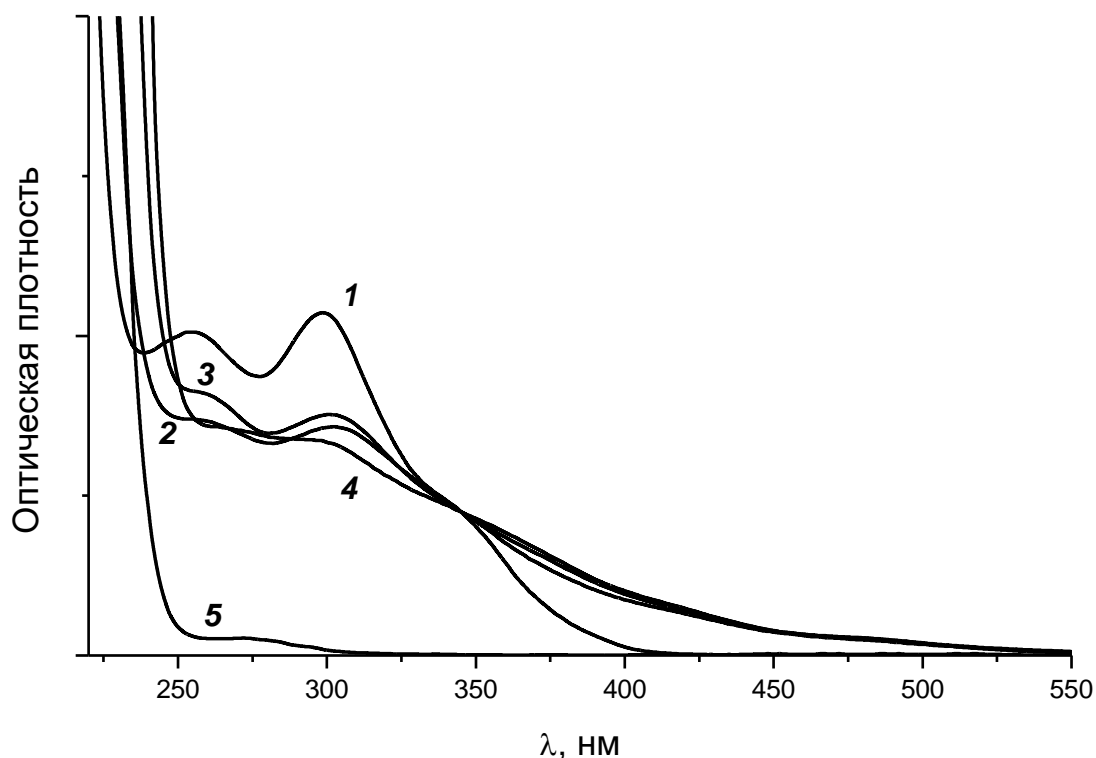


Рисунок 19 – Электронные спектры поглощения 1%-ных растворов: хитозана в 1 М HCl (1); ХЛ-1 (2), ХЛ-2 (3) и ХЛ-3 (4); полилактида в CH_2Cl_2 (5)

Как видно из представленных данных степень полимеризации привитых цепей не превышает 10, что достаточно для придания хитозану средства к хлороформу. Однако прививку таких коротких цепей олиго(L,D-лактида) скорее можно отнести к функционализации хитозана, так как полученные сополимеры в основном обладают базовыми свойствами хитозана.

2.1.2.2. Сополимеры хитозана со средней степенью полимеризации привитых цепей олиголактида

Сополимеры хитозана со средней длиной привитых цепей олиголактида получали методом твердофазного реакционного смешения хитозана с олиголактидами (ММ 5 кДа) как описано в разделе 3.2.1.4. В данном случае взаимодействие компонентов может проходить по разным путям: по концевым группам олиголактида с ацилированием аминогрупп хитозана концевыми

карбоксильными группами олиголактида или посредством этерификации концевых карбоксильных групп олиголактидов гидроксильными группами хитозана. Однако, принимая во внимание достаточно высокую степень полимеризации олиголактида (СП~70) и, соответственно, низкое относительное содержание концевых функциональных групп, более вероятно протекание реакций с участием сложноэфирных групп олиголактида. В этом случае возможен как алкоголиз сложноэфирных связей гидроксильными группами хитозана, так и их аминолит аминогруппами хитозана (Рисунок 20). Реакции взаимодействия хитозана с олиголактидом носят статистический характер, так как возможны все рассмотренные пути химического взаимодействия. Соответственно, полученные сополимеры обладают широким распределением как по узлам прививки, так и по длинам привитых цепей. СП привитой цепи определяется исходным молекулярно-массовым распределением (ММР) олиголактида, интенсивностью протекания реакций аминолита и алкоголиза сложноэфирных связей, а также механодеструкцией самого олиголактида при механическом воздействии во время реакционного смешения.

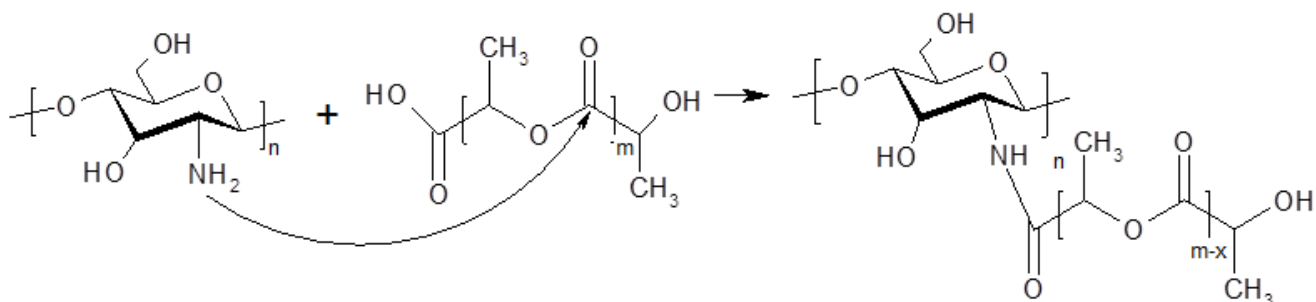


Рисунок 20 – Схема аминолита сложноэфирных связей олиго/полилактида
аминогруппами хитозана

При исследовании влияния характеристик исходных компонентов на структуру и свойства продуктов реакционного смешения в работе варьировали характеристики хитозана (ММ и СА) и стереохимический состав олиголактида, используя для синтеза олиго(L,L-лактид) или олиго(L,D-лактид). Количество

прореагировавшего олиголактида оценивали весовым методом после очистки полученных смесей традиционными для олиголактида растворителями. При этом было обнаружено, что при растворении полученных продуктов в хлороформе или дихлорметане образуются стабильные ультрадисперсные системы, которые трудно разделить с помощью обычных фильтров. Поэтому, для очистки продуктов использовали ацетон, который является растворителем для олиголактидов и осадителем для хитозана. Относительное количество прореагировавшего олиголактида и, соответственно, степень прививки невелики (Таблица 5). Степень прививки как олиго(L,L-лактида), так и олиго(L,D -лактида) на хитозан X-80 существенно выше, чем на хитозан X-350. Вероятно, это связано с меньшей доступностью функциональных групп высокомолекулярного хитозана в выбранных условиях проведения процесса.

Таблица 5 – Состав реакционной смеси и выход продуктов реакции

Образец	Соотношение компонентов (мас-%)	Относительное количество прореагировавшего олиголактида, %	Степень прививки, %
ХЛЛ-к	X-350 /олиго(L,L-лактид) 50/50	5.4	5.4
ХЛЛ-т	X-80 /олиго(L,L-лактид) 40/60	23.4	35.1
ХЛД-т	X-80 /олиго(L,D-лактид) 40/60	24.5	36.7

ИК-спектры исходных компонентов и продуктов их реакционного смешения представлены на рисунке 21 ИК-спектры исходных олиголактидов и сополимеров содержат основные полосы поглощения, которые характерны для полилактидных фрагментов: валентные колебания C=O групп (1747 см^{-1}), полосы симметричных деформационных колебаний CH_3 групп (1380 и 1363 см^{-1}); интенсивная полоса ассиметричных валентных колебаний C–O–C (1183 см^{-1});

симметричных валентных колебаний CH_3 (1083 см^{-1}) и $\text{C}-\text{C}$ (1063 см^{-1}) [359]. Согласно литературным данным полоса при 1452 см^{-1} может быть отнесена к ассиметричным деформационным колебаниям CH_3 групп и практически полностью не зависит от физического состояния полилактидных цепей и, таким образом, может служить в качестве внутреннего стандарта при оценке степени кристалличности [360]. Исследования процессов кристаллизации поли(L,L-лактида) показывают, что полосы поглощения при 1363 и 1210 см^{-1} обладают большой чувствительностью к степени кристалличности [360]. Последняя относится к комбинации ассиметричных $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ и маятниковых колебаний CH_2 групп. В образцах с низкой степенью кристалличности они могут проявляться в качестве плеча полосы при 1083 см^{-1} . Соответственно, руководствуясь этими литературными данными, из спектров видно, что олиго(L,D-лактид) полностью аморфный, а олиго(L,L-лактид) обладает относительно низкой степенью кристалличности. Из данных ИК-спектров продуктов их реакционного смешения с хитозаном видно, что образец ХЛД-т – аморфный, а в спектрах сополимеров на основе аморфно-кристаллического олиго(L,L-лактида) (ХЛЛ-к и ХЛЛ-т) сохраняются характерные для кристаллических образцов полосы. Отличия ИК-спектров сополимеров от спектров исходных олиголактидов, которые наиболее ярко выражены для образца ХЛЛ-т, заключаются в появлении полосы карбоксильных групп в виде плеча при 1710 см^{-1} и широкой полосы в области $1580 - 1650 \text{ см}^{-1}$. В этой области лежат полосы поглощения amino-амидных связей (Амид I, Амид II и деформационные колебания аминогрупп), плохое разрешение которых связано, вероятнее всего, с наложением полос ассиметричных валентных колебаний карбоксилатных групп и деформационных колебаний протонированных аминогрупп. Таким образом, анализ представленных ИК-спектров свидетельствует о вкладе ионного взаимодействия в образование продуктов реакции с образованием солевых связей $\text{COO}^{(-)}\text{NH}_3^{(+)}$.

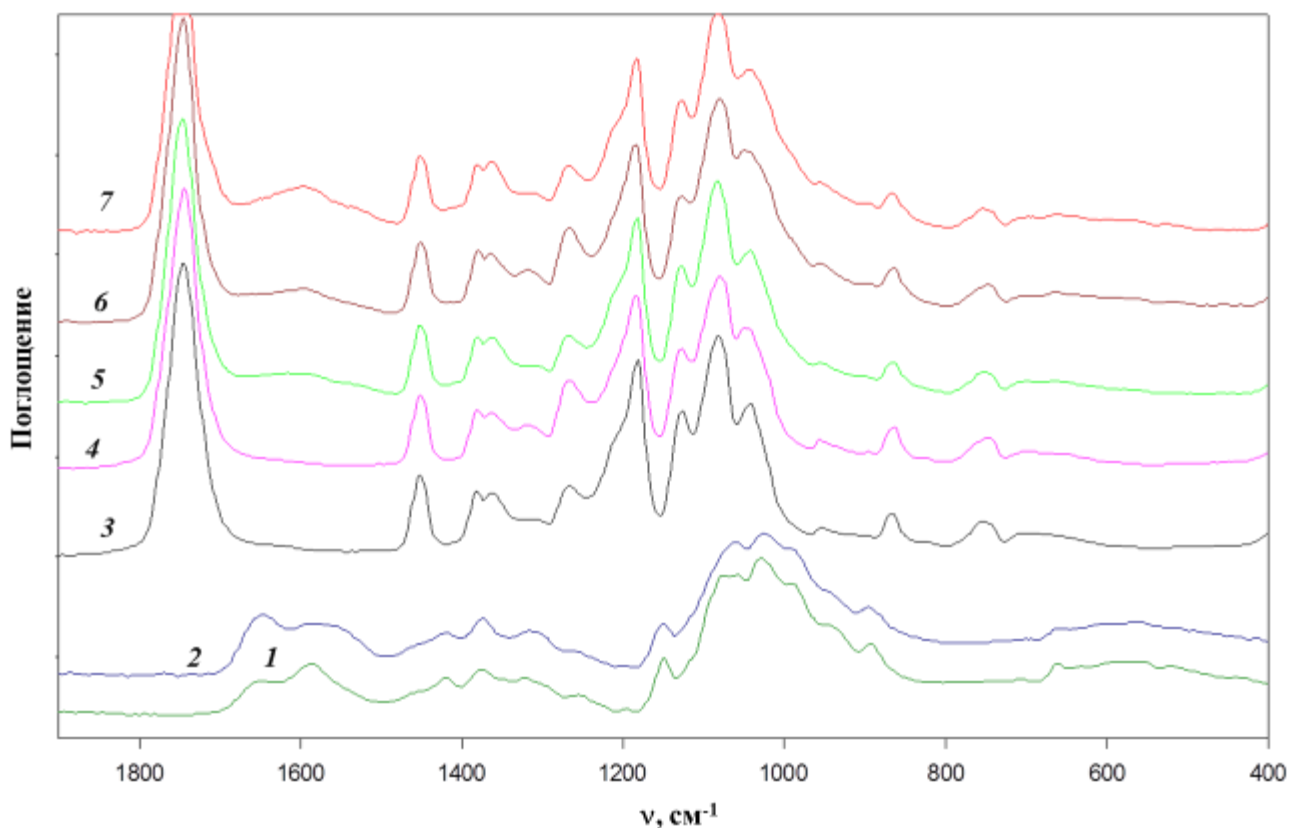


Рисунок 21 – ИК-спектры образцов нативного хитозана X-80 (1) и X-350 (2); олиго(L,L-лактида) (3), олиго(L,D-лактида) (4); образцов ХЛЛ-к (5), ХЛД-т (6) и ХЛЛ-т (7)

Как и в случае сополимеров с короткими привитыми цепями олиголактида, полученные образцы серии ХЛЛ/ХЛД обладают сродством к апротонным органическим растворителям. Однако, если для образцов хитозана с привитыми цепями олиголактида со СП ≤ 10 характерно образование собственной фазы в среде органического растворителя, то полученные смеси хитозана с олиголактидами со СП ~ 70 равномерно распределяются в объеме растворителя. Исследование дисперсий продуктов реакционного смешения в дихлорметане методом динамического лазерного светорассеяния (ДЛС) показывает, что размер агрегатов существенно выше в случае сополимеров, содержащих фрагменты олиго(L,L-лактида), чем при прививке на хитозан цепей олиго(L,D-лактида). При этом разная ММ основной цепи хитозана, как и степень прививки не играют

никакой роли, что свидетельствует о преобладающем вкладе природы привитых цепей во внутри-/межмолекулярные взаимодействия сополимеров в растворах (Рисунок 22).

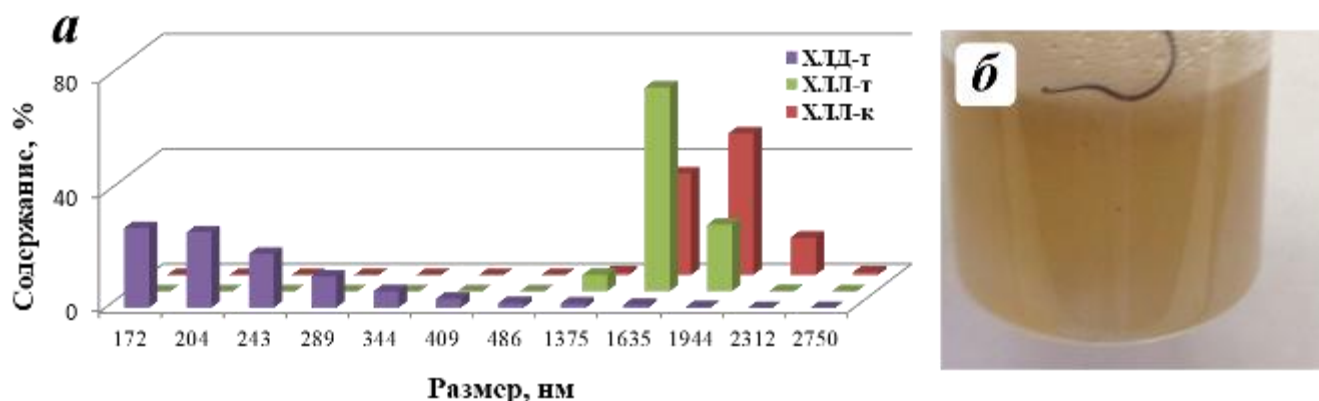


Рисунок 22 – Среднечисловое распределение агрегатов макромолекул по размерам в 0.2 мас.% дисперсиях сополимеров ХЛД-Т, ХЛЛ-Т и ХЛЛ-К в CH_2Cl_2 (а); фотография дисперсии ХЛД-Т в CH_2Cl_2 (б)

Исследование растворимости образцов в дистиллированной воде показало, что во всех случаях в образцах присутствует 1.7-5.5 мас.% растворимой в воде фракции, что может быть связано с образованием низкомолекулярных фрагментов за счет механодеструкции, в том числе коротких фрагментов олиголактида, который может выступать в качестве противоиона для протонирования аминогрупп хитозана. Фракционирование в традиционном для хитозана растворителе – уксуснокислом водном растворе – показало, что растворимость снижается по сравнению с нативным хитозаном, и доля нерастворимой в 2% CH_3COOH фракции составляет 40.3-58.0 мас.% (Таблица 6).

Таблица 6 – Растворимость образцов сополимеров хитозана с привитыми цепями олиголактида с СП ~ 70 в водных средах

Образец	Растворимая в воде фракция, мас. %	Растворимая в 2%CH ₃ COOH фракция, мас. %	Нерастворимая в 2%CH ₃ COOH фракция, мас.%
ХЛЛ-к	3.2±0.1	56.5±0.6	40.3±0.4
ХЛЛ-т	5.5±0.1	45.2±0.5	49.3±0.5
ХЛД-т	1.7±0.1	40.3±0.4	58.0±0.6

Исследование растворов образцов хитозана и сополимеров в 2% CH₃COOH методом ДЛС показало, что при увеличении ММ хитозана размер агрегатов, закономерно, возрастает (Рисунок 23), а введение фрагментов олиголактидов с различным стереохимическим составом имеет, как и в случае дисперсий сополимеров в CH₂Cl₂, разный вклад во взаимодействие макромолекул. В случае введения в структуру хитозана фрагментов олиго(L,L-лактида) преобладают внутримолекулярные взаимодействия и гидродинамический диаметр макромолекул уменьшается по сравнению с нативным хитозаном, в то время как наличие аморфных цепей олиголактида приводит к «разрыхлению» ассоциатов закономерному увеличению их размера.

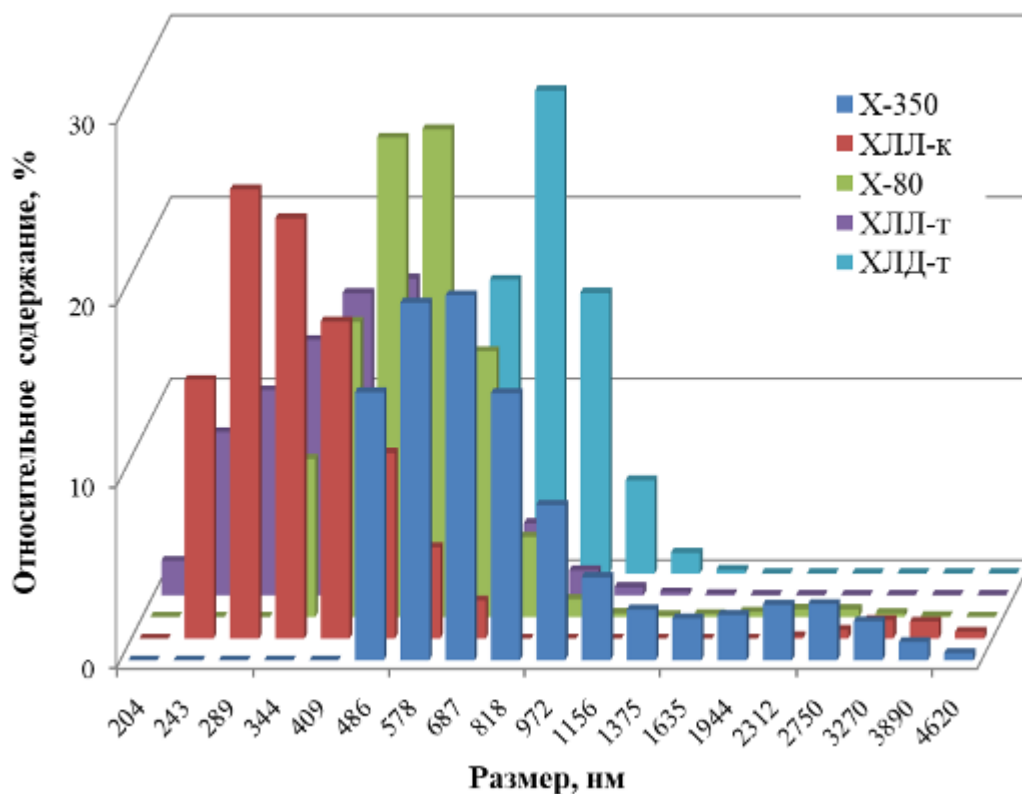


Рисунок 23 – Среднечисловое распределение по размерам агрегатов макромолекул в 0.1 мас.% растворах образцов хитозана и их сополимеров в 2%CH₃COOH

Анализ электронных спектров поглощения растворов образцов ХЛЛ/ХЛД в 0.1 н HCl показал, что введение фрагментов олиголактида в структуру хитозана X-80 приводит к более значительным изменениям в спектрах, чем в случае образца на основе хитозана с более высокой ММ (X-350), что хорошо согласуется с данными по расчету степени прививки олиголактида (Таблица 5). В случае образцов ХЛЛ-т и ХЛД-т наблюдается увеличение интенсивности поглощения в диапазоне 200-400 нм (Рисунок 24). Как и в случае с прививкой олиголактида с низкой СП (раздел 2.1.2.1), это, вероятно, связано с реакциями аминогрупп хитозана. Интенсивность и форма спектров образцов ХЛД-т и ХЛЛ-т близка к суперпозиции спектров исходных компонентов. В сравнении со спектром нативного хитозана, наблюдается появление коротковолновой полосы (< 250 нм), которая характерна для исходных олиголактидов. Увеличение интенсивности при

320 нм, которое наблюдается в образцах, содержащих фрагменты аморфно-кристаллического олиго(L,L-лактида), может быть отнесена к внутримолекулярному взаимодействию между ними.

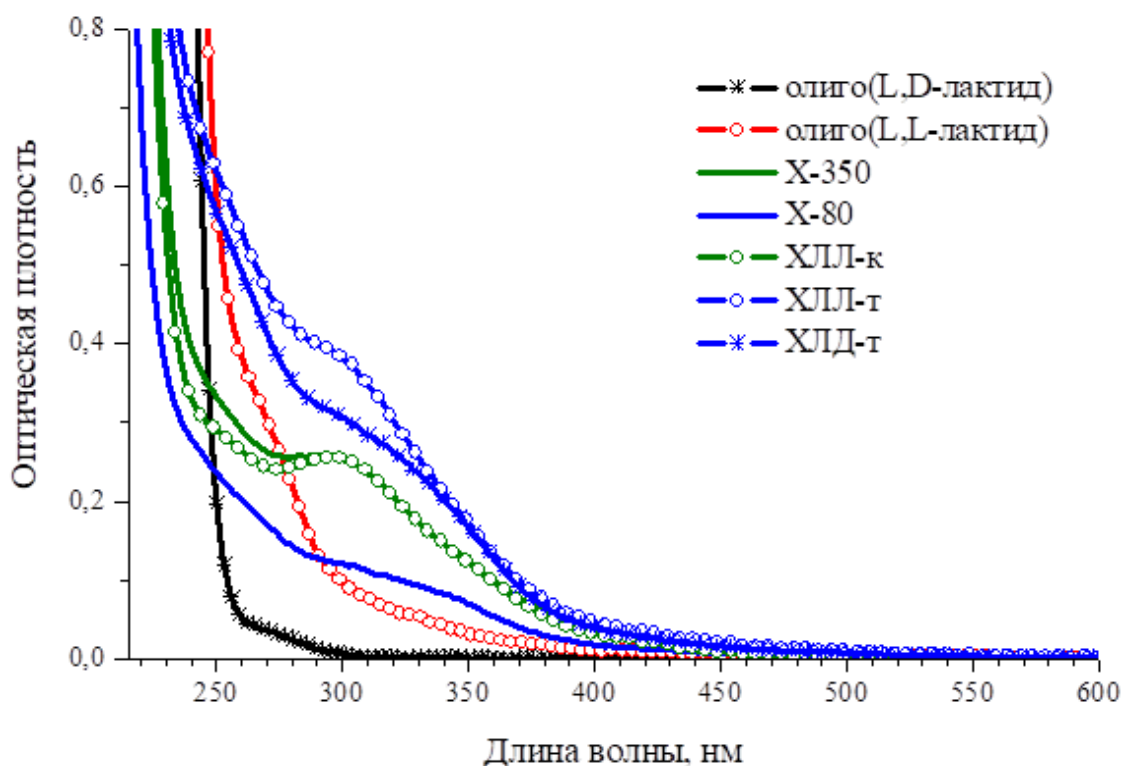


Рисунок 24 – Электронные спектры поглощения 1%-ных растворов хитозана X-80, X-350 и их сополимеров со средней длиной привитых цепей олиголактида в 1 М HCl; олиголактида в CH₂Cl₂

Таким образом, твердофазное реакционное смешение хитозана с олиголактидами со средней СП (~ 70) приводит к получению амфифильных систем, которые в отличие от немодифицированного хитозана образуют стабильные в хлороформе дисперсии и частично теряют растворимость в традиционном для хитозана растворителе. Набор косвенных данных позволяет предположить в полученных системах наличие достаточно широкого набора сополимеров, которые различаются количеством узлов прививки и длиной привитых цепей.

2.1.2.3. Сополимеры хитозана с высокомолекулярными полиэфирами

Прививка на хитозан фрагментов олиголактидов с СП ≤ 70 придает ему новые свойства, но в целом не достаточна для кардинального их изменения. Очевидно, что для придания хитозану ярко выраженных свойств полимеров иной природы нужно осуществлять прививку высокомолекулярных компонентов. В этом разделе диссертации рассмотрена прививка на хитозан двух высокомолекулярных полиэфиров: поли(L,L-лактида) (ПЛА) с ММ 160 кДа (СП~2000) и поли(лактида-со-гликолида) (ПЛГА) с ММ 53 кДа. Учитывая плохую растворимость хитозана, невозможность его переработки в расплаве, а также низкую термодинамическую совместимость с синтетическими полиэфирами, твердофазное реакционное смешение выбрано в качестве метода совмещения хитозана с высокомолекулярными полиэфирами. Условия и методика синтеза описаны в разделе 3.2.1.5.

Реакционное смешение хитозана с ПЛА и ПЛГА приводит к получению продуктов, которые обладают ярко выраженным сродством к органическим растворителям (CHCl_3 и CH_2Cl_2) и образуют в них стабильные дисперсии. Исследование дисперсий образцов в хлороформе методом ДЛС показало, что размер макромолекулярных ассоциатов варьируется от 200 нм до 2.5 μm (Рисунок 25). Очевидно, что способность к самоорганизации зависит как от длины привитых цепей, так и от их химической структуры (ПЛА или ПЛГА). Продукты реакционного смешения хитозана с ПЛГА (образец ХПГ) при диспергировании в хлороформе образуют агрегаты с меньшим средним размером частиц, чем продукты взаимодействия с аморфно-кристаллическим поли(L,L-лактидом).

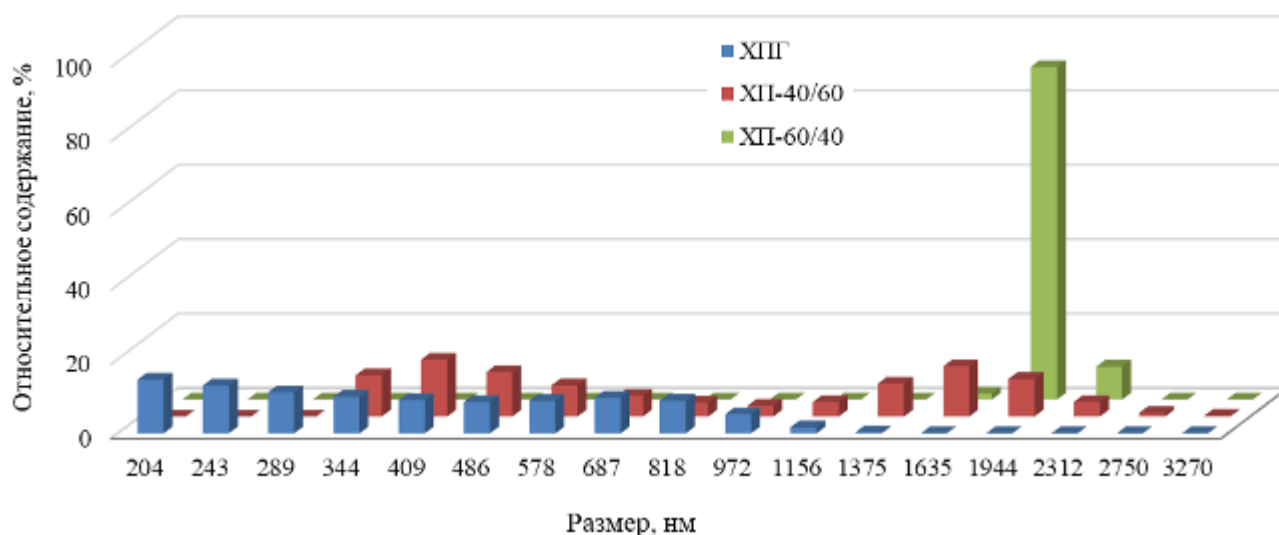


Рисунок 25 – Среднечисловое распределение по размерам макромолекулярных агрегатов образцов ХП-40/60, ХП-60/40 и ХПГ в хлороформе

Для исследования химической структуры полученных смесей был проведен ^1H ЯМР анализ их дисперсий в CDCl_3 . Основные протонные пики в спектрах принадлежат ПЛА и ПЛГА, но наблюдается их значительное уширение [357]. Возможно, это связано с формированием мицеллоподобных ассоциатов в апротонных органических растворителях, где гидрофильные фрагменты хитозана могут образовывать «ядра», с привитыми цепями ПЛА или ПЛГА, которые образуют «оболочку» диспергированных частиц. Вероятно, именно эта оболочка и удерживает хитозан в нетрадиционном для него растворителе. Это предположение подтверждает факт отсутствия сигналов протонов хитозана в спектрах при достаточно высоком его содержании в смесях.

Из-за образования ультратонких дисперсий в хлорсодержащих растворителях, фракционирование полученных образцов из таких растворителей затруднено. Поэтому была предпринята попытка их разделения в кислых водных растворителях (Таблица 7). Исследование поведения полученных смесей в 4% муравьиной кислоте показало, что часть образца (до 12 мас.%) не осаждается при увеличении pH. Исследование этой фракции нингидринным тестом (качественный тест на наличие первичных аминогрупп) показало присутствие в ней хитозана. Это может быть результатом снижения ММ хитозана за счет

механодеструкции в процессе соэкструдирования или формирования фракции ацилпроизводных, способных к растворению в щелочных средах, как это было показано для производных хитозана и гидроксикарбоновой кислоты.

Таблица 7 – Данные фракционного анализа продуктов реакционного смешения хитозана и высокомолекулярных полиэфиров в 4% HCOOH

Образец	Нерастворимая фракция, мас. %	Растворимая фракция, мас. %	Потери, мас. %
ХПГ	29.9	61.2	8.9
ХП-40/60	60.1	27.9	12.0
ХП-60/40	42.9	52.9	4.2

Для оценки состава нерастворимых в кислоте фракций был проведен их элементный анализ (Таблица 8). Наличие азота в этих фракциях указывает на прививку к хитозану фрагментов полиэфиров с высокой молекулярной массой, препятствующих его растворению в водных средах. Как показывает расчет содержания хитозана в нерастворимых фракциях по данным элементного, на интенсивность этого процесса влияет соотношение компонентов в исходной реакционной смеси. При увеличении содержания хитозана в исходной смеси (ХП-60/40) в нерастворимой фракции продуктов наблюдается снижение содержания хитозана в два раза. Данный эффект может быть связан с увеличением отклика системы на сдвиговое деформирование за счет большего содержания хитозана, который в данной системе является более механически жестким компонентом, и, как следствие, с повышением эффективности механохимических реакций. Как и в случае твердофазного реакционного смешения хитозана с олиголактидами, в данной системе возможно протекание нескольких типов реакций функциональных групп хитозана с концевыми или сложноэфирными группами полиэфиров. Учитывая еще более высокую ММ полимера, вероятность реакций алкоголиза и аминолиза увеличивается и, соответственно, их интенсификация при увеличении содержания более механически жесткого компонента (хитозана)

может приводить к росту количества узлов прививки. С другой стороны, эти реакции закономерно снижают длину привитой цепи и, соответственно, увеличивают способность хитозана к растворению в кислых водных средах.

Таблица 8 – Химический состав нерастворимых в 4% HCOOH фракций смесей хитозана и сложных полиэфиров

Образец	Содержание элемента, мас.%			Содержание хитозана, мас.%
	C	N	H	
ХП-40/60	49.1±0.3	1.44±0.06	5.67±0.08	16.6
ХП-60/40	49.8±0.3	0.75±0.05	5.56±0.08	8.6
ХПГ	46.4±0.3	0.97±0.05	4.77±0.08	11.2

Изменения в полилактидной составляющей после твердофазного реакционного смешения с хитозаном исследовали с помощью метода ДСК [357]. Введение хитозана приводит к формированию дополнительных фаз полилактида с пониженными температурами плавления и разным вкладом в эндотерму плавления, зависящим от условий получения смесей. Для образца ХП-40/60, полученного при избытке поли(L,L-лактида) в исходной смеси, характерно наличие на ДСК-термограммах при втором прогреве экзотермического пика холодной кристаллизации, который отсутствует на кривой исходного полилактида. Наличие этого пика может быть связано как со снижением СП цепей полилактида в ходе процессов механодеструкции и аминолитиза, так и с нуклеирующим действием хитозана. Данные ДСК в сочетании с результатами фракционного и элементного анализа указывают на глубокое химическое взаимодействие компонентов в процессе их твердофазного реакционного смешения.

2.1.2.4. Привитые сополимеры хитозана, наполненные коллагеном и желатином

Для повышения биосовместимости сополимеров и придания им дополнительных функциональных свойств были синтезированы многокомпонентные системы на основе сополимеров хитозана с олиго/полиэфирами, содержащие коллаген или его частично гидролизованную глобулярную форму – желатин. При этом для варьирования гидрофильно-липофильных свойств получаемых систем, исходные компоненты для твердофазного синтеза подбирались таким образом, чтобы сочетать природные и синтетические макромолекулы различной молекулярной массы. Как описано в разделе 3.2.1.6 синтезирован сополимер ХП-Ж из хитозана Х-60 (ММ 60 кДа, СА 0.1), поли(L,L-лактида) (ММ 160 кДа) и желатина, а также сополимер ХО-К из хитозана Х-350 (ММ 350 кДа, СА 0.15), олиго(L,L-лактида) (ММ 5 кДа) и коллагена.

Как и в случае описанных в предыдущих разделах сополимеров хитозана с олиго/полиэфирами, системы, содержащие коллаген или желатин, обладают амфифильными свойствами, которые определяют их поведение в различных растворителях. В таблице 9 приведены данные по растворимости трехкомпонентных систем ХП-Ж и ХО-К в кислых водных средах (традиционный для хитозана растворитель) или в дихлорметане. Каждая из фракций, растворимая/нерастворимая в том или ином растворителе характеризует макромолекулы, обогащенные или гидрофобными фрагментами олиго/полилактида или природными компонентами. Закономерно, что образец ХО-К, для синтеза которого использовали относительно низкомолекулярный олиголактид, хуже растворяется в дихлорметане по сравнению с образцом ХП-Ж на основе высокомолекулярного полилактида (Таблица 9). С другой стороны, входящие в состав ХО-К природные компоненты с большей ММ обеспечивают хорошую растворимость в кислой водной среде. При этом оба сополимера не дают истинного раствора ни в одном из растворителей, и их поведение отличается

от того, что можно ожидать от физических смесей компонентов. Несмотря на то, что со временем в дисперсиях сополимеров в дихлорметане наблюдается фазовое разделение, значительная часть образца представляет собой стабильную ультратонкую дисперсию в хлорсодержащих растворителях. Согласно данным элементного анализа в стабильной в дихлорметане фракции ХП-Ж содержится 0.75 ± 0.06 мас. % азота, что соответствует содержанию примерно 8 мас.% хитозана и 2 ± 0.05 мас-% (23 мас.% хитозана) при использовании хлороформа в качестве дисперсионной среды.

Таблица 9 – Растворимость образцов ХО-К и ХП-Ж в различных растворителях

Образец	2% CH ₃ COOH		Дихлорметан	
	растворимая фракция, мас. %	нерастворимая фракция, мас. %	растворимая фракция, мас. %	нерастворимая фракция, мас. %
ХО-К	63.3	36.7	26.4	73.6
ХП-Ж	53.0	47.0	33.0	67.0

Исследование дисперсий ХО-К и ХП-Ж в дихлорметане с помощью динамического лазерного светорассеяния показывает, что они формируют большое количество (~90%) агрегатов с размером ассоциатов ~150-200 нм, а также небольшую часть агрегатов субмикронного размера (Рисунок 26). При этом для образца ХО-К, содержащего олиголактид и высокомолекулярные природные компоненты характерно образование меньших по размеру ассоциатов с более однородным распределением, чем образец ХП-Ж на основе полилактида. Сложное поведение подобных многокомпонентных систем в различных растворителях определяется, в первую очередь, разнообразием возможных путей взаимодействия, как это описано выше, что приводит к широкому набору сополимеров с различной химической структурой (длиной и количеством привитых цепей). От этого зависит механизм их взаимодействия в растворе (внутри- и межмолекулярные взаимодействия), а также кинетика агрегирования.

Размер дисперсной фазы в водных средах существенно выше. Так, образец ХО-К по данным ДЛС образует в кислых водных средах ультратонкие дисперсии со средним размером частиц около 500-600 нм.

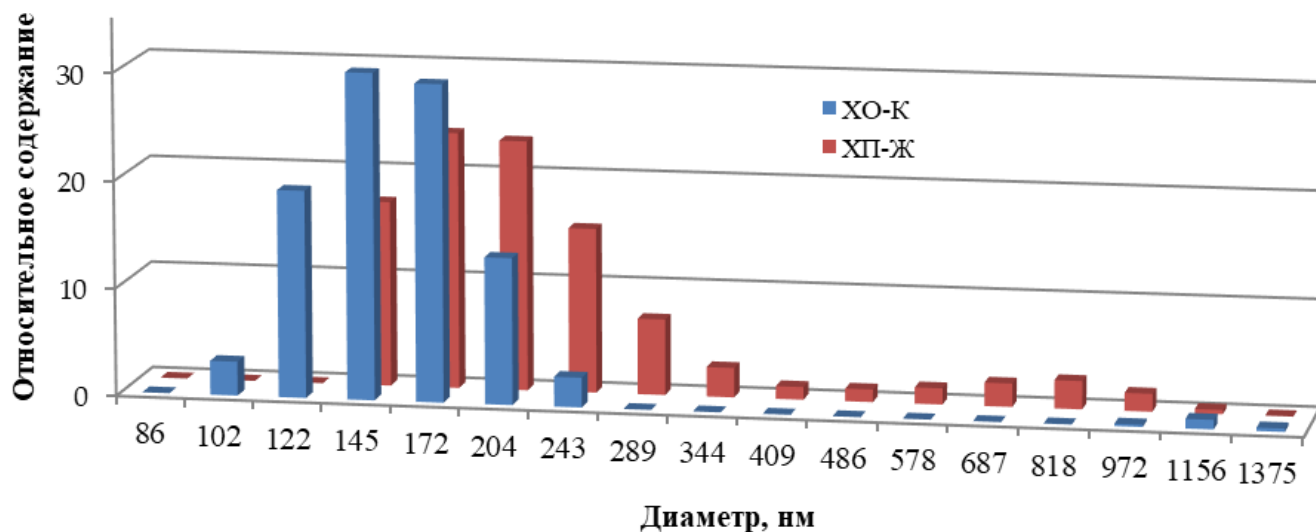


Рисунок 26 – Числовое распределение макромолекулярных агрегатов по размерам в 0.2 мас.% дисперсиях ХО-К и ХП-Ж в дихлорметане

ИК-спектры исходных компонентов и полученных продуктов приведены на рисунке 27. Спектр исходного хитозана содержит все характеристические полосы поглощения, в том числе деформационных колебаний первичных аминогрупп (1588 см^{-1}) и валентных колебаний карбонила в амидной группе Амид I (1650 см^{-1}), соотношение которых указывает на степень деацетилирования. Спектры образцов ХО-К и ХП-Ж содержат основные полосы характерные для исходных соединений. Например, полоса поглощения $\text{C}=\text{O}$ сложноэфирных связей также хорошо разрешена в спектрах сополимеров. Основные изменения в спектрах продуктов наблюдаются в диапазоне amino-амидо групп (от 1650 до 1550 см^{-1}). Так, соотношение полосы первичных аминогрупп, достаточно интенсивной в исходном хитозане, и полосы Амид I, меняется на обратное, что указывает на расход первичных аминогрупп в реакции амидирования при аминолизе сложноэфирных групп олиго/полилактидов. Как было ранее обнаружено при взаимодействии хитозана с олиголактидом в тех же условия (раздел 2.1.2.2),

продукты взаимодействия содержат солевые связи, что выражается на спектрах в уширении полосы Амид I за счет наложения полосы карбоксилат-ионов (1580 см^{-1}).

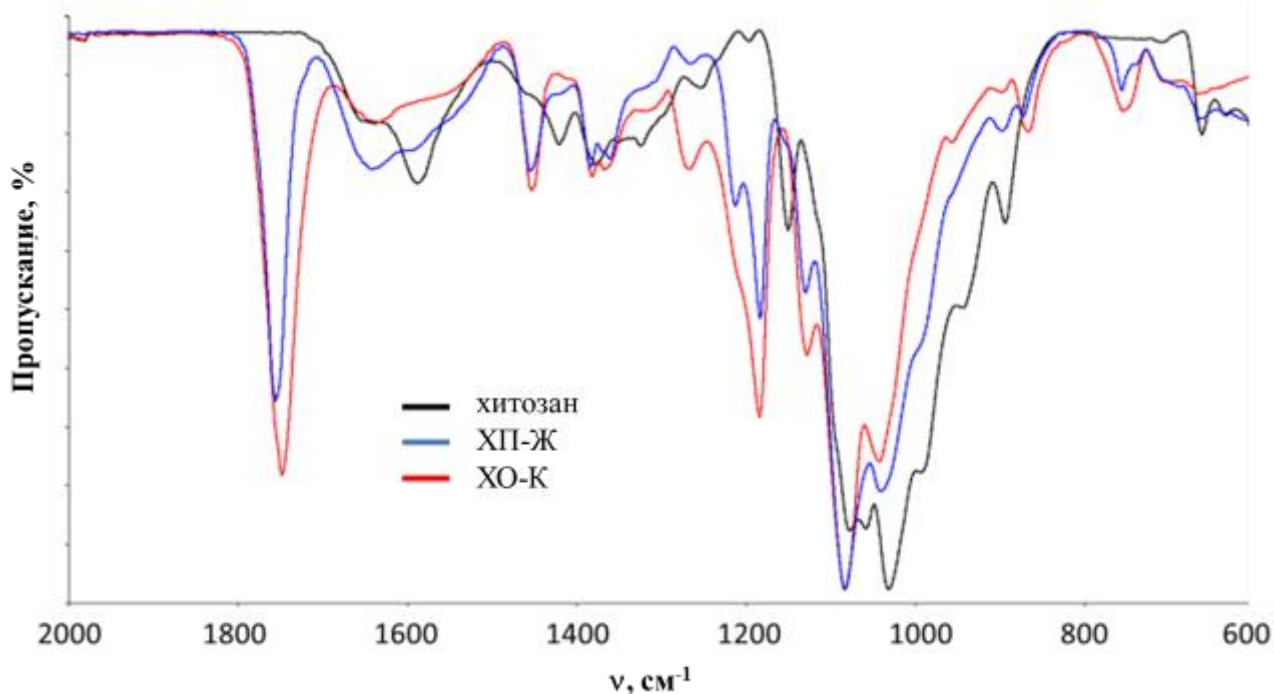


Рисунок 27 – ИК-спектры хитозана Х-60, образца ХП-Ж и ХО-К

Изменения в состоянии олиго/полилактидов, подвергнутых совместной твердофазной экструзии с хитозаном и белками, исследовали с помощью ДСК (Рисунок 28). На термограммах первого нагрева исходного полилактида наблюдаются переход стеклования ($T = 61.2^\circ\text{C}$) и плавления ($T = 165.5^\circ\text{C}$, $\Delta H = 40.6 \text{ Дж/г}$) в то время как на термограмме ХП-Ж наблюдаются широкая эндотерма в диапазоне $50-130^\circ\text{C}$, которая, вероятно, относится к интенсивной десорбции воды, а пик плавления полиэфира в системе, содержащей фракции сополимеров наблюдается при более низкой температуре (163°C), чем в гомополимере. В отличие от полилактида в сополимерной системе также наблюдается уменьшение энтальпии плавления до $\Delta H = 20.6 \text{ Дж/г}$ и усложнение формы пика плавления, что более заметно при втором прогреве. Наличие экзотермического пика в области $100-130^\circ\text{C}$ на термограмме второго прогрева образца ХП-Ж, говорит о процессе

холодной кристаллизации фрагментов полилактида. Ее отсутствие на термограмме гомополимера указывает на то, что хитозан и желатин обладают нуклеирующим эффектом, так же как это наблюдалось и на кривых дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) двухкомпонентных систем и неоднократно отмечалось в литературе [118,361].

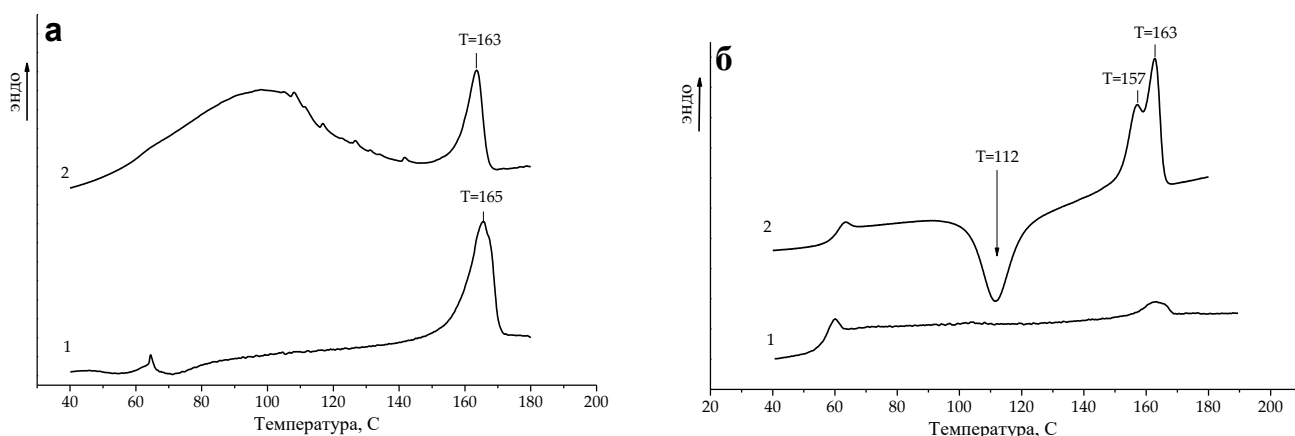


Рисунок 28 ДСК-термограммы (а) первого и (б) второго прогревов исходного поли(L,L-лактида) и ХП-Ж

Многокомпонентная система ППХОЖ, сочетающая в себе поликапролактон, олиго/полилактид, хитозан и желатин, была получена в несколько этапов (раздел 3.2.1.6): на первом из них была получена смесь хитозана с желатином, на которую далее привили короткие фрагменты олиголактида. По данным фракционного анализа степень прививки олиголактида на этом этапе составляла 14.7 мас.%, но этого было достаточно чтобы при дальнейшем твердофазном реакционном смешении хитозан/желатин/олиголактида с высокомолекулярными полиэфирами (полилактидом и поликапролактоном) обеспечить эффективное взаимодействие, сопровождающееся формированием фракции привитых сополимеров. В итоговой системе соотношение природных и синтетических компонентов было 40/60 г/г, но фракционный анализ показал, что только 18.7 мас.% ППХОЖ способно растворяться в нейтральных (11.2 мас.%) или уксуснокислых (7.5 мас.%) водных средах. Сниженная растворимость в

водных средах, как и в случае других привитых систем хитозана с олиго/полиэфирами, была скомпенсирована способностью образовывать стабильные дисперсии в хлорсодержащих растворителях. Согласно данным ДЛС средний размер макромолекулярных ассоциатов в 0.2 мас.% растворе ППХОЖ в дихлорметане составлял 550 нм. В случае такой сложной многокомпонентной системы провести детальный синтез реакций практически невозможно, но данные ИК-спектроскопии и ДСК анализа, как и в случае ХП-Ж и ХО-К, подтверждают значительные изменения в химической структуре исходных компонентов с преимущественным протеканием реакций по пути аминолита сложноэфирных групп полиэфиров [362]. Анализ области $1560\text{--}1650\text{ см}^{-1}$ в спектрах продуктов реакции показывает исчезновение полосы деформационных колебаний NH_2 -групп, которая присутствует при 1590 см^{-1} в спектре исходного хитозана. Одновременно интенсивность полос Амид-I и Амид-II при 1650 и 1540 см^{-1} заметно возрастает, что свидетельствует об интенсивных процессах прививки за счет аминолита сложноэфирных связей аминогруппами хитозана и желатина и образовании привитых сополимеров с амидными группами в точках разветвления. Анализ кривых ДСК также указывает на наличие специфического взаимодействия полиэфирных цепей и фрагментов хитозана и желатина. Эндотерма плавления системы ППХОЖ отличается от таковых для гомополиэфиров и содержит дополнительные пики, принадлежащие к вновь образованным фазам, различающимся термодинамической стабильностью [357].

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 не применимы. Использование механохимического подхода также обеспечивает возможность введения дополнительных биоактивных компонентов (в исследованных системах это белки) для придания материалам специфической биологической активности.

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

Диапазон областей применения хитозана очень широк, и для использования его в наиболее развитых и преспективных, таких как медицина, фармакология, сельское хозяйство, биотехнология, требуется применение материалов с различной морфологией и свойствами. Исходя из поликатионной природы хитозана, практический интерес представляет использование хитозансодержащих полимерных систем в качестве адсорбентов, разделительных мембран, пленочных материалов, оболочек для капсулирования лекарственных форм, матриц (часто в виде геля) для лекарственных препаратов с пролонгированным выделением, структурированных гидрогелей, средств доставки биоактивных компонентов/клеток и т.д. Регулирование химической структуры является не только важным параметром для контроля над свойствами материалов на основе хитозана, но и его способностью к переработке различными методами и, соответственно, возможностью создания широкого спектра материалов с улучшенной морфологией и свойствами.

2.2.1. Пленочные материалы

Несмотря на кажущуюся простоту формования пленочных материалов на основе хитозана, добиться воспроизводимой структуры и свойств хитозансодержащих пленок бывает затруднительно. Получение же пленочных материалов, обладающих заданной структурой и регулируемыми свойствами является нетривиальной и важной задачей.

2.2.1.1. Влияние основных характеристик хитозана, его производных и сополимеров на структуру и свойства пленок

В рамках диссертации было рассмотрено влияние основных характеристик хитозана на получение, структуру и свойства пленок на его основе; рассмотрены как объемные, так и поверхностные свойства пленочных материалов. Несмотря на

то, что объемные свойства материалов традиционно считаются наиболее важными с точки зрения материаловедения, для целей данной диссертации свойства поверхности играют одну из ключевых ролей, так как взаимодействие полимерного материала с клетками/тканями как *in vitro*, так и *in vivo* начинается с поверхности. Поэтому данный раздел диссертации в равной мере посвящен исследованию влияния характеристик хитозана на свойства как объема, так и поверхности пленочных материалов. Основные результаты этого подраздела опубликованы в соавторстве в [352,355,363,364].

Пленки, полученные по единой методике, описанной в разделе 3.3.1.1, из двух образцов немодифицированного хитозана, различающихся методом получения, ММ, ММР, степенью деацетилирования и кристалличности, обладают различной структурой, морфологией и свойствами поверхности. Пленка, сформованная из хитозана с ММ 350 кДа, СА 0.15 (Х-350), полученного методом суспензионного деацетилирования, обладает более гидрофобной поверхностью, чем из хитозана с ММ 60 кДа, СА 0.1 (Х-60), полученного твердофазным деацетилированием: угол смачивания по воде составляет 89° и 68° , соответственно (Таблица 10). Очевидно, что в данном случае, когда образцы хитозана отличаются не только методом деацетилирования, но и основными параметрами макромолекул, гидрофильно/гидрофобный баланс поверхности является суперпозицией всех параметров, ответственных за морфологию и химическую структуру сформованного поверхностного слоя, что также проявляется в разных значениях полярной и дисперсионной компонент поверхностной энергии.

Таблица 10 – Поверхностные характеристики пленок из различных образцов хитозана

Образец	θ , град		W_a , мДж/м ²		γ , мДж/м ²		
	Вода	Глицерин	Вода	Глицерин	γ	γ^{II}	γ^{D}
X-60	68	61	100.1	94.1	35.4	19.0	16.4
X-350	89	72	74.1	83.0	32.2	2.9	29.3

Исследование морфологии сформованных пленок хитозана методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) показало, что поверхность пленки из хитозана X-60 обладает более развитой поверхностью, состоящей из более крупных надмолекулярных структурных образований, чем пленка из высокомолекулярного хитозана X-350. Важно отметить влияние границы раздела фаз, на которой была сформована поверхность (Рисунок 29 (а), левая и правая панели), на морфологию поверхности. К сожалению, в литературе данный фактор практически не учитывается и в экспериментальных разделах научных статей не уточняется. В диссертации все характеристики поверхности пленочных образцов в основной форме из немодифицированного хитозана X-60 и X-350 исследовались на «зеркальной» поверхности, т.е. полученной на границе раздела фаз раствор/полистирол (чашка Петри). Поверхность сформованная на границе раствор/подложка является наименее дефектной (Рисунок 29).

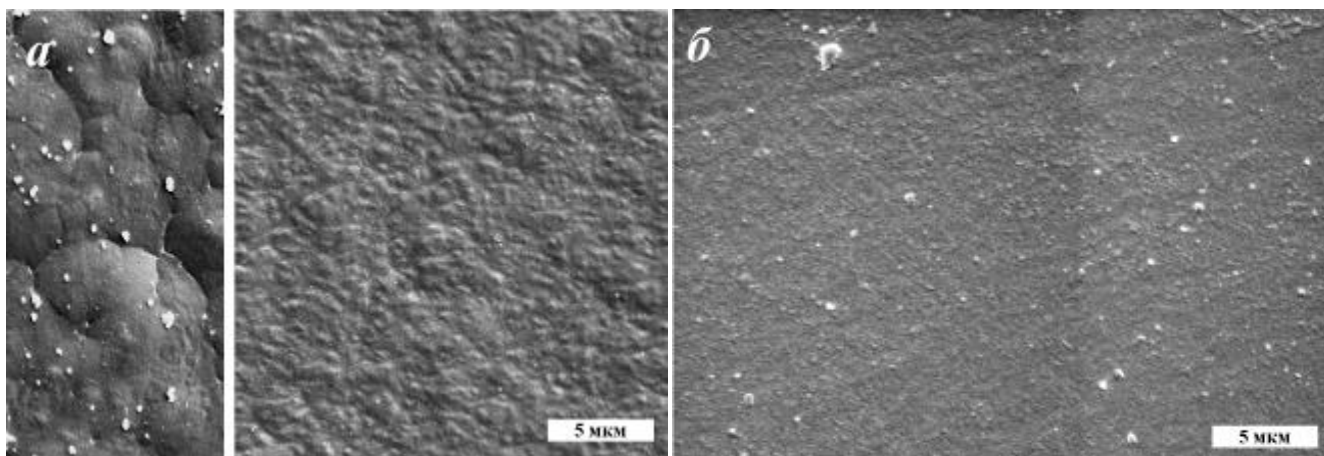


Рисунок 29 – СЭМ пленки, сформованной из хитозана X-60 (а) и хитозана X-350 (б). Левая панель (а) – микрофотография поверхности, полученной на границе раздела раствор/воздух; правая панель (а) – микрофотография поверхности, сформованная на границе раздела раствор/полистирол (чашка Петри)

Исследование химического состава поверхностных слоев пленок хитозана методом РФЭС показало, что состав поверхности различается в зависимости от образца хитозана, из которого она формовалась, и отличается от теоретического, рассчитанного исходя из химического состава образцов хитозана. Последний феномен описан в литературе и отнесен к особенностям упаковки структурных единиц в поверхностном слое [365]. Работ по исследованию влияния макромолекулярных характеристик хитозана на химический состав поверхности в литературе не найдено. Согласно полученным нами данным рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) поверхность пленки, сформованной из относительно низкомолекулярного хитозана X-60 с большим содержанием аминогрупп, содержит почти в два раза меньше азота, чем у пленки из хитозана X-350 с большей СА: 3.5 и 6.1 %, соответственно (Таблица 11).

Таблица 11 – Химический состав поверхностных слоев пленок из хитозана X-60 и X-350

Образец	Атомные концентрации %		
	C	O	N
X-60	76.6	19.9	3.5
X-350	68.0	25.9	6.1

Различия в структуре, морфологии и свойствах поверхности логично влияют и на биосовместимость пленочных материалов. Исследование жизнеспособности клеток мышинных фибробластов L929, культивируемых на поверхности пленок, сформованных из разных образцов хитозана, показало, что пленки из хитозана X-350 обладают лучшей способностью поддерживать адгезию и рост животных клеток, чем пленки из хитозана X-60. Согласно данным МТТ-теста относительная жизнеспособность клеток L929 после культивирования в течение 7-ми дней на пленках из X-350 и X-60 относительно контроля (на дне лунки планшета) составляла 83 и 63 %, соответственно. Оптическая микроскопия показала, что морфология клеток фибробластов также различается (Рисунок 30). Клетки, культивируемые на исходной пленке из хитозана X-350 распластываются на поверхности и образуют плотный монослой, в то время, как на пленках, сформованных из хитозана X-60 наблюдается формирование клеточных агрегатов.

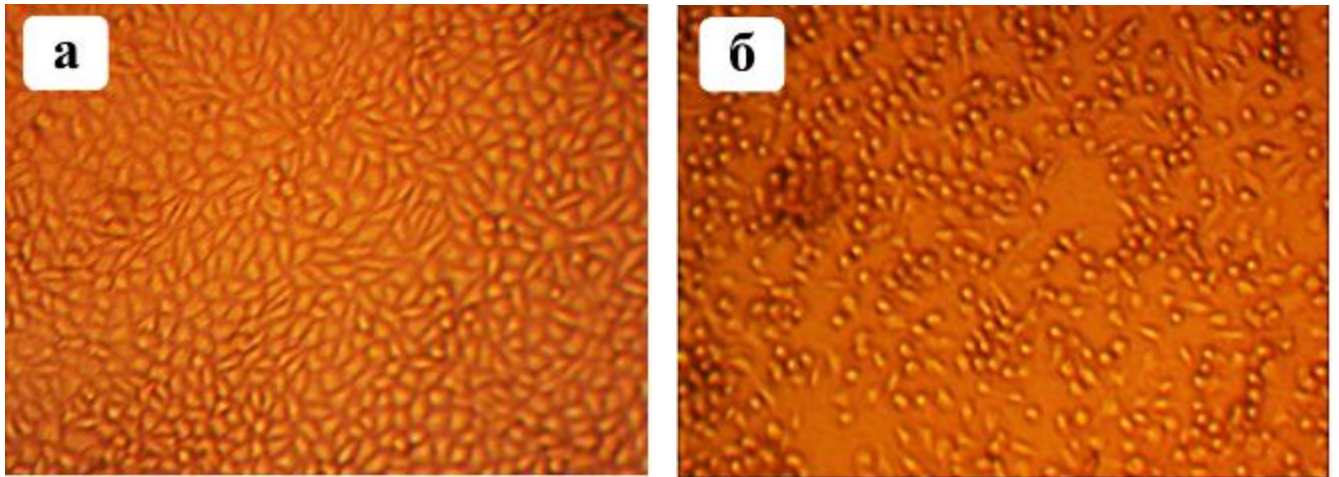


Рисунок 30 – Микрофотографии клеток L929 после культивирования в течение 1 недели на пленках из хитозана X-350 (а) и X-60 (б)

Учитывая то, что прикрепление и рост животных клеток зависят от большого количества факторов (в основном, опосредованно, через сорбцию и конформацию белков на поверхности материала), выделить ключевой параметр не представляется возможным. Важно отметить, что даже варьирование основных характеристик хитозана является достаточно мощным инструментом для регулирования биосовместимости материалов на его основе.

Формование пленок методом полива из уксуснокислых водных растворов образцов хитозана с относительно низкими ММ (например, образец X-60) часто сопровождается их разрушением в процессе испарения растворителя, и оценить их деформационно-прочностные характеристики бывает затруднительно. Введение в химическую структуру хитозана фрагментов гидроксикарбоновой кислоты или коротких цепей олиго(L,D-лактида) позволяет формировать пленки из их растворов в бидистилляте воды. Такие пленки обладают однородной морфологией и повышенными деформационно-прочностными характеристиками. Напряжение при разрыве пленок из относительно низкомолекулярного хитозана, ацилированного гидроксикарбоновой кислотой (образцы серии ХК) достигает 14 ± 0.5 МПа, а прививка на хитозан фрагментов олиголактида (образцы серии ХЛ) позволяет получать пленки с прочностью 106 ± 4 МПа. Модифицирование химической структуры хитозана также позволило получить пленки с

регулируемой эффективностью загрузки и скоростью высвобождения лекарственных соединений [366].

Более детальные исследования влияния характеристик основной цепи хитозана и привитых цепей олиголактида на деформационно-прочностные свойства пленок проводили на образцах, сформованных из водных растворов сополимеров хитозана со средней СП привитой цепи равной 70. Прочность пленок из хитозана с более высокой ММ (Х-350) и сополимеров на его основе в среднем в два раза выше, чем для образцов хитозана с ММ 80 кДа и его сополимеров (Таблица 12). Такая зависимость механических свойств пленок от ММ основной цепи хитозана вполне логична и соответствуют имеющимся литературным данным. Прививка на хитозан Х-80 фрагментов аморфного олиго(L,D-лактида) повышает прочность пленок на 40%, в то время как прививка аморфно-кристаллического олиго(L,L-лактида) приводит к незначительному снижению напряжения при разрыве, хотя можно было бы ожидать обратного. Вероятно, относительно короткие хитозановые фрагменты не препятствуют более склонному к ассоциации олиго(L,L-лактиду) образовывать собственную фазу при формировании пленки. С другой стороны, прививка олиго(L,L-лактида) на хитозан Х-350, наоборот, приводит к увеличению прочности при разрыве, что характерно для образования сетки зацеплений. Об этом говорит и снижение относительного удлинения этих образцов до разрыва, и, напротив, увеличение пластичности для пленочных образцов на основе Х-80 и олиго(L,L-лактида). Таким образом, разница в деформационно-прочностных характеристиках пленок в зависимости от типа привитых фрагментов олиголактида, по-видимому, связана с со структурой пленок, которая в свою очередь определяется разным вкладом привитых цепей во внутри-/межмолекулярные взаимодействия полимерных цепей в формовочных растворах (Раздел 2.1.2.2).

Таблица 12 – Деформационно-прочностные свойства пленочных образцов из сополимеров хитозана со средней СП привитой цепи равной 70

Образец	Напряжение при разрыве, МПа	Относительное удлинение при разрыве, %	Модуль Юнга, ГПа
X-80	38.0±1.0	3.7±0.9	2.3±0.1
ХЛЛ-т	34.0±0.3	2.5±0.6	1.9±0.3
ХЛД-т	53.3±1.8	4.0±0.5	2.6±0.7
X-350	66.1±2.7	31.2±2.7	2.2±0.1
ХЛЛ-к	76.1±5.0	23.5±3.2	3.0±0.3

Исследование морфологии поверхности пленок из хитозана и сополимеров, контактировавших с воздухом, методом СЭМ показало, что структура поверхности также зависит от типа привитых фрагментов олиголактида (Рисунок 31). Пленки из немодифицированных образцов хитозана и сополимера с олиго(L,D-лактидом) (ХЛД-т) имеют гомогенную структуру, в то время как образцы, содержащие фрагменты аморфно-кристаллического олиго(L,L-лактида) обладают гетерогенной топологией поверхности. Вероятно, фрагменты аморфного олиголактида распределяются равномерно и не образуют отдельной фазы при формовании материалов, в то время как фрагменты олиго(L,L-лактида) образуют отдельные домены. Пленка из сополимера хитозана X-350 (ХЛЛ-к) имеет выраженную гетерогенную структуру, вероятно, по типу "матрица/включение", что подтверждает предположение о преимущественно внутримолекулярном взаимодействии привитых цепей олиго(L,L-лактида), сделанное по данным динамического лазерного светорассеяния. В пленке образца из сополимера на основе относительно низкомолекулярного хитозана (ХЛЛ-т) включения образуют протяженные структуры, что говорит о большем влиянии межмолекулярных взаимодействий по сравнению с высокомолекулярным

аналогом и также соответствует полученным другими методами данным (Рисунок 31 б и в).

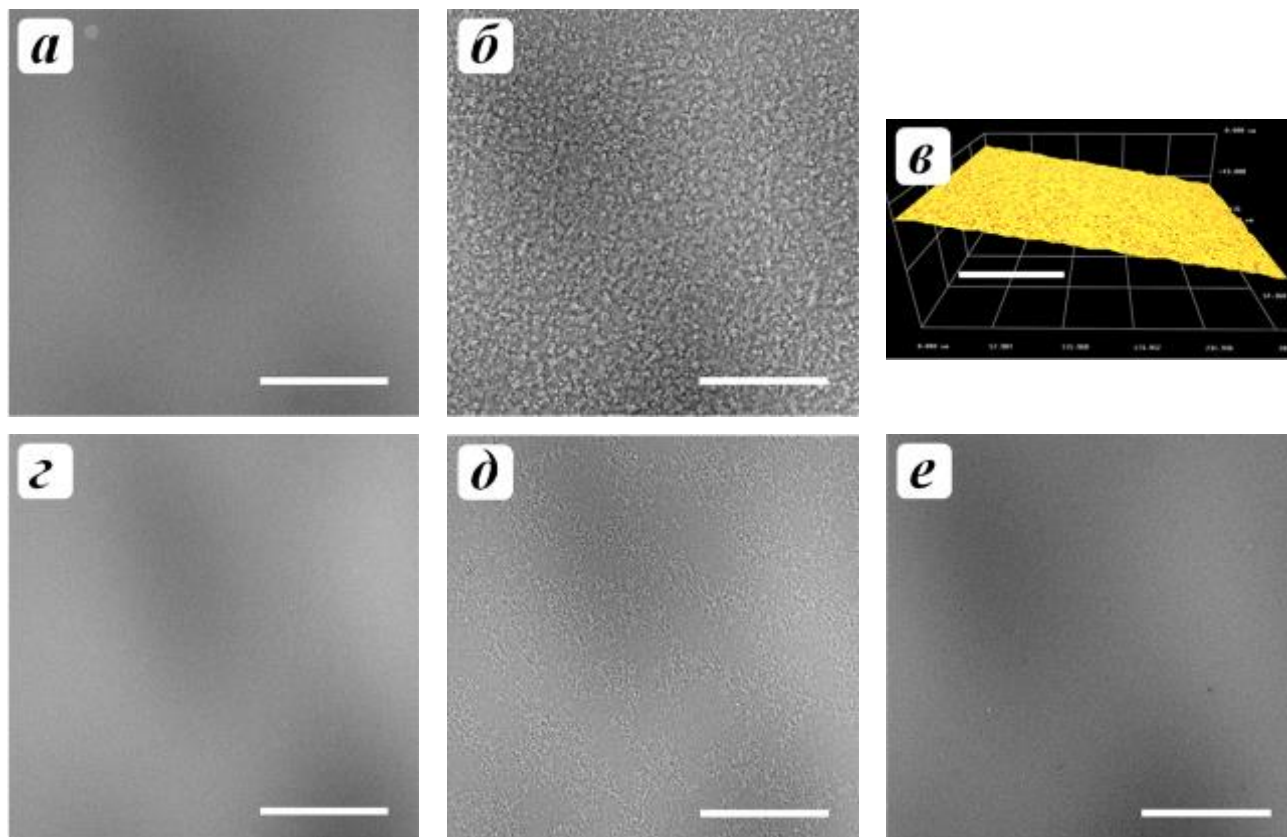


Рисунок 31 – СЭМ микрофотографии поверхности пленок из X-350 (а), ХЛЛ-к (б), X-80 (г), ХЛЛ-т (д) и ХЛД-т (е). Оптическая микрофотография пленки из ХЛЛ-к (в)

Таким образом, даже немодифицированный хитозан существенно различается по структуре и свойствам объема/поверхности за счет различия в ММ и СА, что влияет в том числе на биосовместимость пленочных материалов. Введение функциональных заместителей в структуру хитозана позволяет регулировать морфологию и деформационно-прочностные свойства материалов на его основе. Однако при увеличении глубины химического модифицирования, например, в случае прививки на хитозан фрагментов олиголактоида с относительно высокой СП (≤ 70), его растворимость в водных средах падает и, соответственно, снижается рациональность формирования материалов с использованием традиционных для хитозана методов.

2.2.1.2. Формование пленок с использованием методов, переработка по которым невозможна для немодифицированного хитозана

Снижение растворимости образцов хитозана с относительно длинными привитыми цепями олиго-/полиэфиров в традиционных для хитозана растворителях ограничивает их способность к переработке по классическим для хитозана методам, но введение гидрофобных заместителей также позволяет использовать методы, которые приняты при формовании материалов из олиго/полилактидов и невозможны при переработке из немодифицированного хитозана. В рамках диссертационной работы исследовали возможность получения материалов из сополимеров хитозана и олиго-/полилактида с использованием методов формования, основанных на сродстве сополимеров к хлорсодержащим растворителям и способности к переработке по расплавленным технологиям. Основные результаты, приведенные в данном разделе, были опубликованы и обсуждены в соавторстве в статьях [354,357,367].

Способность сополимеров хитозана с высокомолекулярными полиэфирами образовывать стабильные субмикронные дисперсии в хлорсодержащих растворителях позволяет формовать из них пленки методом полива дисперсий в хлороформе или дихлорметане. Сравнительное исследование химической структуры, морфологии и свойств пленок, полученных из растворов гомополимера поли(L,L-лактида) и сополимерной системы на его основе ХП-Ж в хлористом метиле, показало, что поверхность образца из сополимера обогащена полиэфирными фрагментами. Краевые углы смачивания, рассчитанные значения работы адгезии и поверхностной энергии пленочного образца из сополимера близки к значениям, полученным для пленки из гомополимера поли(L,L-лактида) (Таблица 13). Небольшие различия наблюдаются только в значениях дисперсионного компонента поверхностной энергии.

Таблица 13 – Характеристики поверхности пленки из поли(L,L-лактида) и его сополимера с хитозаном и желатином (ХП-Ж)

Образец	θ, град.		W _a , мДж/м ²		γ, мДж/м ²		
	вода	глицерин	вода	глицерин	γ	γ ^p	γ ^d
ХП-Ж	76	73	90.4	79.8	28.1	20.8	7.3
ПЛА	75	71	91.6	84.0	29.0	18.0	11.0

Исследование морфологии поверхности пленок показало, что пленка из гомополимера обладает неоднородной аморфно-кристаллической структурой, состоящей из сферолитов диаметром от 50 до 100 мкм с дефектными областями между ними. Для поверхности пленок ХП-Ж характерна однородная структура без выраженных крупных кристаллических образований (Рисунок 32).

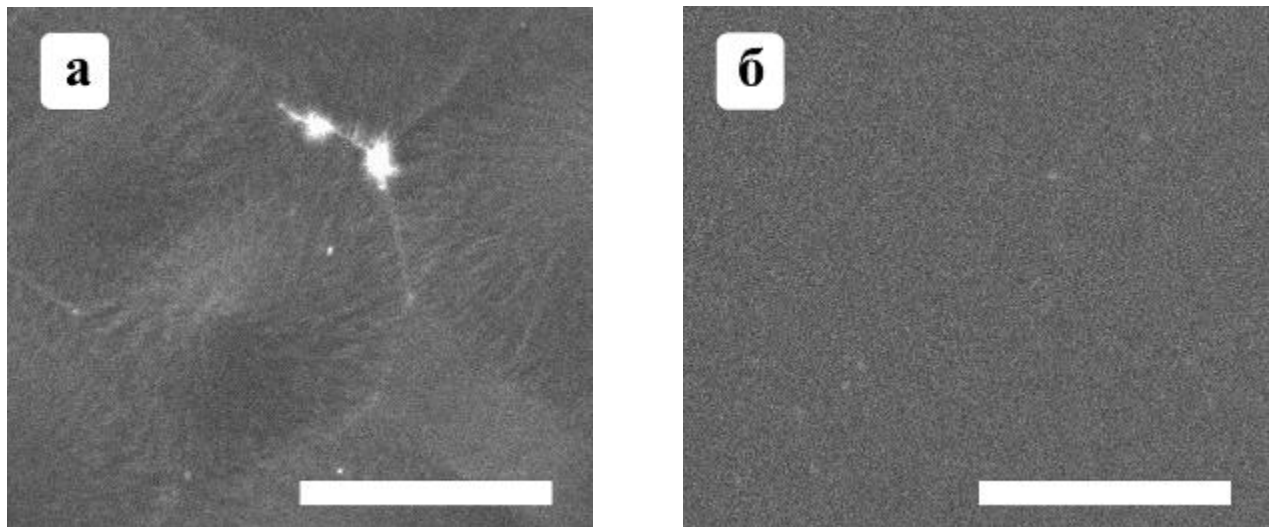


Рисунок 32 – СЭМ микрофотографии поверхности пленок из гомополимера поли(L,L-лактида) (а) и пленки из ХП-Ж (б). Масштабная линейка 50 мкм

Исследование химической структуры поверхностного слоя пленки методом РФЭС показало, что соотношение O/C составляет 0.85 и близко к величине O/C=0.89, рассчитанной, исходя из химической структуры гомополимера полилактида, а атомы азота, характерные для хитозана и желатина не обнаруживаются. Исходя из результатов исследования химической структуры,

морфологии и свойств поверхности при формировании пленок из сополимера ХП-Ж, можно сделать вывод, что привитые цепи полилактида образуют оболочку вокруг фрагментов хитозана/желатина в органических растворителя, что соответствует полученным ранее данным ЯМР спектроскопии и, таким образом, остаются на поверхности пленки при испарении растворителя.

Однако, несмотря на то, что поверхность пленки из сополимера практически полностью состоит из фрагментов полилактида, они обладают более высокой цитосовместимостью, чем пленки из нативного поли(L,L-лактида). Согласно данным МТТ-теста относительная жизнеспособность клеток L929 после 1 недели культивирования на пленке из ХП-Ж в два раза выше, чем жизнеспособность клеток на пленке из гомополимера: 59 и 31% относительно контроля (на дне лунки полистирольного планшета), соответственно. Исследование адгезии и морфологии клеток при культивировании на разных поверхностях показало, что наименьшее количество круглых клеток наблюдалось на пленке из ХП-Ж и в полистирольном планшете для культивирования (Рисунок 33). Все эти поверхности были более однородными, чем поверхность пленки из нативного полилактида, на котором клетки распластывались хуже всего.

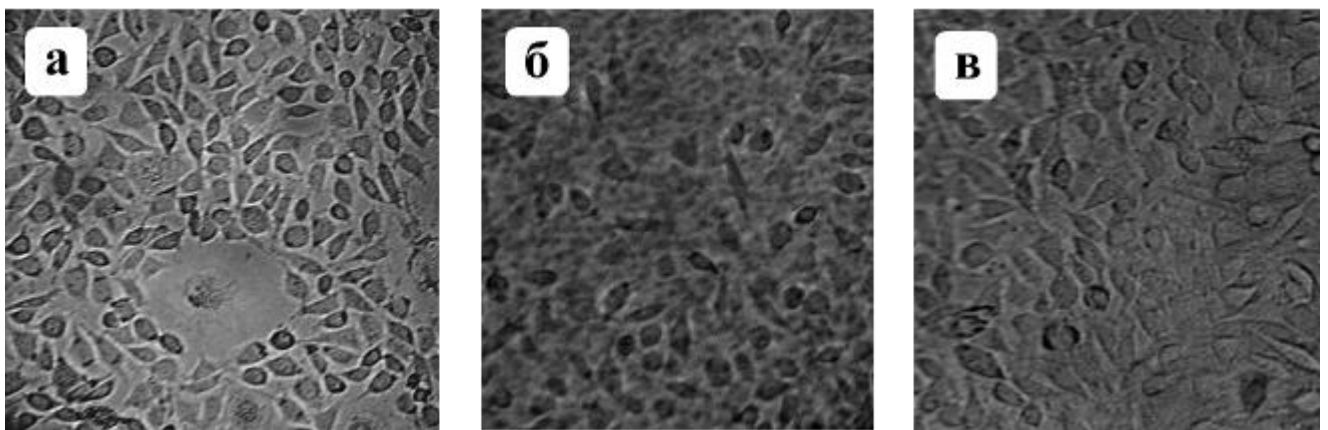


Рисунок 33 – Микрофотографии клеток L929 после 7 дней культивирования: в контроле (в лунке полистирольного планшета) (а); на пленке из гомополимера поли(L,L-лактида) (б) и из ХП-Ж (в)

Адгезия и рост клеток на поверхности определяется во многом сорбцией белков на поверхность субстрата, их концентрацией и конформацией, и,

соответственно, зависит от многих факторов. Исследование зарядовых состояний показало, что обе пленки имеют отрицательный заряд на поверхности, т.е. -6 ± 8 и -11 ± 6 $\mu\text{Кл}/\text{м}^2$, для пленки из полилактида и ХП-Ж, соответственно. Важно отметить, большой разброс в значениях плотности заряда для исходной пленки из полилактида, что говорит о гетерогенности ее поверхности и хорошо согласуется с данными СЭМ (Рисунок 32). Таким образом, высокая цитосовместимость пленки из ХП-Ж определяется гомогенностью ее поверхности с точки зрения морфологии и зарядовых состояний, т.к. с точки зрения химической структуры поверхности и ее гидрофильно/гидрофобного баланса она соответствует поверхности пленки из гомополимера полилактида, который высокой цитосовместимостью не отличается.

Вторым подходом к переработке, который открывает прививка на хитозан высокомолекулярных фрагментов полиэфигов, является возможность формирования материалов из расплава. В отличие от неплавкого хитозана, пленки из сополимеров серии ХП могут быть получены методом горячего прессования. Исследование морфологии пленок из сополимера хитозана с поли(L,L-лактидом), полученного при соотношении хитозан/полилактид 40/60, (ХП-40/60) показало, что они обладают двухфазной структурой, которая значительно зависит от скорости охлаждения образца. После быстрого охлаждения (закалки) размер включений хитозана составляет 200-400 нм, что коррелирует с данными динамического лазерного светорассеяния и указывает на то, что они представляют собой иммобилизованные в полимерной матрице ассоциаты цепей хитозана. После медленного охлаждения (отжига) формируется гетерогенная структура, состоящая из кристаллических областей полилактида (~ 2 $\mu\text{м}$) и включений хитозана на их периферии. Исследование деформационно-прочностных характеристик пленок из ХП-40/60 после отжига и закалки показало, что в обоих случаях их прочность значительно ниже прочности пленки из гомополимера (Таблица 14). Это может быть связано интенсивным протеканием процессов аминолита сложноэфирных связей аминокетонами хитозана, что сопровождается уменьшением длины цепей полиэфира. Вклад работы хитозана в

качестве жесткого инертного наполнителя не так существенен, что было показано при исследовании механических свойств образцов смесей, полученных при низкой температуре соэкструдирования: их прочность была такой же как и прочность пленки из гомополимера [357].

Таблица 14 – Деформационно-прочностные характеристики пленок из гомополимера исходного поли(L,L-лактида) и его сополимера ХП-40/60

Образец	Поли(L,L-лактид)	ХП-40/60	
		закалка	отжиг
Прочность при разрыве (МПа)	48.0	18.3	21.3
Удлинение при разрыве (%)	2.4	0.7	0.7
Модуль Юнга (ГПа)	2.3	2.7	3.0

Таким образом, синтез привитых сополимеров хитозана со сложными полиэфирами, в т.ч. наполненными белками и их гидролизатом, позволил расширить диапазон методов формования пленочных материалов из хитозана до расплавных технологий (горячее прессование из расплава) и переработки из их дисперсий в хлорсодержащих растворителях ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$), что для немодифицированного хитозана невозможно. Важно отметить, что пленочные материалы из полученных сополимерных систем обладают более высокой цитосовместимостью, чем образцы из гомополимера полилактида.

2.2.1.3. Получение покрытий и тонких пленок из хитозана

Отдельным направлением можно считать создание покрытий и микро-/наноразмерных пленок на поверхности материалов иной природы. Во-первых, возможно иммобилизовать отдельные макромолекулы хитозана на подложку иной природы, что фактически является способом модифицирования поверхностного слоя субстрата за счет обогащения его хитозаном. Для этого в основном используют различные методы активации поверхности подложки, обеспечивающие эффективную иммобилизацию на нее хитозана как за счет

электростатических взаимодействий, так и образования ковалентных связей. Вторым вариантом создания покрытий является формирование тонких микро-/наноразмерных пленок на подложке. В рамках диссертационной работы рассмотрены оба подхода к нанесению тонких пленок из хитозана на поверхность пленок из поли(L,L-лактида): иммобилизация хитозана в субповерхностный слой полиэфира, предварительно активированный в смеси растворителей, и электростатическое напыление (электрогидродинамическое распыление), которое по своей сути похоже на электроформование нетканых материалов и основано на распылении жидкости под действием высокого электрического напряжения [368,369]. Основные результаты, приведенные в данном разделе, были опубликованы и обсуждены в соавторстве в статье [206].

Учитывая то, что в качестве подложки в обоих случаях использовали гидрофобную пленку поли(L,L-лактида), одним из важных контролируемых свойств было изменение краевых углов смачивания поверхности. Как видно из Таблицы 15 в случае нанесения покрытия из хитозана X-60 на активированную в смеси растворителей (образец CP-X) подложку смачиваемость поверхности практически не отличается от исходной пленки из поли(L,L-лактида). Нанесение покрытия из хитозана методом электростатического напыления (образец ЭН-X) приводит к уменьшению угла смачивания по воде и увеличению поверхностной энергии. Наблюдается значительное (в 4 раза) увеличение полярного компонента поверхностной энергии и снижение ее дисперсионного компонента в 15 раз. Такие изменения могут быть связаны как с модифицированием химического состава, так и морфологии поверхности.

Таблица 15 – Величины краевых углов смачивания (θ) по воде и глицерину, работы адгезии (W_a), полной поверхностной энергии (γ), ее полярного (γ^p) и дисперсионного (γ^d) компонентов для исходной пленки из поли(L,L-лактида) и после нанесения на ее поверхность покрытий из хитозана после активации подложки в смеси растворителей (СР-Х) и методом электростатического напыления (ЭН-Х)

Образец	θ , град.		W , мДж/м ²		γ , мДж/м ²		
	вода	глицерин	вода	глицерин	γ	γ^p	γ^d
Поли(L,L-лактид)	75	71	91.6	84.0	29.0	18.0	11.0
СР-Х	76	71	90.4	84.0	28.6	16.4	12.2
ЭН-Х	40	58	128.6	97.0	72.4	71.7	0.7

Морфологию поверхности исходной и покрытой хитозаном пленки полилактида исследовали с помощью СЭМ и атомно-силовой микроскопии (АСМ). Как видно из рисунка 34 и таблицы 16 исходная пленка обладает достаточно гладкой поверхностью ($R_a = 11 \pm 1$ нм) и состоит из сферолитов с размерами 30-150 мкм и аморфных доменов между ними. Имобилизация хитозана после активации поверхности полилактида в смеси ацетон/вода приводит к увеличению гетерогенности поверхности. Этот метод основан на предварительном выдерживании пленки полилактида в смеси ацетон/вода, что приводит к частичному набуханию/растворению аморфных областей. Среднеквадратичная шероховатость в случае СР-Х составляет 17 ± 5 нм, а модуль Юнга увеличивается до 5 ± 2 ГПа, но говорить о нанесении какого-либо покрытия с определенной толщиной сложно, т.к. этот метод больше относится к модифицированию поверхности полилактида за счет его обогащения фрагментами хитозана (Таблица 16).

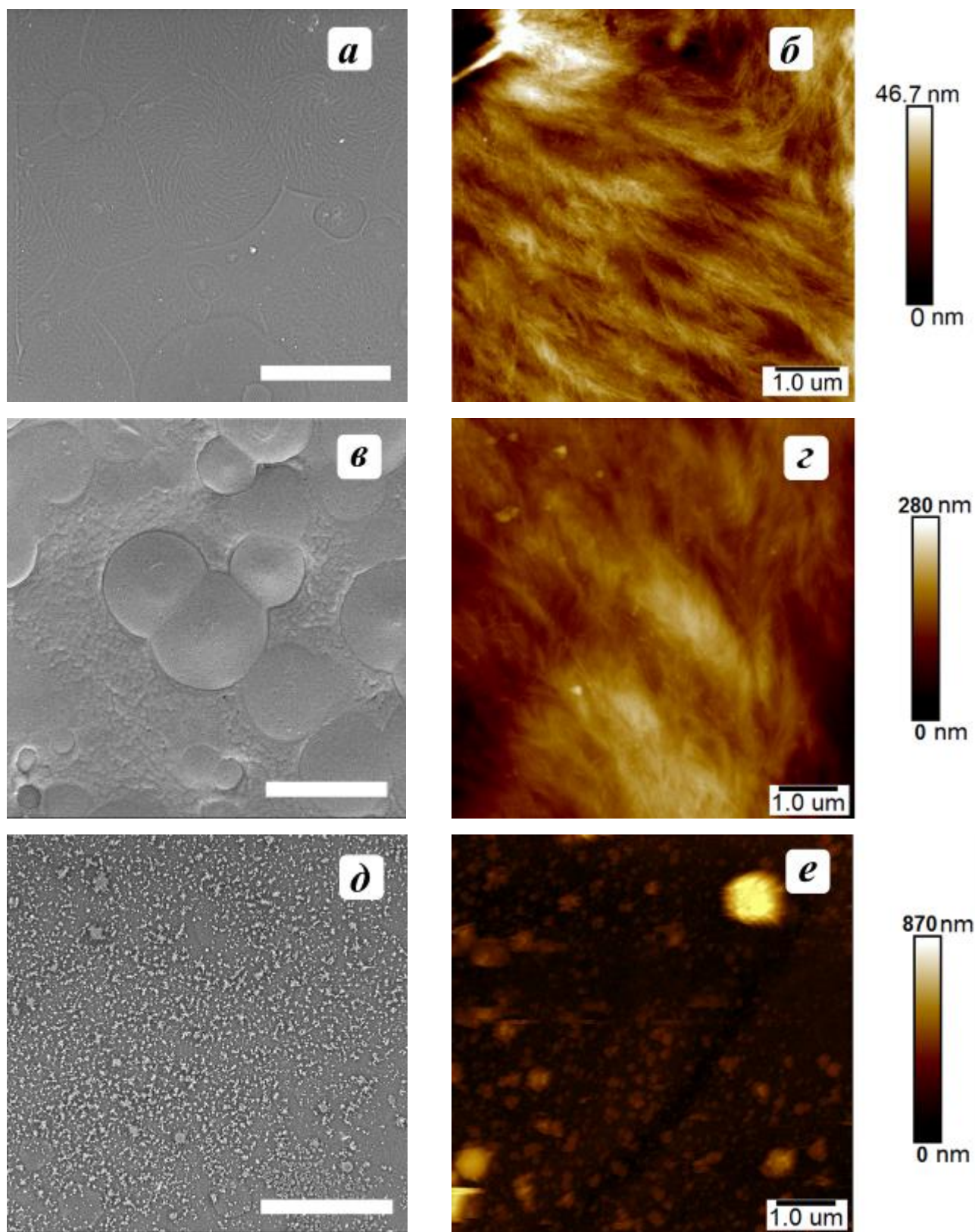


Рисунок 34 – СЭМ (а, в, д) и АСМ (б, г, е) микрофотографии исходной пленки поли(L,L-лактида) (а, б) и после нанесения на нее покрытия их хитозана: СР-Х (в, г) и ЭН-Х (д, е). Масштабная линейка на СЭМ микрофотографиях 100 мкм

При использовании метода электростатического напыления на микрофотографиях образцов видны крупные микронные агрегаты; наблюдается значительное увеличение шероховатости поверхности до 105 ± 10 нм. Очевидно, что в этом случае распределение хитозана по поверхности подложки неоднородное. Измерение толщины покрытия показало формирование слоя со средней толщиной 3.2 ± 0.2 мкм. Снижение модуля Юнга поверхности в этом случае, вероятно, связано с достаточно большим содержанием нанесенного хитозана (Таблица 16).

Таблица 16 – Характеристики поверхности исходной пленки полилактида и после нанесения покрытий из хитозана

Образец	Толщина покрытия, мкм	Шероховатость (R_a), нм	Модуль Юнга, ГПа
Поли(L,L-лактид)	–	11 ± 1	4 ± 1
СР-Х	–	17 ± 5	5 ± 2
ЭН-Х	3.2 ± 0.2	105 ± 10	0.5 ± 0.1

Исследование химической структуры поверхности исходной пленки полилактида и после нанесения слоя хитозана проводили методом РФЭС. В обоих случаях на поверхности наблюдается азот, что говорит об успешной иммобилизации хитозана и нанесении покрытия из него (Таблица 17). Расчет содержания хитозана в поверхностном слое по данным РФЭС показал, что поверхность содержит 11.5 и 43.7 мас.% хитозана в случае СР-Х и ЭН-Х, соответственно.

Таблица 17 – Химический состав поверхностных слоев исходной пленки полилактида и после нанесения покрытий из хитозана

Образец	Атомная концентрация, ат. %		
	С	О	N
Поли(L,L-лактид)	68.8	31.2	–
CP-X	65.9	33.1	1.0
ЭН-X	65.9	30.5	3.6

На рисунке 35 и в таблице 18 приведены данные более детального исследования химической структуры покрытий из хитозана, нанесенных на пленки из полилактида, с помощью разделения C1s и N1s пиков спектров РФЭС. C1s пик исходной пленки полилактида можно разделить на три составляющих с максимумами: 284.6 эВ (C–C и/или C–H), 286 эВ (C–O) и 289 эВ (COO группы). При нанесении покрытия методом электростатического напыления (ЭН-X) на C1s спектре появляется дополнительная составляющая при 287.6 эВ, которая может быть отнесена к N–C=O остаточных ацетамидных групп в хитозане. Разделение N1s спектра показало две основных составляющие: 399 эВ (аминогруппы) и небольшого пика при 401 эВ (ацетамидные группы). Отсутствие дополнительного пика в C1s спектре образца CP-X, вероятно, связано с небольшим количеством иммобилизованного хитозана.

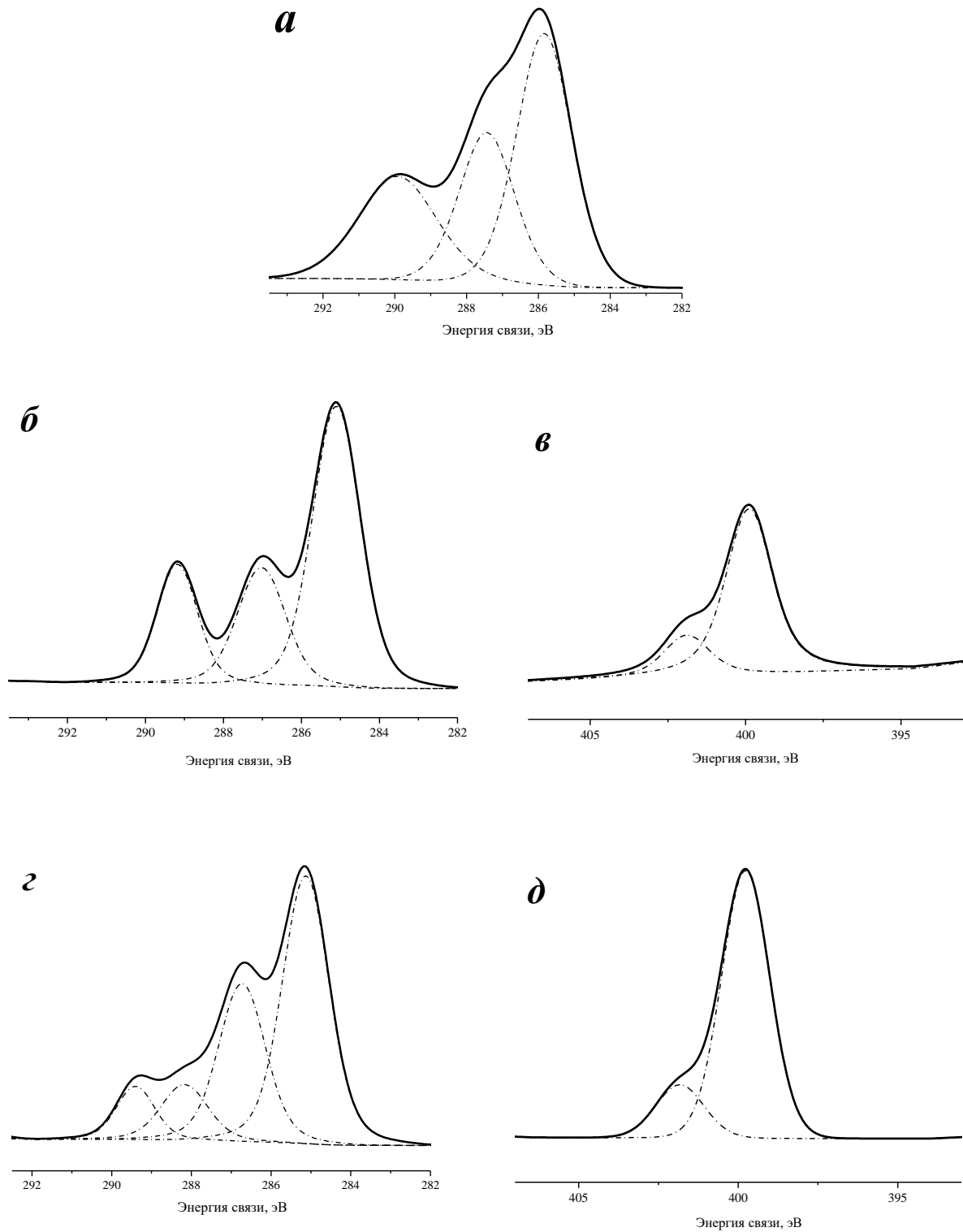


Рисунок 35 – C1s (а,б,г) и N1s (в,д) спектры исходной пленки полилактида
(а), СР-Х (б,в) и ЭН-Х (г,д)

Таблица 18 – Относительные интенсивности составляющих C1s и N1s спектров исходной пленки полилактида и с нанесенным покрытием из хитозана

Образец	Атом	Энергия связи, эВ	Атомная %	Связь
Поли(L,L-лактид)	C1s	284.6	47.5	C–C/C–H
		286.3	28.6	C–OH/C–O–C
		289.2	23.9	C=O/O–C=O
CP-X	C1s	284.6	59.2	C–C/C–H
		286.6	19.9	C–OH/C–O–C
		288.8	20.9	C=O/O–C=O
	N1s	399.4	80.0	N–H/C
		401.4	20.0	N–C=O
ЭН-X	C1s	284.6	50.9	C–C/C–H
		286.1	30	C–OH/C–O–C
		287.6	10.6	C=O (хитозан)
		288.9	8.3	C=O/O–C=O
	N1s	399.2	83.5	N–H/C
		401.3	16.5	N–C=O

Гомогенность нанесения покрытий из хитозана оценивали с помощью ИК-микроскопии (Рисунок 36). Картирование химической структуры покрытия из хитозана, нанесенного на пленку из полилактида методом электростатического напыления (образец ЭН-X), показало образование крупных областей с высокой концентрацией хитозана. Имобилизация хитозана на активированную в смеси растворителей поверхность пленки из поли(L,L-лактида) (образец CP-X) привела к локализации фрагментов хитозана преимущественно, вероятно, в аморфных или дефектных областях пленки. ИК-микрофотографии снимали в режиме отражения при 1600 см^{-1} (деформационные колебания аминогрупп хитозана) и темно-синие области указывают на высокое содержание хитозана.

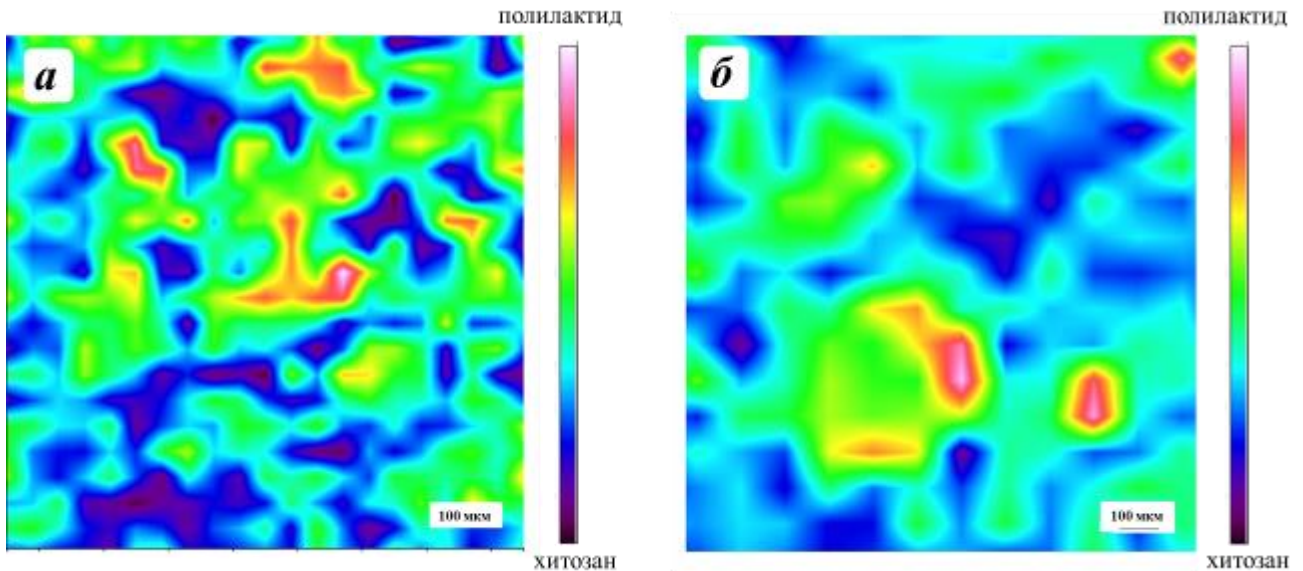


Рисунок 36 – ИК-микрофотография пленки CP-X (а) и ЭН-X (б). Режим отражения при 1600 см^{-1}

Таким образом, показана возможность получения микро-/наноразмерных пленок из хитозана методом электростатического напыления и путем его иммобилизации на активированную в смеси растворителей поверхность полимерного субстрата. Суммируя результаты, приведенные в настоящем разделе, можно сделать выводы: (1) достаточно сложная химическая структура немодифицированного хитозана определяет вариативность свойств (в т.ч. биосовместимости) поверхности пленочных материалов на его основе, что необходимо учитывать при формовании и использовании таких материалов в биомедицине; (2) целенаправленное модифицирование химической структуры открывает широкие перспективы как с точки зрения свойств объема/поверхности, так и методов формования даже таких относительно простых форм материалов, как пленки; (3) морфология покрытий из хитозана на пленках из полилактида существенно зависит от способа нанесения. Все это определяет широкий диапазон возможностей для получения и оптимизации хитозансодержащих пленок биомедицинского назначения.

2.2.2. Нетканые нано-/микроволокнистые материалы

В отличие от пленок нетканые материалы уже относятся к трехмерным изделиям, обладающим достаточной пористостью и развитой поверхностью. Они могут применяться как в качестве разделительных мембран, так и тканезамещающих имплантатов, в т.ч. для регенерации полых органов (трахея, уретра и т.д.). Способность сополимеров хитозана с олиго/полилактидами образовывать стабильные ультратонкие дисперсии в хлорсодержащих растворителях позволяет получать нано-/микроволокнистые материалы методом электроформования (1) без использования таких токсичных растворителей как, например, гексафторизопропанол и (2) в один этап без необходимости получать композиционный нетканый материал, меняя формовочный раствор или используя несколько сопел. Основные результаты, приведенные в данном разделе, были опубликованы и обсуждены в соавторстве в статьях [356,362,370–372].

Учитывая перспективность применения нетканых материалов в качестве матриц для тканевой инженерии, для их получения использовали сополимеры хитозана с олиго/полиэфирами, содержащие белок или его гидролизат желатин, т.е. многокомпонентные системы хитозан/олиголактид/коллаген (ХО-К), хитозан/полилактид/желатин (ХП-Ж) и поликапролактон/полилактид/хитозан/олиго(L,L-лактид)/желатин (ППХОЖ). Для всех этих систем характерна способность образовывать коллоидные дисперсии в хлорсодержащих растворителях. Электроформование (ЭФ) стабильных дисперсий ХО-К и ХП-Ж в хлороформе приводило к получению дефектных материалов с низкими деформационно-прочностными характеристиками, поэтому волокнистые материалы на их основе были получены из 10 мас.% растворов их смесей с полилактидом при весовом соотношении 95/5 в пользу гомополимера в хлороформе. Введение в раствор полилактида в хлороформе коллоидных дисперсий тройных систем ХО-К и ХП-Ж приводит к увеличению его электропроводности, снижению вязкости и поверхностного натяжения (Таблицу 19).

Таблица 19 – Характеристики формовочных растворов полилактида и его смесей с ХО-К и ХП-Ж

Образец	η , мПа*сек	Электропроводность, мкСм/см	σ , мН/м
полилактид	607±20	0.010±0.003	48.5±4.0
полилактид/ХО-К	555±20	0.126±0.005	30.0±3.9
полилактид/ХП-Ж	347±20	0.118±0.006	23.4±6.1

Длина привитых фрагментов природных компонентов в сополимерах существенно влияет на вязкость формовочных растворов. Наибольшая вязкость характерна для гомополимера полилактид, и добавление сополимера с относительно короткими фрагментами хитозана (ХО-К) снижала её незначительно, тогда как вязкость сополимерных композиций, содержащих высокомолекулярный хитозан (ХП-Ж), была ниже практически в 2 раза. Аналогичную зависимость демонстрировали и значения поверхностного натяжения исследуемых образцов. Электропроводность композиционных формовочных растворов, на порядок выше, чем раствора гомополимера. Предположительно, перераспределение электронной плотности в макромолекулах природных компонентов за счет таких ионогенных групп как NH_2 - коллагена (лизин, гидроксизин) и хитозана, COOH - коллагена (аспарагиновая и глутаминовая кислоты) являются основным фактором, влияющими на электропроводимость формовочного раствора.

Из раствора гомополимера и его смесей с ХО-К и ХП-Ж удалось получить высокопористые микроволокнистые материалы, состоящие из волокон диаметром в диапазоне 1-20 мкм. Изучение структуры полученных нетканых материалов с помощью СЭМ показало, что при выбранных условиях проведения процесса ЭФ средний диаметр волокон нетканых материалов, содержащих сополимеры, был достаточно большим (около 5 мкм), в то же время для гомополимера характерен еще больший средний диаметр волокна с увеличением неоднородности по

размеру (Рисунок 37). Причина таких результатов, вероятно, связана с относительно низкой электропроводностью всех исследованных растворов, поскольку при их приготовлении не использовали добавок низкомолекулярных электролитов. В целом, электроформование из композиционных формовочных растворов, содержащих сополимеры, приводит к получению микроволокон с более развитой морфологией, чем при формовании из гомополимера полилактида. Качественное исследование состава поверхности таких волокон осуществляли с помощью флуоресцентной микроскопии с предварительным мечением нетканых материалов флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ). Нетканые материалы, содержащие сополимеры, показали эмиссию от ФИТЦ, т.е. содержали в поверхностном слое фрагменты полисахарида/белка. Это привело к появлению шероховатости поверхности волокон и наличию в них внутренних пор, что должно положительно сказаться на процессах взаимодействия с клетками.

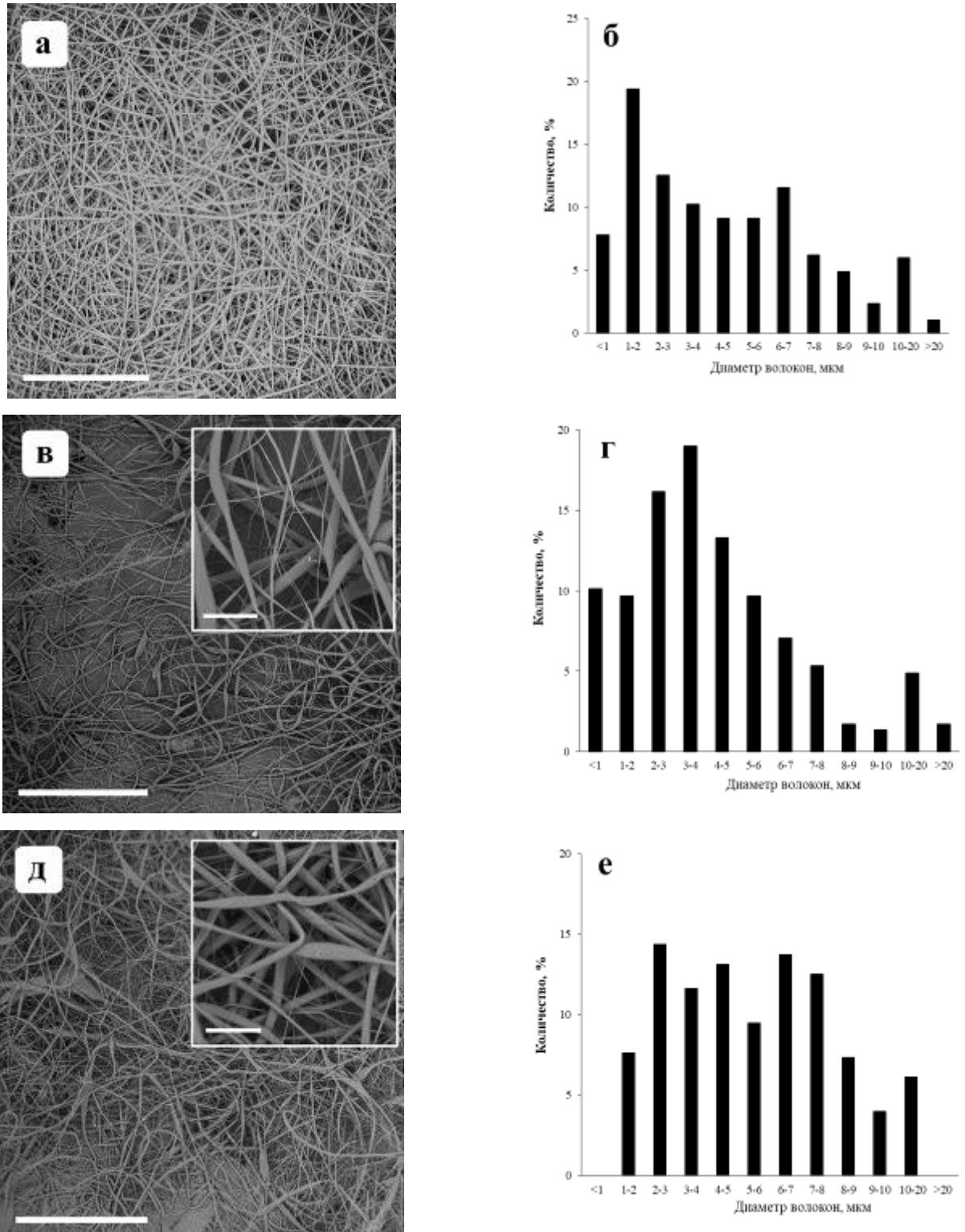


Рисунок 37 – СЭМ микрофотографии (а, в, д) и гистограммы распределения волокон по размеру (б, г, е) нетканых материалов из полилактида (а, б) и его смесей с ХО-К (в, г) и ХП-Ж (д, е)

Варьируя условия получения (соотношение гомополимер/сополимер, состав растворителя, скорость подачи формовочного раствора и т.д.) можно регулировать диаметр волокон и получать более сложные материалы для создания тканеинженерных конструкций. Так, на основе смеси гомополимера и ХП-Ж в весовом соотношении 53 и 47 мас.%, соответственно, были получены бислойные нетканые материалы [372]. Комбинирование микро- и наноразмерного слоев позволило использовать такие материалы для одновременного культивирования клеток фибробластов в микроволокнистом слое материала и клеток дыхательного эпителия на нановолокнистом слое с целью создания тканеинженерной конструкции имитирующей трахею.

Более сложную многокомпонентную систему из поликапролактона/полилактида/хитозана/олиго(L,L-лактида)/желатина (ППХОЖ) с общим содержанием олиго-/полиэфиров 60 % использовали для получения нетканых материалов без добавления гомополимеров в формовочный раствор. Условия электроформования (концентрация ППХОЖ в хлороформе: 25 мас.%; напряжение 13-17 кВ) были оптимизированы для получения нетканого бездефектного материала. Диаметр волокон варьировался в широком диапазоне со средним размером ~ 7 мкм (Рисунок 38). Как и в случае композиционных нетканых материалов, содержащих ХО-К или ХП-Ж, морфология поверхности волокон была достаточно развитой, что, вероятно, связано с агрегированием макромолекулярных ассоциатов в концентрированных формовочных коллоидных растворах ППХОЖ в хлороформе.

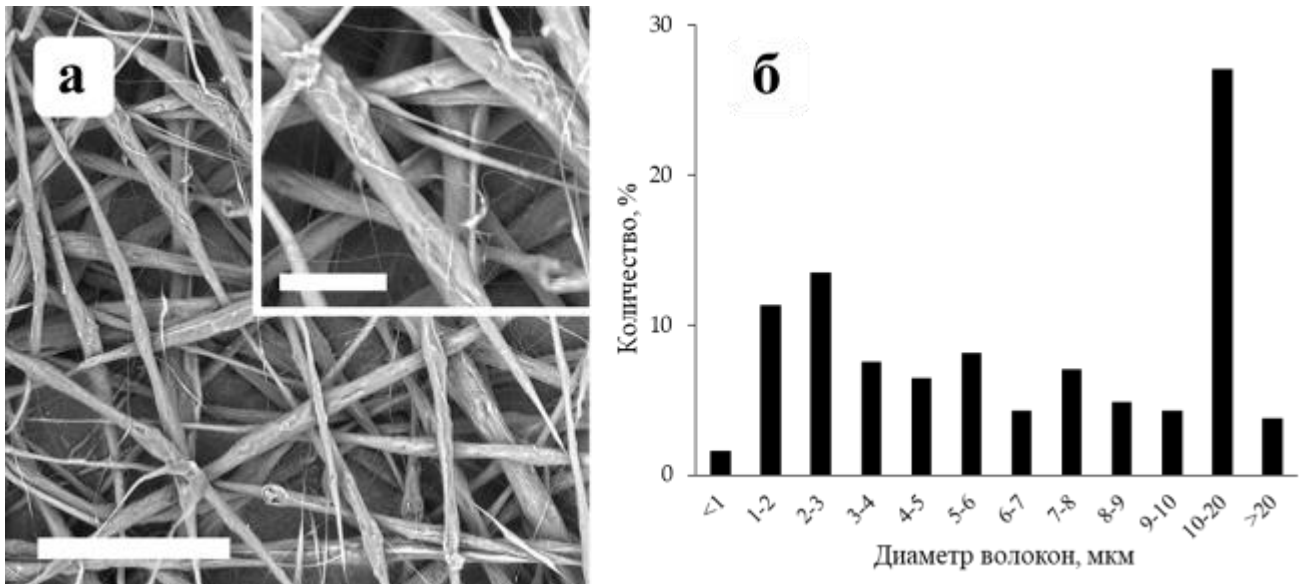


Рисунок 38 – СЭМ микрофотография (а), гистограмма распределения волокон по размеру (б) нетканого материала из многокомпонентной сополимерной системы ППХОЖ

Качественное исследование состава поверхности микроволокнистого материала, проведенное с помощью флуоресцентной микроскопии предварительно помеченных ФИТЦ образцов, показало неоднородную эмиссию селективных флуоресцентных меток (Рисунок 39 а), что хорошо согласуется с предположением об агрегировании природных компонентов ППХОЖ в формовочных растворах. Наличие гидрофильных фрагментов на поверхности волокон из ППХОЖ определяет повышенную гидрофильность полученного нетканого материала по сравнению с нетканым материалом из гомополимера полилактида: угол смачивания по воде 129 и 137°, соответственно. Также, в случае многокомпонентной системы ППХОЖ угол смачивания по воде уменьшается во времени значительно, чем это происходит на нетканом материале из полилактида (Рисунок 39 б). Эта особенность может быть связана как с более развитой поверхностью волокон в случае сополимерной системы, так и с наличием гидрофильных компонентов (хитозан, желатин).

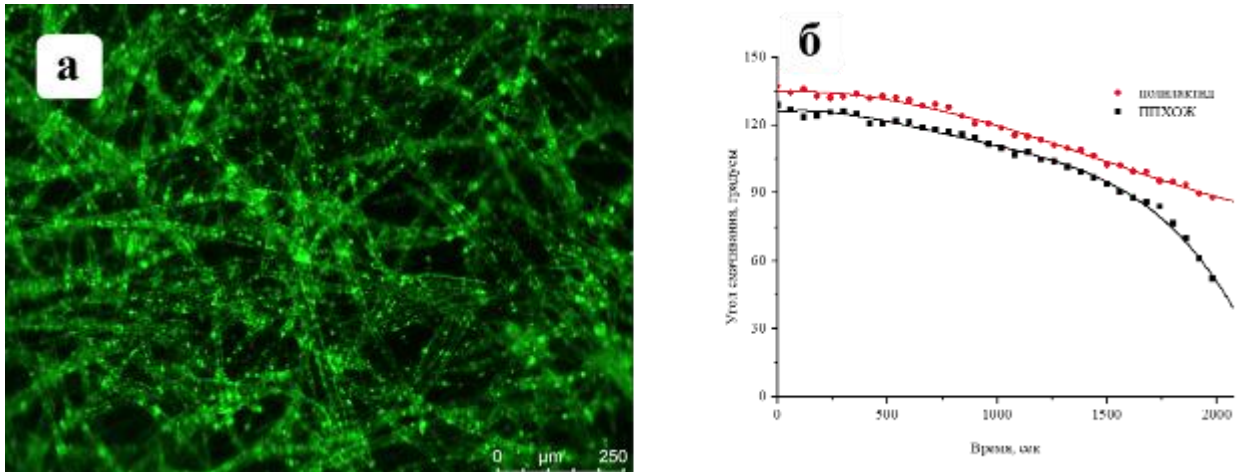


Рисунок 39 – Флуоресцентная микрофотография помеченного ФИТЦ нетканого материала из ППХОЖ (а) и зависимость углов смачивания нетканых материалов из полилактида и ППХОЖ от времени (б)

Наличие гидрофильных фрагментов на поверхности микроволокнистых материалов из многокомпонентного материала ППХОЖ также объясняет особенности деформационно-прочностных характеристик образцов в сухом и увлажненном состоянии. В таблице 20 приведены данные измерения прочности, модуля упругости и удлинения нетканых материалов из полилактида и ППХОЖ. Для материала из гомополимера существенных различий в характеристиках в зависимости от влажности не наблюдается, но физико-механические свойства материала из ППХОЖ в увлажненном состоянии были значительно лучше, чем в сухом. Наличие хитозана/желатина, логично, уменьшает прочность материала в сухом состоянии, так как с точки зрения механических свойств они выступают в качестве жесткого инертного наполнителя. Однако при испытании материала из ППХОЖ в увлажненном состоянии наблюдается повышение его механических характеристик, что, вероятно, связано с набуханием хитозана/желатина и проявлением ими эластических свойств.

Таблица 20 – Деформационно-прочностные свойства нетканых материалов из полилактида и ППХОЖ в сухом и увлажненном состоянии

Образец	Полилактид		ППХОЖ	
	сухой	влажный	сухой	влажный
Разрушающее напряжение, МПа	1.2±0.7	1.4±0.3	0.1±0.01	0.3±0.2
Модуль Юнга, МПа	12±8	8±3	1.7±0.6	6±4
Относительное удлинение при разрыве, %	90±20	70±10	7±1	11±4

Биосовместимость полученных нетканых материалов исследовали *in vitro* в процессе культивирования мезенхимальных стромальных клеток человека в течение 7-ми дней. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью количественных методов (тест AlamarBlue, тест на подсчет количества ДНК) и качественных (окрашивание Live/Dead) методов. Количественные методы оценки жизнеспособности клеток не показали значительной цитотоксичности материалов из ППХОЖ. Конфокальная микроскопия клеток, окрашенных флуоресцентными красителями селективными к живым и мертвым клеткам, также показала хорошую жизнеспособность клеток. При культивировании клеток на микроволокнистых 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 полилактида, но также и в объеме (Рисунок 40). Нетканый материал из многокомпонентной системы отличается также существенной автофлуоресценцией.

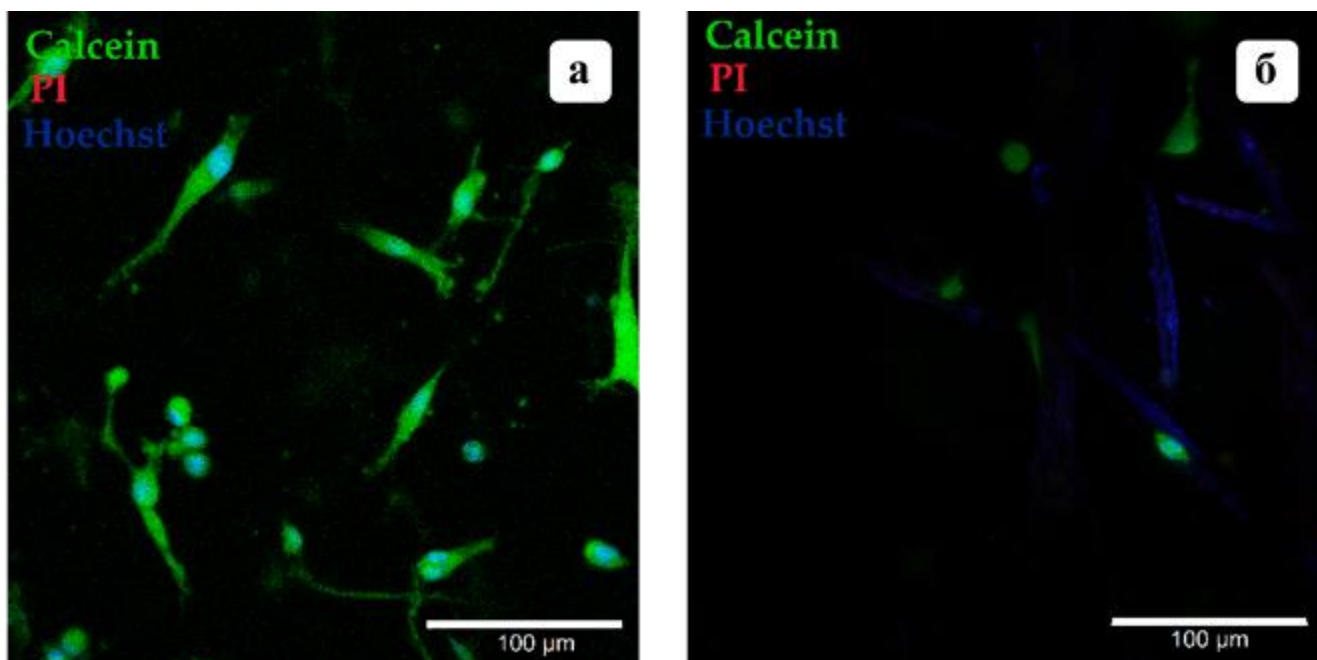


Рисунок 40 – Конфокальная микроскопия нетканых материалов из полилактида (а) и ППХОЖ (б) после культивирования мезенхимальных стромальных клеток человека в течение 7-ми дней. Живые клетки окрашены Calcein (зеленый), мертвые - пропидий йодидом (красный), ядра – Hoechst 33258 (синий)

Таким образом, возможность прививки на хитозан фрагментов олиго/полилактида в условиях твердофазной реакционной экструзии обеспечивает возможность создания этим методом новых амфифильных многокомпонентных систем, в т.ч. обогащенных белками, которые можно использовать для получения нетканых микро-/нановолокнистых материалов методом электроформования. По данным *in vitro* исследований полученные материалы перспективны для использования в качестве матриц для восстановительной хирургии, в т.ч. для создания тканеинженерных конструкций для регенерации полых органов.

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

Биодеградируемые полимерные микрочастицы являются одним из наиболее перспективных видов материалов для регенеративной медицины, т.к. могут использоваться как в качестве инъектируемых многофункциональных

микроносителей клеток/биоактивных веществ, так и являться исходным материалом для формирования из них 3D структур заданной морфологии с помощью аддитивных технологий. Применение микрочастиц в качестве клеточных микроносителей основано на малоинвазивном имплантировании в поврежденные участки тканей клеток, прикрепленных к поверхности микрочастиц, что позволяет осуществить направленную мультипликацию клеток *in vitro* в биореакторе и обеспечить их доставку в поврежденные участки тканей, что особенно важно для субстрат-зависимых линий клеток. Микроносители обладают целым рядом преимуществ перед остальными средствами доставки клеток. Во-первых, их размер (~ 100-300 мкм) и способность к суспендированию в водных средах позволяет вводить их в поврежденные участки тканей инъекционно. Во-вторых, микрочастицы обладают большой поверхностью доступной для адгезии и роста клеток. В-третьих, можно комбинировать различные линии клеток. В-четвертых, они могут одновременно служить средствами доставки биоактивных компонентов, высвобождающихся в процессе деградации полимера. Еще одним очень перспективным направлением использования таких микрочастиц является получение на их основе трехмерных матриц методами прессования, селективного лазерного спекания и т.д. Для применения микрочастиц в медицине в большинстве случаев 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 водной среды в основном влияет на структуру поверхности получаемых микрочастиц, а дисперсная масляная фаза определяет структуру и морфологию их объема.

В настоящем разделе диссертационной работы описано применение производных и сополимеров хитозана с различной длиной привитой цепи олиго/полиэфиров для получения сферических микрочастиц методом испарения растворителя из эмульсий масло/вода. Рассмотрены различные подходы к использованию хитина, хитозана и его производных/сополимеров в форме

растворов или наночастиц в качестве эмульгаторов в дисперсионной среде. Описаны и обобщены данные по влиянию степени замещения аминогрупп хитозана, природы/длины привитых на хитозан фрагментов, макромолекулярных характеристик основной цепи хитозана на выход микрочастиц, химическую структуру и морфологию их поверхности и объема. Также оценены возможности по варьированию состава микрочастиц и масштабированию процесса их получения. Основные экспериментальные результаты опубликованы в соавторстве в [353,373–378].

2.2.3.1. Модифицирование состава дисперсионной среды

По классической технологии получения биodeградируемых микрочастиц на основе полиэфиров методом испарения растворителя из эмульсий масло/вода дисперсионная среда должна содержать эмульгатор, препятствующий агрегированию микрочастиц во время формования. В основном используют поливиниловый спирт (ПВС), который, с одной стороны, является хорошим эмульгатором, но с другой – обладает рядом недостатков. Основными проблемами, которые возникают при получении микрочастиц по классической методике с использованием ПВС, являются: (1) наличие остаточного синтетического эмульгатора на поверхности микрочастиц после их получения, что ставит под вопрос их безопасность для *in vivo* применения; (2) отсутствие функциональных групп, способствующих прикреплению и росту клеток на поверхности микрочастиц, что препятствует их эффективному использованию в качестве клеточных микроносителей. В рамках оптимизации состава дисперсионной среды использовали или водные растворы производных/сополимеров хитозана или водные дисперсии наночастиц хитина, хитозана и его производных.

2.2.3.1.1. Использование растворов производных и сополимеров хитозана в качестве эмульгаторов в дисперсионной среде

Возможность применения растворов хитозана, его производных и сополимеров в качестве эмульгаторов в дисперсионной среде в первую очередь определяется их способностью к растворению в водных средах, поэтому для исследования влияния степени замещения аминогрупп хитозана, длины привитых цепей и их стереохимического состава использовали сополимеры хитозана с короткими ($СП \leq 10$) и средней длины ($СП \leq 70$) привитыми цепями олиголактида.

Сополимеры с короткими привитыми цепями олиго(L,D-лактида) (образцы серии ХЛ) являются эффективными эмульгаторами при формировании микрочастиц, чья стабилизирующая способность прямо коррелирует с длиной привитой цепи (Рисунок 41). Использование образцов ХЛ в дисперсионной среде позволяет получить микрочастицы из поли(L,D-лактида) с общим выходом до 75 мас.%, что сравнимо с выходом микрочастиц, полученных при тех же условиях с применением ПВС в качестве эмульгатора. Увеличение способности стабилизировать границу раздела фаз с увеличением длины привитой цепи также видно по изменению распределения микрочастиц по размерам: средний размер микрочастиц уменьшается в ряду ХЛ-1>ХЛ-2>ХЛ-3. Важно также отметить, что даже раствор немодифицированного хитозана в 2%СН₃СООН может выполнять функцию эмульгатора в фазе водного растворителя, но выход микрочастиц в этом случае составляет всего 26 мас.%.

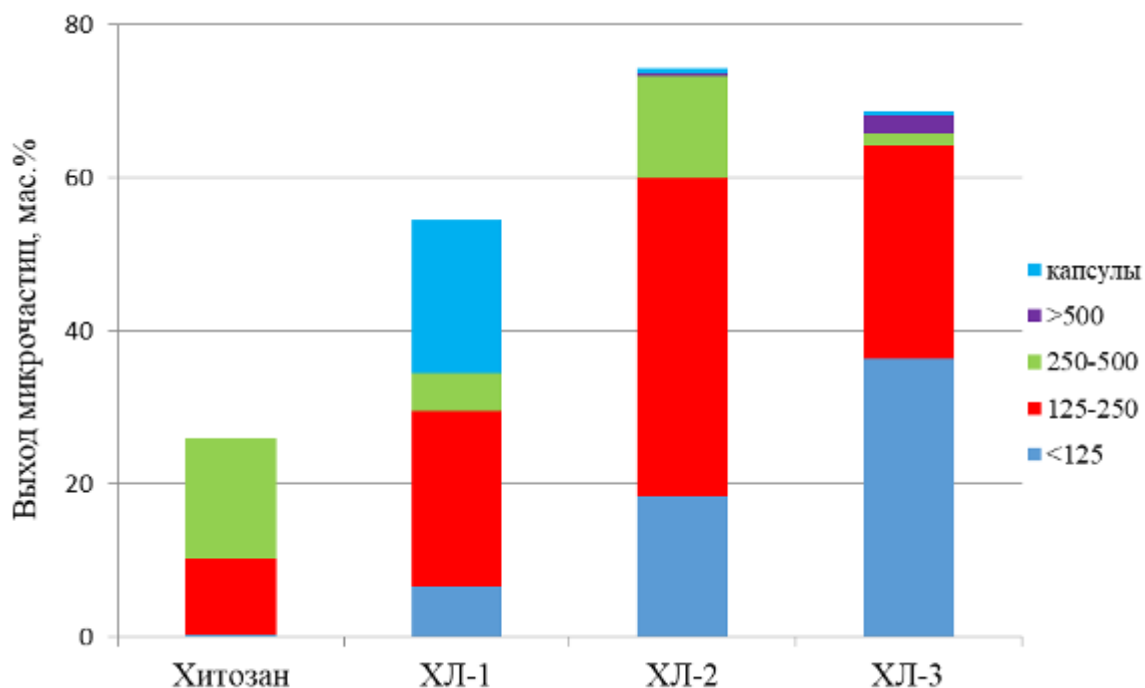


Рисунок 41 – Выход микрочастиц и их распределение по размерам в зависимости от образца ХЛ, используемого в качестве эмульгатора в дисперсионной среде

Исследование морфологии микрочастиц, стабилизированных привитыми сополимерами хитозана, введенными в дисперсионную среду, методом СЭМ показало, что использование как немодифицированного хитозана, так и его сополимеров, содержащих короткие привитые фрагменты олиго(L,D-лактида), приводит к получению сферических микрочастиц с гладкой поверхностью (Рисунок 42).

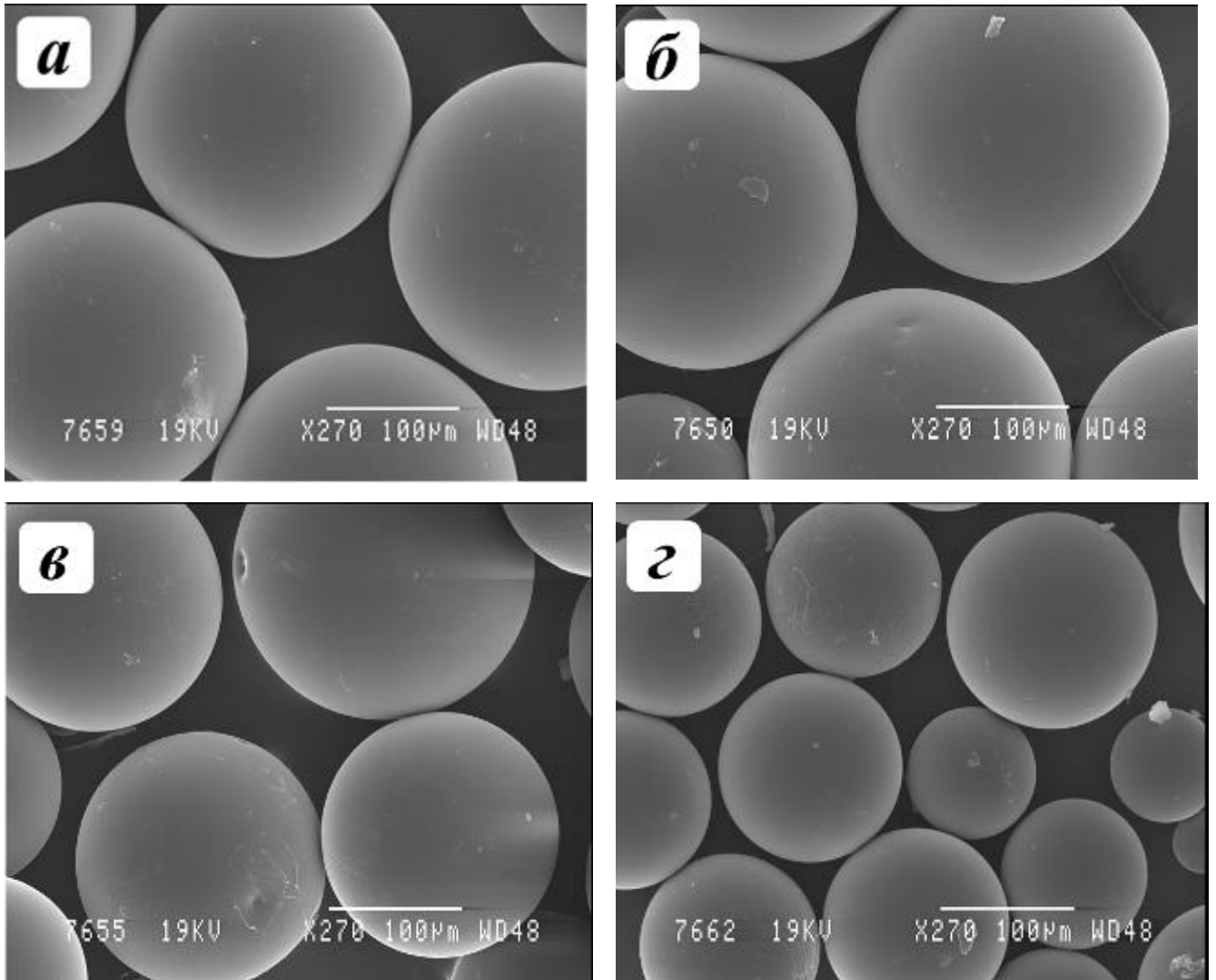


Рисунок 42– Микрофотографии микрочастиц, полученных с использованием уксуснокислых водных растворов немодифицированного хитозана (а), ХЛ-1 (в), ХЛ-2 (д) и ХЛ-3 (ж) в качестве дисперсионной среды

Дальнейшее увеличение длины привитых цепей до $СП \leq 70$ (образцы серии ХЛЛ/ХЛД) значительно снижает растворимость сополимеров в водных средах, что делает их применение в качестве эмульгаторов в дисперсионной среде менее рациональным. Выход микрочастиц при использовании сополимеров со средней длиной привитых цепей варьируется от 55 до 71 мас.% (Рисунок 43). Наибольший выход микрочастиц и меньший их средний размер наблюдался в системе, содержащей в качестве эмульгатора в дисперсионной среде раствор образца ХЛЛ-к, с наименьшей степенью прививки. Введение большего количества привитых цепей (образцы ХЛЛ-т и ХЛД-т) приводит к снижению способности сополимеров

стабилизировать границу раздела фаз. Очевидно, что существует оптимум с точки зрения количества и СП привитых цепей для эффективного использования сополимеров в качестве эмульгаторов. Также наблюдается небольшое увеличение выхода микрочастиц при использовании сополимера, содержащего аморфно-кристаллические фрагменты олиго(L,L-лактида), по сравнению с выходом в случае применения хитозана, содержащего средней длины фрагменты олиго(L,D-лактида). Использование в качестве дисперсионной среды раствора ХО-К позволяет достичь общего выхода микрочастиц 73 мас. %.

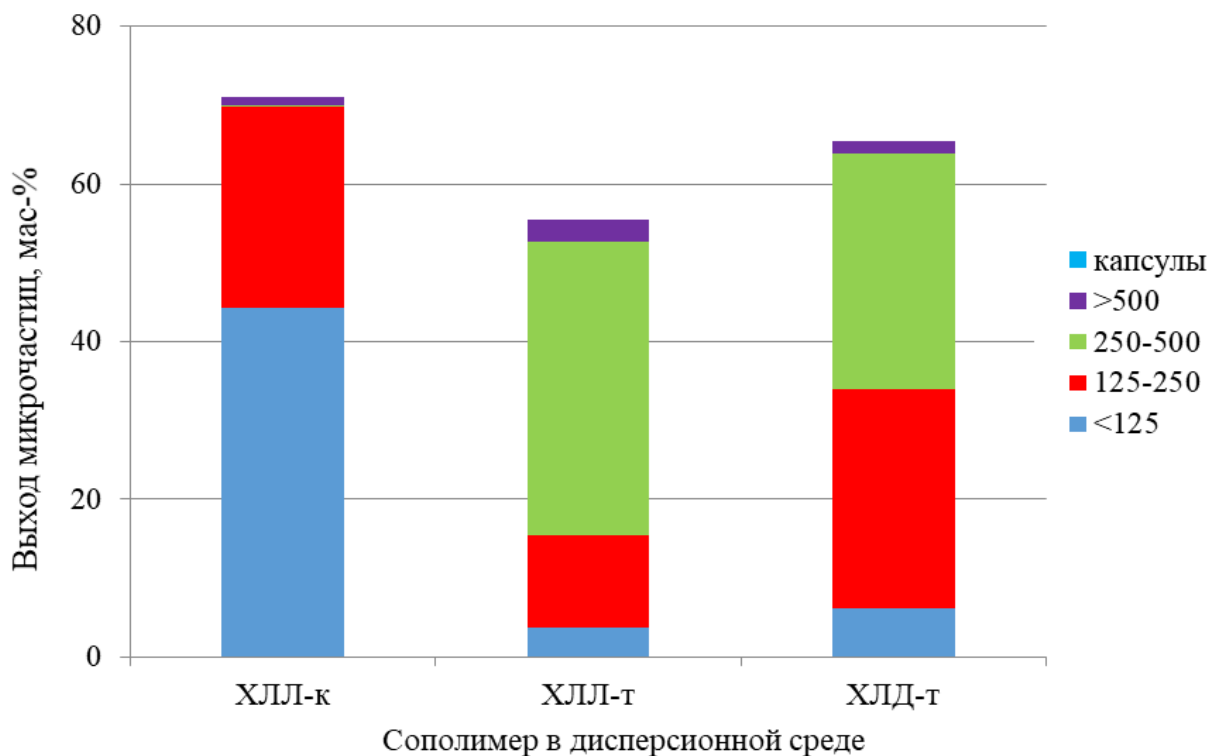


Рисунок 43 – Выход микрочастиц и их распределение по размерам в зависимости от образца серии ХЛД/ХЛД, используемого в качестве эмульгатора в дисперсионной среде

Исследование методом СЭМ морфологии микрочастиц из полилактида, полученных с использованием сополимеров со средней СП привитых цепей, показало, что они имеют сферическую форму (Рисунок 44). Небольшая неоднородность морфологии поверхности полученных микрочастиц, вероятно, связана с тем, что при их формировании в качестве матричного полимера в

дисперсной фазе использовали аморфно-кристаллический поли(L,L-лактид), который кристаллизуется в процессе испарения растворителя. Качественный анализ химического состава поверхностного слоя проводили с помощью флуоресцентной микроскопии микрочастиц, предварительно инкубированных в растворе флуоресцеин изотиоцианата, который обладает селективной реакционной способностью по отношению к аминогруппам (Рисунок 44). Флуоресценция микрочастиц, стабилизированных сополимерами, подтверждает, что их поверхность обогащена фрагментами хитозана.

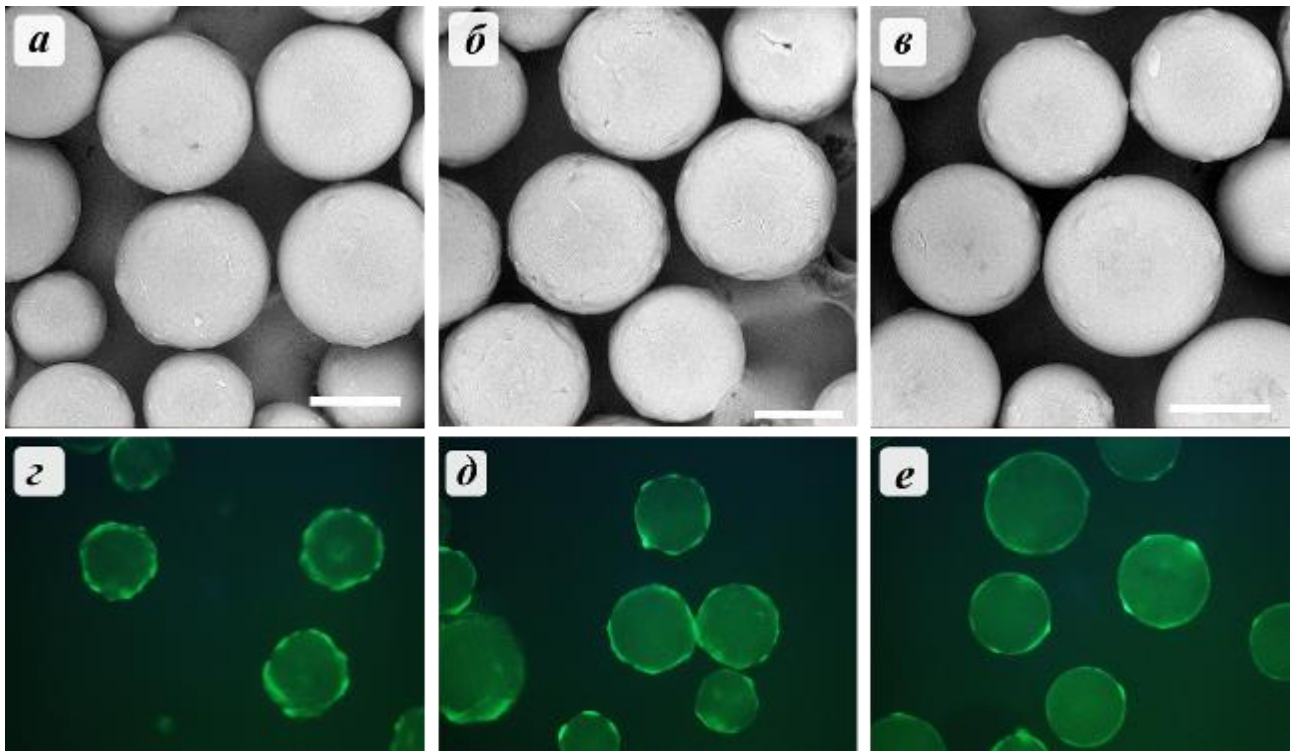


Рисунок 44 – Изображения (а, б, в) сканирующего электронного и (г, д, е) флуоресцентного микроскопов микрочастиц из поли(L,L-лактида), полученных с использованием ХЛЛ-к (а, г), ХЛЛ-т (б, д) и ХЛД-т (в, е) в качестве эмульгаторов в дисперсионной среде. Масштабная линейка 100 мкм

Таким образом, увеличение степени полимеризации (вплоть до СП ~ 10) коротких привитых на хитозан цепей олиго(L,D-лактида) приводит к увеличению выхода микрочастиц и уменьшению их среднего размера. Дальнейшее увеличение СП привитых цепей до ~ 70 не только снижает растворимость сополимеров в

водных средах, что делает их использование в дисперсионной среде менее рациональным, но и снижает способность к стабилизации границы раздела фаз.

2.2.3.1.2. Использование наночастиц хитина, хитозана и его производных в качестве эмульгаторов в дисперсионной среде

Перспективным подходом к регулированию структуры поверхности полимерных микрочастиц также является их формирование из эмульсий Пикеринга, когда стабилизация границы раздела фаз осуществляется с помощью наночастиц различной природы. В рамках диссертационной работы рассмотрена возможность получения микрочастиц из полилактида, стабилизированных наноразмерными формами хитина, хитозана и его производных. Наночастицы были получены или методом «сверху-вниз» (нанокристаллический хитин) или методом «снизу-вверх» путем контролируемого осаждения хитина или его производных.

2.2.3.1.2.1. Использование наночастиц, полученных методом «сверху-вниз»

Одним из основных методов получения наночастиц из полисахаридов методом «сверху-вниз» является выделение их нанокристаллических форм путем кислотного гидролиза аморфных областей полисахарида. В рамках настоящей работы исследовано влияние источника хитина, его химической структуры и морфологии наночастиц на их способность стабилизировать границу раздела фаз в эмульсиях масло/вода в процессе получения полимерных микрочастиц, а также оценить влияние вышеперечисленных факторов на выход, средний размер, распределение по размерам, форму и морфологию получаемых микрочастиц.

Для исследования использовали частицы нанокристаллического хитина, выделенные из хитина марок «Комбио» и «Xiamen Fine Chemical» (образец нХ-К и нХ-Х, соответственно). Нанокристаллы имеют анизометричную форму, но различаются по значениям средней длины и диаметра. Средняя длина нанокристаллов хитина составляла 181 ± 63 нм и 131 ± 94 нм; диаметр 65 ± 14 нм и 93 ± 42 для образца нХ-Х и нХ-К, соответственно. По данным ДЛС средний размер и распределение частиц нХ-Х по размерам стабильны и не зависят от их

концентрации в воде, в то время как частицы нХ-К при увеличении концентрации до 1 мас.% характеризуются более широким распределением по размерам (Рисунок 45).

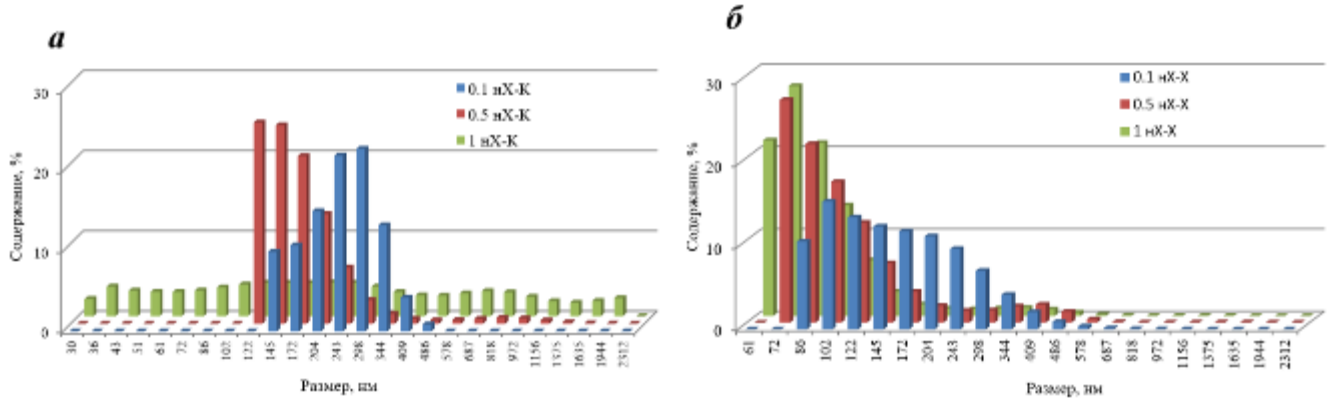


Рисунок 45 – Распределение частиц нанокристаллического хитина типа нХ-К (а) и нХ-Х (б) в водных дисперсиях с различными концентрациями

Водные дисперсии обоих типов образцов нанокристаллического хитина могут применяться в качестве эмульгатора в дисперсионной среде при получении микрочастиц из полилактида. Увеличение концентрации наночастиц в дисперсионной среде приводит к увеличению выхода микрочастиц. При небольшой концентрации наночастиц в дисперсионной среде эффективность нХ-К была выше, чем нХ-Х, но при повышении концентрации нХ-Х обеспечивал лучшую способность стабилизировать границу раздела фаз в эмульсиях, что выражается в увеличении выхода микрочастиц из полилактида и уменьшении их среднего размера (Рисунок 46). Как следует из рисунков 45 и 46, наблюдается четкая зависимость стабилизирующей способности наночастиц хитина от их среднего диаметра и однородности распределения по размеру.

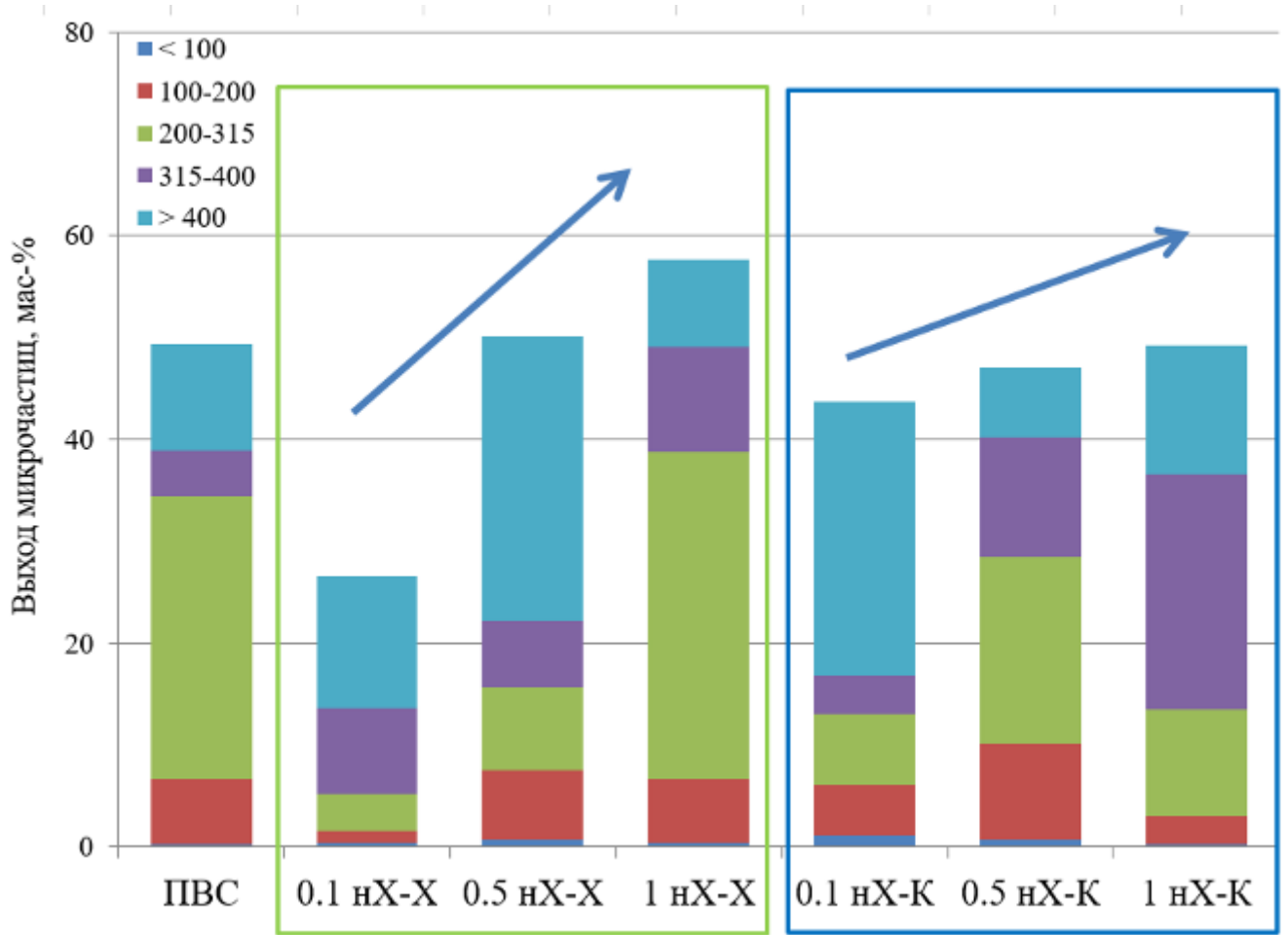


Рисунок 46 – Выход микрочастиц из полилактида и их распределение по размерам в зависимости от типа и концентрации нанокристаллического хитина в дисперсионной среде

Исследование морфологии микрочастиц, стабилизированных нанокристаллическим хитином, методом СЭМ показало, что они обладают более шероховатой поверхностью, чем при использовании растворов полимеров в дисперсионной среде (Рисунок 47). Морфология микрочастиц зависит от типа и концентрации нанокристаллического хитина. Применение дисперсий частиц обоого типа в низкой концентрации (0.1 мас.%) приводит к формированию микрочастиц сферической формы, но при увеличении концентрации микрочастицы, стабилизированные nX-K, обладают неправильной морфологией (Рисунок 47). При использовании nX-X даже при высокой концентрации форма микрочастиц остается сферической. Разница в форме микрочастиц при высокой

концентрации наночастиц в дисперсионной среде может быть связана с возможностью более анизометричных частиц нХ-Х повернуться на границе фаз, чтобы уменьшить занимаемую ими площадь в процессе испарения растворителя из дисперсной фазы. Частицы нХ-К с более низкой степенью анизометрии образуют слой на границе раздела фаз и не могут эффективно скомпенсировать уменьшение ее площади, что приводит к деформации микрочастиц. Второй причиной различий в формировании микрочастиц, стабилизированных разными типами нанокристаллического хитина, может быть однородность распределения по размерам наночастиц в исследуемом диапазоне концентраций (Рисунок 45).

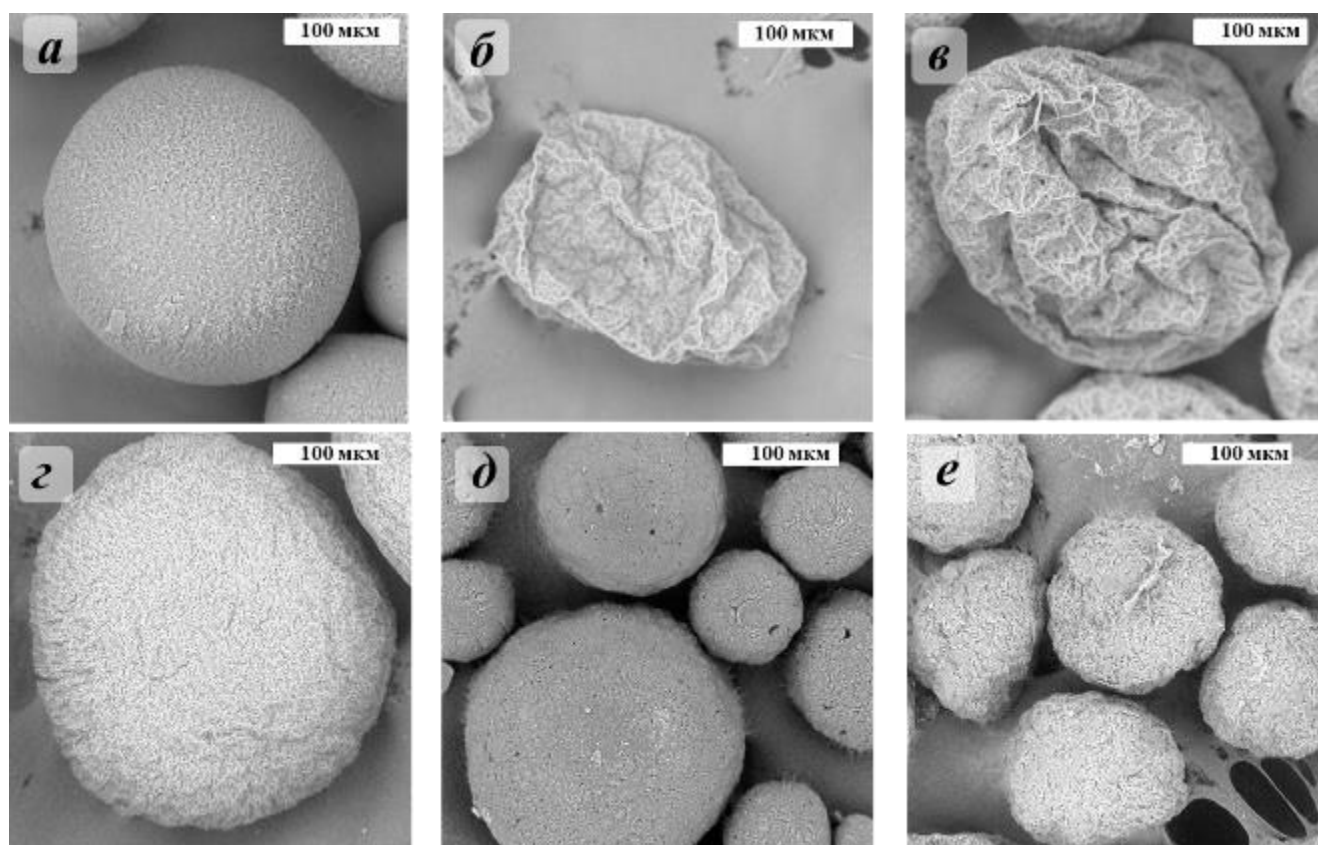


Рисунок 47 – Изображения СЭМ микрочастиц полилактида, полученных с использованием 0.1 (а,г), 0.5 (б,д), 1 мас.% (в,е) дисперсий частиц нХ-К (а, б, в) или нХ-Х (г, д, е) в дисперсионной среде

Таким образом, наноразмерные формы хитина являются перспективным типом эмульгаторов для стабилизации границы раздела фаз масло/вода в процессе

получения микрочастиц. Такой подход позволяет, во-первых, сформировать микрочастицы со структурой ядро/оболочка, а во-вторых, регулировать морфологию микрочастиц путем оптимизации характеристик наночастиц, используемых для их стабилизации.

2.2.3.1.2.2. Использование наночастиц, полученных методом «снизу-вверх»

Наночастицы из полисахаридов также можно получать различными методами «снизу-вверх», но в случае поликатиона хитозана самым простым из них является контролируемое осаждение за счет повышения рН. Возможность регулировать химическую структуру хитозана обеспечивает возможность также контролировать свойства получаемых наночастиц. В работе исследовали возможность получения наночастиц из немодифицированного хитозана Х-60 и его N-ацилированных гидроксикарбоновой кислотой производных (образцы ХК-1 и ХК-2), а также на их способность стабилизировать границу раздела фаз в процессе получения микрочастиц из полилактида, в том числе в сравнении с эффективностью этих производных в виде растворов.

При использовании растворов хитозана Х-60 и его ацилированных производных ХК-1 ($CЗ = 0.18$) и ХК-2 ($CЗ = 0.43$) в качестве эмульгаторов в дисперсионной среде выход микрочастиц увеличивается при увеличении степени замещения аминогрупп хитозана (Рисунок 48). Такой результат, вероятно, связан со смещением гидрофильно-гидрофобного баланса макромолекул из-за уменьшения количества первичных аминогрупп, обеспечивающих хитозану растворимость в подкисленных водных средах. Этот же хитозан и производные при переводе в форму наночастиц за счет повышения рН среды до 6.5 и УЗ-воздействия образуют опалесцирующие растворы, которые также эффективны в качестве эмульгаторов в дисперсионной среде. При этом, в случае немодифицированного хитозана Х-60 и его ацилированного производного с наименьшей $CЗ$ (образец ХК-1), эмульгирующая способность выше при использовании их в форме наночастиц. В случае образца ХК-2 выход микрочастиц выше при использовании его в виде раствора.

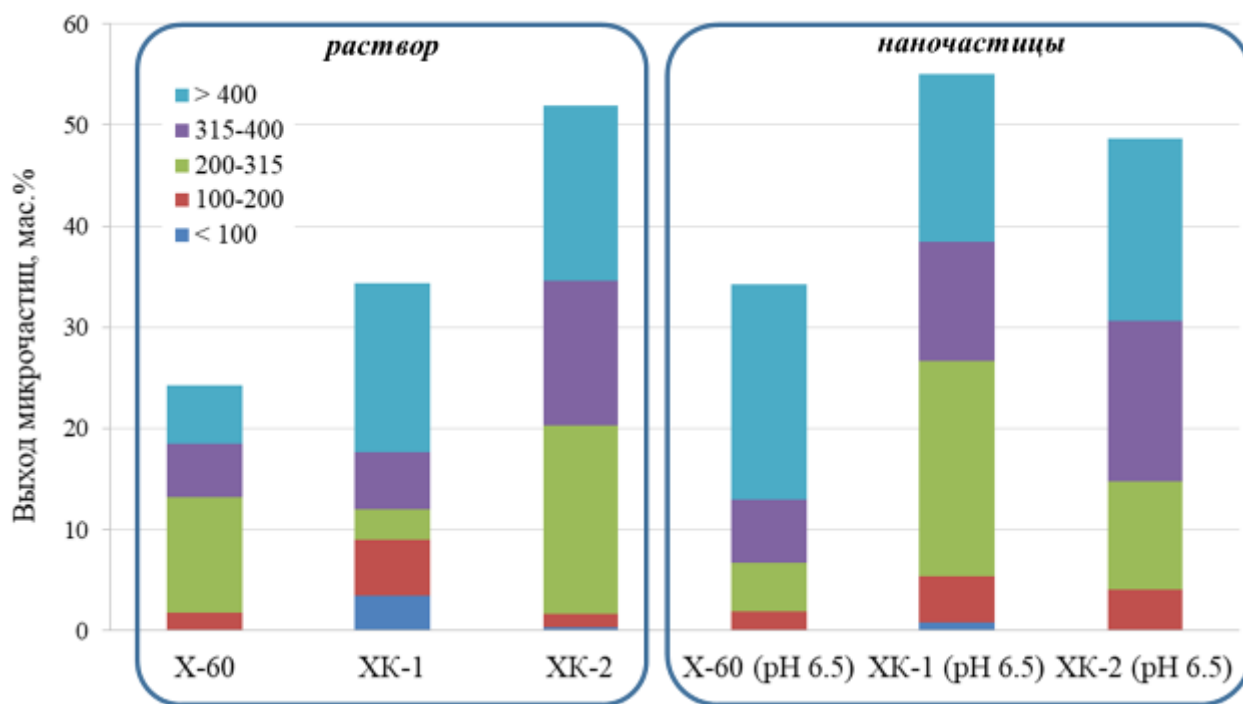


Рисунок 48 – Выход микрочастиц и их распределение по размерам в зависимости от типа полимера и его формы (раствор или наночастицы), используемого в дисперсионной среде

В литературе уже описано применение наночастиц хитозана, полученных его контролируемым осаждением, для стабилизации эмульсий масло/вода, в т.ч. в процессе формирования полимерных микрочастиц методом испарения растворителя из эмульсий [19,255,256]. Работ по применению наночастиц из производных хитозана в литературе не найдено. Высокая эффективность наночастиц из немодифицированного хитозана и его производного с низкой СЗ вероятно связана с традиционно большей эффективностью эмульсий Пикеринга [249]. Снижение способности к стабилизации границы раздела фаз в случае XK-2 в форме наночастиц, возможно, связано с относительно большими размерами формируемых наночастиц из-за большого количества стерически затрудненных заместителей. Согласно данным ДЛС средний размер макромолекулярных ассоциатов (наночастиц), образующихся в случае контролируемого осаждения XK-2, составляет 500 нм, но варьируется в широких пределах до субмикронного размера. Для немодифицированного хитозана средний размер получаемых

наночастиц составляет 200 нм. На способность хитозана и его производных в форме наночастиц стабилизировать границу раздела фаз помимо размера и однородности распределения по размерам могут влиять и другие факторы, что требует отдельных исследований.

Исследование морфологии микрочастиц, стабилизированных хитозаном Х-60 в форме раствора или наночастиц, показало, что микрочастицы имеют сферическую форму, но при использовании наночастиц хитозана их морфология более неоднородная (Рисунок 49). Как и в случае применения в дисперсионной среде другого типа наночастиц – нанокристаллического хитина – граница раздела фаз (поверхность микрочастиц) формируется еще на стадии эмульсии и в процессе испарения растворителя, сопровождающегося уменьшением площади раздела фаз, наблюдается формирование более развитой поверхности. В случае получения микрочастиц из эмульсий Пикеринга граница раздела фаз образована относительно жестким слоем наночастиц, менее склонным к «перестройке».

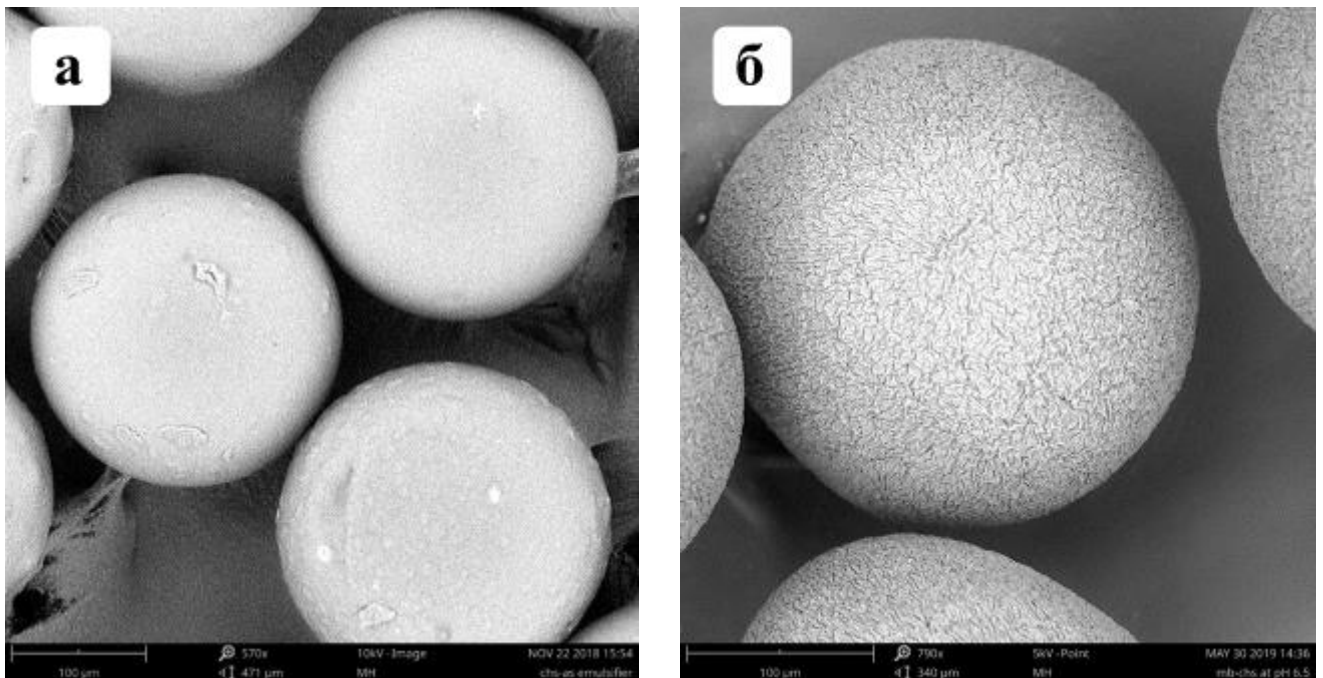


Рисунок 49 – Электронные микрофотографии поверхности микрочастиц полилактида, полученных с использованием Х-60 в форме раствора (а) или наночастиц (б) в качестве эмульгатора в дисперсионной среде

Таким образом, суммируя результаты настоящего раздела, посвященного получению микрочастиц из эмульсий Пикеринга, стабилизированных наноразмерными формами полисахарида, можно сделать выводы: (1) наночастицы из полисахаридов вне зависимости от метода их получения («снизу-вверх» или «сверху-вниз») являются эффективными стабилизаторами границы раздела фаз при получении полимерных микрочастиц методом испарения растворителя из эмульсий; (2) на характеристики получаемых полимерных микрочастиц значительно влияют различные параметры наночастиц полисахарида (степень анизотропии, размер, однородность распределения и т.д.), которые в свою очередь зависят не только от метода получения, но и от химической структуры самого полисахарида.

2.2.3.2. Модифицирование состава дисперсной фазы

Прививка на хитозан гидрофобных фрагментов олиго/полиэфиров обеспечивает им сродство к хлорсодержащим растворителям и позволяет использовать их в качестве компонента дисперсной фазы при получении микрочастиц. В диссертационной работе исследовано влияние введения в дисперсную фазу трех серий сополимеров хитозана с олиго/полиэфирами, различающихся длиной привитых цепей: (1) серия ХЛ – продукты полимеризации L,D-лактида с раскрытием цикла в присутствии хитозана, которая приводит к формированию привитых на хитозан цепей с СП ≤ 10 ; (2) серия ХЛЛ/ХЛД – сополимеры хитозана с олиголактидами с СП ≤ 70 ; (3) прививка на хитозан сложных полиэфиров с СП ≤ 2000 .

2.2.3.2.1. Получение сферических микрочастиц с использованием сополимеров хитозана с короткими цепями олиго(L,D-лактида) в дисперсной фазе

Сохранение способности сополимеров хитозана с короткими привитыми цепями олиголактида (образцы серии ХЛ) растворяться в водных средах не

мешает им обладать достаточным сродством к хлорсодержащим растворителям, чтобы набухать в них, поэтому в работе была оценена возможность их применения в качестве «стабилизирующего допанта» в дисперсной фазе. Фактически, этот подход представляет собой введение эмульгатора не со стороны непрерывной дисперсионной среды, а со стороны дискретной. В таком случае, в качестве дисперсионной «водной» среды использовали бидистиллят без добавления каких-либо эмульгаторов.

На рисунке 50 представлена гистограмма выхода композиционных микрочастиц, полученных при использовании в дисперсной фазе 30 мас.% сополимера серии ХЛ (или немодифицированного хитозана) и 70 мас.% гомополимера поли(L,D-лактида). Как видно из приведенных данных, этот подход также позволяет получить микрочастицы с выходом, сопоставимым с выходом микрочастиц, сформированных по классической технологии (82 мас.%). Увеличение СП привитых на хитозан цепей олиголактида так же увеличивает способность к стабилизации микрочастиц. Выход микрочастиц составлял 22, 48 и 80 мас.% для образцов ХЛ-1, ХЛ-2 и ХЛ-3, соответственно. Вместе с повышением выхода микрочастиц уменьшается их средний размер, что также говорит об увеличении способности сополимеров стабилизировать микрочастицы в процессе их формирования. Также была реализована попытка использования в качестве «внутреннего» эмульгатора немодифицированного хитозана, которая удалась только при закислении дисперсионной среды, то есть использовании 2% уксусной кислоты.

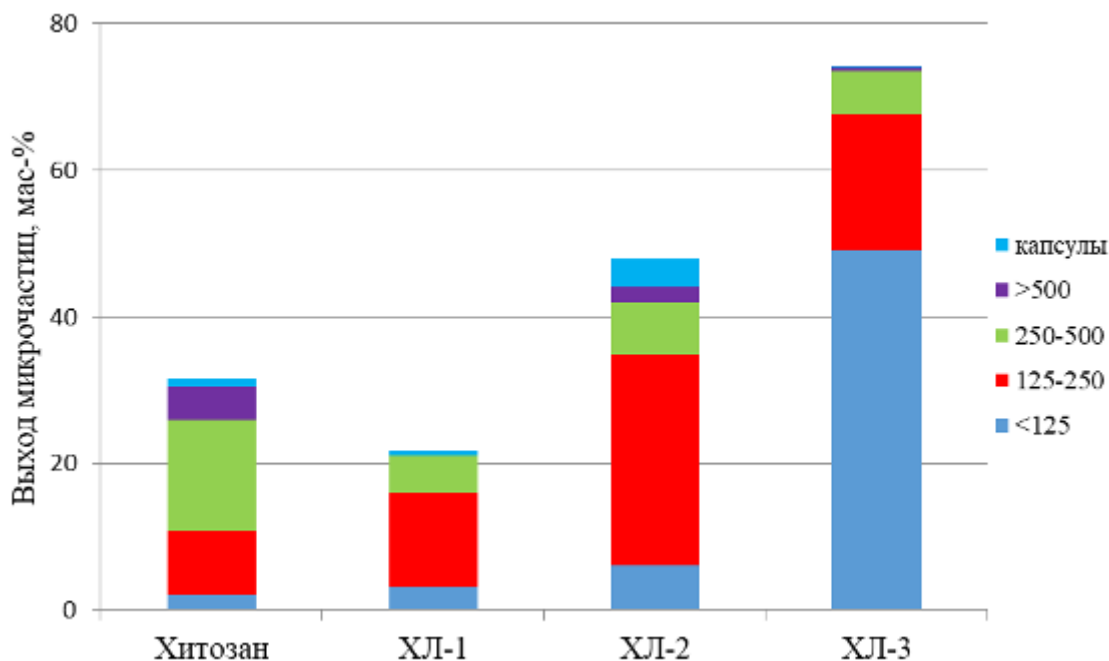


Рисунок 50 – Выход микрочастиц и их распределение по размерам в зависимости от образца ХЛ, используемого в дисперсной фазе

Введение сополимеров в дисперсную фазу, также как и в случае их использования в качестве эмульгатора в дисперсионной среде, приводит к получению микрочастиц с гладкой поверхностью, но при использовании немодифицированного хитозана микрочастицы хоть и обладают сферической формой, но их поверхность становится неоднородной (Рисунок 51). Исследование внутренней морфологии микрочастиц, полученных при введении сополимеров в дисперсную фазу, показало пористую внутреннюю структуру микрочастиц.

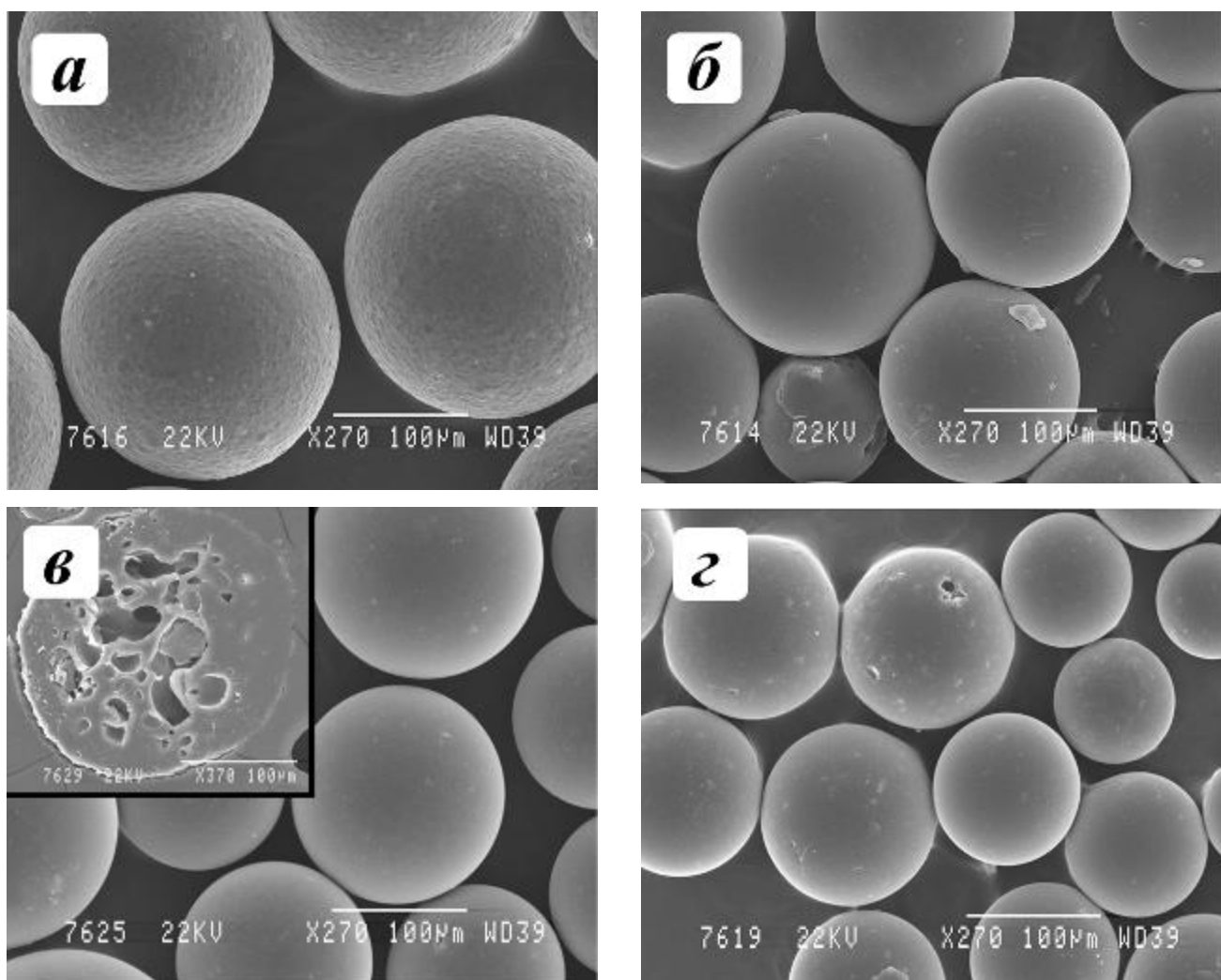


Рисунок 51 – Микрофотографии микрочастиц, полученных введением немодифицированного хитозана (а), ХЛ-1 (б), ХЛ-2 (в) и ХЛ-3 (г) в дисперсную фазу

Таким образом, сополимеры хитозана с короткими привитыми цепями олиго(L,D-лактида) при введении в дисперсную фазу обеспечивают возможность получения «самостабилизирующихся» микрочастиц без применения какого-либо эмульгатора в дисперсионной среде. Увеличение длины привитой цепи приводит к увеличению общего выхода микрочастиц и снижению их среднего размера, что говорит о повышении способности сополимеров к стабилизации границы раздела фаз. Полученные микрочастицы имеют сферическую форму с гладкой морфологией поверхности и внутренней пористостью по типу «матрица/включения».

2.2.3.2.2. Получение сферических микрочастиц с использованием сополимеров хитозана со средней длиной привитых цепей олиго(L,L-/L,D-лактида) в дисперсной фазе

Благодаря наличию достаточно длинных гидрофобных фрагментов сополимеры серии ХЛЛ/ХЛД обладают способностью образовывать стабильные субмикронные дисперсии в дисперсной фазе, но их растворимость в водных средах низкая (42-59.7 мас.% в CH_3COOH), что существенно снижает целесообразность их применения в качестве эмульгаторов в дисперсионной среде. Соответственно, более логичным представляется их использование в качестве компонентов дисперсной фазы. В этом случае достаточно высокая степень полимеризации гидрофобных фрагментов обеспечивает возможность применения этих сополимеров в качестве основного полимера дисперсной фазы, а не «стабилизирующего допанта» как это было в случае сополимеров с короткими привитыми фрагментами. В рамках диссертации была оценена возможность получения микрочастиц, состоящих как из сополимеров, так и смесей сополимер/гомополимер; в обоих случаях в качестве дисперсионной среды использовали бидистиллят.

Выход микрочастиц, состоящих только из сополимеров в дисперсной фазе, варьируется в диапазоне 39-52 мас.% и существенно зависит от состава сополимеров (реакционной смеси): наименьший выход характерен для образца из сополимера с минимальной степенью прививки (ХЛЛ-к); использование сополимеров, содержащих фрагменты аморфного олиго(L,D-лактида), приводит к получению микрочастиц с большим выходом, чем при использовании образцов, содержащих олиго(L,L-лактид) (Рисунок 52).

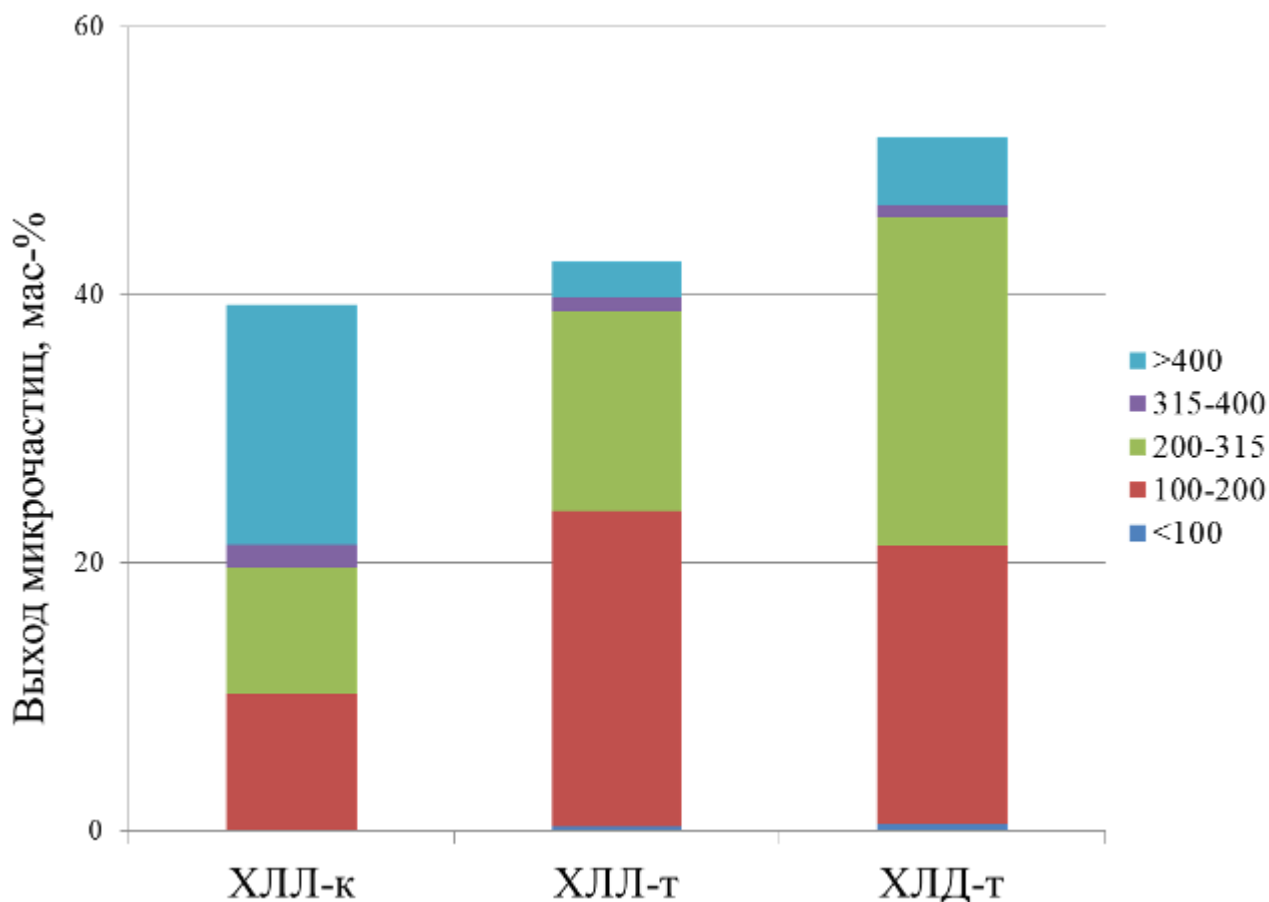


Рисунок 52 – Выход микрочастиц и их распределение по размерам в зависимости от образца ХЛЛ/ХЛД, используемого в дисперсной фазе

Второй подход к использованию сополимеров со средней длиной привитых цепей в дисперсной «масляной» фазе основан на получении композиционных микрочастиц, содержащих сополимеры и гомополимеры поли(L,D-лактида). На рисунке 53 приведена гистограмма выхода композиционных микрочастиц и их распределения по размерам в зависимости от типа введенного сополимера, которая показывает, что выход микрочастиц достигает 52-70 мас.%, что превышает выход, наблюдаемый для микрочастиц из сополимеров. Максимальный выход характерен для образца, содержащего сополимер с привитыми цепями олиго(L,D-лактида), в то время как прививка на хитозан аморфно-кристаллических фрагментов приводит к значительно меньшему выходу микрочастиц (52-59 мас.%). Средний размер микрочастиц, полученных с использованием образца ХЛД-т также меньше, чем для образцов, содержащих

сополимеры с аморфно-кристаллическими цепями. Сравнение выхода микрочастиц, полученных с использованием сополимеров ХЛЛ-к и ХЛЛ-т, которые в основном различаются ММ основной цепи, показало, что их способность стабилизировать микрочастицы практически одинаковая. Во всех случаях наблюдалось активное формирование полых «капсул» с размером 1-1.5 мкм.

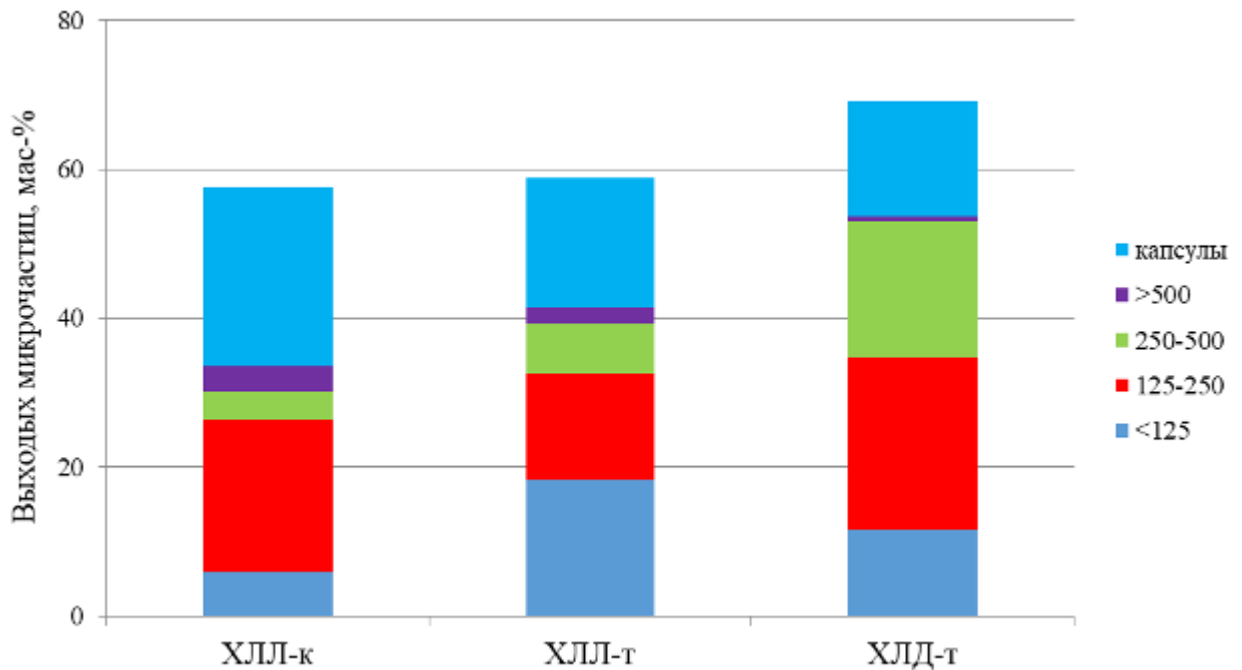


Рисунок 53 – Выход композиционных микрочастиц, содержащих 30 мас.% сополимеров и 70 мас.% поли(L,D-лактида), и их распределение по размерам

Влияние типа гомополимера (поли(L,L-лактид), поли(L,D-лактид), олиго(L,L-лактид), поли(L,D-лактид)) в составе композиционных микрочастиц, содержащих 30 мас.% ХЛД-т и 70 мас.% олиго/полиэфира, на выход и распределение полученных микрочастиц представлены на рисунке 54. Наибольший выход микрочастиц (69 мас.%) был получен при использовании в дисперсной фазе поли(L,D-лактида). Выход микрочастиц уменьшался в ряду олиго/полигомополимеров: поли(L,D-лактид) > поли(L,L-лактид) > олиго(L,D-лактид) > олиго(L,L-лактид). Эту зависимость можно объяснить двумя основными факторами:

- лучшей совместимостью между привитыми на хитозан цепями олиго(L,D-лактида) и макромолекулами поли(L,D-лактида);
- лучшим фазовым разделением между дисперсионной средой и дисперсной фазой при увеличении ММ гомополимера.

Последний фактор также объясняет активное формирование «капсул», т.к. при увеличении времени стабилизации и отверждения дисперсной фазы увеличивается вероятность протекания побочных физико-химических процессов, в том числе агрегирование, коалесценция или пенообразование.

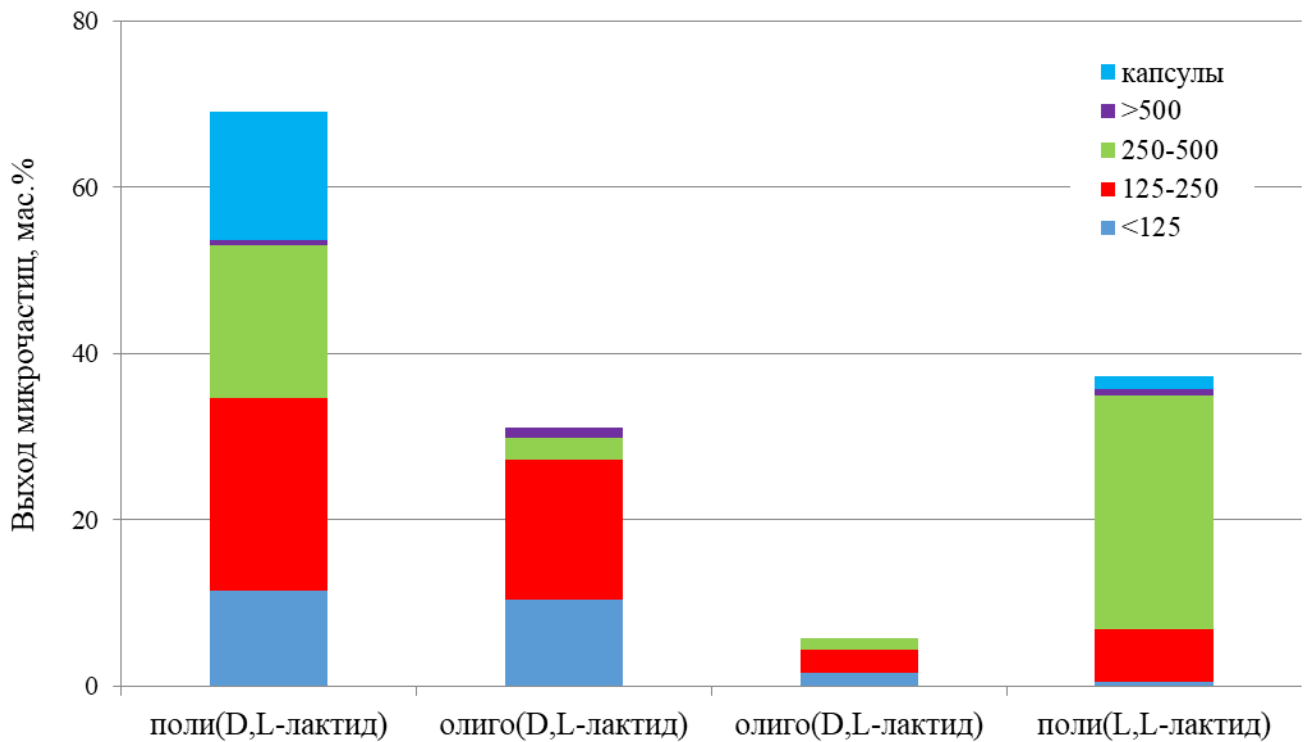


Рисунок 54 – Выход и распределение по размерам микрочастиц, содержащих в дисперсной фазе 30 мас.% ХЛД-т и 70 мас.% олиго/полиэфира

Исследование морфологии микрочастиц методом СЭМ показало, что при их формировании из сополимеров серии ХЛЛ/ХЛД микрочастицы имеют пористую структуру (размер пор более 10 мкм) (Рисунок 55). При получении композиционных микрочастиц, содержащих 30 мас.% ХЛД-т и 70 мас.% поли(L,D-лактида), их поверхность не имеет открытых пор, но наблюдаются

неоднородности микронного уровня. При использовании другого типа сополимера (ХЛЛ-к) на поверхности присутствуют поры, что может быть связано с более низкой совместимостью привитых фрагментов олиго(L,L-лактида) и поли(L,D-лактида) в дисперсной фазе, а также их способностью к кристаллизации.

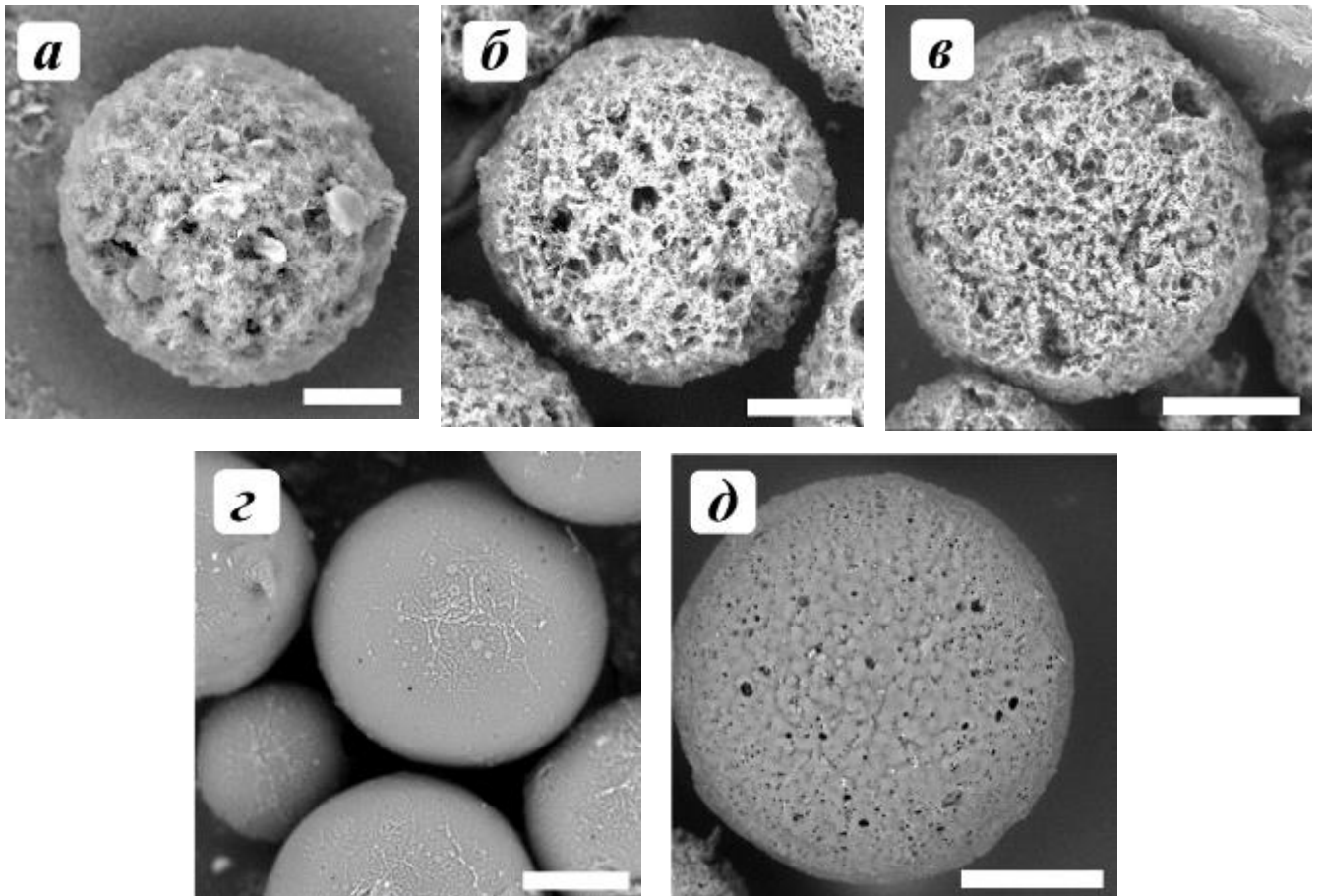


Рисунок 55 – Электронные микрофотографии микрочастиц, полученных из ХЛД-т (а), ХЛЛ-т (б) и ХЛЛ-к (в) в дисперсионной среде; композиционных микрочастиц, состоящих из 70 мас.% поли(L,D-лактида) и ХЛД-т (г) или ХЛЛ-к (д) в дисперсной фазе. Масштабная линейка 50 мкм

Таким образом, использование сополимеров хитозана со средней длиной привитых цепей олиголактида в дисперсной фазе также позволяет получать микрочастицы с достаточно высоким выходом и является более предпочтительным, чем применение этих сополимеров в качестве эмульгаторов в

дисперсионной среде. Для микрочастиц, полученных из сополимеров или смесей полилактида с сополимерами серии ХЛЛ/ХЛД в дисперсной фазе, характерна пористая структура. Возможность регулировать морфологию поверхности как с помощью подбора состава дисперсной фазы, так и оптимизации химической структуры сополимеров, является очень перспективным подходом с точки зрения контроля над адгезией и ростом клеток как на начальной стадии, так и в процессе деградации полимера. Более того, возможность регулировать пористость материалов позволит контролировать скорость их деградации.

2.2.3.2.3. Получение сферических микрочастиц с использованием сополимеров хитозана с высокомолекулярными полиэфирами

Учитывая высокую гидрофобность сополимеров хитозана с полиэфирами, их использовали только для введения в дисперсную фазу. Как видно из рисунка 56, при введении 30 мас.% сополимеров в дисперсную фазу только часть образцов оказалась способна эффективно стабилизировать микрочастицы в процессе формования. Введение сополимеров на основе хитозана и аморфно-кристаллического полилактида (образцы ХП-40/60, ХП-60/40) привело к получению микрочастиц с общим выходом < 10%, в то время как сополимеры, содержащие привитые цепи ПЛГА (образец ХПГ) и дополнительно модифицированный желатином образец (ХП-Ж), позволили стабилизировать до 75% полимеров, введенных в дисперсную фазу. Средний размер микрочастиц и их распределение по размерам во всех случаях были выше, чем при получении микрочастиц с использованием ПВС в дисперсионной среде. Также, в случае использования ХП-Ж и ХПГ наблюдалось формирование полых «капсул».

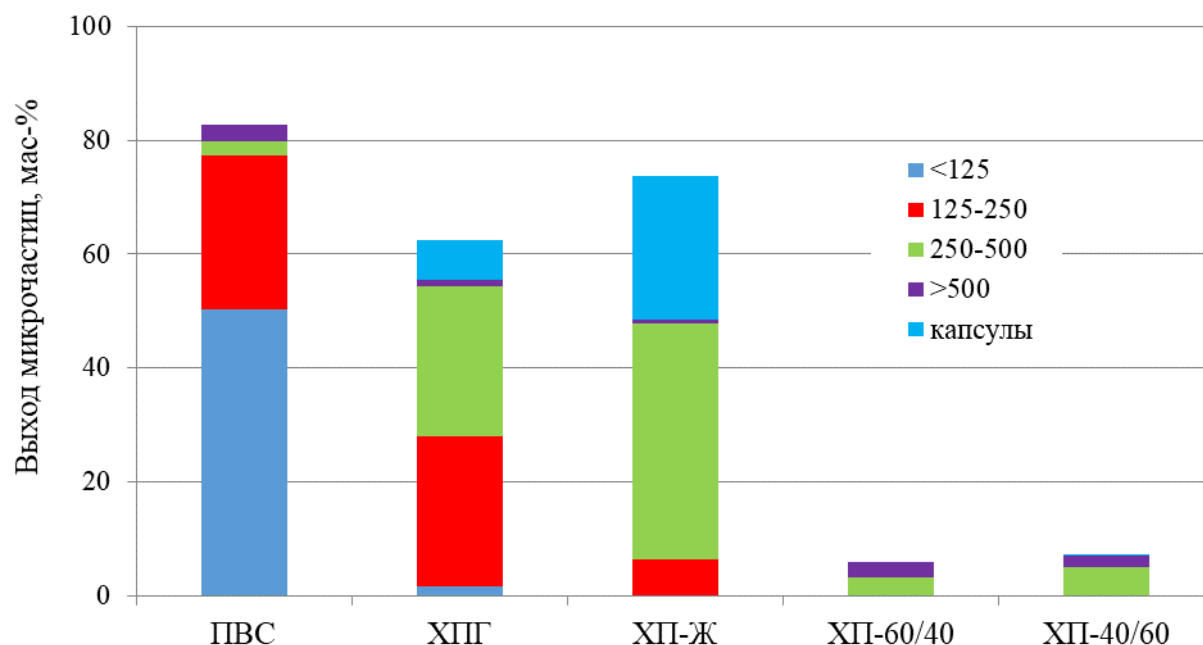


Рисунок 56 – Выход микрочастиц и их распределение по размерам в зависимости от образца сополимера хитозана с полиэфирами, используемого в дисперсной фазе

Исследование влияния содержания сополимера в дисперсной фазе показало, что увеличение содержания ХПГ в дисперсной фазе приводит к увеличению выхода микрочастиц и снижению их среднего размера за исключением 100% замены полилактида на сополимер (Рисунок 57). Похожая тенденция наблюдается и в случае использования в фазе органического растворителя сополимера ХП-Ж.

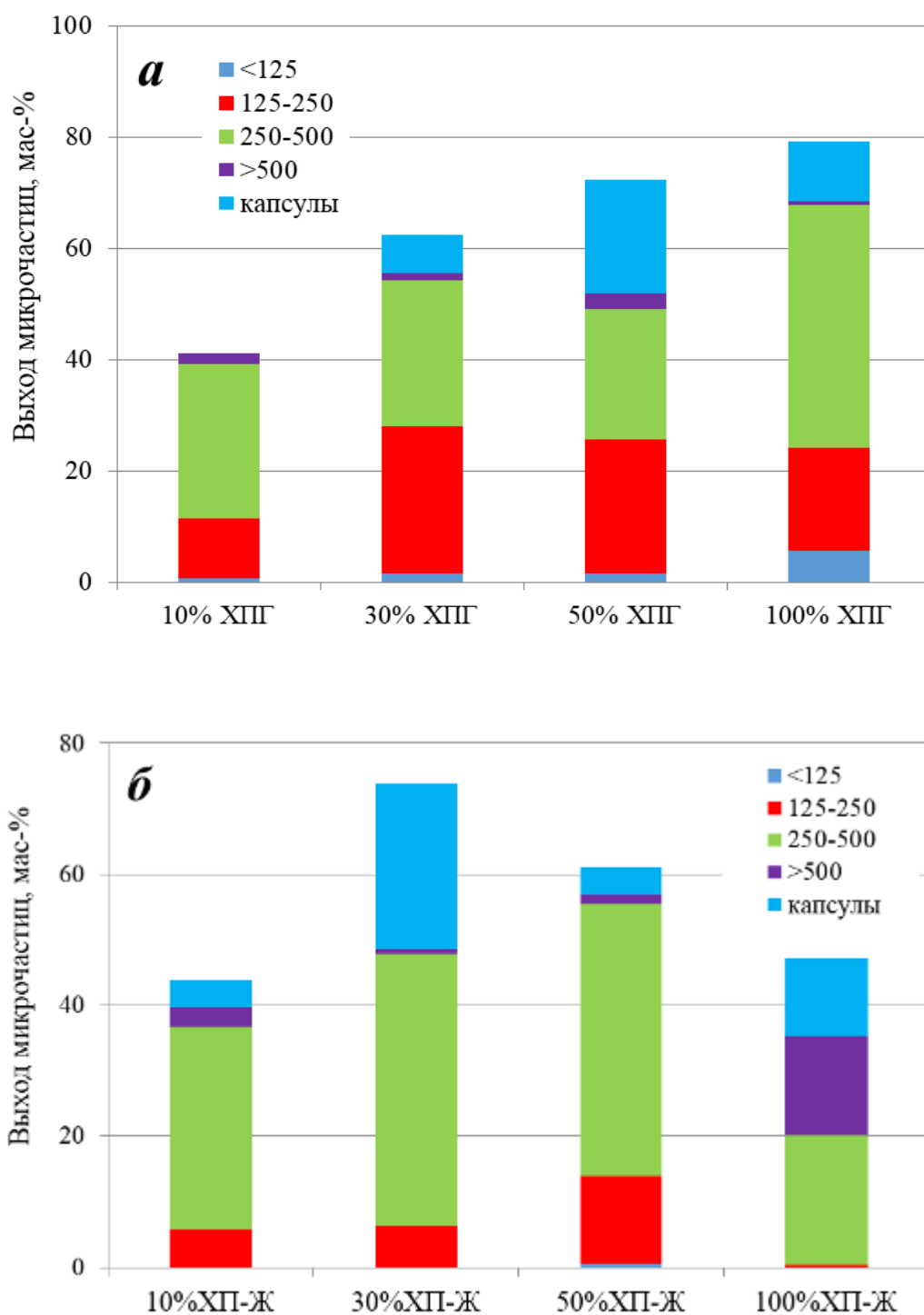


Рисунок 57 – Выход микрочастиц и их распределение по размерам в зависимости от содержания ХПГ (а) и ХП-Ж (б) в дисперсной фазе

Исследование влияния содержания и типа сополимера в дисперсной фазе на морфологию поверхности микрочастиц показало, что увеличение содержания сополимера приводит к получению микрочастиц с неоднородной поверхностью (Рисунок 58). Микрочастицы, содержащие 10% сополимера, обладают гладкой и практически бездефектной поверхностью, тогда как микрочастицы, состоящие только из сополимеров, представляют собой микрочастицы неправильной формы с неоднородной поверхностью. Таким образом, 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 достаточно однородную морфологию поверхности, для них характерна пористая внутренняя структура, состоящая из полого «ядра» и пористой «оболочки».

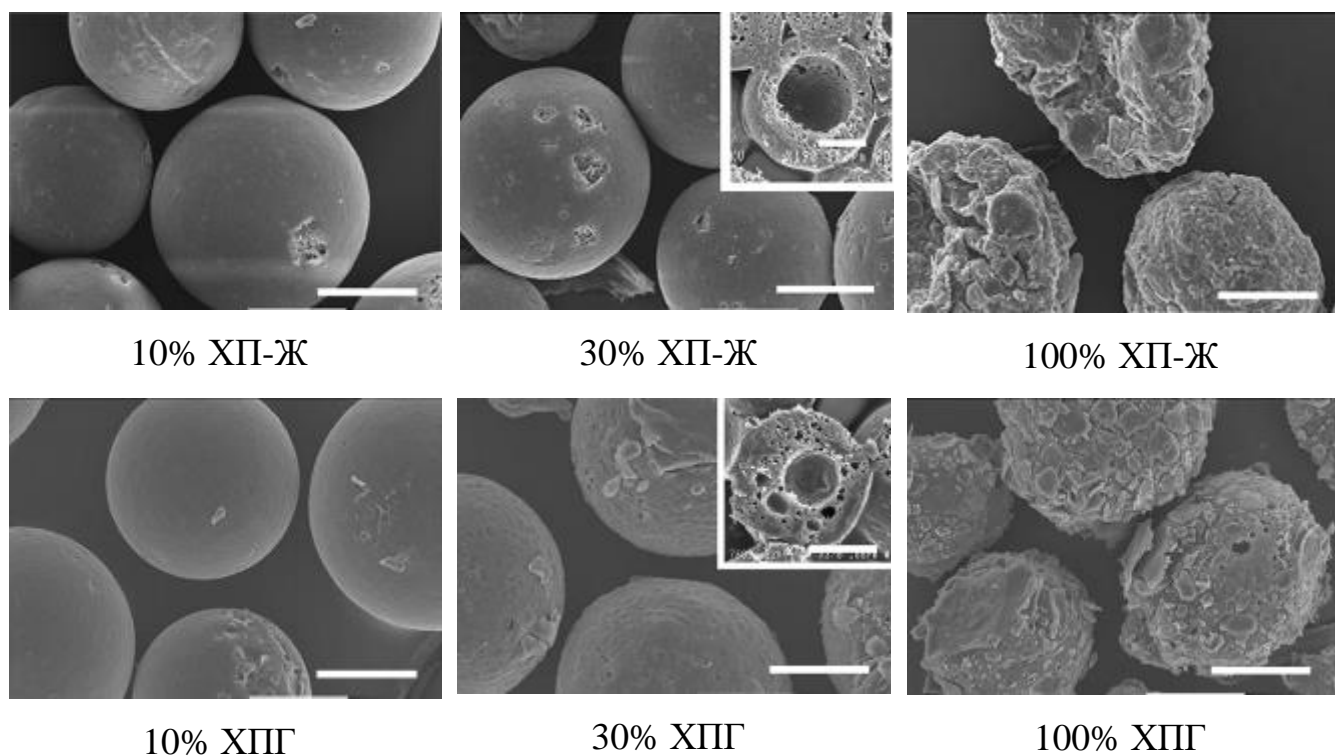


Рисунок 58 – Электронные микрофотографии поверхности композиционных микрочастиц, содержащих разное количество ХП-Ж и ХПГ в дисперсной фазе

Цитосовместимость композиционных микрочастиц, содержащих 30 мас.% ХП-Ж или ХПГ и 70 мас.% поли(L,D-лактида), оценивали *in vitro* в ходе

культивирования клеток фибробластов мышцы L929, которые используют в качестве модельной линии при оценке медицинских изделий согласно ISO10093. В качестве системы сравнения использовали микрочастицы из поли(L,D-лактида), полученные с применением раствора ПВС в качестве дисперсионной среды. Оптическая микроскопия клеток в ходе их культивирования на микрочастицах в течение недели не выявила существенных различий в зависимости от типа микрочастиц. Для оценки жизнеспособности клеток после 3-х дней культивирования использовали флуоресцентные красители Calcein AM и DAPI, которые селективны по отношению к живым клеткам и ядрам, соответственно. Как видно из рисунка клетки прикрепляются и распластываются на поверхности всех трех типов микрочастиц, а эмиссия от Calcein AM подтверждает жизнеспособность клеток (Рисунок 59).

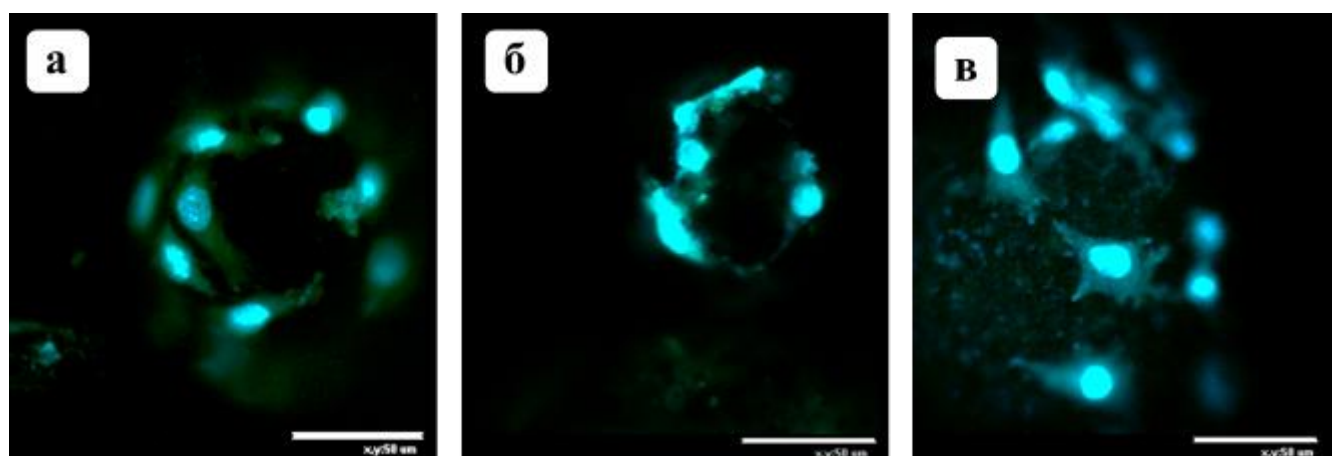


Рисунок 59 – Конфокальная микроскопия клеток фибробластов мышцы L929 после 3-х дней культивирования на микрочастицах из поли(L,D-лактида) (а) и композиционных микрочастицах, содержащих 30 мас.% ХПГ (б) или ХП-Ж (в). Живые клетки помечены флуоресцентным красителем Calcein AM, а ядра клеток – DAPI

Таким образом, подводя итоги по использованию производных/сополимеров хитозана, в том числе в форме наночастиц, для получения биodeградируемых микрочастиц методом испарения растворителя из

эмульсий масло/вода можно отметить высокий выход микрочастиц и возможность регулирования их структуры поверхности и объема. В зависимости от метода введения, макромолекулярных характеристик сополимеров и их содержания можно получать микрочастицы с различной морфологией объема и поверхности. Благодаря амфифильным свойствам сополимеров хитозана с олиго/полиэфирами и их способности образовывать стабильные дисперсии в CH_2Cl_2 /ацетон, их можно вводить в дисперсную фазу и получать «самостабилизирующиеся» микрочастицы без применения какого-либо эмульгатора в дисперсионной среде с сохранением выхода микрочастиц, сопоставимого с выходом, получаемым с применением ПВС в качестве эмульгатора. Предварительные *in vitro* исследования микрочастиц, содержащих синтезированные сополимеры, показали их цитосовместимость и способность поддерживать адгезию и рост клеток.

2.2.3.3. Особенности формирования микрочастиц с использованием сополимеров хитозана с олиго/полиэфирами

Формирование микрочастиц на основе сополимеров отличается от того, что наблюдается при получении микрочастиц с использованием ПВС в качестве эмульгатора. Получение микрочастиц методом испарения растворителя из эмульсий масло/вода основано на трансформации эмульсии (жидкость-в-жидкости) в суспензию (твердое-в-жидком) за счет испарения растворителя из дисперсной фазы. При этом реальное время жизни границы раздела фаз жидкость/жидкость очень недолгое, но определяет возможность получения микрочастиц. При неспособности системы образовать устойчивую границу в течение нескольких минут (как правило, не более 5 мин), начинается коалесценция.

При использовании эффективного эмульгатора в дисперсионной среде формирование устойчивой границы раздела фаз завершается очень быстро, а дальше идет процесс испарения органического растворителя из дисперсной фазы, который приводит к получению суспензии твердых микрочастиц в дисперсионной

среде. Соответственно, основные характеристики микрочастиц задаются в первые несколько секунд/минут после введения дисперсной фазы. В классическом случае размер микрочастиц можно задавать, варьируя температуру, скорость перемешивания, природу растворителей в дисперсионной среде и дисперсной фазе, ММ и тип полимера в дисперсной фазе.

Исследование процесса получения микрочастиц при использовании сополимеров серии ХЛ в качестве эмульгатора в дисперсионной среде показало, что граница раздела фаз полностью формируется в течение нескольких первых минут; оптическая микроскопия проб не выявила никаких отличий от классической схемы протекания процесса формирования микрочастиц. Как видно из микрофотографий проб, взятых через 5 минут после введения дисперсной фазы, система, содержащая ХЛ-3 в качестве эмульгатора, является самой эффективной с точки зрения создания поверхности формирующихся микрочастиц: их больше и они меньше по размеру (Рисунок 60), что отражается в выходе и распределении по размеру получаемых в результате микрочастиц (Рисунок 41). После завершения процесса испарения растворителя (CH_2Cl_2 /ацетон) из дисперсной фазы часть полимера агрегирует на мешальниках, но большая часть представляет собой суспензию микрочастиц. Оптическая микроскопия проб также показывает, что дисперсная фаза практически не содержит включений, то есть полученные микрочастицы в основном будут монолитными.

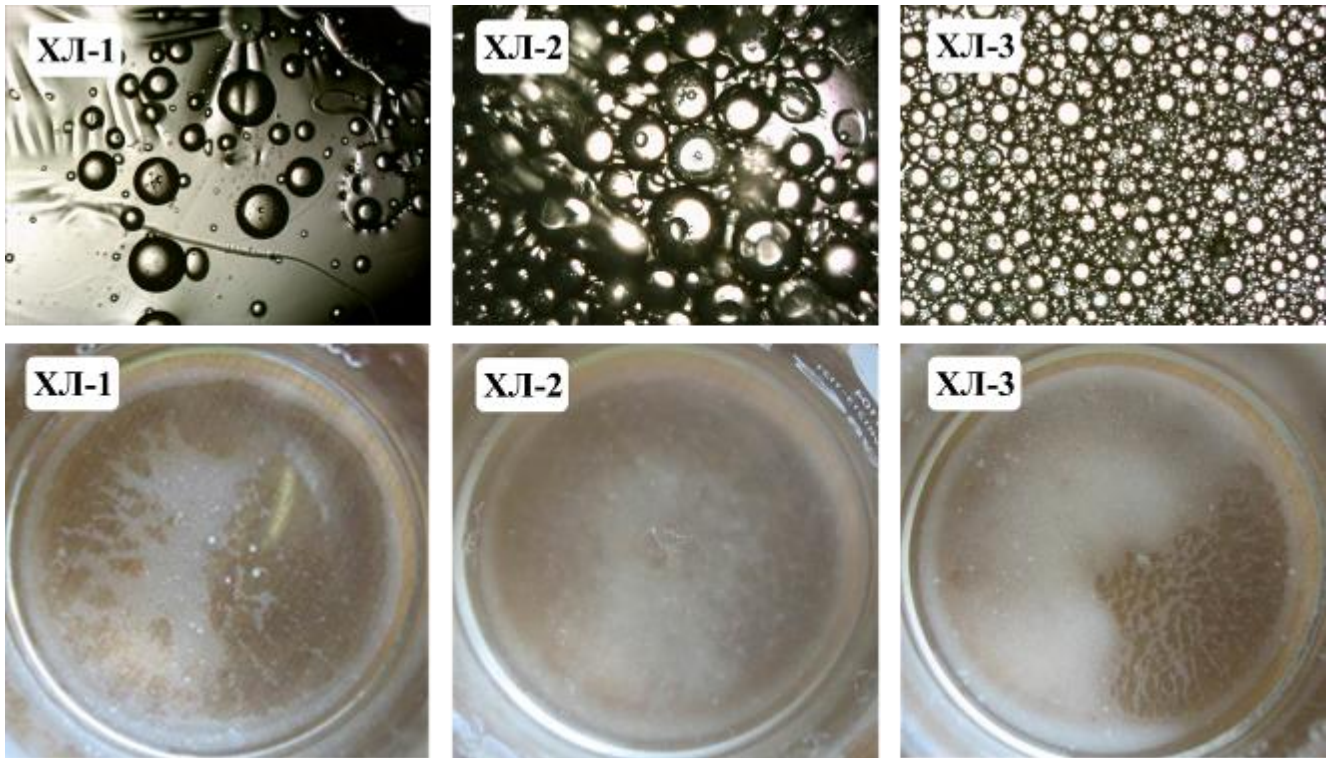


Рисунок 60 – Получение микрочастиц при использовании растворов сополимеров серии ХЛ в качестве дисперсионной среды: оптическая микроскопия проб, взятых через 5 минут после введения дисперсной фазы (верхний ряд); фотография микрочастиц в конце процесса их получения (нижний ряд). Масштабная линейка 500 мкм

Оптическая микроскопия пробы взятой через 5 минут после введения дисперсной фазы и содержащей 30 мас.% сополимера серии ХЛ, показывает, что микрочастицы содержат большое количество включений (вероятно, воздух), которые остаются иммобилизованными на протяжении всего процесса формирования микрочастиц и определяют их внутреннюю пористую морфологию, которая видна на СЭМ микрофотографиях уже готовых микрочастиц (ср. Рисунок 51 и Рисунок 61).

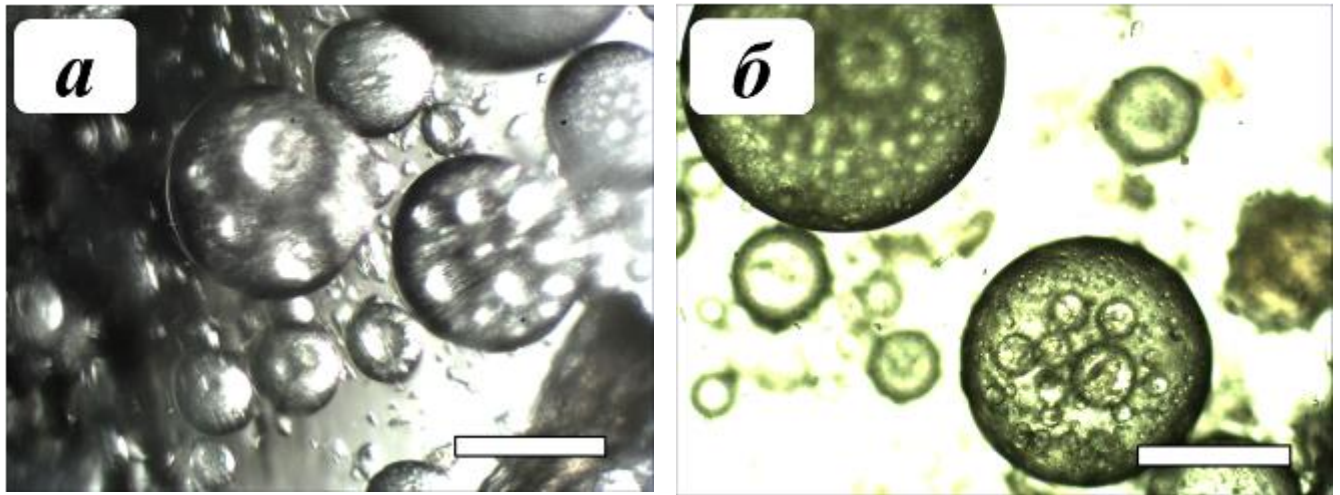


Рисунок 61 – Микрофотография проб, взятых через 5 (а) и 15 (б) минут после введения дисперсной фазы, содержащей 30 мас.% ХЛ-1 и 70 мас.% полилактида.

Масштабная линейка 500 мкм

Способность сополимеров ХЛ стабилизировать границу раздела фаз при введении в дисперсную «масляную» фазу, скорее всего, является суперпозицией вклада двух процессов. Во-первых, часть сополимера ХЛ растворяется в дисперсионной среде и впоследствии работает как эмульгатор. Именно частичное растворение полимера, содержащегося в дисперсной фазе, в дисперсионной среде в основном определяет возможность получения микрочастиц при введении немодифицированного хитозана в дисперсную фазу. Если в качестве фазы водного растворителя использовать бидистиллят, то хитозан не может в ней раствориться и, соответственно, работать как эмульгатор; весь полимер агрегирует. При закислении фазы водного растворителя (2% CH_3COOH как растворитель в дисперсионной среде), идет формирование микрочастиц с выходом 32 мас.% (Рисунок 50). В случае использования амфифильных сополимеров ХЛ в дисперсной фазе снижение рН дисперсионной среды после формирования микрочастиц указывает на то, что сополимеры действительно частично растворяются в бидистилляте в процессе формирования микрочастиц. Второй фактор, ответственный за стабилизацию микрочастиц на основе ХЛ, – частичная миграция сополимеров на границу раздела фаз, которая не сопровождается их растворением в дисперсионной среде.

Наиболее ярко это показано для микрочастиц, содержащих сополимеры со средней СП привитой цепи в фазе органического растворителя. Исследование химического состава их поверхности энергодисперсионной спектроскопией (ЭДС), совмещенной с СЭМ, показало, что выход микрочастиц напрямую коррелирует с содержанием азота на поверхности полученных микрочастиц. Как видно из таблицы 21, процентное содержание азота на поверхности микрочастиц превышает рассчитанное исходя из содержания хитозана в дисперсной фазе. Поверхность микрочастиц, содержащих 30 мас.% ХЛД-т, практически полностью состоит из фрагментов хитозана, т.к. содержание азота в самом хитозане (с учетом СА) ~ 8.8 мас.%.

Таблица 21 – Химический состав поверхностных слоев микрочастиц, полученных при использовании сополимеров серии ХЛЛ/ХЛД в дисперсной фазе

Образец	Теоретическое содержание N исходя из состава дисперсной фазы, %	Содержание N по данным ЭДС, %	Выход микрочастиц, %
ХЛЛ-к	1.34	5.6	52
ХЛЛ-т	1.07	7.1	59
ХЛД-т	1.07	8.5	69

Сополимеры со средней СП привитых цепей олиголактида в отличие от образцов серии ХЛ в бидистилляте практически не растворяются (растворимость в воде 1-5 мас.%) и, соответственно, основной вклад в их способность стабилизировать микрочастицы в процессе получения вносит именно миграция фрагментов хитозана на границу раздела фаз.

Исследование процесса формирования самоорганизующихся микрочастиц, содержащих сополимеры хитозана с высокомолекулярными полиэфирами, показало, что образование дискретной фазы проходит медленнее, чем в случае использования эмульгатора в дисперсионной среде (Рисунок 62). Оптические наблюдения показали формирование только небольшого числа дискретных фаз в

течение первых 15 минут после добавления дисперсной фазы в бидистиллят. Через 25 минут видны микрочастицы, но они имеют структуру «ядро-оболочка». Замедленный процесс получения микрочастиц хорошо коррелирует с данными представленными на рисунке 56, т.е. с образованием более крупных микрочастиц по сравнению с получаемыми при использовании ПВС в дисперсионной среде.

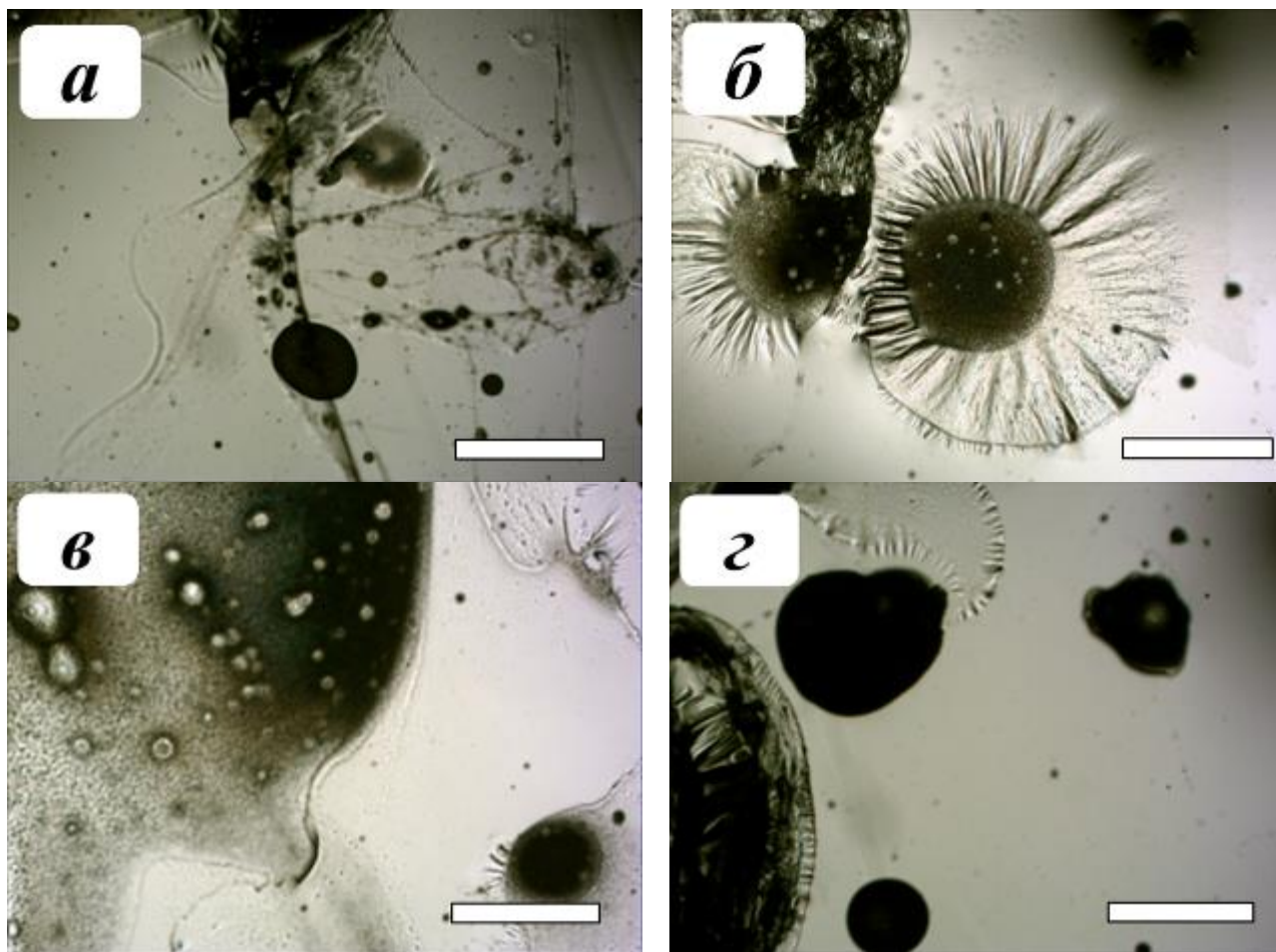


Рисунок 62 – Микрофотографии проб, взятых через 5 (а), 15 (б), 25 (в) и 35 (г) мин. после введения дисперсной фазы, содержащей 30 мас.% ХП-Ж и 70 мас.% поли(L,D-лактида) в бидистиллят. Масштабная линейка 500 мкм

Исследование влияния содержания сополимера в дисперсной фазе на формирование микрочастиц показало, что увеличение содержания сополимера (до 100 мас.%) приводит к ускорению образования границы раздела фаз, но структура «ядро-оболочка» на первом этапе эмульгирования сохраняется во всех случаях.

На рисунке 63 представлены микрофотографии проб, взятых через 25 минут после введения дисперсной фазы, содержащей разное количество ХПГ. Видно, что при 10 мас.% содержании сополимера процесс формирования микрочастиц еще не завершен, в то время как дисперсная фаза, состоящая из одного только сополимера, уже образует дискретную фазу с четкими контурами и формой.

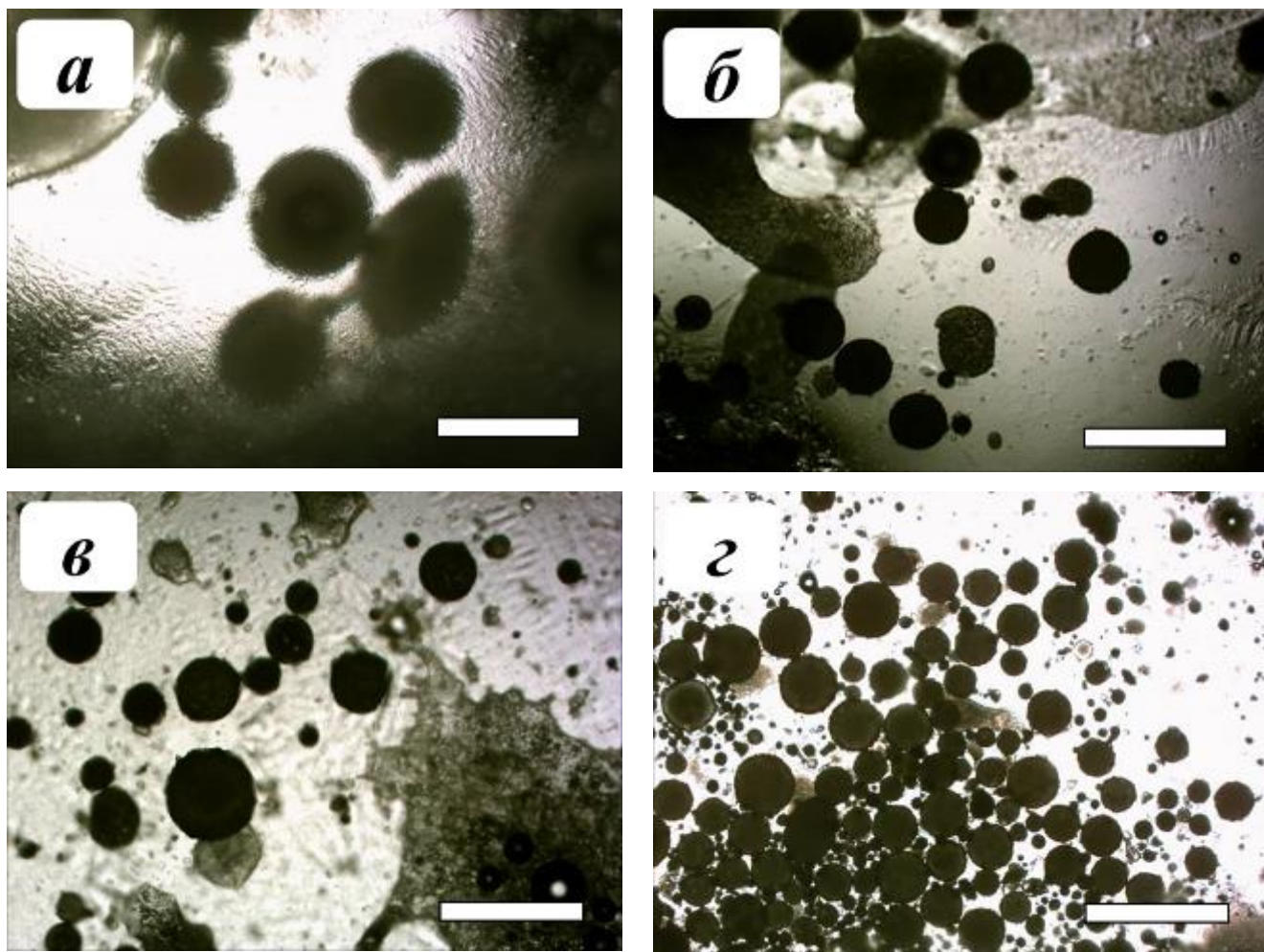


Рисунок 63 – Микрофотографии проб, взятых через 25 мин. после введения дисперсных фаз, содержащих 10 (а), 30 (б), 50 (в) и 100 (г) мас.% ХПГ.

Масштабная линейка 500 мкм

Миграцию природных фрагментов (хитозан/желатин) на границу раздела фаз и, соответственно, их присутствие на поверхности микрочастиц подтверждали с помощью селективного флуоресцентного красителя (ФИТЦ). На рисунке 64 представлены флуоресцентные микрофотографии поверхности

композиционных микрочастиц, содержащих 30 мас.% ХПГ или ХП-Ж. На микрофотографиях наблюдается неоднородность эмиссии ФИТЦ, что возможно связано с агрегированием хитозан/желатин-содержащих фрагментов на поверхности микрочастиц. Согласно данным ЭДС даже в случае композиционных микрочастиц, содержащих 10 мас.% ХП-Ж в дисперсной фазе, на поверхности присутствует ~ в 15 раз больше N, чем можно было ожидать теоретически при его равномерном распределении по объему образца. В зависимости от точки проведения анализа на микрочастицах, содержание азота варьируется от 5.45 до 6.74 ат.%, подтверждая неоднородное распределение биополимеров на поверхности микрочастиц, что также наблюдается на флуоресцентных микрофотографиях.

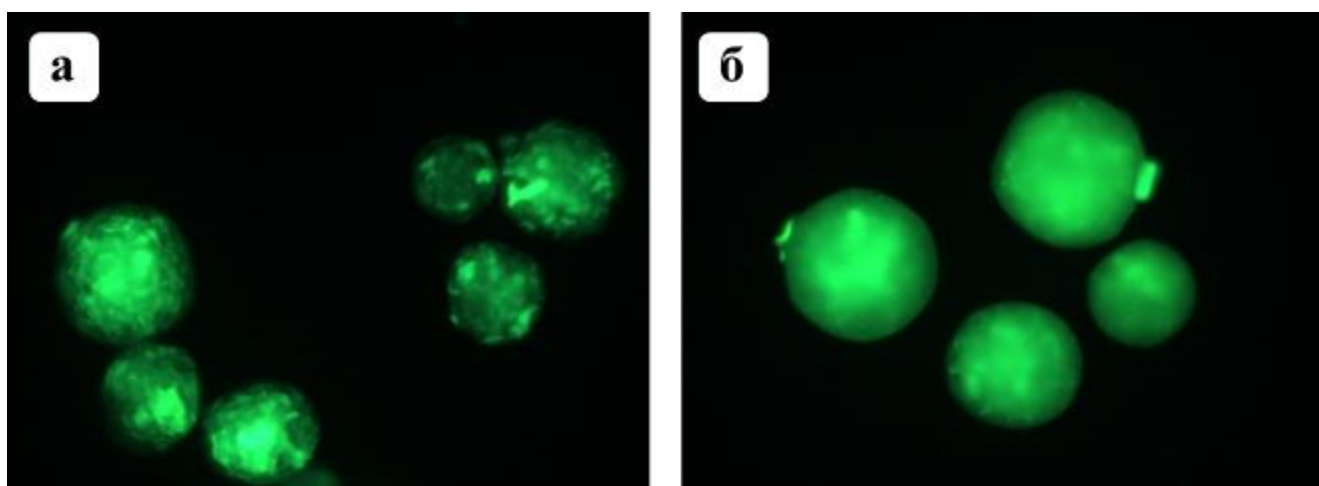


Рисунок 64 – Флуоресцентные микрофотографии композиционных микрочастиц из поли(L,D-лактида), содержащих 30 мас.% ХПГ (а) или ХП-Ж (б) в дисперсной фазе

Таким образом, формирование микрочастиц с использованием сополимеров хитозана с олиго/полиэфирами определяется миграцией хитозансодержащих фрагментов цепей на границу раздела масло/вода. При введении сополимеров в дисперсионную среду процесс формирования микрочастиц схож с тем, что наблюдается при получении микрочастиц с использованием ПВС в качестве эмульгатора. Формирование самоорганизующихся микрочастиц за счет введения

амфифильных сополимеров в дисперсную фазу проходит медленнее и определяется миграцией сополимеров на границу раздела фаз. Частично сополимер может раствориться в дисперсионной среде в процессе формирования микрочастиц и работать как эмульгатор, но в основном стабилизация поверхности формируемых микрочастиц проходит за счет концентрации амфифильных сополимеров на границе раздела фаз.

2.2.3.4. Оценка технологичности процесса получения микрочастиц на основе сополимеров: возможности масштабирования, варьирования природы полимера в дисперсной фазе и параметров процесса

Учитывая то, что процесс формирования «самостабилизирующихся» микрочастиц с использованием сополимеров хитозана с олиго/полиэфирами в дисперсной фазе существенно отличается от получения микрочастиц по классической методике с использованием эмульгаторов в дисперсионной среде, важно оценить «гибкость» полученных систем с точки зрения варьирования параметров процесса и возможность его масштабирования. В данном подразделе диссертационной работы кратко приведены основные закономерности при изменении параметров формирования микрочастиц, в т.ч. специфические для микрочастиц, полученных с использованием различных сополимеров в дисперсной фазе.

I – Воспроизводимость основных характеристик микрочастиц (выход, распределение по размерам, морфология) высокая ($\pm 2\%$);

II – Влияние основных параметров получения микрочастиц, таких как (1) концентрация полимера в дисперсной фазе и (2) его ММ; (3) скорость перемешивания; (4) температура на начальном этапе эмульгирования (первые 15 мин), на средний размер получаемых микрочастиц и их распределение по размерам не отличается от поведения классических систем: увеличение вязкости дисперсной фазы за счет повышения ММ полимера и его концентрации или за

счет снижения температуры, а также же при снижении скорости перемешивания приводит к увеличению среднего размера микрочастиц.

III – Формование микрочастиц с использованием сополимеров более чувствительно к изменению геометрических параметров эмульгирования, т.е. к изменению соотношения фаз; геометрии мешальника. В ходе оптимизации получения микрочастиц использовали разные типы мешальников. Наиболее эффективным с точки зрения выхода и формы микрочастиц оказался пропеллерный 4-х лопастной.

IV – Получение композиционных микрочастиц с использованием сополимеров хитозана с высокомолекулярными полиэфирами в дисперсной фазе имеет существенные ограничения с точки зрения характеристик полиэфира, используемого в качестве со-компонента (гомополимера). Использование в качестве гомополимера в дисперсной фазе поли(L,D-лактида) с высокой ММ (≥ 200 кДа) приводит к коалесценции, что, вероятно, связано с затруднением миграции фрагментов хитозана на границу раздела фаз. Значительное снижение выхода композиционных микрочастиц или их полное агрегирование в процессе получения наблюдается при использовании в качестве гомополимера других полиэфиров: аморфно-кристаллического поли(L,L-лактида) и поли(лактид-со-гликолида).

V – Классические системы с использованием эмульгатора в дисперсионной среде легко могут быть масштабированы, но получение микрочастиц с использованием сополимеров в дисперсной фазе при пропорциональном увеличении объемов фаз может потребовать дополнительной оптимизации условий получения. В рамках диссертационной работы проводили ступеньчатое масштабирование систем: в 5 и 18 раз, т.е. объем дисперсной фазы увеличивали с 2 до 10 и до 36 мл. Самыми ненадежными с точки зрения масштабирования систем оказались микрочастицы, содержащих сополимеры хитозана с высокомолекулярными полиэфирами в дисперсной фазе. Для этого ряда образцов наблюдали изменение морфологии микрочастиц, снижение их выхода

или полное агрегирование микрочастиц в процессе получения, что, вероятно, связано со сложным механизмом их стабилизации.

Таким образом, использование сополимеров хитозана с привитыми цепями олиго/полиэфиров позволяет получать «самостабилизирующиеся» микрочастицы с высоким выходом с контролируемым химическим составом поверхности и морфологией как поверхности, так и объема. В зависимости от СП привитых цепей появляется возможность отказаться от использования эмульгатора в дисперсионной среде, что очень перспективно с технологической точки зрения, т.к. позволяет исключить сразу несколько стадий в процессе формирования микрочастиц. Полученные микрочастицы могут использоваться или в качестве инъектируемых клеточных микроносителей или в качестве исходного материала для получения трехмерных матриц с помощью различных методов: прессование, селективное лазерное спекание и т.д.

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

Создание более сложных трехмерных материалов, воспроизводящих структуру комплексных тканей, в большинстве случаев требует использования аддитивных технологий, в том числе их специфических вариантов [379]. Поверхностно-селективное лазерное спекание (ПСЛС) позволяет получать полимерные трехмерные структуры с заданной архитектурой без их перегрева, т.е. подходит для работы с материалами, наполненными термочувствительными компонентами, что особенно перспективно для создания матриц для тканевой инженерии. В качестве исходных материалов для ПСЛС требуются микрочастицы из термопластов, содержащие на поверхности компонент, способный в отличие от термопласта поглощать лазерное излучение среднего инфракрасного диапазона (1.9 мкм), например, воду. Микрочастицы из полилактида, стабилизированные хитозаном и его производными/сополимерами (раздел 2.2.3.1.1), могут быть перспективны для этой цели, как показывают наши исследования в рамках настоящего раздела.

Для исследования использовали микрочастицы из полилактида, полученные методом испарения растворителя из эмульсий масло/вода, с использованием в качестве дисперсионной среды раствора хитозана Х-350 и его привитого сополимера с олиго(L,L-лактидом) и коллагеном (образец ХО-К). Условия получения микрочастиц (объем фаз, концентрация полилактида в дисперсионной фазе, скорость перемешивания) были оптимизированы для получения микрочастиц со средним размером 59 ± 60 мкм и 67 ± 47 мкм для образца с хитозаном и ХО-К, соответственно. Согласно данным СЭМ микрочастицы имели сферическую форму, а флуоресцентная микроскопия предварительно меченых ФИТЦ микрочастиц подтвердила наличие на их поверхности хитозана/коллагена. С учетом важности для дальнейшего спекания микрочастиц методом ПСЛС были оценены удельная площадь их поверхности и адсорбция воды на ней (Таблица 22). Несмотря на то, что удельная площадь поверхности микрочастиц, стабилизированных сополимером, была меньше площади поверхности микрочастиц с немодифицированным хитозаном, наибольшее значение удельной адсорбции воды на поверхности, обогащенной сополимером, было выше. Эта особенность может быть связана с большей толщиной покрытия из сополимера, что возможно из-за сильных межмолекулярных взаимодействий между ядром микрочастицы из полилактида и фрагментами олиголактидов, привитых на основную цепь хитозана.

Таблица 22 – Характеристики поверхности микрочастиц из полилактида, стабилизированных хитозаном Х-350 или его сополимером ХО-К

Микрочастицы	Удельная площадь поверхности, м ² /г	Адсорбция воды, г/м ²
Стабилизированные хитозаном Х-350	0.0787 ± 0.0005	0.079 ± 0.003
Стабилизированные сополимером ХО-К	0.0695 ± 0.0005	0.089 ± 0.003

Возможность получения трехмерных структур из полученных микрочастиц оценивали экспериментально, и на первом этапе был осуществлен подбор оптимальных параметров спекания (скорость сканирования, плотность заливки и мощность лазерного излучения) на одном слое (толщина 300-600 мкм) микрочастиц. Для покрытых хитозаном X-350 микрочастиц оптимальными условиями, то есть обеспечивающими спекание без перегрева и переплавления объема микрочастиц, были следующие: полная мощность лазера (~ 2.6 Вт), плотность заливки 15 линий/мм и скорость перемещения лазерного пятна 50 мм/сек. Микрочастицы, покрытые сополимером, для достижения оптимальных условий спекания требовали снижения скорости перемещения лазера до 25 мм/сек. После подбора параметров спекания были получены трехмерные структуры (Рисунок 65), которые обладали необходимой прочностью для проведения дальнейших манипуляций.

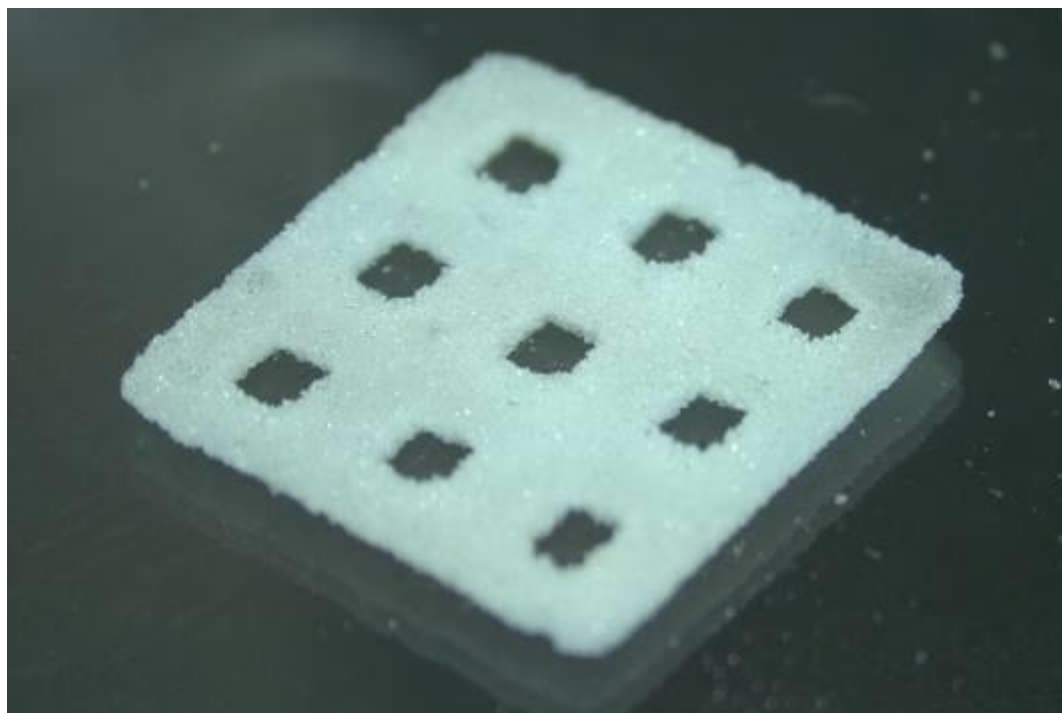


Рисунок 65 – Фотография типичной трехмерной структуры, полученной из микрочастиц полилактида

При достижении оптимальных условий проведения процесса ПСЛС микрочастицы спекаются только в поверхностном слое без изменения их формы (Рисунок 6б). На микрофотографиях срезов видны «перешейки», соединяющие микрочастицы. Полимер, используемый для стабилизации микрочастиц полилактида в процессе их получения, влияет не только на оптимальные параметры их спекания. При использовании немодифицированного хитозана Х-350 полученные микрочастицы агрегируют, и получение каждого слоя для спекания сопряжено с техническими трудностями. Очевидно что эта проблема связана с достаточно широким распределением микрочастиц по размерам и наличием большого количества частиц с диаметром до 30 мкм. Микрочастицы, стабилизированные сополимером ХО-К, обладали более однородным распределением по размерам, что облегчало работу с ними. Тем не менее, вне зависимости от типа полимера в дисперсионной среде все микрочастицы были пригодны для получения трехмерных структур методом ПСЛС. Наличие покрытия из хитозана/сополимера на поверхности спеченных микрочастиц показано с помощью оптической микроскопии срезов структур из микрочастиц, покрытых сополимером, с использованием селективного по отношению к аминогруппам хитозана и белка флуоресцентного красителя ФИТЦ. В световом режиме видны только спеченные микрочастицы, иммобилизованные в клее, в то время как во флуоресцентном режиме наблюдается эмиссия с поверхности микрочастиц, в том числе в области спекания (помечено красными стрелками на микрофотографиях) (Рисунок 6б). Наличие полисахарида/белка на поверхности спеченных микрочастиц подтверждает, что они остаются на поверхности готовых трехмерных структур, что также важно для дальнейшего из применения в биомедицине. Поверхность материалов из полилактида не может обеспечить хорошей адгезии и роста животных клеток, и наличие хитозана/белка на поверхности будет благоприятно для интеграции полученного матрикса при его имплантации в организм.

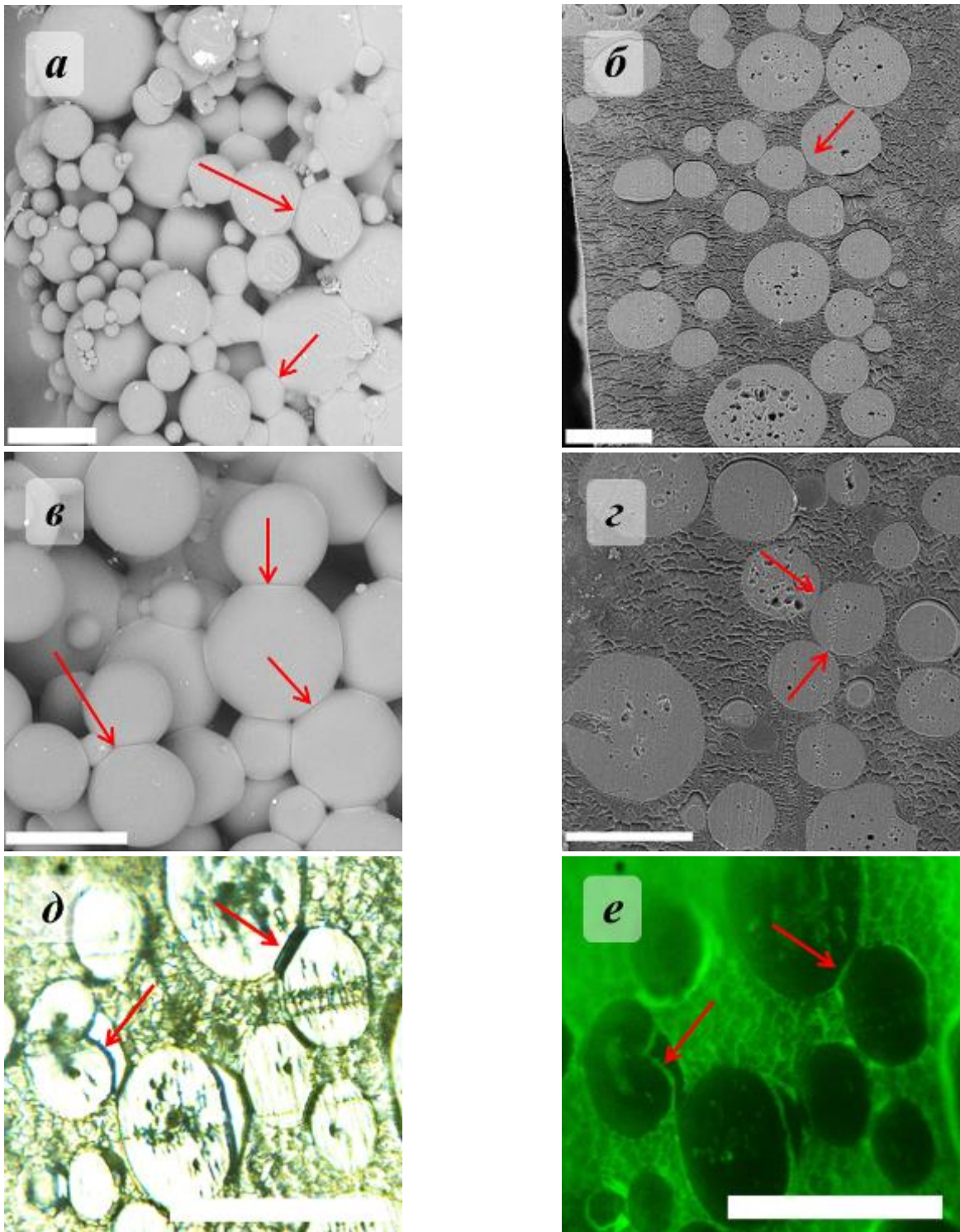


Рисунок 66 – Микрофотографии спеченных микрочастиц из полилактида, стабилизированных хитозаном (а,в,д) или сополимером ХО-К (б,г,е). СЭМ изображения (а,в) поверхности и (б,г) среза, а также микрофотографии срезов в световом (д) и флуоресцентном (е) режиме. Красными стрелками указаны места спекания поверхности микрочастиц. Масштабная линейка 100 мкм

Таким образом, хитозан и его производные/сополимеры могут быть успешно использованы для получения микрочастиц, пригодных для получения на их основе трехмерных структур с заданной архитектурой с помощью поверхностно-селективного лазерного спекания. Возможность получать сферические биodeградируемые микрочастицы с покрытием из биополимеров *in situ* является существенным прогрессом с точки зрения оптимизации технологии получения целевых матриц и вывода в широкую клиническую практику принципов тканевой инженерии.

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

Метод лиофильной сушки является одним из наиболее простых и достаточно эффективных, с точки зрения регулирования морфологии получаемых макропористых губок, подходов. Варьирование концентрации полимерного раствора, условий замораживания и высушивания под вакуумом позволяет контролировать пористость материала. Но полученные губки остаются водорастворимыми и для дальнейшего практического применения необходимо их переводить в нерастворимую форму, что является дополнительным фактором, влияющим на структуру и целевые свойства макропористых гидрогелей для регенеративной медицины. В данном разделе описано получение макропористых гидрогелей на основе образцов хитозана с различными характеристиками макромолекул (ММ и СА), сшитых различными сшивающими агентами (глутаровый альдегид или дженипин); композиционных гидрогелей на основе сшитого хитозана или его интерполиэлектролитного комплекса с гиалуроновой кислотой (ГК), в том числе содержащего наночастицы гидроксиапатита (нГА); гидрогели на основе хитозана, ацилированного гидроксикарбоновой кислотой: на основе его сополимеров с различной СП привитых цепей олиголактоидов. Основные результаты, приведенные в данном разделе, были опубликованы и обсуждены в соавторстве в статьях [378,380–382].

2.2.5.1. Макропористые гидрогели на основе ионно и ковалентно сшитого хитозана

В данном подразделе были оценены различные подходы к получению макропористых гидрогелей с целевыми свойствами путем формирования многокомпонентных гидрогелей на основе хитозана. Сначала исследовали гидрогели на основе хитозана, для перевода которого в нерастворимую форму использовали формирование его полиэлектролитного комплекса с полианионом – ГК (Рисунок 67). Наличие в структуре хитозана первичной аминогруппы придает ему реакционную способность не только с точки зрения синтеза его производных и сополимеров, но и способности к образованию солей, в том числе полиэлектролитных комплексов. Предложенная схема получения макропористых гидрогелей позволяет не только формировать пористые губки с контролируемым размером пор и однородным составом полимерной матрицы, но и эффективно иммобилизовать наноразмерные функциональные компоненты в структуре гидрогеля – наночастицы гидроксиапатита (нГА) (раздел 3.3.5.1). Выбор компонентов (ГК и нГА) для введения в состав гидрогелей на основе хитозана связан, во-первых, с возможностью формирования полиэлектролитного комплекса (ПЭК) между поликатионом хитозаном и полианионом ГК и, во-вторых, с перспективностью применения таких композиционных гидрогелей для регенерации костных тканей (см. обзор литературы).

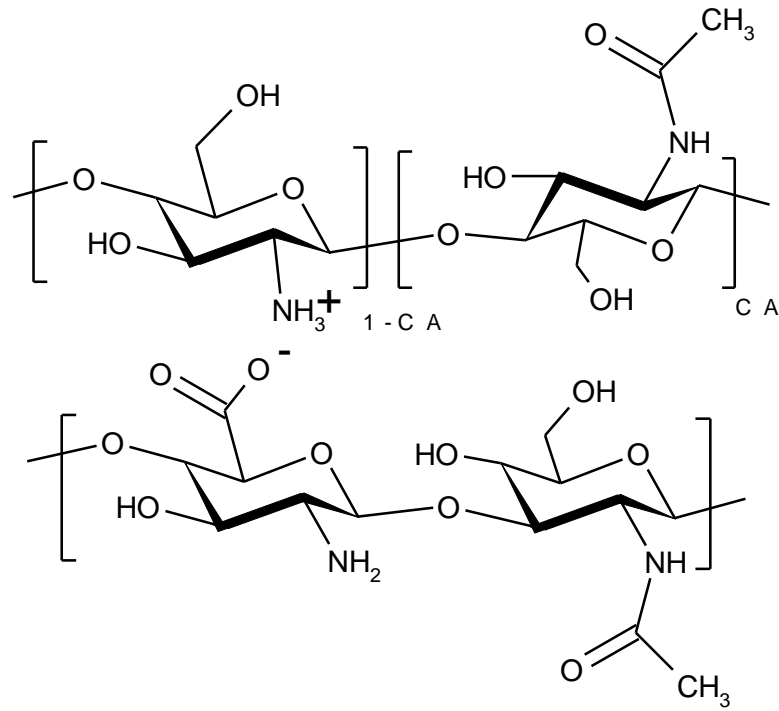


Рисунок 67 – Химическая структура хитозана и ГК с образованием полиэлектролитного комплекса

На первом этапе получения гидрогелей нГА распределяли в растворе ГК с помощью УЗ-обработки, затем дисперсии замораживали и сушили лиофильно. На фотографиях полученных губок видно, что структура образцов, содержащих нГА, более выражена, чем в контрольном образце без добавления нГА (Рисунок 68), что, вероятно, связано со сшиванием макромолекул ГК поливалентными ионами (Ca⁺²). Как было показано в [383], 10 мас.% содержание нГА обеспечивает максимальное взаимодействие ГК и нГА, что выражается в изменении реологических характеристик дисперсии и морфологии образцов.

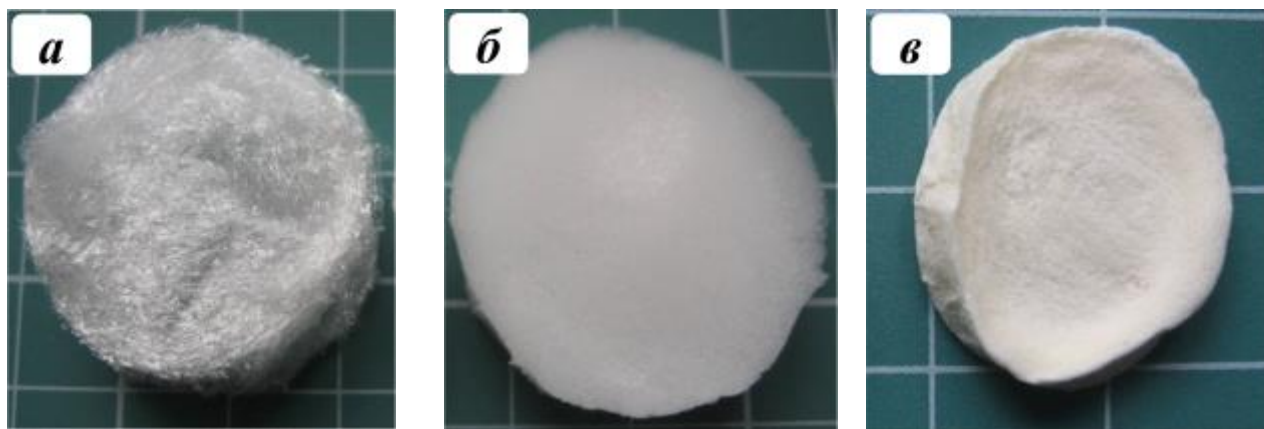


Рисунок 68 – Фотографии губок, полученных из 1% водного раствора ГК (а), раствора ГК с 1 мас.% диспергированных нГА до (б) и после (в) инкубирования в растворе хитозана

Последующее инкубирование высушенных губок в растворе хитозана Х-60 обеспечило формирование ПЭК между двумя полисахаридами и перевод полученных образцов в нерастворимую в воде форму. Для подтверждения химической структуры полимерной матрицы (образования поликомплекса) и расчета ее композиции был проведен элементный анализ, который показал, что все образцы содержат ~ 50 мас.% хитозана (Таблица 23).

Таблица 23 – Данные элементного анализа и расчет состава полимерной матрицы образцов гидрогелей

Образец	Атомная концентрация, %			Содержание хитозана, мас- %
	N	C	H	
ГК/Х	4.38	38.0	6.63	50.37
ГК/Х/нГА-1	4.37	38.2	6.68	50.26
ГК/Х/нГА-5	4.37	38.1	6.75	50.26
ГК/Х/нГА-10	4.36	37.5	6.55	50.14

Образцы ПЭК хитозан/ГК, в том числе содержащие нГА, были высушены лиофильно, и их срезы исследованы с помощью СЭМ (Рисунок 69). Наличие вторичных и частично сформированных пор на электронных микрофотографиях,

скорее всего, связано с дополнительной лиофилизацией образцов после выдерживания в растворе хитозана. ЭДС показала наличие атомов Са и Р, характерных для гидроксиапатита, в составе стенок пор.

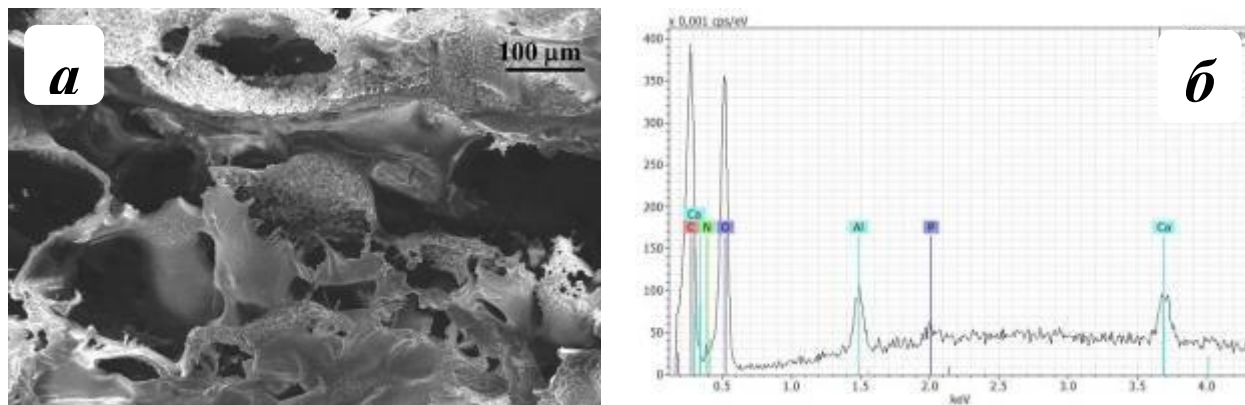


Рисунок 69 – Микрофотография среза (а) и ЭДС-спектр гидрогеля ГК/Х/нГА-

10

Исследование степени резорбции гидрогелей на основе ПЭК хитозан/ГК в различных водных средах, показало, что наличие ионов в средах, очевидно, ведет к ослаблению электростатических взаимодействий между полисахаридами. Все образцы были стабильны при инкубировании в бидистилляте и физиологическом растворе (0.9% NaCl), тогда как инкубирование в среде для культивирования и полифосфатном буфере приводит к значительной (до 60 мас.% после 7 дней инкубирования при 37°C) резорбции образцов. Увеличение содержания нГА приводит к снижению степени резорбции (до 45 мас.% после 7 дней инкубирования).

Таким образом, благодаря наличию первичных аминогрупп в структуре хитозана можно получить нерастворимые в воде макропористые гидрогели на основе его полиэлектролитного комплекса с ГК, в том числе наполненные наночастицами гидроксиапатита. Однако электростатические взаимодействия нестабильны в физиологических условиях, и полученные макропористые гидрогели имеют высокую степень резорбции, то есть «время жизни» полученных образцов слишком короткое, и они могут быть пригодны для решения только отдельных задач регенеративной медицины.

Для получения гидрогелей на основе хитозана, стабильных в течение более длительного времени, использовали сшивающие агенты. Варьирование характеристик хитозана (образцы хитозана Х-190 и Х-320 с ММ 190 и 320 кДа, соответственно) и природы сшивающего агента (глутаровый альдегид (ГА) и дженипин (Дж)) позволило сформировать макропористые гидрогели с различным размером пор и степенью их анизотропии. Гидрогели, сшитые дженипином, обладают голубым цветом, что является дополнительным преимуществом при имплантировании *in vivo*, так как это обеспечивает хорошую визуализацию материала на фоне крови (Рисунок 70). Исследование морфологии полученных гидрогелей в сухом состоянии методом СЭМ показало, что наиболее крупными порами (свыше 500 мкм) обладали образцы, сформованные на основе гидрогеля из Х-320, сшитого Дж (образец Х(320)-Дж). Замена сшивающего реагента на более реакционно-способный ГА или повышение концентрации хитозана (образец гидрогеля Х(190)-Дж) приводило к получению более плотной структуры, в которой при замораживании формировались мелкие кристаллы льда, а после лиофильного высушивания – поры размером 100-200 мкм (для образца Х(190)-Дж) или 30-100 мкм (в случае образца Х(320)-ГА).

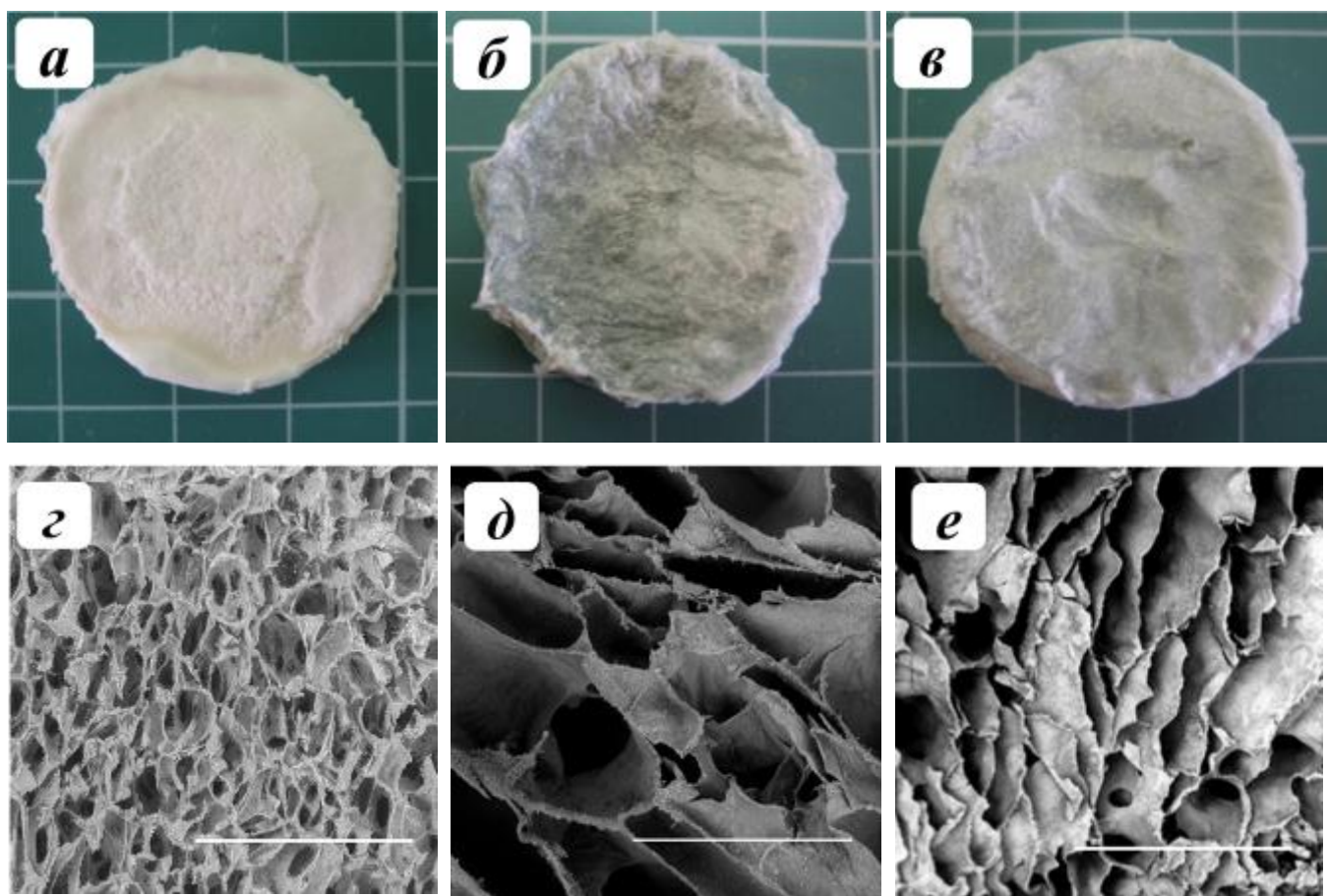


Рисунок 70 – Фотографии (а, б, в) и электронные микрофотографии (г, д, е) образцов гидрогелей X(320)-ГА (а, г), X(320)-Дж (б, д) и X(190)-Дж (в, е).

Масштабная линейка 500 мкм

Все образцы имели высокую степень набухания, которая зависела как от способности к набуханию самих образцов хитозана, так и от осмотических свойств материала, т.е. затеканию воды внутрь материала и удерживанию ее в порах матрикса. Степень набухания для всех образцов гидрогелей варьировалась от 4700 до 6400 %.

Исследование цитотоксичности полученных гидрогелей из сшитого хитозана методом экстракт-теста на линии мышинных фибробластов L929 показало, что экстракты от всех образцов не токсичны для клеток [380]. Приводимые в литературе противоречивые сведения о токсичности глутарового альдегида, скорее всего, связаны с избыточным содержанием сшивающего агента. В данном случае было взято расчетное количество как ГА, так и Дж для

получения не растворимого в воде гидрогеля, т.е. 0.005-0.01 моль сшивающего реагента на 1 моль аминогрупп хитозана. Исследование распределения клеток, качественную оценку их адгезии и расплывания в образцах гидрогелей, а также роста и пролиферации в матриксах проводили с помощью конфокальной лазерной микроскопии на 4 день культивирования. Значительных различий в морфологии и росте клеток на 4 день культивирования обнаружить не удалось. Однако, МТТ-тест после недели культивирования показал, что количество жизнеспособных клеток на образцах гидрогелей на основе X-320 было выше, чем на гидрогелях из X-190.

Таким образом, использование сшивающих агентов позволило получить нерастворимые в воде макропористые гидрогели на основе хитозана. Однако, значительного влияния на цитосовместимость матриксов в зависимости от природы сшивающего агента и характеристик образцов хитозана (ММ и СА) выявить не удалось. Для модифицирования свойств и увеличения цитосовместимости сшитых гидрогелей использовали дополнительное введение в состав гидрогелей гиалуроновой кислоты. Иммуобилизацию ГК проводили двумя методами: (1) предварительно полученные макропористые гидрогели из хитозана, сшитого дженипином, инкубировали в растворе ГК, которая при этом адсорбировалась преимущественно по поверхности образца; 2) смесь растворов хитозана с ГК сшивали дженипином, замораживали и сушили лиофильно, что позволило распределить ГК по всему объёму образца.

Введение ГК различными методами не приводит к изменению структуры гелей: морфология гелей на основе образцов хитозана с одинаковой ММ вне зависимости от наличия ГК и метода ее иммобилизации была схожей (Рисунок 71). Единственным различием, выявленным электронной микроскопией, является морфология стенок пор, которые были шероховатыми как в случае немодифицированных образцов гидрогелей из хитозана, так и модифицированных по методу (2), тогда как модифицированные по первому – гладкие. Вероятно эта шероховатость связана с наличием ацетата натрия, который является продуктом взаимодействия уксусной кислоты, в которой растворяли образцы, и гидроксидом

натрия, которым довели рН растворов хитозана до 5.6 для регулирования содержания реакционноспособных депротонированных аминогрупп. При инкубировании гидрогелей в растворе ГК по методу (1) эти соли просто растворялись.

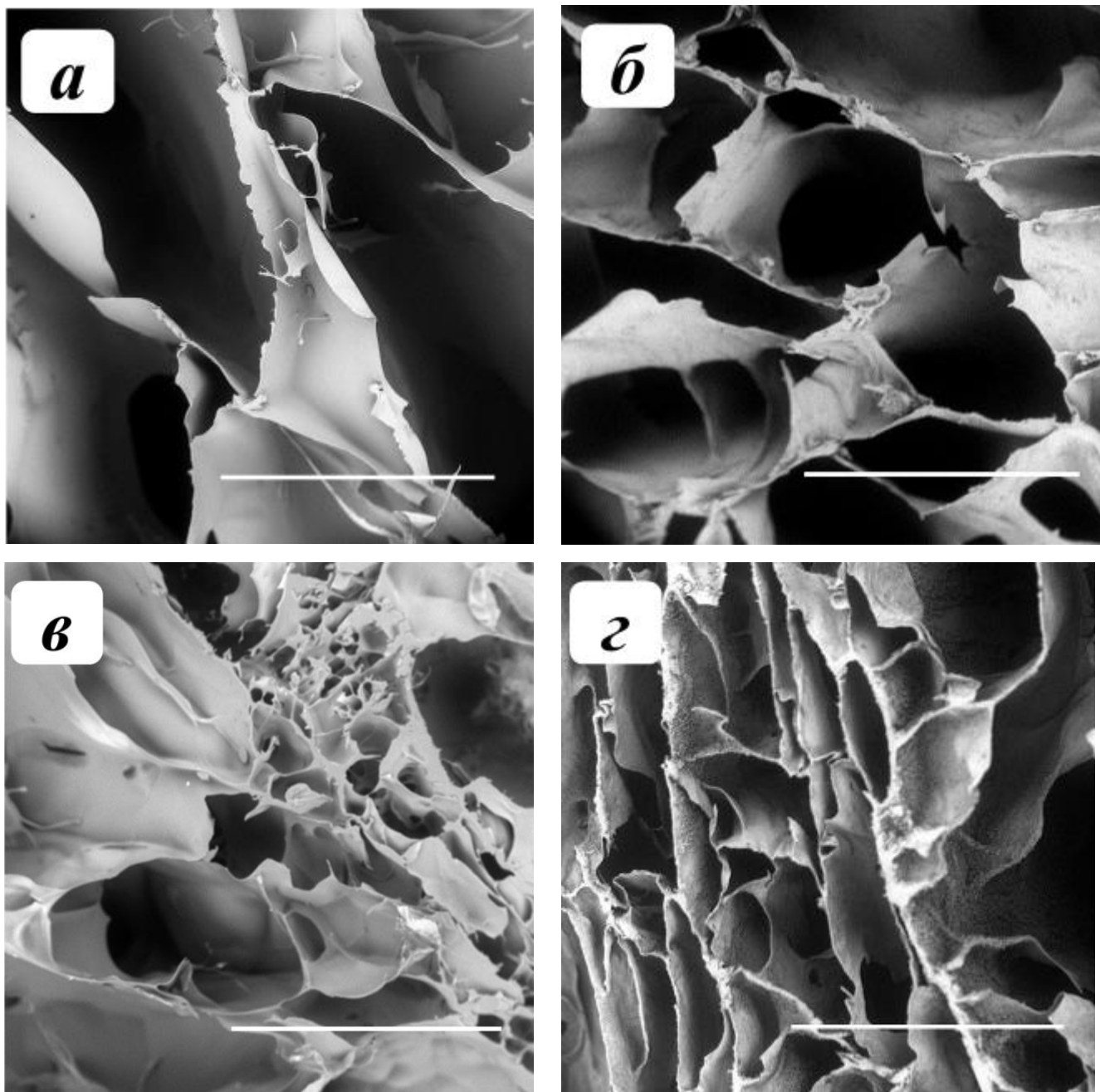


Рисунок 71 – Электронные микрофотографии срезов макропористых гидрогелей из сшитого хитозана X-320 (а, б) и X-190 (в, г), модифицированных по методу (1) (а, в) и (2) (б, г). Масштабная линейка 500 мкм

Введение ГК в состав гидрогелей по методу (2) не приводит к существенному изменению степени набухания образцов в воде, тогда как дополнительное инкубирование сшитых гидрогелей в ГК (модифицирование по методу (1)) приводит к снижению степени набухания в 2-3 раза вследствие образования устойчивого поликомплекса.

Исследование влияния ГК на поведение клеток линии мышинных фибробластов L929 при их длительном культивировании в гидрогелях оценивали с помощью МТТ-теста через 7 дней культивирования (Рисунок 72) и методом конфокальной микроскопии (Рисунок 73) на 4 день культивирования. Количество клеток в образцах гидрогелей без добавления ГК (образцы Х-190-Дж и Х-320-Дж) было ниже, чем в образцах содержащих ГК. Введение ГК в состав гидрогелей на основе Х-320 с использованием обеих методик приводило к увеличению количества жизнеспособных клеток по сравнению с исходным образцом (на 16 % для образца Х(320)-Дж-1 и на 30% для Х(320)-Дж-2). В случае образцов Х-190 такой зависимости не наблюдали. При этом введение ГК по методу (2) оказалось более эффективным, чем по методу (1), что позволило улучшить рост и увеличить пролиферацию клеток. Большое количество жизнеспособных клеток на образцах, содержащих ГК затрудняет оценку степени расплывания клеток с помощью конфокальной микроскопии, так как к 4 дню культивирования клетки уже образовали мультислои (Рисунок 73).

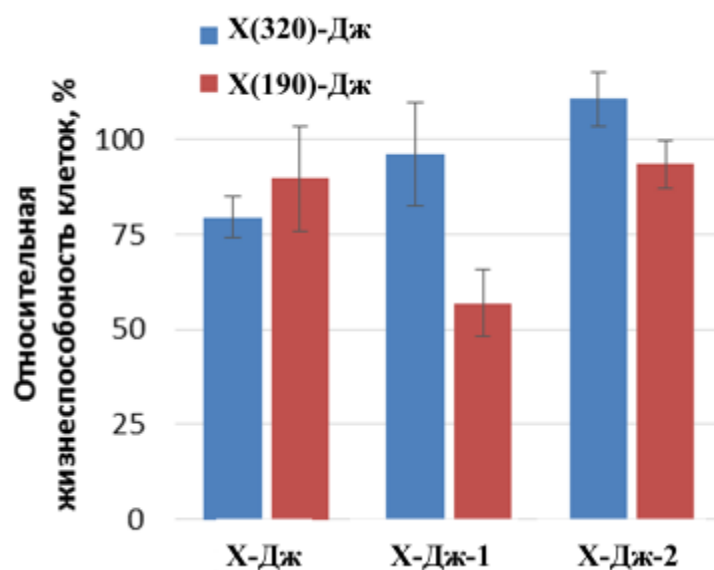


Рисунок 72 – Жизнеспособность клеток L929 в гидрогелях после 7 дней культивирования. Контроль (100%) – монослой клеток

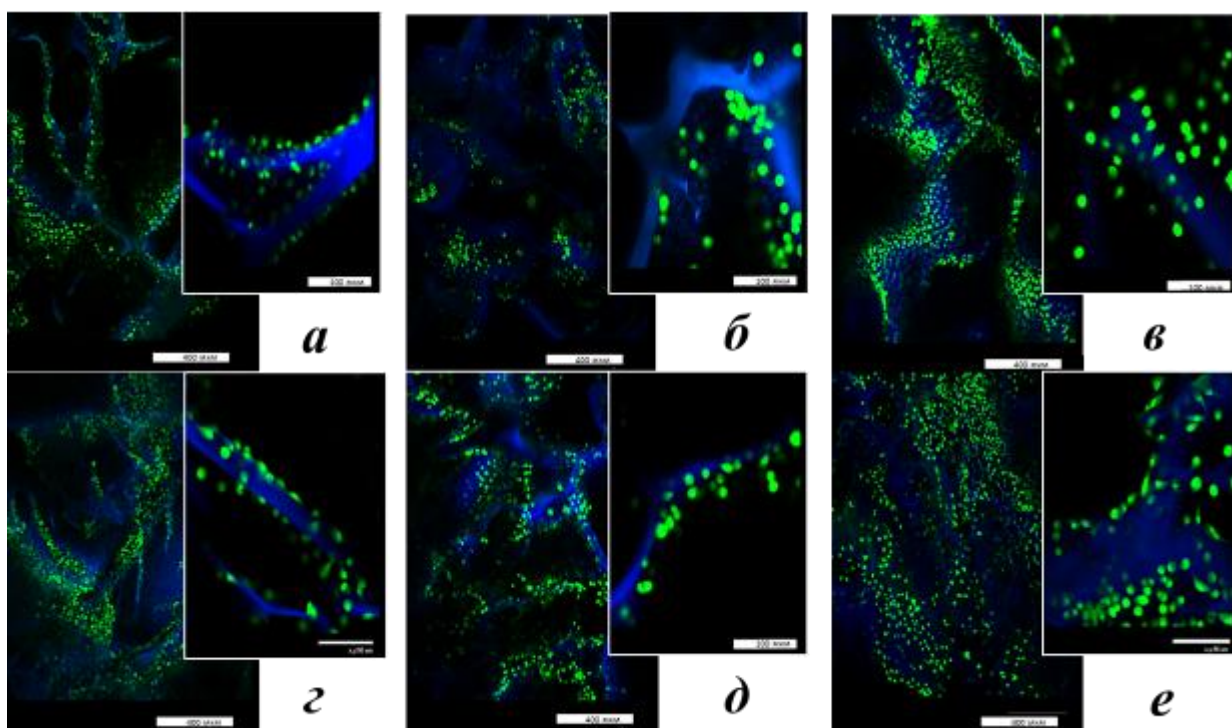


Рисунок 73 – Распределение и морфология клеток линии L929 после 4 дней культивирования в X(320)-Дж (а), X(320)-Дж-1 (б), X(320)-Дж-2 (в), X(190)-Дж (г), X(190)-Дж-1 (д), X(190)-Дж-2 (е)

Таким образом, получены композиционные макропористые гидрогели на основе хитозана, перевод которых в нерастворимую в воде форму осуществляли или путем комплексообразования с полианионом или с использованием сшивающих агентов. Варьирование природы сшивающего агента и характеристик хитозана несущественно влияет на цитосовместимость полученных гидрогелей. Введение гиалуроновой кислоты различными методами позволяет увеличить биосовместимость материала. Создание многокомпонентных материалов требует нескольких этапов формования материала и может быть сопряжено с технологическими трудностями. Более простым и эффективным подходом к регулированию свойств гидрогелей на основе хитозана может являться модифицирование его химической структуры.

2.2.5.2. Макропористые гидрогели на основе производных и сополимеров хитозана

Гидрогели получали из производных и сополимеров хитозана, которые обладали достаточной гидрофильностью для растворения в водных средах: хитозан, ацилированный гидроксикарбоновой кислотой; сополимеры хитозана со СП привитых цепей олиголактоидов ≤ 70 . Макропористые гидрогели из хитозана, ацилированного гидроксикарбоновой кислотой (образец ХК-2) и хитозана с короткими привитыми фрагментами олиго(L,D-лактида) (образец ХЛ-2) получали путем замораживания их растворов в бидистилляте, а гидрогели из немодифицированных образцов хитозана (Х-60, Х-80, Х-350) и сополимеров серии ХЛЛ/ХЛД получали из их уксуснокислых водных растворов. Условия формования гидрогелей (концентрации растворов, параметры замораживания и лиофильной сушки) были предварительно оптимизированы для обеспечения требуемого для миграции клеток/питательных веществ размера пор и механических характеристик, достаточных для манипулирования образцами во время дальнейших исследований.

Для перевода макропористых губок, полученных после лиофильной сушки растворов полимеров, в нерастворимую форму использовали термическую

обработку образцов. Выбор такого способа сшивки обусловлен необходимостью нивелировать побочные эффекты введения сшивающих агентов на структуру и свойства гидрогелей. Эффективность сшивки после термической обработки оценивали по потере массы гидрогелей после дополнительного цикла «набухание-замораживание-лиофилизация», то есть после очистки гидрогелей от несшитых в процессе термической обработки фрагментов. Гидрогели из сополимера хитозана с олиго(L,L-лактидом) (ХЛЛ-т) не только отличаются от образцов из Х-80 и ХЛД-т по цвету, но и характеризуются наибольшей потерей массы после очистки (Рисунок 74). Низкая эффективность термической обработки в случае сополимеров с олиго(L,L-лактидом) связана, вероятно, с их гетерогенностью, которая была показана на пленочных образцах (раздел 2.2.1.1).

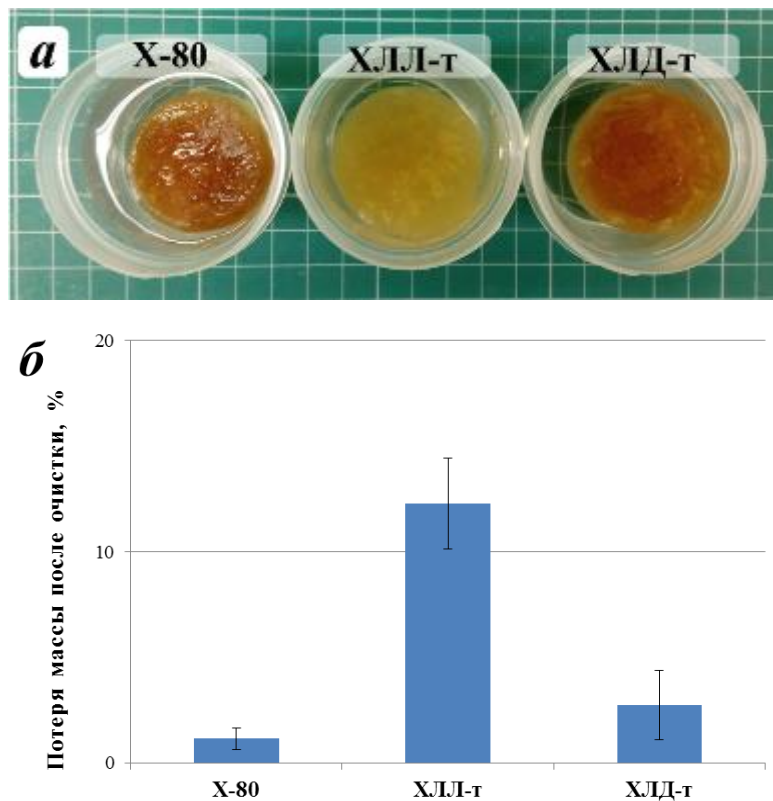


Рисунок 74 – Фотографии гидрогелей из немодифицированного хитозана Х-80 и его сополимеров с олиголактидом со средней СП привитой цепи (а); потеря массы после очистки гидрогелей от несшитых в процессе термической обработки фрагментов (б)

Исследование влияния химической структуры на морфологию губок после первой и второй лиофилизации показало, что все гидрогели обладают взаимопроникающей сетью пор с широким диапазоном по размеру (от 10 до 500 мкм), но средний размер пор во всех случаях составляет 100-150 мкм. Дополнительный цикл «набухание-замораживание-лиофилизация» в случае немодифицированного хитозана приводит к образованию вторичных пор в стенках основных (Рисунок 75). По сравнению с образцом из ХЛД-т для образца гидрогеля из ХЛЛ-т характерно значительное увеличение размера пор после отмывки от несшитых фрагментов и второй лиофилизации. Это может быть связано с утончением стенок пор за счет удаления несшитых фрагментов, но основной вклад в увеличение размера пор вносит высокая степень набухания образцов в воде, что также связано с низкой эффективностью термического сшивания в случае сополимеров хитозана с олиго(L,L-лактидом).

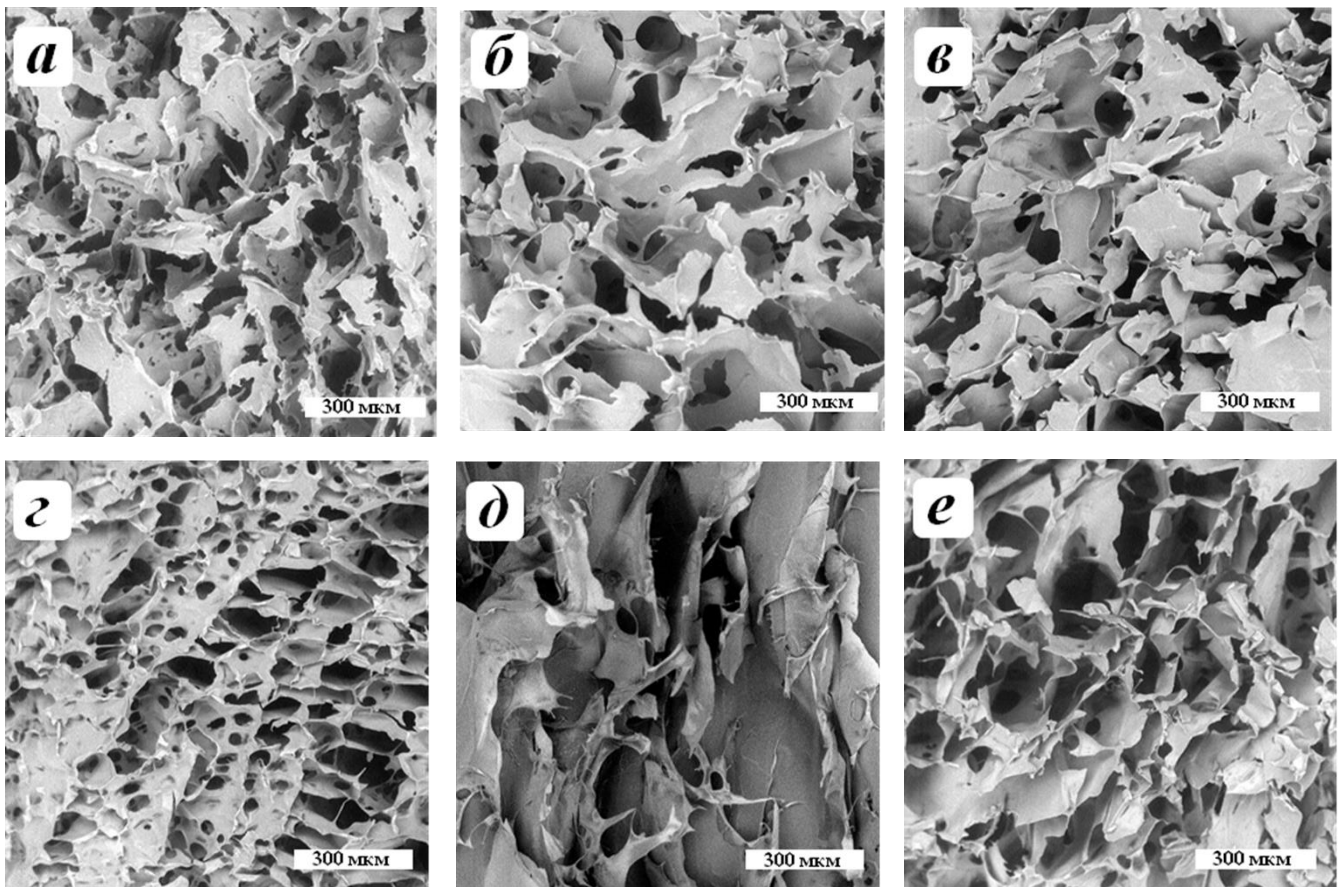


Рисунок 75 – СЭМ срезов гидрогелей из хитозана Х-80 (а, г), ХЛЛ-т (б, д), ХЛД-т до (а, б, в) и после (г, д, е) дополнительного цикла лиофильной сушки

Исследование степени влагопоглощения гидрогелей в воде показало, что образцы на основе немодифицированного хитозана Х-80 и ХЛД-т имеют наименьшие степени влагопоглощения (4088 ± 37 - 4332 ± 16 мас.%), а для образцов, содержащих фрагменты аморфно-кристаллического олиго(L,L-лактида) (ХЛЛ-т), они существенно больше (4949 ± 56 мас.%), что хорошо коррелирует с результатами оценки эффективности сшивки.

Исследование вертикальных и горизонтальных срезов гидрогелей на основе немодифицированного хитозана Х-60, его производного с гидроксикарбоновой кислотой (ХК-2) и сополимера с небольшой длиной привитой цепи (ХЛ-2) методом СЭМ также показало формирование взаимопроникающей сети пор со средним размером 70 – 120 мкм (Рисунок 76). На стенках пор гидрогелей на основе ХК-2 видны кристаллические образования, которые, вероятно, связаны с наличием непрореагировавшей ГКК (~ 59 мас.% от введенной в реакционную смесь). Дополнительный цикл «набухание-замораживание-лиофилизация» приводит к удалению непрореагировавшей гидроксикарбоновой кислоты и формированию вторичных и частично сформированных пор в стенках основных, что особенно характерно для образца из ХЛ-2.

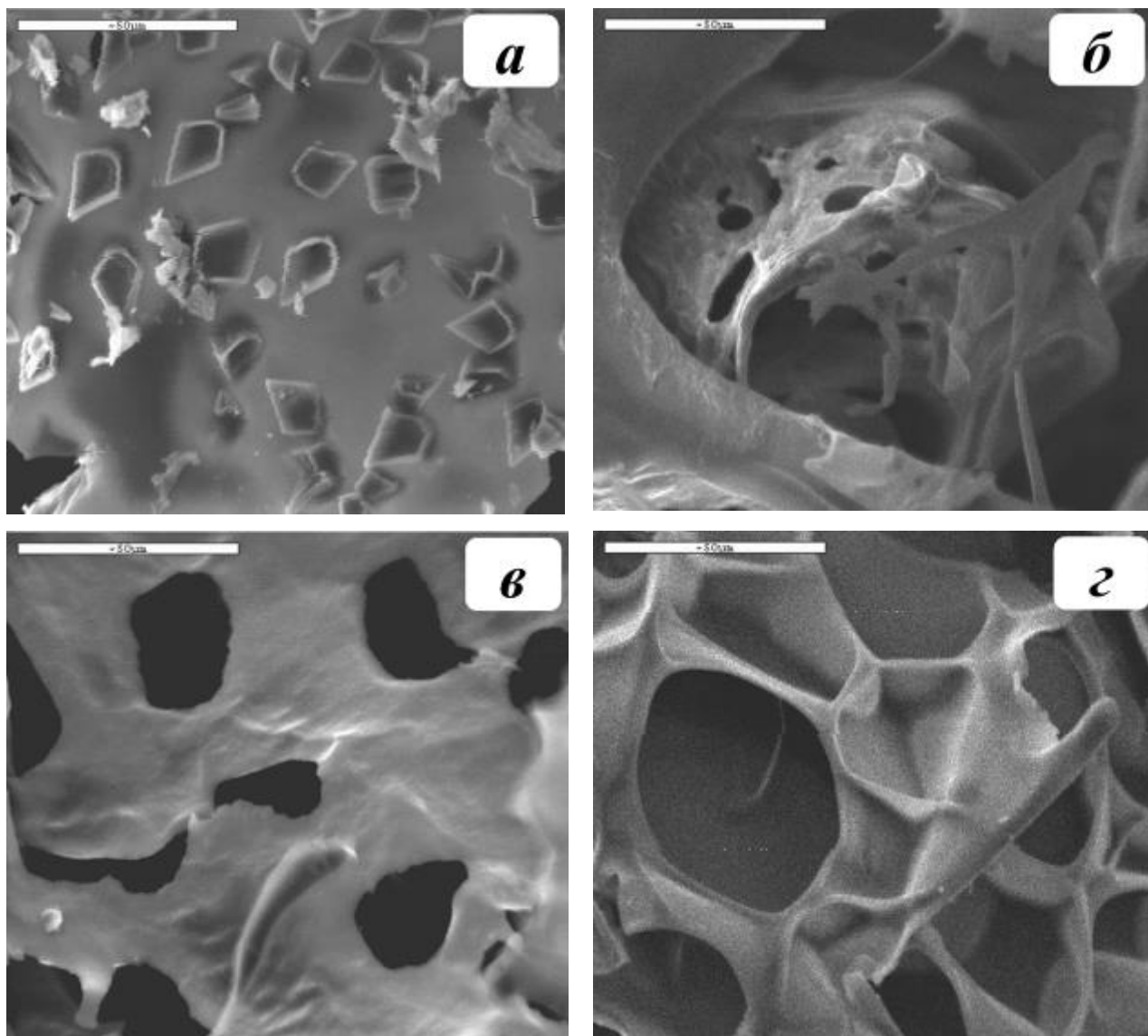


Рисунок 76 – СЭМ срезов гидрогелей на основе ХК-2 (а, б) и ХЛ-2 (в, г) до (а, в) и после (б, г) очистки от несшитых фрагментов и второго цикла лиофильной сушки

Исследование морфологии образцов в набухшем состоянии методом конфокальной микроскопии показало, что структура гидрогелей сохраняется, но размер основных пор увеличивается приблизительно на 20 %. Поры взаимосвязаны и их размер достаточен для тока питательных веществ и роста клеток. Расчет распределения пор по размерам показал наличие пор с диаметром в диапазоне от 5 до 400 мкм. Однако, средний размер пор, их распределение по размерам, а также толщина стенок пор зависят от химической структуры полимера, используемого для получения гидрогеля, что, вероятно, связано с

разницей в упаковке макромолекул. Расчет площади стенок пор в срезе образцов показал, что стенки пор, сформованные в гидрогеле из немодифицированного хитозана и ХЛ-2, характеризуются практически одинаковой площадью (24 и 23 %, соответственно), тогда как образец из ХК-2 обладает более плотной структурой с относительной площадью стенок пор 37 %. Гидрогель из немодифицированного хитозана имеет наибольший средний размер пор (123 мкм), в то время как образцы на основе производных хитозана имеют средний размер пор 75-77 мкм. Эта разница, скорее всего, связана с формированием различного количества кристаллов льда при замораживании растворов и их размера, что в свою очередь определяется упаковкой макромолекул в растворе.

Характеристики используемого полимера также влияют на кинетику и равновесную степень набухания гидрогелей в воде. Образцы, полученные из немодифицированного хитозана, набухали только при приложении циклической механической нагрузки, в то время как образцы, полученные из производных хитозана, достигали равновесной степени набухания в течение 1-2-х минут. С другой стороны, гидрогели из немодифицированного хитозана обладали наибольшей степенью набухания (3700 ± 60), что хорошо согласуется с литературными данными [384,385]. Степень набухания гидрогелей на основе ХК-2 и ХЛ-2 составляла 1300 ± 290 и 2200 ± 160 , соответственно.

Важным параметром, который влияет на возможность применения полученных гидрогелей в качестве подложки для прикрепления и роста клеток и зависит от характеристик макромолекул полимера, является заряд поверхности. Учитывая то, что клетки взаимодействуют с поверхностью опосредовано через слой белков, сорбированный на поверхности матрикса, то заряд может влиять на количество сорбированных белков и их конформацию. Все полученные гидрогели обладали положительным и достаточно высоким зарядом поверхности вследствие катионной природы хитозана. Гидрогель из ХК-2 имеет меньший дзета-потенциал ($+31.2 \pm 1.7$ мВ), чем образец из ХЛ-2 ($+38.7 \pm 0.7$ мВ) (Таблица 24). Результаты исследования сорбции отрицательно заряженного модельного белка (бычий

сывороточный альбумин) на поверхности гидрогелей хорошо коррелируют с данными измерений дзета-потенциала.

Таблица 24 – Дзета-потенциал и адсорбция белка на поверхности гидрогелей

Образец гидрогеля	Дзета-потенциал, мВ	Адсорбция белка, мкг/мг
Хитозан	-	146 ± 25
ХК-2	+31.2 ± 1.7	32 ± 17
ХЛ-2	+38.7 ± 0.7	119 ± 20

Возможность применения полученных гидрогелей в качестве матриц для тканевой инженерии также определяется их способностью к биодegradации. Известно, что характеристики макромолекул немодифицированного хитозана влияют на скорость его ферментативного гидролиза: чем выше СА и ниже ММ, тем выше скорость деградации [386]. Соответственно, ацилирование аминогрупп хитозана ГКК и короткими цепями олиго(L,D-лактида) может существенно изменить его способность к биодegradации. Для исследования кинетики деградации гидрогелей *in vitro* был выбран лизоцим – природный фермент, который находится во многих тканях и жидкостях человеческого организма, а также продуцируется макрофагами в процессе заживления ран [387]. Обнаружено, что гидролиз образца из ХЛ-2 проходит быстрее, чем образца из немодифицированного хитозана, в то время как образец на основе ХК-2 деградирует очень медленно (Рисунок 77). ММ основной цепи всех образцов была примерно одинакова, т.е. основной вклад в изменение скорости биодegradации должно вносить изменение СА хитозана и природа заместителей. Степень ацилирования хитозана ГКК и олиголактидом была соизмеримой и должна была привести к увеличению скорости гидролиза, что подтвердилось экспериментально в случае гидрогеля из ХЛ-2. Повышение стабильности образца из ХК-2, вероятно, связано с наличием двух стерически затрудненных гидроксильных групп, которые препятствуют «пристыковке» лизоцима. Важным параметром также является характер деградации полученных образцов: они

сохраняли свою целостность при постепенном истончении стенок пор до конца процесса гидролиза. Таким образом, модифицирование химической структуры хитозана позволяет получать материалы с регулируемой скоростью биодegradации.

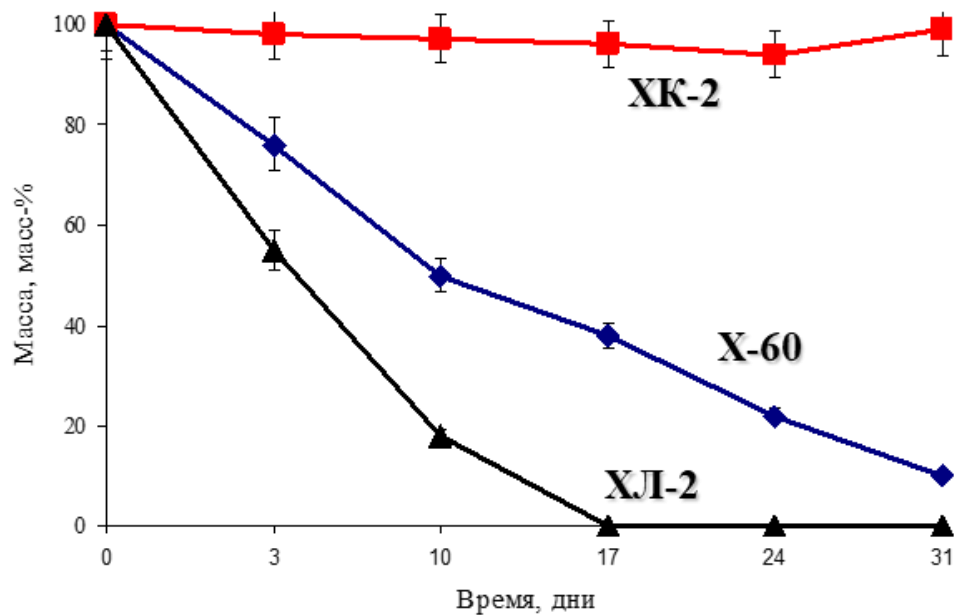


Рисунок 77 – Кинетика деградации образцов гидрогелей в присутствии лизоцима.

Способность полученных образцов на основе немодифицированного хитозана и его производных обеспечивать адгезию и рост животных клеток исследовали *in vitro* культивированием клеток фибробластов мыши L929 в гидрогелях в течение 2-х недель. Для визуализации живых клеток использовали МТТ, который добавляли в среду для культивирования и митохондриальные ферменты метаболически активных клеток расщепляли желтую соль МТТ с образованием фиолетовых кристаллов формазана. Живые клетки видны на всех типах гидрогелей, что указывает на их цитосовместимость (Рисунок 78). Однако в зависимости от химической структуры полимера, из которого был сформован гидрогель, адгезия и рост клеток существенно различались. На гидрогелях, полученных из немодифицированного хитозана Х-60, клетки росли преимущественно поодиночке, расплываясь на стенках пор (Рисунок 78). В

случае культивирования L929 на гидрогелях из хитозана, ацилированного ГКК (образец ХК-2), клетки растут преимущественно на границах пор и местах их пересечения. В отличие от гидрогеля из немодифицированного хитозана, было обнаружено большое количество агрегатов из клеток, превышающих в диаметре 50 мкм. При культивировании на гидрогелях из хитозана с небольшой СП привитой цепи (образец ХЛ-2) клетки или росли по отдельности, распластываясь на поверхности стенок пор, или в виде больших агрегатов, прикрепленных к границам стенок пор или на их пересечении.

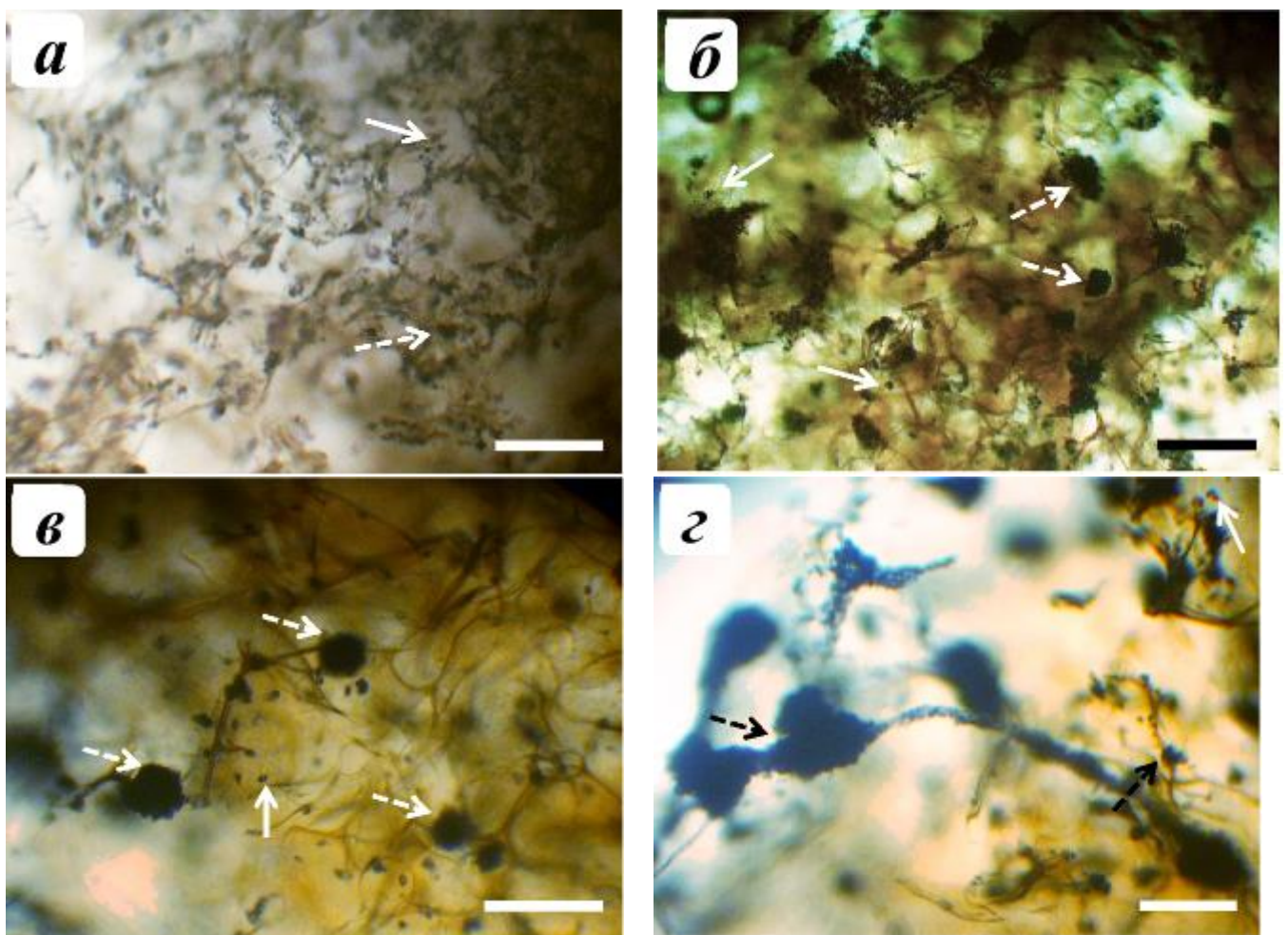


Рисунок 78 – Микрофотографии клеток фибробластов мыши L929 после их культивирования на гидрогелях из хитозана Х-60 (а), ХК-2 (б) и ХЛ-2 (в, г) в течение 2-х недель. Стрелками и пунктирными стрелками указаны отдельные клетки и агрегаты, соответственно. Живые клетки визуализированы МТТ в течение 3-х часов при 37°C. Масштабная линейка 200 мкм

Таким образом, модифицирование химической структуры хитозана путем его ацилирования гидроксикарбоновой кислотой или привитыми цепями олиго(L,D-лактида), позволило получить макропористые гидрогели с требуемой структурой и размером пор, достаточным для их использования в качестве матриц для тканевой инженерии. Химическое модифицирование также обеспечило возможность регулировать дзета-потенциал и сорбцию белков на поверхности образцов, а также скорость биodeградации. Все гидрогели на основе модифицированного хитозана были цитосовместимы, а природа функциональных заместителей оказывает существенно влияние на поведение животных клеток при их длительном культивировании в полученных гидрогелях.

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

Формование макропористых гидрогелей методом лиофильной сушки позволяет варьировать размер пор в достаточно широких пределах, но для некоторых областей тканевой инженерии (например, для регенерации нервной ткани) необходимо создание матриц с четко заданной сложной архитектурой. Одним из основных подходов к созданию таких матриц является лазерная стереолитография, которая основана на сшивании жидкой фоточувствительной композиции под действием остро фокусированного лазерного излучения. В диссертационной работе была оценена эффективность синтезированных производных и сополимеров хитозана в качестве основы фоточувствительной композиции для лазерно-индуцированной стереолитографии. Основные результаты, приведенные в данном разделе, были опубликованы и обсуждены в соавторстве в статьях [348,350,355,378,388–395].

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.

Основной модификацией хитозана, синтезированной для формирования гидрогелей с заданной архитектурой методом лазерно-индуцированной стереолитографии, является его непредельное алкилированное производное – аллилхитозан – который был описан в разделе 2.1.1.1 настоящей диссертационной работы. Использование аллилхитозана в качестве полимерной основы фоточувствительной композиции для одно- и двухфотонной лазерной стереолитографии позволило получить ряд материалов с четко заданной архитектурой (Рисунок 79).

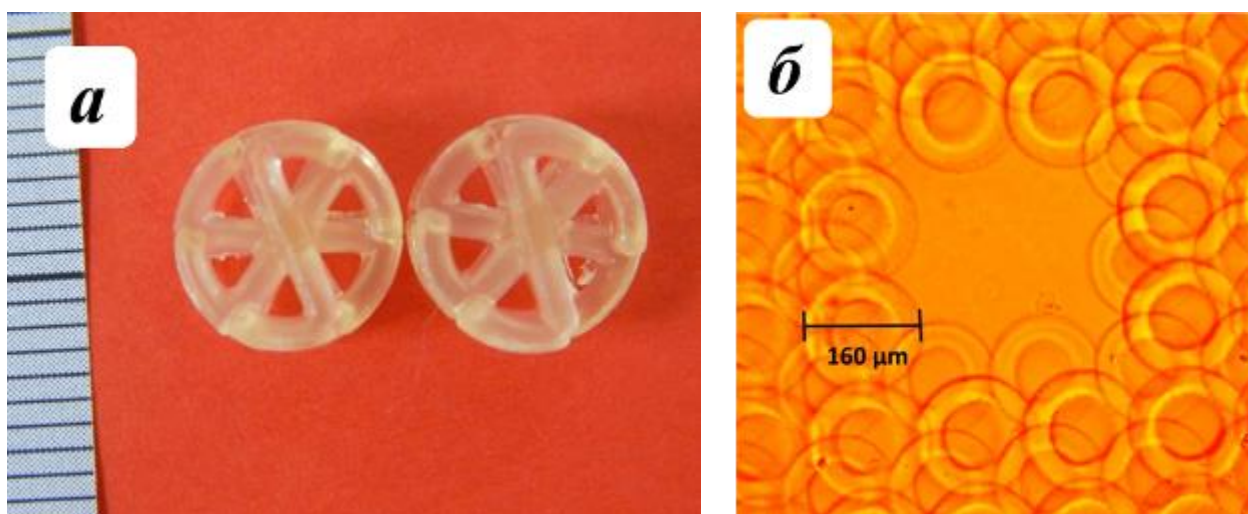


Рисунок 79 – Структуры, полученные одно- (а) и двухфотонной (б) лазерной стереолитографией с использованием аллилхитозана в качестве полимерной основы фоточувствительной композиции

Гидрогели из аллилхитозана, полученные методом двухфотонной стереолитографией были исследованы с точки зрения цитосовместимости с различными клеточными линиями, в т.ч. клетками нервной ткани [388,392]. Показано, что структура материала обеспечивает адгезию первичных культур

клеток гиппокампа, а матриксы сформованные на основе смеси аллилхитозана и метакрилированной гиалуроновой кислоты стимулируют образование отростков нервных клеток и поддерживают формирование нейронных сетей.

Второй тип модифицированного хитозана, который был исследован в качестве полимерной основы фоточувствительной композиции для двухфотонной лазерной стереолитографии – сополимеры хитозана, содержащие привитые фрагменты олиголактида небольшой (образцы ХЛ-1, ХЛ-2 и ХЛ-3) и средней (образцы ХЛЛ-к, ХЛЛ-т и ХЛД-т) длины. Относительно низкая степень полимеризации привитых цепей в случае ХЛ и ХЛЛ/ХЛД образцов ($СП \leq 70$) хотя и придает сополимерам некоторое сродство к органическим растворителям, но недостаточна для кардинального смещения гидрофильно-гидрофобного баланса макромолекул, и они в основном сохраняют свою растворимость в водных средах. Это определяет возможность получения гидрогелей на их основе.

Эффективность процесса двухфотонной лазерной стереолитографии для получения гидрогелей на основе сополимеров хитозана с олиголактидами серии ХЛ изучали в ходе формирования однослойных материалов с помощью оптического микроскопа. При использовании композиций на основе хитозана Х-60 и сополимера ХЛ-1 инициировать процесс сшивания при подборе параметров лазерно-индуцированного структурирования (интенсивность лазера, скорость перемещения лазерного луча) не удалось. В случае композиций на основе сополимеров ХЛ-2 и ХЛ-3 были получены трехмерные структуры, но они характеризовались неоднородностью и нечеткими границами и разрушались при очистке от непрореагировавшего полимера. При введении в фоточувствительную композицию 10 мас.% диакрилата полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДА) удастся сформировать воспроизводимые структуры, которые, однако, не выдерживают очистки от несшитых фрагментов с помощью циклической обработки растворителями. Сформировать пригодные к дальнейшему использованию трехмерные матриксы удалось только с использованием сополимера ХЛ-3 и 20 мас.% ПЭГ-ДА (Рисунок 80). Предполагаемым механизмом сшивания в этом

случае является реакция акрилатных групп ПЭГ-ДА с аминогруппами хитозана, инициируемая воздействием лазерного излучения.

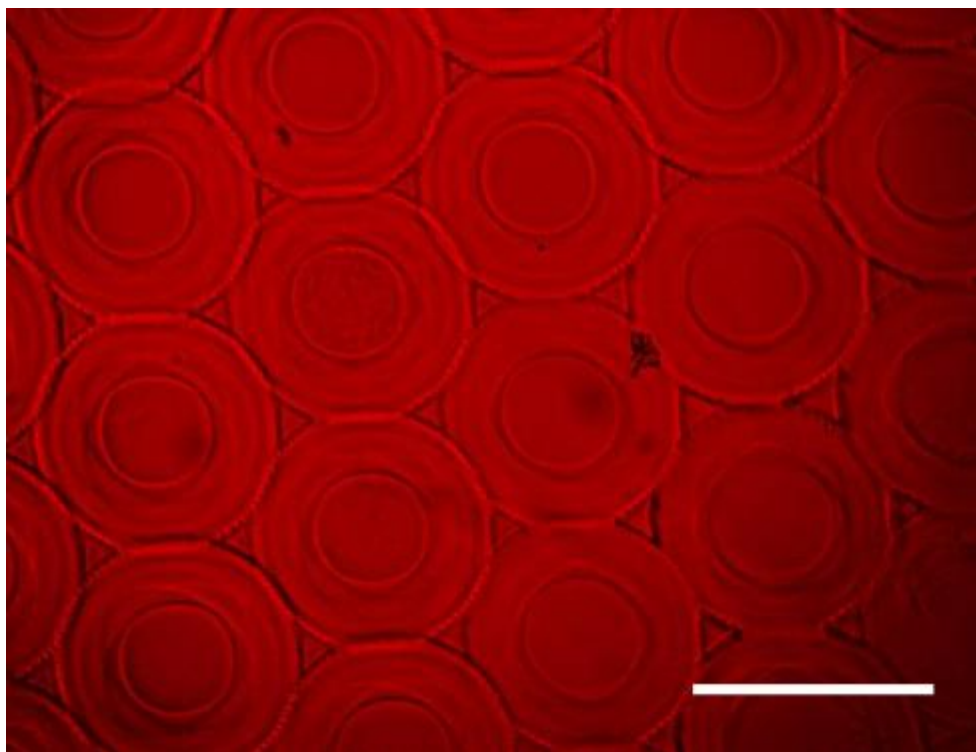


Рисунок 80 – Оптическая микрофотографии структурированного гидрогеля на основе образца ХЛ-3. Масштабная линейка 250 мкм

Таким образом, увеличение степени замещения аминогрупп хитозана и степени полимеризации олиголактида в сополимерах серии ХЛ благоприятствует протеканию процесса сшивки. Вероятно, увеличение СП не только позволило получить более длинные гибкие спейсеры между макромолекулами и большее количество сшивок, но и сместило весовой баланс в сторону гидрофобной составляющей, а значит снизило образование напряженных структур при очистке материала от несшитых фрагментов. Однако даже СП порядка 10 звеньев олиголактида (образец ХЛ-3) не обеспечивает образования устойчивых связей при облучении в отсутствие дополнительного сшивающего агента ПЭГ-ДА.

Исходя из полученных данных, использование сополимеров хитозана, содержащих более длинные цепи олиголактидов с $СП \leq 70$ (образцы серии ХЛЛ/ХЛД), является логичным выбором с точки зрения дальнейшего увеличения

эффективности лазерной стереолитографии. В качестве основы для фоточувствительной композиции исследованы сополимеры, содержащие фрагменты олиго(L,L-лактида) (образцы ХЛЛ-к и ХЛЛ-т) или олиго(L,D-лактида) (образец ХЛД-т). Эффективность каждой из этих систем была оценена не только с точки зрения сшивания под действием лазера, воспроизведения цифровой модели и достаточной прочности полученных структур, но и параметров прохождения лазера, т.е. расстоянием между линиями (параметр XY) и слоями (параметр Z). На рисунке 81 обозначены оптимальные параметры получения гидрогелей из полимеров, которые могут быть использованы в качестве основы фоточувствительной композиции. Только использование сополимеров хитозана X-80 с олиголактидами (образцы ХЛЛ-т и ХЛД-т), а также нативного хитозана X-320 позволяет получить гидрогели методом лазерной стереолитографии. При использовании немодифицированного хитозана X-80 не удастся получить даже устойчивой сшитой линии при воздействии лазера, а при использовании композиции на основе ХЛЛ-к полученные в процессе стереолитографии структуры разрушаются при очистке от несшитых фрагментов. Нативный хитозан X-350 способен к образованию гидрогелей, но получаемые структуры имеют дефекты и низкие деформационно-прочностные характеристики. Гидрогели из X-350 при очистке набухают в 3.5-4 раза и становятся очень хрупкими, что затрудняет дальнейшую работу с ними. Использование образцов ХЛЛ-т и ХЛД-т, содержащих гидрофобные фрагменты, в качестве основы фоточувствительной композиции позволяет получать гидрогели методом лазерной стереолитографии, которые обладают меньшей степенью набухания (3-3.5 и 2 раза, соответственно) и достаточно высокими прочностными характеристиками. Структуры из ХЛД-т полностью воспроизводят модель, в то время как некоторые структуры из ХЛЛ-т имеют дефекты в виде скошенных краев или пор с диаметром, меньше заданного.

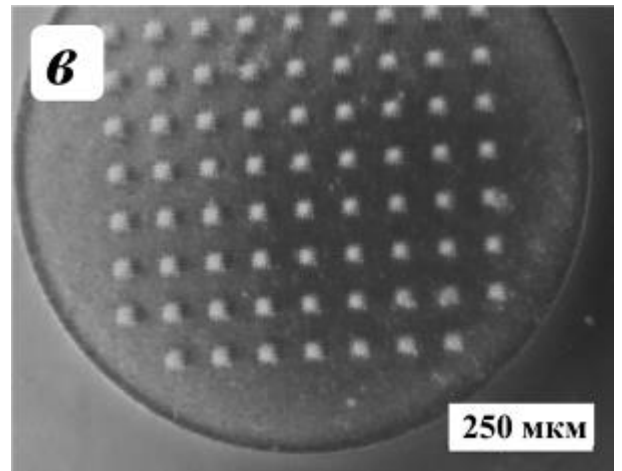
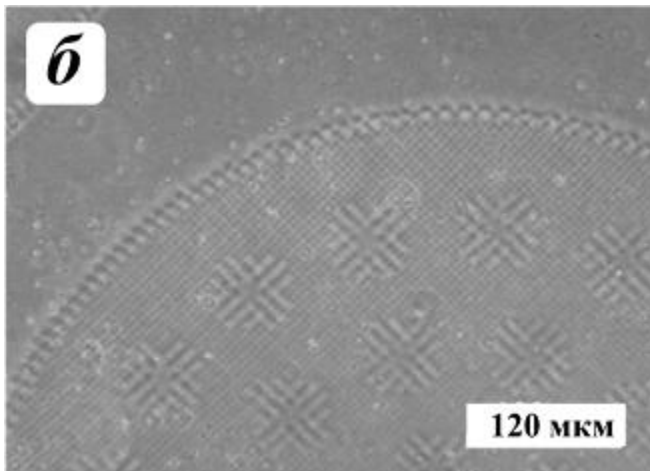
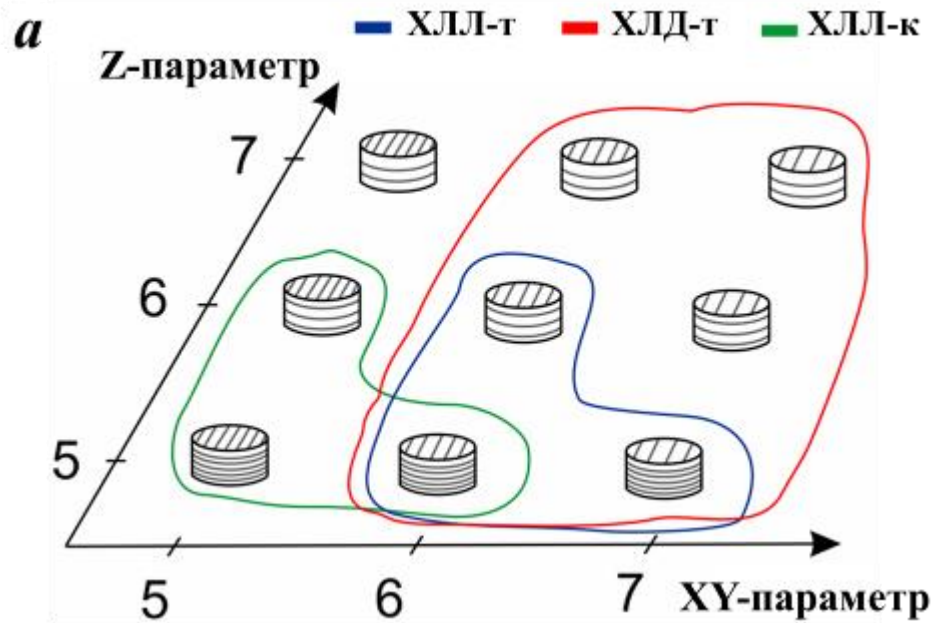


Рисунок 81 – Оптимальные параметры получения гидрогелей на основе сополимеров хитозана со средней СП привитых цепей олиголактоидов (а);
Микрофотографии структур из ХЛЛ-т (б) и ХЛД-т (в)

Исследование эффективности образцов сополимеров со средней длиной привитых цепей подтвердило, что увеличение СП фрагментов олиголактоида повышает реакционную способность фоточувствительной композиции, что хорошо согласуется с данными полученными при исследовании образцов серии ХЛ. Увеличение СП фрагментов олиголактоида позволило снизить содержание ПЭГ-ДА, вводимого в фоточувствительную композицию, при сохранении механической прочности получаемых гидрогелей. Однако пригодность

сополимеров для лазерной стереолитографии зависит не только от СП привитых цепей олиголактида, но и от стереохимического состава привитых фрагментов: введение в структуру хитозана аморфного олиго(L,D-лактида) приводит к более эффективному протеканию процесса лазерно-индуцируемого сшивания, чем при использовании аморфно-кристаллического олиго(L,L-лактида). Вероятно, в случае получения гидрогелей из ХЛЛ-т и ХЛД-т действует тот же фактор, который описан в разделах 2.2.1.1 и 2.2.5.2, посвященных формированию пленок из этих сополимеров методом полива из раствора и гидрогелей методом лиофильной сушки, а именно разный вклад привитых цепей во внутри-/межмолекулярные взаимодействия в растворах сополимеров.

Деформационно-прочностные характеристики получаемых гидрогелей также существенно зависят от свойств полимеров, используемых в качестве основы фоточувствительной композиции, и согласуются с данными механических испытаний пленочных образцов (раздел 2.2.1.1). Значения модуля упругости поверхности гидрогелей, измеренные с помощью нанотвердомера, были логично ниже значений, полученных для сухих пленок, но основные закономерности сохраняются. Наибольший модуль упругости характерен для гидрогелей из ХЛД-т (978 ± 176 Па), что хорошо согласуется с высоким модулем упругости, характерным для пленочного материала, но также может быть связан с высокой эффективностью процессов сшивания этого сополимера при использовании в лазерной стереолитографии. Средние значения модуля упругости гидрогелей из ХЛЛ-т и Х-320 были ниже и составляли 411 ± 74 Па и 518 ± 93 Па, соответственно.

Гидрогели на основе производных и сополимеров хитозана особенно перспективны в качестве матриксов для регенерации нервных тканей, создание которых требует регулирования многих параметров материала (цитосовместимость, скорость биodeградации, деформационно-прочностные характеристики, трехмерная архитектура и т.д.). Исследования по возможности применения гидрогелей на основе сополимера хитозана с олиго(L,L-лактидом) в качестве матриксов для адгезии и роста различных клеточных линий, в том числе нейрональных, показали их соответствие требуемым параметрам [394,395].

Таким образом, функционализированный хитозан, содержащий в боковой цепи как привитые фрагменты олиголактида, так и аллильные заместители, может быть использован для получения биосовместимых гидрогелей с четко заданной архитектурой методом лазерно-индуцированной стереолитографии.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Характеристики исходных соединений

Аллилбромид (99%) поставлен Sigma-Aldrich и использовался без дополнительной очистки.

2,2-Бис(гидроксиметил)пропионовую кислоту (ГКК) фирмы «Merck-Schuchardt» (Германия) для синтеза, с содержанием карбоксильных групп более 99% и $T_{пл} = 159^{\circ}\text{C}$ применяли без дополнительной очистки.

L,D-лактид – цис-(±)-3,6-диметил-1,4-диоксан-2,5-дион - фирмы «PURAC Biochem» (Голландия) с $T_{пл} = 124-128^{\circ}\text{C}$ использовали без дополнительной очистки.

Олиго(L,L-лактид) и *олиго(L,D-лактид)* синтезированы поликонденсационным методом в тонком слое при постоянной продувке реактора сухим азотом (расход газа 200 мл/мин). На первом этапе из реакционной среды удаляли воду при температуре 120°C и остаточном давлении 500 мм, продолжительность отгонки 60 мин. После этого в реактор вводили катализатор SnCl_2 , 0,001% от массы молочной кислоты. Далее происходил непосредственно процесс поликонденсации (время синтеза 360 мин) при плавном повышении температуры от 120°C до 190°C и снижении давления до 10 мм. Конверсия полимера составила 65%. ММ олиголактидов по данным гелепроникающей хроматографии составляет 5 кДа, индекс полидисперсности 2.3.

Аморфно-кристаллический *поли(L,L-лактид)* с молекулярной массой (ММ) 1.6×10^5 , $T_{пл} = 165^{\circ}\text{C}$; *поли(лактид-со-гликолид)* фирмы «Boehringer Ingelheim» (Германия) с $\text{MM} = 5.3 \times 10^4$, $T_{ст} = 60^{\circ}\text{C}$; *полилактид* марки Natureworks 4043D (США) и *поликапролактон* марки «Полиморфус» (Китай) с $\text{MM} 6.7 \times 10^4$ применяли без дополнительной очистки. *Поли(L,D-лактид)* с $\text{MM} 7.6 \times 10^4$ для формования микрочастиц был синтезирован, очищен и охарактеризован в Centre Interfacultaire des Biomatériaux (CEIB) de l'Université de Liège (Льеж, Бельгия).

В работе использовали, как образцы *хитозана*, полученного из хитина панцирей краба твердофазным синтезом [68,170], так и коммерческие образцы хитозана, полученные суспензионным деацетилированием (Таблица 25). Характеристики образцов хитозана, используемые для синтеза производных и сополимеров, описаны в данном разделе, а характеристики образцов хитозана, используемых для получения некоторых типов матриц, приведены в разделах, посвященных их формования.

Таблица 25 – Характеристики образцов хитозана

Образец хитозана	Характеристики		
	ММ	СА	Получение
X-60	60	0.1	твердофазное реакционное смешение, ИСПМ РАН
X-80	80	0.15	
X-350	350	0.15	«Сонат», Россия
X-190	190	0.13	«Roeper», Германия
X-320	320	0.11	«Биопрогресс», Россия)

Для синтеза аллилированных производных использовали хитозан X-80 с ММ 80 кДа и СА 0.15, полученный методом твердофазного реакционного смешения из хитина (Xiamen Fine Chemical Import & Export CO., LTD, Китай). Часть образцов аллилхитозана были получены с использованием хитозана образец X-AX, который получали методом твердофазного реакционного смешения хитина (Xiamen Fine Chemical Import & Export CO., LTD, Китай) и NaOH в 3-х мольном избытке щелочи при температуре соэкструдирования 160 °С и использовали его в качестве промежуточного компонента, без предварительной очистки от остатков щелочи и ацетата натрия. После очистки образец хитозана X-AX имеет ММ 80

кДа, СА 0.15 и по своим характеристикам аналогичен образцу хитозана Х-80. Для синтеза N-ацелированных ГКК производных хитозана, синтеза привитых сополимеров хитозана с короткими боковыми цепями лактида (образцы серии ХЛ) и с высокомолекулярными сложными полиэфирами (образцы серии ХП, ХПГ, ХП-Ж) использовали хитозан Х-60 с ММ 60 кДа и СА 0.1, полученный методом твердофазного реакционного смешения хитина из дальневосточного краба (Россия). Для синтеза сополимеров с олиго(L,L-/L,D-лактидами) использовали хитозан Х-80 (для образцов ХЛЛ-т, ХЛД-т, ППХОЖ) или хитозан Х-350 с ММ 350 кДа и СА 0.15 («Сонат», Россия) (для образцов ХЛЛ-к и ХО-К). Содержание золы во всех образцах хитозана не превышало 0.5%, влаги 5%.

Образцы хитозана характеризовали методами потенциометрического титрования, ¹H ЯМР, ИК-спектроскопией; ММ и ММР оценивали вискозиметрически по уравнению Марка-Куна-Хаувинка по ММ фракций, полученных дробным осаждением изопропанолом; степень кристаллическости оценивали методом рентгеноструктурного анализа, как это показано в [174].

Образцы *нанокристаллического хитина*, выделенные из хитина марки «Комбио» (Россия) и «Xiamen Fine Chemical» (Китай), были получены как описано в [373] и маркированы как образец нХ-К и нХ-Х, соответственно. Согласно данным АСМ, морфология выделенных нанокристаллов существенно различалась несмотря на то, что оба образца исходного хитина были получены из панциря крабов. Средняя длина нанокристаллов хитина составляла 181 ± 63 нм и 131 ± 94 нм; диаметр 65 ± 14 нм и 93 ± 42 для образца нХ-Х и нХ-К, соответственно. Степень анизотропии в случае нХ-Х составляла 2.8, а для нХ-К 1.4.

3.2. Синтез и исследование производных и привитых сополимеров хитозана

3.2.1. Синтез производных и привитых сополимеров хитозана

3.2.1.1. Синтез аллилхитозана

Синтез непредельного производного хитозана – аллилхитозана – проводили методом твердофазного реакционного смешения хитозана и аллилбромида в двухшвенковом экструдере «Verstorff» (Германия) как это описано в [347,348]. Для синтеза аллилированных производных на первом этапе методом твердофазного реакционного смешения проводили деацетилирование хитина (Xiamen Fine Chemical Import & Export CO., LTD, Китай) в присутствии 3-х кратного мольного избытка NaOH при температуре соэкструдирования 160 °С. Полученный хитозан (образец X-AX) был использован в качестве промежуточного компонента. Полученная после твердофазного деацетилирования хитина система содержала хитозан 52±2%, гидроксид натрия 25±2% и ацетат натрия 23±2%. Для получения аллилированных производных к этой системе добавляли аллилбромид в различном соотношении и проводили соэкструдирование при температуре рабочих зон от 0 до –5 °С. Соэкструдированием очищенного от щелочи хитозана X-80 (ММ 80 кДа, СА 0.15) и аллилбромида был получен образец аллилхитозана AX-1. Для образцов AX-1 и AX-2 мольное соотношение аллилбромида к звену хитозана составляло 0.5; для AX-3 – 1.0; для AX-4 – 1.5; для AX-5 – 2.0. Мольное содержание щелочи в образцах AX-2 – AX-5 составляло 2 моля NaOH на звено хитозана. Полученные продукты очищали от непрореагировавшего аллилбромида и щелочи изопропанолом и диализом против воды. Далее образцы растворяли в 0.1М HCl, высаживали 1М NaOH, отмывали дистиллированной водой и сушили лиофильно.

3.2.1.2. Синтез хитозана, N-ацелированного гидроксикарбоновой кислотой

Условия синтеза продуктов взаимодействия хитозана и гидроксикарбоновой кислоты (ГКК) (образцы с маркировкой ХК) подробно описаны в [352]. Реакционное смешение хитозана Х-60 (ММ 60 кДа, СА 0.1) и ГКК проводили при эквимольном соотношении компонентов (45 мас.% ГКК, образец ХК-1) и при трехкратном мольном избытке кислоты (71 мас.% ГКК, образец ХК-2); температура со-экструдирования в обоих случаях составляла 100°C. Скорость вращения шнеков экструдера 60-100 об/мин, время пребывания образца в зоне деформирования 5-10 мин.

3.2.1.3. Синтез сополимеров хитозана с короткими привитыми цепями олиго(L,D-лактида)

Твердофазный синтез ацелированных L,D-лактидом производных хитозана и полимеризацию лактида с раскрытием цикла в присутствии хитозана осуществляли путем соэкструдирования хитозана Х-60 и L,D-лактида (маркировка образцов – ХЛ) при различных соотношениях компонентов и температурах обработки [353,358]. Условия проведения процессов представлены в таблице 3. Скорость вращения шнеков экструдера составляла 80-100 об/мин, время пребывания образца в зоне деформирования 5-10 мин. Реакционное смешение компонентов осуществляли при мольном недостатке лактида (31 мас.%) (образец ХЛ-1), эквимольном соотношении компонентов (47 мас.% лактида) (образец ХЛ-2) и трехкратном мольном избытке лактида (73 мас.%) (образец ХЛ-3).

3.2.1.4. Синтез сополимеров хитозана со средней степенью полимеризации привитых цепей олиголактида

Сополимеры хитозана, содержащие привитые фрагменты олиголактида со $СП \leq 70$, получали методом твердофазного реакционного смешения хитозана (Х-

80 или X-350) и олиголактида в опытно-промышленном двухшнековом экструдере “Verstorff ZE-40” (Германия). Характеристики исходных компонентов, их соотношение и условия проведения синтеза представлены в Таблице 26.

Таблица 26 – Условия процесса и выход продуктов реакции

Образец	Соотношение компонентов (мас-%)	Т соэкструдирования (°С) / количество прогонов
ХЛЛ-т	Х-80 /олиго(L,L-лактид) 40/60	55 / 1
ХЛД-т	Х-80 /олиго(L,D-лактид) 40/60	55 / 1
ХЛЛ-к	Х-320 /олиго(L,L-лактид) 50/50	55 / 1

3.2.1.5. Синтез сополимеров хитозана с высокомолекулярными полиэфирами

Образцы получали реакционным смешением компонентов в экструдере при массовом соотношении компонентов хитозан (X-60) : поли(L,L-лактид) равном 40 : 60 и 60 : 40 (маркировка образцов – ХП); хитозан : поли(лактид-со-гликолид) 60 : 40 (маркировка образцов – ХПГ) (Таблица 27). Исходные компоненты предварительно смешивали в экструдере при 50°С и скорости вращения шнеков 100 об/мин. Реакционное смешение проводили при скорости вращения шнеков 80-120 об/мин и температурах, не превышающих температуру плавления поли(L,L-лактида) или температуру стеклования поли(лактид-со-гликолида), т.е. при 130 и 60°С, соответственно.

Таблица 27 – Условия получения образцов смесей хитозана и сложных полиэфиров

Образец	Массовое содержание компонентов, %			Температура обработки, °С
	Хитозан	Поли(L,L-лактид)	Поли(лактид-со-гликолид)	
ХПГ	60	–	40	60
ХП-40/60	40	60	–	130
ХП-60/40	60	40	–	130

3.2.1.6. Получение привитых сополимеров хитозана, наполненных желатином и коллагеном

Для исследования возможности одновременной иммобилизации биологически активных компонентов в процессе твердофазного синтеза получали многокомпонентные системы на основе сополимеров хитозана с олиго/полиэфирами с добавлением коллагена или желатина в реакционную систему. Соплимер ХП-Ж получен методом твердофазного реакционного смешения в опытно-промышленном двухшнековом экструдере “Berstorff ZE-40” хитозана Х-60 (ММ 60 кДа, СД 0.9), поли(L,L-лактида) (ММ 160 кДа) и желатина при соотношении компонентов хитозан : желатин : поли(L,L-лактид) равном 52/13/35 и температуре соэкструдирования 100°С. Образец ХО-К получен смешением хитозана Х-350 (ММ 350 кДа, СА 0.15), олиго(L,L-лактида) (ММ 5 кДа) и коллагена при соотношении компонентов равном 46.5/50/3.5 и температуре соэкструдирования 55°С [356]. Соплимер ППХОЖ, сочетающий в себе хитозан Х-350, желатин, олиго-/полилактид и коллаген, был получен путем последовательного со-экструдирования как описано в [362]. На первом этапе в экструдере смешивали хитозан (Х-80) и желатин при соотношении 50/50 г/г, затем добавляли олиго(L,L-лактид) в соотношении 0.25 моль на звено хитозана и соэкструдировали при 60°С. Эти условия были выбраны для предварительной прививки фрагментов олиголактида на хитозан, чтобы облегчить дальнейшее смешение и прививку на хитозан/желатин высокомолекулярных фрагментов

полиэфиров (т.е. полилактида и поликапролактона) путем соэкстудирования с ними при 30°C. Финальное соотношение синтетических (олиго/полилактид, поликапролактон) и природных (хитозан/желатин) компонентов составляло 60/40 г/г. Весовой состав многокомпонентного сополимера ППХОЖ: поликапролактон/полилактид/ хитозан/олиголактид/желатин 18/37/20/5/20 г/г.

3.2.2. Методы исследования производных и сополимеров хитозана

3.2.2.1. Фракционирование продуктов твердофазного синтеза

Количество прореагировавшей сореагента оценивали по массе после очистки полученных смесей этанолом (образцы ХК) или хлороформом (образцы ХЛ). Навеску образца (≈ 1 г) в 20 мл органического растворителя перемешивали при комнатной температуре в течение 8 ч, отделяли фильтрованием через бумажный фильтр, сушили в термошкафу при 105°C до постоянной массы.

Фракционирование N-ацелированных производных хитозана в водной среде проводили следующим образом. Предварительно высушенную навеску образца (1–2 г) в течение 2 ч растворяли в 70 мл деионизованной воды при постоянном перемешивании. Нерастворимую часть отделяли центрифугированием, дополнительно промывали деионизованной водой, сушили из замороженного состояния в вакууме. Растворимую в воде фракцию осаждали 5%-ным NH_4OH , контролируя значения pH. Осадок, образовавшийся при значениях pH 7.5 и 10, последовательно отделяли центрифугированием, промывали деионизованной водой и сушили из замороженного состояния в вакууме.

Фракционирование образцов смесей хитозана и сложных полиэфиров в водной среде проводили по следующей схеме. Навеску образца (~ 1 г) растворяли в 70 мл 4%-ной муравьиной кислоты в течение 24-х часов при постоянном перемешивании. Нерастворимую в кислой водной среде фракцию отделяли центрифугированием, промывали деионизованной водой до нейтральных значений pH, сушили в вакууме из замороженного состояния. Растворимую

фракцию осаждали 5%-ным NH_4OH , отделяли центрифугированием, промывали водой до $\text{pH}=7$, замораживали и сушили в вакууме из замороженного состояния.

3.2.2.2. ИК-спектроскопия

В качестве одного из основных методов структурного анализа продуктов реакционного смешения использовалась инфракрасная спектроскопия. ИК-спектры образцов снимали на спектрометре Bio-Rad (Digilab) FTS-40 при разрешении 4 см^{-1} . Регистрацию и обработку спектров проводили с помощью пакета программ Win-IR версия 4 (Bio-Rad, Digilab Division). Образцы готовили в виде запрессованных в вакууме таблеток, содержащих навеску исследуемого образца в количестве 0.0020-0.0040 г растёртую с 1.5-2 г KBr. Режим записи ИК-спектров: область сканирования от 4000 до 200 см^{-1} , время интеграции – 1с, шаг сканирования – 8 см^{-1} , ширина щели 8 см^{-1} . Спектры всех исследованных продуктов, содержащих хитозан, нормированы с использованием в качестве внутреннего стандарта составной полосы валентных колебаний C–O пиранозного цикла 1075 см^{-1} .

Основная часть исследований образцов производных и сополимеров хитозана методом ИК-спектроскопии была выполнена в сотрудничестве с ныне покойным к.х.н. Владимировым Л.В. (Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН), который был не только высококвалифицированным специалистом, но и замечательным Человеком, о котором автор вспоминает с огромным теплом и благодарностью.

3.2.2.3 Элементный анализ

Оценку содержания N-ацелированных звеньев хитозана в продуктах реакционного смешения проводили на основе данных элементного анализа образцов, очищенных от ионносвязанной кислоты ее нейтрализацией щелочью с дальнейшим удалением низкомолекулярных примесей диализом против дистиллированной воды. Навеску образца (1–2 г) растворяли в деионизованной воде в течение 2 ч, добавляли 4%-ный раствор NaOH до $\text{pH} 10$. Полученный

раствор вместе с нерастворимыми и осажденными при нейтрализации кислоты продуктами помещали в диализный мешок с пределом отсечения по ММ = 3.5×10^3 и проводили длительную экстракцию (в течение недели) до полного удаления примесей. Очищенные продукты сушили из замороженного состояния в вакууме.

Количество привитых сополимеров в смесях хитозана и сложных полиэфиров рассчитывали по данным элементного анализа фракций, полученных при фракционировании образцов в 4%-ной муравьиной кислоте. Навеску смеси (~1 г) растворяли в 70 мл раствора муравьиной кислоты в течение 2-х часов при постоянном перемешивании. Нерастворимую в кислой среде фракцию отделяли центрифугированием, промывали деионизованной кислотой до нейтральных значений рН, сушили в вакууме из замороженного состояния. Растворимую фракцию осаждали 4%-ным раствором NaOH и помещали в диализный мешок с пределом отсечения по ММ = 3.5×10^3 и проводили экстракцию (в течение 48-ми часов) до удаления низкомолекулярных примесей, замораживали и сушили в вакууме из замороженного состояния.

Элементный анализ выполняли на элементном анализаторе “FLASH 1112”. Расчет степени ацилирования проводили, исходя из изменения соотношения C:N в образцах относительно исходного хитозана. Содержание звеньев хитозана рассчитывали по формуле:

$$X = A_{Mi} \times \mathcal{E} / A_{\mathcal{E}},$$

где X – содержание мономера M_i (хитозан) в сополимере, мас.%; \mathcal{E} – определенное экспериментально количество элемента (N) в навеске, мас.%; A_{Mi} – атомная масса звена мономера (хитозан) M_i ; $A_{\mathcal{E}}$ – атомная масса элемента \mathcal{E} , содержащегося в звене M_i .

3.2.2.4. Потенциметрическое титрование

Степень ацилирования аминогрупп хитозана растворимых фракций продуктов реакционного смешения хитозана с мономерной гидроксикарбоновой кислотой (ГКК) и циклическим димером молочной кислоты (L,D-лактид)

определяли потенциометрическим титрованием на универсальном иономере ЭВ-74. Навеску исследуемого образца 0.05–0.1 г, взятую с точностью 0.0002 г, растворяли в 6–8 см³ 0.1 М раствора соляной кислоты при перемешивании в течение 1 ч. Титрование полученного раствора проводили при его постоянном перемешивании магнитной мешалкой, добавляя порциями 0.1 М раствор NaOH и фиксируя величину объема титранта и рН. По полученным данным строили кривую потенциометрического титрования. Расчет степени ацилирования хитозана проводили по формуле:

$$CA = \frac{n_{re}}{n_{chs} + n_{ch} + n_{re}} \times 100\% ,$$

где n_{chs} – число молей свободных аминогрупп хитозана; n_{ch} – число остаточных звеньев хитина; n_{re} – число ацилированных звеньев хитозана.

3.2.2.5. Динамическое лазерное светорассеяние

Измерения методом динамического светорассеяния проводили на приборе Zetatrac (Microtrac, США) с использованием ПО Microtrac V 10.5.3 (таблица 2.6.) для определения размеров макромолекулярных ассоциатов в растворах хитозана, его производных и сополимеров.

3.2.2.6. Ядерный магнитный резонанс

Исследования образцов смесей хитозана и сложных полиэфиров методом ¹H ЯМР проводили по следующей методике: навеску образца (≈10 мг) в течение 2-х часов растворяли в 600 мкл CDCl₃ и проводили исследования на установке Bruker 250. Полученные спектры обрабатывали в MestReNova V.5-3-0-4536 (Mestrelab Research S.L.). ¹H ЯМР (300 МГц, D₂O) спектры аллилированных производных хитозана снимали на Bruker-Avance II-300 при 90 °С.

Автор выражает глубочайшую признательность Г.В. Черкаеву (ИСПМ РАН) за регистрацию и анализ ЯМР-спектров образцов аллилхитозана.

3.2.2.7. УФ-спектрофотометрия

Спектры поглощения растворов исследуемых растворов регистрировали на спектрофотометре “Shimadzu UV 2501 PC” (“Shimadzu”, Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см. Анализ спектральных данных для всех растворов проводили после вычитания вклада соответствующего растворителя. Для записанных спектров было проведено математическое разделение полос, относящихся к поглощению и рэлеевскому рассеянию, а затем выполнено разложение спектров поглощения на отдельные полосы.

Автор выражает глубочайшую благодарность за помощь в проведении спектрофотометрических исследований Е.А. Свидченко и к.ф.-м.н. Н.М. Сурина (ИСПИМ РАН).

3.2.2.8. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Состояние реакционных систем после деформирования в разных условиях (соотношение реагентов, температура обработки, наличие дополнительной термической обработки) изучали методом анализа ДСК нативных смесей. Измерения проводили на микрокалориметре Perkin-Elmer DSC-7 (США) с чувствительностью датчика – 8 мкВ/см; собственным шумом датчика (среднеквадратичным) – 2 мкВ; точностью калориметрических измерений >1%; емкостью тигля для образцов до 50 мкл; температурным диапазоном измерений - 25÷750°C; точностью измерений температуры $\pm 0.1^\circ\text{C}$.

Перед проведением измерений температурную шкалу и чувствительность прибора калибровали по температурам и энтальпиям плавления металлических In (156.6°C, 28.48 Дж/г) и Zn (419.47°C, 108.44 Дж/г) стандартов. Измерения проводили в герметичных тиглях при скорости нагревания 10 К/мин в диапазоне температур 25-185°C. Масса образцов в разных экспериментах варьировалась в пределах 2.0 - 4.0 мг. Полученные данные обрабатывали с помощью пакета ПО NETZSCH Proteus Thermal Analysis (V.4.8.4). Автор выражает глубокую благодарность за помощь в проведении исследований методом ДСК к.х.н.

Шеголихину А.Н. (Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН) и к.х.н. Аксеновой Н.А. (ИХФ РАН).

3.3. Методы получения материалов на основе хитозана, его производных и привитых сополимеров

3.3.1. Пленочные материалы

3.3.1.1. Получение пленок из хитозана, его производных и сополимеров из водных растворов

Пленки в основной форме, описанные в разделе 2.2.1.1, получали методом сухого формования из 1 мас.% растворов хитозана Х-60 (ММ 60 кДа, СА 0.1) или хитозана Х-350 (350 кДа, СА 0.15) в 2% уксуснокислых водных растворах на полистирольную чашку Петри в беспылевом шкафу при комнатной температуре в течение ~ 48 часов. Для перевода пленок в основную непротонированную форму их последовательно выдерживали в 25%, 10% и 1% водных растворах NH_4OH в течение 10, 30 и 60 минут, соответственно; затем тщательно отмывали бидистиллятом в течение, как минимум, суток, меняя бидистиллят; сушили в беспылевом шкафу при комнатной температуре.

Пленки из N-ацелированного гидроксикарбоновой кислотой хитозана (ХК-1) и сополимеров хитозана с олиго/полиэфирами (ХЛЛ-т, ХЛЛ-г, ХЛД-т, ХЛЛ-к, ХЛЛ-к), а также образцов хитозана, которые были использованы для синтеза вышеуказанных производных и сополимеров, и описаны в разделе 2.2.1.1 формовали по следующей методике. Растворы производных (ХК-1) в воде, растворы ХЛЛ-т, ХЛД-т, ХЛЛ-к в 2% CH_3COOH с концентрацией 2 мас.% фильтровали через эфироцеллюлозный фильтр с диаметром пор 0.8 мкм и формовали методом полива на чашках Петри из полистирола. Сушили при комнатной температуре в течение 24 ч в беспылевом шкафу.

3.3.1.2. Формование пленок из сополимеров хитозана с высокомолекулярными полиэфирами

Пленки из сополимеров хитозана и сложных полиэфиров, описанные в разделе 2.2.1.2, формовали двумя методами: горячим прессованием или методом сухого формования из растворов. Методом формования из расплава были получены пленки из ХП-40/60 и ХП-60/40, а так же модельная пленка исходного поли(L,L-лактида). Прессование проводили между двумя политетрафторэтиленовыми подложками при 180°C с последующим закаливанием или отжигом образцов. Для выявления надмолекулярной структуры композитных пленок применяли травление кислородом плазмы высокочастотного тлеющего разряда.

Методом сухого формования готовили пленки из дисперсии ХП-Ж в CH_2Cl_2 методом полива на стеклянную подложку. Стабильную дихлорметане фракцию отбирали по следующей схеме: навеску образца ХП-Ж растворяли в дихлорметане (5 мас.%) в течение 2-х часов при постоянном перемешивании на магнитной мешалке, выдерживали в течение 2-х суток при комнатной температуре и пипеткой отбирали пробу из середины образца. Пленки сушили при комнатной температуре в равновесных условиях до полного высыхания (~ 7 суток), толщина сформованных пленок составляла ~ 100 мкм.

3.3.2. Получение микроволокнистых материалов методом электроформования

Нетканые волокнистые материалы из стабильных в хлороформе фракции ХО-К, ХП-Ж и ППХОЖ, а также из немодифицированного полилактида получали методом электроформования, как описано в [356,362,372]. Нетканые образцы из ППХОЖ были получены на установке ESR100D NanoNC (Корея) из 15 мас.% растворов ППХОЖ в хлороформе, при напряжении 23-26 кВ на стальную подложку (30×30 см), отстоящую от сопла на 20 см. Нетканые материалы, содержащие ХО-К и ХП-Ж, были сформованы на лабораторных установках,

описанных в [356,396]. Основные характеристики формовочных растворов (электропроводность, вязкость и поверхностное натяжение) были исследованы, как описано в [356,362,372]. Автор выражает глубокую благодарность А.С. Курьяновой и д.х.н. П.С. Тимашеву (ИХФ им. Н.Н. Семенова РАН, Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России), а также член-корр. РАН д.х.н. С.Н. Чвалуну (ИСПМ РАН, НИЦ «Курчатовский институт») за сотрудничество в области получения нетканых материалов из синтезированных сополимеров хитозана.

3.3.3. Получение сферических микрочастиц на основе хитина, хитозана и его сополимеров с олиго/полиэфирами

Микрочастицы получали методом испарения растворителя из эмульсий масло/вода. Исследована возможность использования хитина, хитозана и его сополимеров с олигоэфирами в качестве эмульгаторов в дисперсионной среде. В случае немодифицированного хитозана, его ацилированных гидроксипропионовой кислотой производных (ХК-1 и ХК-2) и сополимеров хитозана с олиголактидами (серии ХЛ и ХЛЛ/ХЛД, ХО-К) их использовали в качестве дисперсионной среды в виде 2% растворов в 2% уксусной кислоте. Водные дисперсии нанокристаллического хитина (нХ-К и нХ-Х) использовали в качестве дисперсионной среды в различных концентрациях: 0.1, 0.5 и 1 мас.%. Наночастицы из хитина и его ацилированного ГКК производного получали методом контролируемого осаждения путем добавления NaOH в 2% растворы соответствующих полимеров в 2% уксусной кислоте до достижения pH 6.5 и обработки УЗ с частотой 23 кГц в течение 3 мин. Во всех перечисленных случаях, кроме использования образцов серии ХЛ и сополимеров хитозана с высокомолекулярными полиэфирами, дисперсная фаза состояла из раствора полилактида (Natureworks 4043D, США) в смеси дихлорметан:ацетон (9:1 об/об); для образцов серии ХЛ и сополимеров хитозана с высокомолекулярными полиэфирами использовали поли(L,D-лактид), синтезированный в Centre Interfacultaire des Biomateriaux (CEIB) de l'Université de Liège (Льеж, Бельгия). В

качестве системы сравнения также были получены микрочастицы из полилактида, с использованием 2.5 мас.% раствора ПВС (марка 3-83 «Mowiol», ММ 18 кДа) в качестве дисперсионной среды.

При исследовании возможности использования сополимеров хитозана с олиго/полиэфирами в дисперсной фазе микрочастицы получали без введения эмульгатора в дисперсионную среду (т.е. бидистиллированная вода). Дисперсная фаза в этом случае состояли или из соответствующего сополимера или его смеси с поли(L,D-лактидом), синтезированным в Centre Interfacultaire des Biomatériaux (CEIB) de l'Université de Liège (Льеж, Бельгия). В качестве растворителя в дисперсной фазе во всех случаях использовали смесь дихлорметан:ацетон (9:1 об/об); соотношение дисперсной фазы и дисперсионной среды составляло 1:9 об/об. Получение микрочастиц проводили по следующей методике: дисперсную фазу вводили в дисперсионную среду в условиях механического перемешивания со скоростью 500 или 700 об/мин при помощи верхнеприводной 4-х лопастной мешалки. Процесс проводили до полного испарения органических растворителей (~3 часа). Полученные микрочастицы промывали деионизованной водой, фракционировали с помощью набора стандартных сит, замораживали и сушили под вакуумом из замороженного состояния. Выход микрочастиц и вклад каждой фракции оценивали гравиметрически по отношению массы микрочастиц в данной фракции и массе компонентов в дисперсной фазе. Общий выход микрочастиц рассчитывали суммированием выхода всех фракций. Более подробно методика получения микрочастиц была опубликована в [353,373,375–378].

3.3.4. Поверхностно-селективное лазерное спекание микрочастиц из полилактида, стабилизированных хитозаном или его сополимером

Получение трехмерных материалов из микрочастиц методом ПСЛС осуществляли с помощью оригинальной установки, состоящей из одномодового тулиевого волоконного инфракрасного лазера TLM-3 (НТО «ИРЭ-полюс») с длиной волны 1.9 мкм, описанной в [379,397]. Плотность мощности лазера достигала 1.2×10^2 Вт/см²; диаметр пятна около 280 мкм в рабочем поле диаметром

30 или 50 мм с возможностью увеличения до 140 мм; скорость перемещения лазерного пятна и плотность заливки варьировались. Высокая производительность лазерной части установки обеспечивается использованием системы доставки лазерного излучения, основанной на высокоскоростном двухзеркальном гальваносканере и инфракрасном F-theta объективе (SL-2000-100-160, RonarSmith, Сингапур). Спекание микрочастиц проводили послойно с автоматическим формированием каждого слоя и его увлажнением с помощью ультразвукового пьезоэлемента, обеспечивающего интенсивный поток мелкодисперсного водяного тумана на целевую поверхность с производительностью до 1 мг в секунду.

Работы по поверхностно-селективному лазерному спеканию микрочастиц проводились во ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. Автор выражает глубочайшую признательность д.х.н. Тимашеву П.С. (Сеченовский Университет, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН), к.ф.-м.н. Минаеву Н.В. (ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН) и их команде за сотрудничество в получении структурированных материалов для регенеративной медицины.

3.3.5. Получение макропористых гидрогелей на основе хитозана методом лиофильной сушки

3.3.5.1. Получение макропористых гидрогелей на основе ионно и ковалентно сшитого хитозана

Для получения макропористых композиционных гидрогелей на основе полиэлектролитного комплекса хитозана и гиалуроновой кислоты на первом этапе навески наночастиц гидроксиапатита диспергировали в 1 мас.% водном растворе натриевой соли гиалуроновой кислоты с ММ 1×10^6 фирмы «Shiseido» (Япония) в течение 15 мин с использованием УЗ-ванны с частотой 35 КГц. Таким образом были получены дисперсии с содержанием 1, 5 и 10 мас.% нГА по отношению к массе сухой ГК в растворе. В качестве контроля также использовали раствор ГК без нГА, но обработанный УЗ в тех же условиях. Далее по 10 мл полученных

растворов/дисперсий замораживали при -5°C и сушили лиофильно. Для получения полиэлектролитных комплексов сформованные губки инкубировали в 30 мл 1 мас-% раствора хитозана X-60 (ММ 60 кДа, СА 0.1) в 2% CH_3COOH в течение 2-х часов при комнатной температуре. Далее, гели отмывали от избытка хитозана бидистиллятом до нейтральных значений pH, замораживали при -5°C и сушили лиофильно. Таким образом, были получены образцы:

ГК/Х – из раствора ГК, не содержащего нГА;

ГК/Х/нГА-1 – из раствора ГК, содержащего 1 мас-% нГА;

ГК/Х/нГА-5 – из раствора ГК, содержащего 5 мас-% нГА;

ГК/Х/нГА-10 – из раствора ГК, содержащего 10 мас-% нГА.

Макропористые сшитые гидрогели на основе хитозана получали лиофильной сушкой гелей хитозана, сшитых различными сшивающими агентами. Варьировали как макромолекулярные характеристики хитозана (использовали хитозан с ММ 190 кДа и СА 0.13 («Roerig», Германия) или хитозан с ММ 320 кДа и СА 0.11 («Биопрогресс», Россия)), так и природу сшивающего агента (дженипин или глутаровый альдегид). Гели получали следующим образом: уксуснокислые водные растворы хитозана X-320) и X(190), доводили до pH 5.6 добавлением раствора NaOH для регулирования процесса сшивки [380,381]. Добавляли необходимое количество сшивающего агента (для систем на основе X-320 – 0.01 Дж(ГА)/ NH_2 ; для X-190 – 0.05 Дж(ГА)/ NH_2) и выдерживали в течение времени, необходимого для гелеобразования. В представлен Состав и условия получения образцов представлены в таблице 28. Для формирования пор полученные гели замораживали при -5°C и сушили лиофильно. Некоторые из образцов содержали гиалуронат натрия (ММ 30 кДа фирмы «Shiseido», Япония), который вводили в состав гидрогелей различными методами.

Таблица 28 – Состав и условия получения гидрогелей на основе ковалентно-сшитого хитозана, в том числе содержащих гиалуроновую кислоту

Маркировка образца	Хитозан, кДа	Сшивающий реагент	Метод введения ГК*
X(320)-ГА	320	ГА	–
X(320)-Дж	320	Дж	–
X(190)-Дж	190	Дж	–
X(320)-Дж-1	320	Дж	(1)
X(190)-Дж-1	190	Дж	(1)
X(320)-Дж-2	320	Дж	(2)
X(190)-Дж-2	190	Дж	(2)

* (1) предварительно сформованные макропористые гидрогели из сшитого хитозана инкубировали в растворе ГК; (2) ГК вводили непосредственно в раствор хитозана, содержащий сшивающий агент.

Автор выражает глубокую благодарность заведующей кафедрой д.х.н. Кильдеевой Н.Р. (кафедра «Химия и технология полимерных материалов и нанокompозитов» Российского государственного университета им. А.Н. Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)) за сотрудничество в области формирования сшитых глутаровым альдегидом и дженипином гидрогелей на основе хитозана.

3.3.5.2 Получение макропористых гидрогелей на основе производных и привитых сополимеров хитозана методом лиофильной сушки

Методом лиофильной сушки и последующей термической обработки были получены макропористые гидрогели на основе немодифицированного хитозана (X-60 и X-80), ацилированного гидроксипропионовой кислотой производного (образец ХК-2), сополимеров с короткой привитой цепью олиго(L,D-лактида) (образец ХЛ-2) и со средними длинами цепей олиго(L,L-/L,D-лактидов) (образцы ХЛЛ-т и ХЛД-т). Полимеры растворяли в бидистилляте (ХК-2, ХЛ-2) или в 2%

уксусной кислоте (Х-60, Х-80, ХЛЛ-т и ХЛД-т), замораживали при -15°C , сушили лиофильно (под вакуумом из замороженного состояния). Концентрации растворов, условия замораживания и получения макропористых гидрогелей были предварительно оптимизированы для обеспечения требуемого для миграции клеток/питательных веществ размера пор и механических характеристик, достаточных для манипулирования образцами во время дальнейших исследований. Для перевода полученных губок в нерастворимую в воде форму их прогревали в термошкафу при 150°C в течение 3-5 часов. Для удаления несшитых в процессе термической обработки фрагментов губки отмывали в течение 2-х часов в бидистилляте, замораживали при -15°C и сушили лиофильно [382]. Оценку эффективности термического сшивания определяли весовым методом по изменению массы образцов после прогрева и после очистки от несшитых фрагментов.

3.3.6. Получение гидрогелей на основе производных и сополимеров хитозана методом лазерно-индуцированной стереолитографии

Методика получения фоточувствительных композиций из производных и сополимеров хитозана, а также формирования структурированных гидрогелей на их основе методом лазерно-индуцированной стереолитографии подробно описаны в статьях [355,393].

Для получения фоточувствительных композиций на основе немодифицированного хитозана (Х-60, Х-80, Х-350), аллилхитозана АХ-1, сополимеров хитозана с короткими привитыми цепями олиго(D,L-лактида) (образцы ХЛ-1, ХЛ-2 и ХЛ-3) и со средними длинами привитых цепей олиго(L,L-/L,D-лактидов) (образцы ХЛЛ-к, ХЛЛ-т и ХЛД) готовили их концентрированные растворы в воде; затем смешивали раствор сополимера с раствором фотоинициатора Irgacure 2959 (BASF Kaisten AG, Германия) в воде и выдерживали при постоянном перемешивании 24 ч. В работе также исследовали влияние введения в фоточувствительные композиции на основе сополимеров серии ХЛ 10 и 20 мас.% диакрилата полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДА, 2 кДа) (Sigma-

Aldrich, Германия). Для получения гидрогелей на основе сополимеров серии ХЛЛ/ХЛД использовали ~6.5 мас.% ПЭГ-ДА.

Гидрогели на основе аллилхитозана АХ-1 были получены методом как одно-, так и двухфотонной лазерной стереолитографии. Однофотонную лазерную стереолитографию осуществляли на установке LS 120 (ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН), оснащенной He-Cd лазером с длиной волны 325 нм и мощностью 10 мВт. Облучение проводили при скорости перемещения лазера 1.5 м/с; диаметр пятна 0.10 мм. Гидрогели на основе хитозана, его производных и сополимеров получали методом двухфотонной лазерной стереолитографии на установке, схема которой приведена на рисунке 82. В качестве источника лазерного излучения использовалась вторая гармоника иттербиевого фемтосекундного лазера «ТЕМА-1053/100» (ООО «Авеста-Проект», Россия) с длиной волны 525 нм, длительностью импульса 200 фс и частотой 70 МГц, при этом рабочая длина волны двухфотонной полимеризации составляла 262 нм. Для доставки с высокой точностью излучения в образец использовалась система трехмерного микроструктурирования «M3D Nano-Rapid-Prototyping System» (Laser Zentrum Hannover, Германия). Область, в которой под действием высокоинтенсивного фемтосекундного лазерного излучения проходило двухфотонное поглощение, вызывающее распад фотоинициатора на радикалы и трехмерную сшивку, находилась в центре перетяжки лазерного излучения и имела форму эллипсоида, вытянутого по вертикальной оси. Высота сшиваемой области составляла ~5 мкм, диаметр сечения по осям ХУ составлял ~2 мкм. Размер сшиваемой области задавался как параметрами объектива, так и мощностью лазерного излучения.

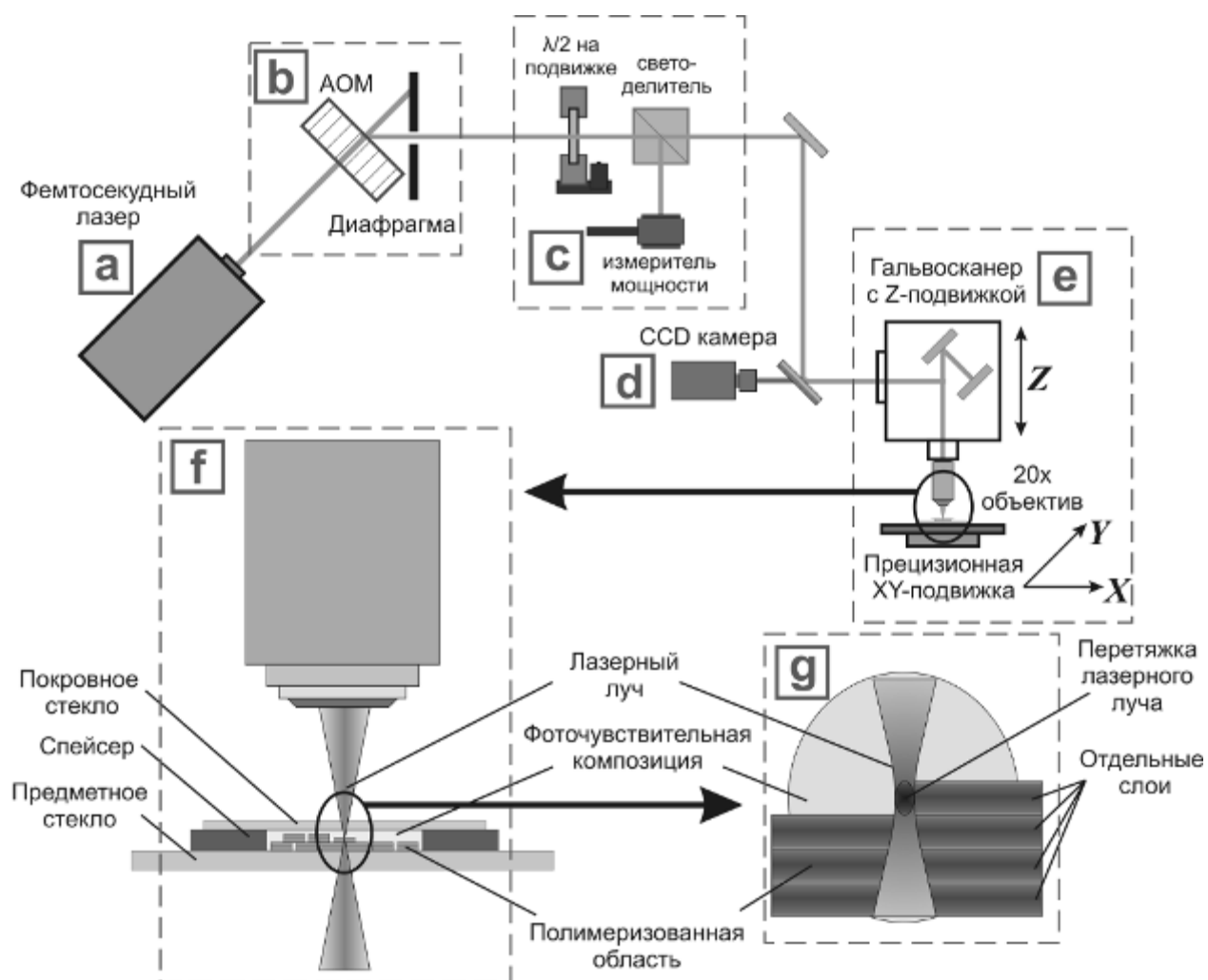


Рисунок 82 – Схема установки для двухфотонной лазерной микростереолитографии [393]

Для работ по исследованию цитосовместимости гидрогелей из сополимеров хитозана с олиголактоидом также получали материалы методом облучения фоточувствительной композиции диодной матрицей (Epileds Technologies Inc.) с длиной волны 365 нм, мощностью 3.9 мВт/см^2 в течение 10 мин [395].

Все полученные гидрогели очищали от остатков несшитого материала последовательной циклической обработкой дистиллированной водой, водным аммиаком и 2%-ной уксусной кислотой.

Все работы по получению гидрогелей из хитозана, его производных и сополимеров методом лазерной стереолитографии проводились во ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. Автор выражает глубочайшую признательность д.х.н. Тимашеву П.С. (Сеченовский Университет, ФНИЦ

«Кристаллография и фотоника» РАН), к.ф.-м.н. Минаеву Н.В. (ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН) и их команде за сотрудничество в получении структурированных материалов для регенеративной медицины.

3.4. Методы исследования материалов из хитозана, его производных и сополимеров

3.4.1. Сканирующая электронная микроскопия, в т.ч. совмещенная с энергодисперсионной спектроскопией

Для изучения морфологии материалов использовали сканирующие микроскопы JEOL-840M (Япония), ESEM-FEG XL-30 (Голландия) или Phenom ProX (США). Для получения срезов микрочастицы или структуры на их основе иммобилизовали в клее UHU Plus Endfest 300 (Германия) и нарезали на микротоме Leica EM UC7 (Россия). Цифровую обработку полученных микрофотографий (функция распределение микро- и нановолокон по диаметру) проводили с использованием программного обеспечения Image Tool V.3.0.

3.4.2. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Исследования гидрогелей, полученных методом лиофильной сушки, проводили в лаборатории полимеров для биологии ИБХ РАН с помощью инвертированного микроскопа Nikon TE-2000 (Япония), снабженного конфокальной лазерной системой EZ-C1 и получали изображения гидрогелей, которые затем анализировали в программе Nikon EZ-C1 FreeViewer 3.40.691. Автор выражает глубокую благодарность д.х.н. Марквичевой Е.А., к.х.н. Зайцевой-Зотовой Д.С. и М.Г. Дроздовой за помощь в исследовании хитозансодержащих макропористых гидрогелей, полученных методом лиофильной сушки.

3.4.3. Механические испытания

Физико-механические свойства пленок изучали путем нагружения образцов до разрушения. Механические испытания пленочных материалов проводили на универсальной разрывной машине AG-E или AGS-H (Shimadzu, Япония) при скорости 1 мм/мин. Перед проведением испытаний все пленки кондиционировали эксикаторе при постоянной влажности над насыщенными растворами K_2CO_3 или $NaNO_2$. Автор выражает благодарность А.С. Кечекьяну и к.х.н. Г.П. Гончарук за помощь в проведении механических испытаний пленок.

3.4.4. Определение степени набухания

Степень набухания (%) пленочных и макропористых образцов определяли весовым методом по следующей методике: исследуемые образцы помещали в бидистиллированную воду на 2 часа при комнатной температуре и взвешивали, предварительно удалив избыток влаги с поверхности. Расчет степени набухания (%) проводили по формуле:

$$C = M_{\text{наб}}/M_{\text{сух}} \times 100$$

Учитывая то, что степень набухания макропористых образцов характеризует их влагоудерживающую способность, то есть является суммой степени набухания полимера, формирующего стенки пор, и воды, удерживаемой в порах образца, для таких образцов, по возможности, была определена степень набухания модельных пленок.

3.4.5. Оценка скорости ферментативного гидролиза

Ферментативный гидролиз лизоцимом – неспецифическим протеолитическим ферментом, присутствующим в организме позвоночных, является основным фактором, обеспечивающим деградацию хитозана *in vivo* [2]. Исследования скорости ферментативного гидролиза образцов гидрогелей в присутствии лизоцима проводили весовым методом в лаборатории полимеров для биологии ИБХ РАН. Образцы гидрогелей (5 мг) стерилизовали в автоклаве

(121°C, 30 мин) и помещали в стерильный раствор лизоцима (2 мг/мл) в фосфатном буфере (pH 7.4) в инкубационную камеру, термостатированную при 37°C. Каждые 7 дней образцы вынимали из раствора лизоцима, 3 раза промывали деионизованной водой и сушили под вакуумом из замороженного состояния. Степень деградации рассчитывали по формуле:

$$D(\%) = (m_i - m_t) / m_i \times 100,$$

где m_i и m_t – массы образцов гидрогеля до и после деградации в течение определенного промежутка времени. Полный цикл исследования скорости деградации проводился в течение месяца.

3.4.6. Гониометрические измерения

Измерения углов смачивания проводили с использованием Easy Drop DSA100 (KRUSS, Германия) и программного обеспечения Drop Shape Analysis V.1.90.0.14 по двум рабочим жидкостям – воде (деионизованной) и глицерину. Для получения среднего экспериментального значения проводят не менее 5 измерений капель на одном образце. Работу адгезии (W_a), полную поверхностную энергию (γ), ее полярный (γ^p) и дисперсионный (γ^d) компоненты рассчитывали согласно методике [398], используя полученные экспериментально величины θ .

3.4.7. Рентгенофотоэлектронная спектроскопия

Исследование состава и структуры поверхностного слоя пленочных образцов проводили методом рентгенофотоэлектронной спектроскопии с помощью прибора LAS – 3000 фирмы “Riber”. Для возбуждения фотоэлектронов использовали рентгеновское излучение алюминиевого анода ($AlK_{\alpha}=1486.6$ эВ) при напряжении на трубке 12 кВ и токе эмиссии 20 мА. Положение пиков калибровали по стандартному пику C1S (284.6 эВ).

3.4.8. Исследования *in vitro*

Исследование биосовместимости пленочных образцов, сферических микрочастиц и гидрогелей, полученным методом лиофильной сушки, проводили в лаборатории полимеров для биологии ИБХ РАН, как описано в [354,363,374,380,382]. Автор выражает глубокую благодарность М.Г. Дроздовой, к.х.н. Д.С. Зайцевой-Зотовой и д.х.н. Е.А. Марквичевой. Коротко, оценку цитосовместимости проводили следующим образом: предварительно простерилизованные (автоклавированием или в 70% спирте) образцы материалов помещали в лунки 24- или 96-луночных планшетов и вносили суспензию клеток в питательной среде (DMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки) из расчета 2×10^4 кл/образец гидрогеля; 3×10^3 кл/см² поверхности пленок; 1×10^3 кл на 4 мг микрочастиц. В качестве контроля использовали клетки, растущие в монослое в стандартных условиях на дне планшета (полистирол). Клетки культивировали в CO₂ инкубаторе в газовой среде, содержащей 5% CO₂, при температуре 37°C. Наблюдения за пролиферацией клеток и изменениями в их морфологии вели с помощью оптического микроскопа. Долю жизнеспособных клеток оценивали с помощью МТТ-теста [179].

Биосовместимость гидрогелей из хитозана, его производных и сополимеров, сформированных методом лазерной стерелитографии, исследовали как описано в [388,394,395].

Цитосовместимость нетканых материалов исследовали в Институте регенеративной медицины Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и в Национальном исследовательском центре «Курчатовский институт». Методика проведения экспериментов опубликована в [362,372]. Автор выражает глубокую признательность П.Ю. Бикмулиной, к.б.н. Н.В. Кошелевой, к.б.н. Шпичке А.И., д.х.н. Тимашеву П.С. (Сеченовский Университет), а также к.б.н. О.А. Романовой (НИЦ «Курчатовский институт») за плодотворную совместную работу и проведение *in vitro* исследований полимерных образцов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования процессов, протекающих в ходе механохимического модифицирования полисахаридов, а также разработка и оптимизация способов регулирования химической структуры полимеров с использованием перспективных с экологической и экономической точек зрения подходов, в том числе в области создания функциональных материалов биомедицинского назначения, являются динамично развивающимися областями науки в мире и в России. Современное материаловедение нацелено на переход к экологически чистым материалам и подходам к их созданию, что требует активного применения высокомолекулярных соединений, выделенных из возобновляемых природных источников, разработки биodeградируемых полимерных материалов с контролируемым сроком службы и с улучшенными функциональными свойствами, а также развития безрастворных процессов. С другой стороны, создание материалов, которые можно использовать для культивирования субстрат-зависимых клеток и для получения замещаемых имплантов для регенеративной медицины, является одним из ключевых направлений современной персонализированной медицины.

Таким образом, результаты, полученные в настоящей диссертационной работе, лежат в русле приоритетных направлений из Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации (Указ Президента Российской Федерации от 01.12.2016 г. № 642), а именно в рамках перехода к новым материалам, перехода к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, переходу к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству.

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 по использованию полученных результатов

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 формирование полимерных материалов для создания биodeградируемых тканеинженерных конструкций и искусственных органов.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные при выполнении диссертационного исследования результаты показывают перспективность развития темы в следующих направлениях:

- разработанные подходы к механохимическому модифицированию химической структуры хитозана можно использовать для регулирования структуры и свойств других полимеров;
- основные закономерности влияния химической структуры хитозана, модифицированного методом твердофазного реакционного смешения, на способность к формированию различных материалов с применением

широкого спектра технологий можно расширить на смежные области материаловедения, не связанные с биомедициной;

- перспективными представляются систематические исследования механохимических подходов к повышению растворимости хитозана в водных средах при нейтральных значениях рН путем его механохимического модифицирования.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АСМ – атомно-силовая микроскопия;
- ГА – глутаровый альдегид;
- ГК – гиалуроновая кислота;
- ГКК – гидроксикарбоновая кислота (2,2-бис(гидроксиметил)пропионовая кислота);
- Дж – дженипин;
- ДЛС – динамическое лазерное светорассеяние;
- ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия;
- ММ – молекулярная масса;
- ММР – молекулярно-массовое распределение;
- нГА – наночастицы гидроксиапатита;
- ПВС – поливиниловый спирт;
- ПЛА – полилактид;
- ПЛГА – поли(лактид-со-гликолид);
- ПСЛС – поверхностно-селективное лазерное спекание;
- ПЭГ-ДА – диакрилата полиэтиленгликоля;
- ПЭК – полиэлектролитный комплекс;
- РФЭС – рентнефотоэлектронная спектроскопия;
- СА – степень ацилирования;
- СЗ – степень замещения;
- СЛС – селективное лазерное спекание;
- СП – степень полимеризации;
- СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;
- УЗ – ультразвук/ультразвуковая;
- ФИТЦ – флуоресцеин изотиоцианат;
- ЭДС – энергодисперсионная спектроскопия;
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под ред. Скрябин К.Г., Вихорева Г.А., Варламов В.П. Москва: Наука, - 2002. - 368 с.
2. Хитозан / Под ред. Скрябин К.Г., Михайлов С.Н., Варламов В.П. Москва: Центр “Биоинженерия” РАН, - 2013. - 593 с.
3. Annu, Ahmed S., Ahmed S., Ikram S. Chitin and Chitosan: History, Composition and Properties // Chitosan. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., - 2017. - P. 1–24.
4. Reys L.L. Marine-origin polysaccharides for tissue engineering and regenerative medicine / L.L. Reys, S.S. Silva, C. Oliveira, R. Lopez-Cebral, N.M. Neves, A. Martins, J.M. Oliveira, T.H. Silva, R.L. Reis // Encyclopedia of Marine Biotechnology. Wiley, - 2020. - P. 2619–2650.
5. Refining biomass residues for sustainable energy and bioproducts. Elsevier, - 2020.
6. Hamed I. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review / I. Hamed, F. Özogul, J.M. Regenstein // Trends Food Sci. Technol. - 2016. - V. 48. - P. 40–50.
7. Khayrova A. Obtaining chitin, chitosan and their melanin complexes from insects / A. Khayrova, S. Lopatin, V. Varlamov // Int. J. Biol. Macromol. - 2021. - V. 167. - P. 1319–1328.
8. Roy J.C. Solubility of chitin: solvents, solution behaviors and their related mechanisms / J.C. Roy, F. Salaün, S. Giraud, A. Ferri, G. Chen, J. Guan // Solubility of Polysaccharides / ed. Xu Z. InTech, - 2017.
9. Богданова О.И. Природные и синтетические нанокомпозиты на основе полисахаридов / О.И. Богданова., С.Н. Чвалун // Высокомолекулярные соединения А. - 2016. - Т. 58 - № 5. - С. 407–438.
10. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications / M. Rinaudo // Prog. Polym. Sci. - 2006. - V. 31 - № 7. - P. 603–632.
11. Kaur S. Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes:

- a review / S. Kaur, G.S. Dhillon // *Crit. Rev. Biotechnol.* - 2015. - V. 35 - № 1. - P. 44–61.
12. Jin H. Polysaccharide-based nanocrystals: Chemistry and applications / ed. Huang J., Chang P.R., Lin N., Dufresne A. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, - 2015. - 328 p.
 13. Wijesena R.N. A method for top down preparation of chitosan nanoparticles and nanofibers / R.N. Wijesena, N. Tissera, Y.Y. Kannangara, Y. Lin, G.A.J. Amaratunga, K.M.N. De Silva // *Carbohydr. Polym.* - 2015. - V. 117. - P. 731–738.
 14. Lin N. Preparation, properties and applications of polysaccharide nanocrystals in advanced functional nanomaterials: A review / N. Lin, J. Huang, A. Dufresne // *Nanoscale.* - 2012. - V. 4. - № 11. - P. 3274–3294.
 15. Scaffaro R. Polysaccharide nanocrystals as fillers for PLA based nanocomposites / R. Scaffaro, L. Botta, F. Lopresti, A. Maio, F. Suter // *Cellulose.* - 2017. - V. 24. - № 2. - P. 447–478.
 16. Cheikh B.F. Chitin nanocrystals as Pickering stabilizer for O/W emulsions: Effect of the oil chemical structure on the emulsion properties / B.F. Cheikh, A.B. Mabrouk, A. Magnin, J.-L. Putaux, S. Boufi // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* - 2021. - V. 200. - P. 111604.
 17. Anitha A., Chitin and chitosan in selected biomedical applications / A. Anitha, S. Sowmya, P.T.S. Kumar, S. Deepthi, K.P.P. Chennazhi, H. Ehrlich, M. Tsurkan, R. Jayakumar // *Prog. Polym. Sci.* - 2014. - V. 39. - № 9. - P. 1644–1667.
 18. Popa-Nita S. Continuum of structural organization from chitosan solutions to derived physical forms / S. Popa-Nita, P. Alcouffe, C. Rochas, L. David, A. Domard // *Biomacromolecules.* - 2010. - V. 11. - № 1. - P. 6–12.
 19. Wei Z. Chitosan nanoparticles as particular emulsifier for preparation of novel pH-responsive Pickering emulsions and PLGA microcapsules / Z. Wei, C. Wang, S. Zou, H. Liu, Z. Tong // *Polymer.* - 2012. - V. 53. - № 6. - P. 1229–1235.
 20. Dong Y. Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques / Y. Dong, Y. Ruan, H. Wang, Y. Zhao, D. Bi // *J. Appl. Polym. Sci.* - 2004. - V.

93. - № 4. - P. 1553–1558.
21. de Britto D. Kinetics of the thermal degradation of chitosan / D. de Britto, S.P. Campana-Filho // *Thermochim. Acta.* - 2007. - V. 465. - № 1–2. - P. 73–82.
 22. Wan Ngah W.S. Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review / W.S. Wan Ngah, L.C. Teong, M.A.K.M. Hanafiah // *Carbohydrate Polymers.* - 2011. - V. 83. - № 4. - P. 1446–1456.
 23. Crini G. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature / G. Crini, P.M. Badot // *Progress in Polymer Science.* - 2008. - V. 33. - № 4. - P. 399–447.
 24. Zhang L. Removal of heavy metal ions using chitosan and modified chitosan: A review / L. Zhang, Y. Zeng, Z.Cheng // *Journal of Molecular Liquids.* - 2016. - V. 214. - P. 175–191.
 25. Venkataraman P. Attachment of a hydrophobically modified biopolymer at the oil–water interface in the treatment of oil spills / P. Venkataraman, J. Tang, E. Frenkel, G.L. McPherson, J. He, S.R. Raghavan, V. Kolesnichenko, A. Bose, V.T. John // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* - 2013. - V. 5. - № 9. - P. 3572–3580.
 26. Yang R. A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment / R. Yang, H. Li, M. Huang, H. Yang, A. Li // *Water Research.* - 2016. - V. 95. - P. 59–89.
 27. Vunain E. Dendrimers, mesoporous silicas and chitosan-based nanosorbents for the removal of heavy-metal ions: A review / E. Vunain, A. Mishra, B. Mamba // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2016. - V. 86. - P. 570–586.
 28. Hosseinejad M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan / M. Hosseinejad, S.M. Jafari // *International Journal of Biological Macromolecules.* - 2016. - V. 85. - P. 467–475.
 29. Sahariah P., Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: A review of the structure–activity relationship / P. Sahariah, M. Másson // *Biomacromolecules.* - 2017. - V. 18. - № 11. - P. 3846–3868.
 30. Arfin T. Chitosan and its derivatives: overview of commercial applications in

- diverse fields / T. Arfin // *Chitosan*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., - 2017. - P. 115–149.
31. Kong M. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review / M. Kong, X.G. Chen, K. Xing, H.J. Park // *International Journal of Food Microbiology*. - 2010. - V. 144. - № 1. - P. 51–63.
 32. Aider M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review / M. Aider // *LWT - Food Science and Technology*. - 2010. - V. 43. - № 6. - P. 837–842.
 33. Choi C. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials / C. Choi, J.P. Nam, J.W. Nah // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. - 2016. - V. 33. - P. 1–10.
 34. Patrulea V. Chitosan as a starting material for wound healing applications / V. Patrulea, V. Ostafe, G. Borchard, O. Jordan // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* - 2015. - V. 97. - P. 417–426.
 35. Jayakumar R. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials - A short review / R. Jayakumar, D. Menon, K. Manzoor, S. V. Nair, H. Tamura // *Carbohydrate Polymers*. - 2010. - V. 82. - № 2. - P. 227–232.
 36. Ahsan S.M. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering / S.M. Ahsan, M. Thomas, K.K. Reddy, S.G. Sooraparaju, A. Asthana, I. Bhatnagar // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2018. - V. 110. - P. 97–109.
 37. Jiang T. Micro- and nanofabrication of chitosan structures for regenerative engineering / T. Jiang, M. Deng, R. James, L.S. Nair, C.T. Laurencin // *Acta Biomater.* - 2014. - V. 10. - № 4. - P. 1632–1645.
 38. Ahmed S. A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering / S. Ahmed, A.A. Annu, J. Sheikh // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2018. - V. 116. - P. 849–862.
 39. Kumar L.R. A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering / L.R. Kumar, A.K. Narayan, S. Dhivya, A. Chawla, S. Saravanan, N. Selvamurugan // *Carbohydr. Polym.* - 2016. - V. 151. - P. 172–188.
 40. Cheung R. Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical

- applications / R. Cheung, T. Ng, J. Wong, W. Chan // *Mar. Drugs*. - 2015. - V. 13. - № 8. - P. 5156–5186.
41. Saravanan S. Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering / S. Saravanan, R.S. Leena, N. Selvamurugan // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2016. - V. 93. - P. 1354–1365.
 42. Ahmed S. Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing / S. Ahmed, S. Ikram // *Achiev. Life Sci.* - 2016. - V. 10. - № 1. - P. 27–37.
 43. Kim I.Y. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications / I.Y. Kim, S.J. Seo, H.S. Moon, M.K. Yoo, I.Y. Park, B.C. Kim, C.S. Cho // *Biotechnol. Adv.* - 2008. - V. 26. - № 1. - P. 1–21.
 44. Casettari L. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs / L. Casettari, L. Illum // *Journal of Controlled Release*. - 2014. - V. 190. - P. 189–200.
 45. Huang M. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation / M. Huang, E. Khor, L.-Y. Lim // *Pharm. Res.* - 2004. - V. 21. - № 2. - P. 344–353.
 46. Balan V. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review / V. Balan, L. Verestiuc // *Eur. Polym. J.* - 2014. - V. 53. - № 1. - P. 171–188.
 47. Dowling M.B. A self-assembling hydrophobically modified chitosan capable of reversible hemostatic action / M.B. Dowling, R. Kumar, M.A. Keibler, J.R. Hess, G.V. Bochicchio, S.R. Raghavan // *Biomaterials*. - 2011. - V. 32. - № 13. - P. 3351–3357.
 48. Delmar K. Composite chitosan hydrogels for extended release of hydrophobic drugs / K. Delmar, H. Bianco-Peled // *Carbohydr. Polym.* - 2016. - V. 136. - P. 570–580.
 49. Racine L. Chitosan-based hydrogels: recent design concepts to tailor properties and functions / L. Racine, I. Texier, R. Auzély-Velty // *Polym. Int.* - 2017. - V. 66. - № 7. - P. 981–998.
 50. de Azevedo E.P. Chitosan hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications / E.P. de Azevedo // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* - 2015. - V. 7. - № 12. - P. 8–14.

51. Van Vlierberghe S. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: A review / S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, E. Schacht // *Biomacromolecules*. - 2011. - V. 12. - № 5. - P. 1387–1408.
52. Bardakova K.N. From aggregates to porous three-dimensional scaffolds through a mechanochemical approach to design photosensitive chitosan derivatives / K.N. Bardakova, T.A. Akopova, A.V. Kurkov, G.P. Goncharuk, D.V. Butnaru, V.F. Burdukovskii, A.A. Antoshin, I.A. Farion, T.M. Zharikova, A.B. Shekhter, V.I. Yusupov, P.S. Timashev, Y.A. Rochev // *Mar. Drugs*. - 2019. - V. 17. - № 1. - P. 48.
53. Kalantari K. Biomedical applications of chitosan electrospun nanofibers as a green polymer – Review / K. Kalantari, A.M. Afifi, H. Jahangirian, T.J. Webster // *Carbohydr. Polym.* - 2019. - V. 207. - P. 588–600.
54. Agnihotri S.A. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery / S.A. Agnihotri, N.N. Mallikarjuna, T.M. Aminabhavi // *J. Control. Release*. - 2004. - V. 100. - № 1. - P. 5–28.
55. Yang J. Effect of chitosan molecular weight and deacetylation degree on hemostasis / J. Yang, F. Tian, Z. Wang, Q. Wang, Y.-J. Zeng, S.-Q. Chen // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* - 2008. - V. 84. - № 1. - P. 131–137.
56. Hu L. Advances in chitosan-based drug delivery vehicles / L. Hu, Y. Sun, Y. Wu // *Nanoscale*. - 2013. - V. 5. - № 8. - P. 3103.
57. Jennings J.A. Controlling chitosan degradation properties in vitro and in vivo / J.A. Jennings // *Chitosan Based Biomaterials*. - 2017. - V. 1. - P. 159–182.
58. Tomihata K. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives / K. Tomihata, Y. Ikada // *Biomaterials*. - 1997. - V. 18. - № 7. - P. 567–575.
59. Luo L.-J. Effect of deacetylation degree on controlled pilocarpine release from injectable chitosan-g-poly(N-isopropylacrylamide) carriers / L.-J. Luo, C.-C. Huang, H.-C. Chen, J.-Y. Lai, M. Matsusaki // *Carbohydr. Polym.* - 2018. - V. 197. - P. 375–384.
60. Kiang T. The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of

- gene transfection / T. Kiang, J. Wen, H.W. Lim, K.W. Leong // *Biomaterials*. - 2004. - V. 25. - № 22. - P. 5293–5301.
61. Foster L.J.R. Chitosan films are NOT antimicrobial / L.J.R. Foster, J. Butt // *Biotechnol. Lett.* - 2011. - V. 33. - № 2. - P. 417–421.
62. Thakur V.K. Recent advances in graft copolymerization and applications of chitosan: A review / V.K. Thakur, M.K. Thakur // *ACS Sustain. Chem. Eng.* - 2014. - V. 2. - № 12. - P. 2637–2652.
63. Farion I.A. Functionalization of chitosan with carboxylic acids and derivatives of them: Synthesis issues and prospects of practical use: A review / I.A. Farion, V.F. Burdukovskii, B.C. Kholkhoev, P.S. Timashev, R.K. Chailakhyan // *Express Polym. Lett.* - 2018. - V. 12. - № 12. - P. 1081–1105.
64. Dimassi S. Sulfonated and sulfated chitosan derivatives for biomedical applications: A review / S. Dimassi, N. Tabary, F. Chai, N. Blanchemain, B. Martel // *Carbohydr. Polym.* - 2018. - V. 202. - P. 382–396.
65. Bhavsar C. Functionalized and graft copolymers of chitosan and its pharmaceutical applications / C. Bhavsar, M. Momin, S. Gharat, A. Omri // *Expert Opinion on Drug Delivery*. - 2017. - V. 14. - № 10. - 1189–1204 p.
66. Kumar D. A review on the synthesis of graft copolymers of chitosan and their potential applications / D. Kumar, S. Gihar, M.K. Shrivash, P. Kumar, P.P. Kundu // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2020. - V. 163. - P. 2097–2112.
67. Negm N.A. Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications / N.A. Negm, H.H. Hefni, A.A. Abd-Elaal, E.A. Badr, M.T.H. Abou Kana // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2020. - V. 152. - P. 681–702.
68. Akopova T.A., Zelenetskii A.N., Ozerin A.N. Solid state synthesis and modification of chitosan // *Focus on Chitosan Research* / ed. Ferguson A.N., O'Neill A.. New York: Nova Science Publishers, - 2011. - 223–253 p.
69. Пестов А.В. Гранулированные каталитические материалы на основе хитозана и его производных / А.В. Пестов, Ю.О. Привар, Е.Б. Модин, А.Ю. Устинов, С.Ю. Братская // *Высокомолекулярные соединения Б*. - 2016. - Т. 58. - № 6. - P. 493–499.

70. Нудьга Л.А. Гетерогенная привитая полимеризация анилина на хитозан и физико-химические свойства продукта / Л.А. Нудьга, В.А. Петрова, В.И. Фролов, И.В. Гофман, А.В. Маслякова, Н.М. Журавлева // *Высокомолекулярные соединения*. - 2005. - Т. 47. - № 2. - P. 213–219.
71. Мочалова А.Е. Современное состояние направленной модификации хитозана / А.Е. Мочалова, Л.А. Смирнова // *Высокомолекулярные соединения Б*. - 2018. - № 2. - P. 89–122.
72. Wang J. Recent progress on synthesis, property and application of modified chitosan: An overview / J. Wang, L. Wang, H. Yu, Zain-ul-Abdin, Y. Chen, Q. Chen, W. Zhou, H. Zhang, X. Chen // *International Journal of Biological Macromolecules*. - 2016. - V. 88. - P. 333–344.
73. Rafique A. Chitosan functionalized poly(vinyl alcohol) for prospects biomedical and industrial applications: A review / A. Rafique, K. Mahmood Zia, M. Zuber, S. Tabasum, S. Rehman // *International Journal of Biological Macromolecules*. - 2016. - V. 87. - P. 141–154.
74. Vikhoreva G. Preparation and anticoagulant activity of a low-molecular-weight sulfated chitosan / G. Vikhoreva, G. Bannikova, P. Stolbushkina, A. Panov, N. Drozd, V. Makarov, V. Varlamov, L. Galbraikh // *Carbohydr. Polym.* - 2005. - V. 62. - № 4. - P. 327–332.
75. Demina T.S. Solid-state synthesis of water-soluble chitosan-g-hydroxyethyl cellulose copolymers / T.S. Demina, A.V. Birdibekova, E.A. Svidchenko, P.L. Ivanov, A.S. Kuryanova, T.S. Kurkin, Z.I. Khaibullin, G.P. Goncharuk, T.M. Zharikova, S. Bhuniya, C. Grandfils, P.S. Timashev, T.A. Akopova // *Polymers*. - 2020. - V. 12. - № 3. - P. 611.
76. Strelina I.A. Chitosan and its derivatives in extensional and shear flows / I.A. Strelina, Z.F. Zoolshoev, L.A. Nud'ga // *Polym. Sci. Ser. A*. - 2007. - V. 49. - № 8. - P. 928–932.
77. Nud'ga L.A. Effect of allyl substitution in chitosan on the structure of graft copolymers / L.A. Nud'ga, V.A. Petrova, M.F. Lebedeva // *Russ. J. Appl. Chem.* - 2003. - V. 76. - № 12. - P. 1978–1982.

78. Illy N. Synthesis of water-soluble allyl-functionalized oligochitosan and its modification by thiol-ene addition in water / N. Illy, M. Robitzer, R. Auvergne, S. Caillol, G. David, B. Boutevin // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* - 2014. - V. 52. - № 1. - P. 39–48.
79. Blasi P. Poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid)-based microparticles: an overview / P. Blasi // *J. Pharm. Investig. Springer Singapore*, - 2019. - V. 49. - № 4. - P. 337–346.
80. Gritsch L. Polylactide-based materials science strategies to improve tissue-material interface without the use of growth factors or other biological molecules / L. Gritsch, G. Conoscenti, V. La Carrubba, P. Noeaid, A.R. Boccaccini // *Mater. Sci. Eng. C.* - 2019. - V. 94. - P. 1083–1101.
81. Molavi F. Polyester based polymeric nano and microparticles for pharmaceutical purposes: A review on formulation approaches / F. Molavi, M. Barzegar-Jalali, H. Hamishehkar // *J. Control. Release.* - 2020. - V. 320. - P. 265–282.
82. Lassalle V. PLA nano- and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation / V. Lassalle, M.L. Ferreira // *Macromol. Biosci.* - 2007. - V. 7. - № 6. - P. 767–783.
83. Kumari A. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems / A. Kumari, S.K. Yadav, S.C. Yadav // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* - 2010. - V. 75. - № 1. - P. 1–18.
84. Mohamed F. Engineering biodegradable polyester particles with specific drug targeting and drug release properties / F. Mohamed, C.F. van der Walle // *J. Pharm. Sci.* - 2008. - V. 97. - № 1. - P. 71–87.
85. Toncheva A. Polylactide (PLA)-based electrospun fibrous materials containing ionic drugs as wound dressing materials: a review / A. Toncheva, M. Spasova, D. Paneva, N. Manolova, I. Rashkov // *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* - 2014. - V. 63. - № 13. - P. 657–671.
86. Santoro M. Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering / M. Santoro, S.R. Shah, J.L. Walker, A.G. Mikos // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2016. - V. 107. - P. 206–212.

87. Poh P.S.P. Polylactides in additive biomanufacturing / P.S.P. Poh, M.P. Chhaya, F.M. Wunner, E.M. De-Juan-Pardo, A.F. Schilling, J.T. Schantz, M. van Griensven, D.W. Hutmacher // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2016. - V. 107. - P. 228–246.
88. Jafari M. Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review / M. Jafari, Z. Paknejad, M.R. Rad, S.R. Motamedian, M.J. Eghbal, N. Nadjmi, A. Khojasteh // *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* - 2017. - V. 105. - № 2. - P. 431–459.
89. Asghari F. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review / F. Asghari, M. Samiei, K. Adibkia, A. Akbarzadeh, S. Davaran // *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* - 2017. - V. 45. - № 2. - P. 185–192.
90. Kudryavtseva V. Atmospheric pressure plasma assisted immobilization of hyaluronic acid on tissue engineering PLA-based scaffolds and its effect on primary human macrophages / V. Kudryavtseva, K. Stankevich, A. Gudima, E. Kibler, Y. Zhukov, E. Bolbasov, A. Malashicheva, M. Zhuravlev, V. Riabov, T. Liu, V. Filimonov, G. Remnev, H. Klüter, J. Kzhyshkowska, S. Tverdokhlebov // *Mater. Des.* - 2017. - V. 127. - P. 261–271.
91. Liu S. Current applications of poly(lactic acid) composites in tissue engineering and drug delivery / S. Liu, S. Qin, M. He, D. Zhou, Q. Qin, H. Wang // *Compos. Part B Eng.* - 2020. - V. 199. - P. 108238.
92. Sinha R.S. Polylactide-based bionanocomposites: A promising class of hybrid materials / R.S. Sinha // *Acc. Chem. Res.* - 2012. - V. 45. - № 10. - P. 1710–1720.
93. Роговина С.З. Композиции на основе крахмала и полилактида / С.З. Роговина, Э.В. Прут, К.В. Алексанян, В.Г. Крашенинников, Е.О. Перепелицина, Д.П. Шашкин, А.А. Берлин // *Высокомолекулярные соединения Б.* - 2019. - Т. 61. - № 3. - P. 226–232.
94. Цверова Н.Е. Получение и свойства композиций на основе хитозана и полилактида с использованием компатибилизаторов / Н.Е. Цверова, А.Е. Мочалова, А.Г. Морозов, П.А. Юнин, Л.А. Смирнова, И.Д. Гришин //

- Высокомолекулярные соединения Б. - 2015. - Т. 57. - № 3. - P. 214–219.
95. Banerjee R. An overview of the recent advances in polylactide-based sustainable nanocomposites / R. Banerjee, S.S. Ray // *Polym. Eng. Sci.* - 2021. - V. 61. - № 3. - P. 617–649.
96. Garlotta D. A literature review of poly(lactic acid) / D. Garlotta // *J. Polym. Environ.* - 2001. - V. 9. - № 2. - P. 63–84.
97. Hamad K. Properties and medical applications of polylactic acid: A review / K. Hamad, M. Kaseem, H.W. Yang, F. Deri, Y.G. Ko // *Express Polym. Lett.* - 2015. - V. 9. - № 5. - P. 435–455.
98. Madhavan N.K. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research / N.K. Madhavan, N.R. Nair, R.P. John // *Bioresour. Technol.* - 2010. - V. 101. - № 22. - P. 8493–8501.
99. Polylactic acid PLA biopolymer technology and applications / ed. L.T. S., Rahmat A.R., Rahman W.A.W.A. Elsevier Science Ltd, - 2012. - 352 p.
100. Никишев П.А. Синтез блок-сополимеров стирола с D,L-лактидом методами последовательной контролируемой катионной полимеризации и анионной полимеризации с раскрытием цикла / П.А. Никишев, Ю.А. Пискун, И.В. Василенко, Л.В. Гапоник, П.С. Тимашев, А.А. Акованцева, С.В. Костюк // *Высокомолекулярные соединения Б.* - 2017. - V. 59. - № 6. - P. 413–423.
101. Badia J.D. Mechanical recycling of polylactide, upgrading trends and combination of valorization techniques / J.D. Badia, A. Ribes-Greus // *Eur. Polym. J.* - 2016. - V. 84. - P. 22–39.
102. Armentano I. Multifunctional nanostructured PLA materials for packaging and tissue engineering / I. Armentano, N. Bitinis, E. Fortunati, S. Mattioli, N. Rescignano, R. Verdejo, M.A.A. Lopez-Manchado, J.M.M. Kenny // *Prog. Polym. Sci.* - 2013. - V. 38. - № 10–11. - P. 1720–1747.
103. Abdel-Rahman M.A. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes / M.A. Abdel-Rahman, Y. Tashiro, K. Sonomoto // *Biotechnol. Adv.* - 2013. - V. 31. - № 6. - P. 877–902.
104. Ögmundarson Ó. Environmental hotspots of lactic acid production systems / Ó.

- Ögmundarson, S. Sukumara, A. Laurent, P. Fantke // *GCB Bioenergy*. - 2020. - V. 12. - № 1. - P. 19–38.
105. Ichikawa F., Kobayashi M., Ohta M., Yoshida Y., Obuchi S., Itoh H. Process for preparing polyhydroxycarboxylic acid: pat. US5440008A USA. - 1995. - P. 9.
106. Auras R. An overview of polylactides as packaging materials / R. Auras, B. Harte, S. Selke // *Macromol. Biosci.* - 2004. - V. 4. - № 9. - P. 835–864.
107. Timashev P. Novel biodegradable star-shaped polylactide scaffolds for bone regeneration fabricated by two-photon polymerization / P. Timashev, D. Kuznetsova, A. Koroleva, N. Prodanets, A. Deiwick, Y. Piskun, K. Bardakova, N. Dzhoyashvili, S. Kostjuk, E. Zagaynova, Y. Rochev, B. Chichkov, V. Bagratashvili // *Nanomedicine*. - 2016. - V. 11. - № 9. - P. 1041–1053.
108. Vert M. Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity / M. Vert, J. Mauduit, S. Li // *Biomaterials*. - 1994. - V. 15. - № 15. - P. 1209–1213.
109. Richbourg N.R. Tuning the biomimetic behavior of scaffolds for regenerative medicine through surface modifications / N.R. Richbourg, N.A. Peppas, V.I. Sikavitsas // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* - 2019. - V. 13. - № 8. - P. 1275–1293.
110. Ma Z. Immobilization of natural macromolecules on poly-L-lactic acid membrane surface in order to improve its cytocompatibility / Z. Ma, C. Gao, Y. Gong, J. Ji, J. Shen // *J. Biomed. Mater. Res.* - 2002. - V. 63. - № 6. - P. 838–847.
111. Li L. Preparation and degradation of PLA/chitosan composite materials / L. Li, S. Ding, C. Zhou // *J. Appl. Polym. Sci.* - 2004. - V. 91. - № 1. - P. 274–277.
112. Bonilla J. Effects of chitosan on the physicochemical and antimicrobial properties of PLA films / J. Bonilla, E. Fortunati, M. Vargas, A. Chiralt, J.M. Kenny // *J. Food Eng.* - 2013. - V. 119. - № 2. - P. 236–243.
113. Singh S. 3D printed biodegradable composites: An insight into mechanical properties of PLA/chitosan scaffold / S. Singh, G. Singh, C. Prakash, S. Ramakrishna, L. Lamberti, C.I. Pruncu // *Polym. Test.* - 2020. - V. 89. - P. 106722.
114. Xu J. Preparation of chitosan/PLA blend micro/nanofibers by electrospinning / J. Xu, J. Zhang, W. Gao, H. Liang, H. Wang, J. Li // *Mater. Lett.* - 2009. - V. 63. -

- № 8. - P. 658–660.
115. Râpă M. Influence of chitosan on mechanical, thermal, barrier and antimicrobial properties of PLA-biocomposites for food packaging / M. Râpă, A.C. Miteluț, E.E. Tănase, E. Grosu, P. Popescu, M.E. Popa, J.T. Rosnes, M. Sivertsvik, R.N. Darie-Niță, C. Vasile // *Compos. Part B Eng.* - 2016. - V. 102. - P. 112–121.
 116. Liu Y. Composite poly(lactic acid)/chitosan nanofibrous scaffolds for cardiac tissue engineering / Y. Liu, S. Wang, R. Zhang // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2017. - V. 103. - P. 1130–1137.
 117. Thomas M.S. Electrospun polylactic acid-chitosan composite: a bio-based alternative for inorganic composites for advanced application / M.S. Thomas, P.K.S. Pillai, M. Faria, N. Cordeiro, H. Barud, S. Thomas, L.A. Pothen // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* - 2018. - V. 29 - № 9.
 118. Correlo V.M. Properties of melt processed chitosan and aliphatic polyester blends / V.M. Correlo, L.F. Boesel, M. Bhattacharya, J.F. Mano, N.M. Neves, R.L. Reis // *Mater. Sci. Eng. A.* - 2005. - V. 403. - № 1–2. - P. 57–68.
 119. Li G. Preparation, characterization and aggregation behavior of amphiphilic chitosan derivative having poly (l-lactic acid) side chains / G. Li, Y. Zhuang, Q. Mu, M. Wang, Y. Fang // *Carbohydr. Polym.* - 2008. - V. 72. - № 1. - P. 60–66.
 120. Luckachan G.E. Chitosan/oligo L-lactide graft copolymers: Effect of hydrophobic side chains on the physico-chemical properties and biodegradability / G.E. Luckachan, C.K.S. Pillai // *Carbohydr. Polym.* - 2006. - V. 64. - № 2. - P. 254–266.
 121. Feng H. Preparation, characterization, and self-assembled properties of biodegradable chitosan–poly(L-lactide) hybrid amphiphiles / H. Feng, C.-M. Dong // *Biomacromolecules.* - 2006. - V. 7. - № 11. - P. 3069–3075.
 122. Liu Y. Synthesis and characterization of a brush-like copolymer of polylactide grafted onto chitosan / Y. Liu, F. Tian, K.A. Hu // *Carbohydr. Res.* - 2004. - V. 339. - № 4. - P. 845–851.
 123. Wu Y. Synthesis and characterization of a novel amphiphilic chitosan-poly lactide graft copolymer / Y. Wu, Y. Zheng, W. Yang, C. Wang, J. Hu, S. Fu // *Carbohydr.*

- Polym. - 2005. - V. 59. - № 2. - P. 165–171.
124. Bhattarai N. Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolonged drug delivery / N. Bhattarai, H.R. Ramay, S.-H. Chou, M. Zhang // *Int. J. Nanomedicine*. - 2006. - V. 1. - № 2. - P. 181–187.
125. Goryunova P.E. Thermodynamic properties of block copolymers of chitosan with poly(D,L-lactide) / P.E. Goryunova, S.S. Sologubov, A.V. Markin, N.N. Smirnova, S.D. Zaitsev, N.E. Silina, L.A. Smirnova // *Thermochim. Acta*. - 2018. - V. 659. - P. 19–26.
126. Feng H. Synthesis and characterization of phthaloyl-chitosan-g-poly(l-lactide) using an organic catalyst / H. Feng, C.-M. Dong // *Carbohydr. Polym.* - 2007. - V. 70. - № 3. - P. 258–264.
127. Liu L. Preparation of chitosan-g-poly(lactide) graft copolymers via self-catalysis of phthaloylchitosan and their complexation with DNA / L. Liu, A. Shi, S. Guo, Y. Fang, S. Chen, J. Li // *React. Funct. Polym.* - 2010. - V. 70. - № 5. - P. 301–305.
128. Qu X. Synthesis and characterization of pH-sensitive hydrogels based on chitosan and D,L-lactic acid / X. Qu, A. Wirsén, A. Albertsson // *J. Appl. Polym. Sci.* - 1999. - V. 74. - № 13. - P. 3193–3202.
129. Силина Н.Е. Получение блок-сополимеров хитозана и D,L-лактида под действием ультразвука. Структура и свойства / Н.Е. Силина, А.Г. Морозов, Е.Е. Горностаева, Л.А. Смирнова, С.Д. Зайцев // *Высокомолекулярные соединения Б*. - 2017. - Т. 596 - № 5. - С. 355–364.
130. Luo B. Rapid synthesis and characterization of chitosan-g-poly(D,L-lactide) copolymers with hydroxyethyl chitosan as a macroinitiator under microwave irradiation / B. Luo, J. Yang, J. Zhao, C. Hsu, J. Li, C. Zhou // *J. Appl. Polym. Sci.* - 2012. - V. 125. - P. 125–131.
131. *The IUPAC compendium of chemical terminology* / ed. Gold V. Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), - 2019.
132. Gomollón-Bel F. Ten chemical innovations that will change our world: IUPAC identifies emerging technologies in chemistry with potential to make our planet

- more sustainable / F. Gomollón-Bel // *Chem. Int.* - 2019. - V. 41. - № 2. - P. 12–17.
133. Boldyrev V.V. Mechanochemistry of solids: past, present, and prospects / V.V. Boldyrev, K. Tkáčová // *J. Mater. Synth. Process.* - 2000. - V. 8. - № 3/4. - P. 121–132.
134. Барамбойм Н.К. Механохимия высокомолекулярных соединений. Химия, - 1978. - 386 p.
135. Жаров В.А. Процессы в полимерах и низкомолекулярных веществах, сопровождающие пластическое течение под высоким давлением / В.А. Жаров // *Высокомолекулярные соединения.* - 1994. - Т. 36. - № 4. - С. 559–579.
136. Boldyreva E. Mechanochemistry of inorganic and organic systems: what is similar, what is different? / E. Boldyreva // *Chem. Soc. Rev.* - 2013. - V. 42. - № 18. - P. 7719.
137. Ляхов Н.З. Механохимический синтез органических соединений и композитов с их участием / Н.З. Ляхов, Т.Ф. Григорьева, А.П. Баринаова, И.А. Ворсина // *Успехи Химии.* - 2010. - Т. 79. - № 3. - С. 218–233.
138. Ениколопов Н.С. Твердофазные химические реакции и новые технологии / Н.С. Ениколопов // *Успехи химии.* - 1991. - Т. 60 - № 3. - С. 586–594.
139. Friščić T., Mottillo C., Titi H.M. Mechanochemistry for synthesis / T. Friščić, C. Mottillo, H.M. Titi // *Angew. Chemie Int. Ed.* - 2020. - V. 59. - № 3. - P. 1018–1029.
140. Momzyakov A.A. Kinetic features of mechanosynthesis of calcium stearate / A.A. Momzyakov, A.A. Zharov, T.R. Deberdeev, R.F. Nafikova, L.B. Stepanova, R.Y. Deberdeev // *Russ. J. Phys. Chem. B.* - 2020. - V. 14. - № 2. - P. 270–277.
141. Wang G.W. Mechanochemical organic synthesis / G.W. Wang // *Chem. Soc. Rev.* - 2013. - V. 42. - № 18. - P. 7668–7700.
142. Li J., Nagamani C., Moore J.S. Polymer mechanochemistry: from destructive to productive / J. Li, C. Nagamani, J.S. Moore // *Acc. Chem. Res.* - 2015. - V. 48. - № 8. - P. 2181–2190.

143. Klukovich H.M. A backbone lever-arm effect enhances polymer mechanochemistry / H.M. Klukovich, T.B. Kouznetsova, Z.S. Kean, J.M. Lenhardt, S.L. Craig // *Nat. Chem.* - 2013. - V. 5. - № 2. - P. 110–114.
144. Gossweiler G.R. Mechanochemical activation of covalent bonds in polymers with full and repeatable macroscopic shape recovery / G.R. Gossweiler, G.B. Hewage, G. Soriano, Q. Wang, G.W. Welshofer, X. Zhao, S.L. Craig // *ACS Macro Lett.* - 2014. - V. 3. - № 3. - P. 216–219.
145. Brantley J.N. Polymer mechanochemistry: The design and study of mechanophores / J.N. Brantley, K.M. Wiggins, C.W. Bielawski // *Polym. Int.* - 2013. - V. 62. - № 1. - P. 2–12.
146. Ghanem M.A. The role of polymer mechanochemistry in responsive materials and additive manufacturing / M.A. Ghanem, A. Basu, R. Behrou, N. Boechler, A.J. Boydston, S.L. Craig, Y. Lin, B.E. Lynde, A. Nelson, H. Shen, D.W. Storti // *Nat. Rev. Mater.* - 2021. - V. 6. - № 1. - P. 84–98.
147. Jones W. Introductory Lecture: Mechanochemistry, a versatile synthesis strategy for new materials / W. Jones, M.D. Eddleston // *Faraday Discuss.* - 2014. - V. 170. - P. 9–34.
148. Аввакумов Е.Г. Механические методы активации химических процессов. 2nd ed. Новосибирск: Наука, - 1989. - 306 p.
149. Mateti S. Mechanochemistry: A force in disguise and conditional effects towards chemical reactions / S. Mateti, M. Mathesh, Z. Liu, T. Tao, T. Ramireddy, A.M. Glushenkov, W. Yang, Y.I. Chen // *Chem. Commun.* - 2021. - V. 57. - № 9. - P. 1080–1092.
150. Colacino E. Upscaling mechanochemistry: challenges and opportunities for sustainable industry / E. Colacino, V. Isoni, D. Crawford, F. García // *Trends Chem.* - 2021. - V. 3. - № 5. - P. 335–339.
151. Crawford D.E. Recent developments in mechanochemical materials synthesis by extrusion / D.E. Crawford, J. Casaban // *Adv. Mater.* - 2016. - V. 28. - № 27. - P. 5747–5754.
152. Прут Э.В., Зеленецкий А.Н. Химическая модификация и смешение

- полимеров в экструдере-реакторе / Э.В. Прут, А.Н. Зеленецкий // Успехи химии. - 2001. - Т. 70. - № 1. - С. 72–87.
153. Tan D. Towards medicinal mechanochemistry: evolution of milling from pharmaceutical solid form screening to the synthesis of active pharmaceutical ingredients (APIs) / D. Tan, L. Loots, T. Friščić // Chem. Commun. - 2016. - V. 52. - № 50. - P. 7760–7781.
154. Халиков С.С. О методах улучшения растворимости антигельминтных лекарственных веществ / С.С. Халиков, А.В. Душкин // Химико-фармацевтический журнал. - 2020. - Т. 54. - № 5. - С. 33–37.
155. Stolar T. Control of pharmaceutical cocrystal polymorphism on various scales by mechanochemistry: Transfer from the laboratory batch to the large-scale extrusion processing / T. Stolar, S. Lukin, M. Tireli, I. Sović, B. Karadeniz, I. Kereković, G. Matijašić, M. Gretić, Z. Katančić, I. Dejanović, M.M. Di, I. Halasz, K. Užarević // ACS Sustain. Chem. Eng. - 2019. - V. 7. - № 7. - P. 7102–7110.
156. Baláž P. Mechanochemistry in technology: From minerals to nanomaterials and drugs / P. Baláž, M. Baláž, Z. Bujňáková // Chem. Eng. Technol. - 2014. - V. 37. - № 5. - P. 747–756.
157. Ivashchenko G.L. Effect of mechanical activation on the physicochemical properties of piroxicam with chitosan / G.L.Ivashchenko, T.P. Shakhtshneider, V.V. Boldyrev, N.G. Bazarnova, A.S. Medvedeva, L.P. Safronova // Mendeleev Commun. - 2003. - V. 13. - № 1. - P. 3–5.
158. Wang L. Microstructure and gelation behavior of hydroxyapatite-based nanocomposite sol containing chemically modified silk fibroin / L. Wang, G.-L. Ning, M. Senna // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. - 2005. - V. 254. - № 1–3. - P. 159–164.
159. Роговина, С.З. Химическая модификация природных полисахаридов целлюлозы, хитина и хитозана в твердой фазе под действием сдвиговых деформаций: дис...д.х.н.: 02.00.06. / Роговина Светлана Захаровна. - М., 2003. - 232 с.
160. Акопова, Т.А. Твердофазный синтез, структура, свойства и перспективы

- применения материалов на основе полисахарида хитозана: дис...д.х.н.: 02.00.06. / Акопова Татьяна Анатольевна. М., 2013. - 284 с.
161. Bychkov A. Current achievements in the mechanically pretreated conversion of plant biomass / A. Bychkov, E. Podgorbunskikh, E. Bychkova, O. Lomovsky // *Biotechnol. Bioeng.* - 2019. - V. 116. - № 5. - P. 1231–1244.
162. Dome K. Changes in the crystallinity degree of starch having different types of crystal structure after mechanical pretreatment / K. Dome, E. Podgorbunskikh, A. Bychkov, O. Lomovsky // *Polymers (Basel)*. - 2020. - V. 12. - № 3. - P. 641.
163. Rogovina S.Z. Biodegradable polymer composites based on synthetic and natural polymers of various classes / S.Z. Rogovina // *Polym. Sci. Ser. C.* - 2016. - V. 58. - № 1. - P. 62–73.
164. Rogovina S.Z. Composites based on cellulose and chitosan / S.Z. Rogovina, R.Y. Deberdeev, K.S. Fadeeva // *Polym. Sci. Ser. D.* - 2018. - V. 11. - № 4. - P. 448–453.
165. Zelenetskii A.N. Immobilization of trypsin on polysaccharides upon intense mechanical treatment / A.N. Zelenetskii, T.A. Akopova, N.R. Kildeeva, G.A. Vikhoreva, E.S. Obolonkova, A.A. Zharov // *Russ. Chem. Bull.* - 2003. - V. 52. - № 9. - P. 2073–2077.
166. Вихорева, Г.А. Синтез и свойства водорастворимых производных хитина: дис...д.х.н.: 02.00.06. / Вихорева Галина Александровна. - М., 1998. - 389 с.
167. Enikolopian N.S. Some aspects of chemistry and physics of plastic flow / N.S. Enikolopian // *Pure Appl. Chem.* - 1985. - V. 57. - № 11. - P. 1707–1711.
168. Enikolopian N.S. Processes of wood delignification and cellulose mercerization under conditions of shear deformations / N.S. Enikolopian, E.A. Balashova, L.S. Sakhonenko, S.Z. Rogovina // *J. Appl. Polym. Sci.* - 1992. - V. 44. - № 3. - P. 459–466.
169. Роговина С.З. Модификация полисахаридов в условиях сдвиговых деформаций (Обзор) / С.З. Роговина, Т.А. Акопова // *Высокомолекулярные соединения.* - 1994. - Т. 36. - № 4. - С. 593–600.
170. Акопова Т.А. Образование хитозана из хитина в условиях сдвиговых

- деформаций / Т.А. Аكوпова, С.З. Роговина, Г.А. Вихорева, Л.С.Гальбрайт, Н.С. Ениколопян // Высокомолекулярные соединения. - 1991. - Т. 32. - № 10. - С. 735–737.
171. Rogovina S.Z. Modification of cellulose in conditions of plastic flow under pressure / S.Z. Rogovina, V.A. Zhorin, N.S. Enikolopian // J. Appl. Polym. Sci. - 1995. - V. 57. - № 4. - P. 439–447.
172. Роговина С.З. Модификация хитозана ангидридами дикарбоновых кислот в условиях сдвиговых деформаций / С.З. Роговина, Т.А. Аكوпова, Г.А. Вихорева, И.Н. Горбачева, С.Н. Зеленецкий // Высокомолекулярные соединения. - 1998. - Т. 40. - № 8. - С. 1389–1393.
173. Rogovina S.Z. Investigation of properties of chitosan obtained by solid-phase and suspension methods / S.Z. Rogovina, T.A. Akopova, G.A. Vikhoreva // J. Appl. Polym. Sci. - 1998. - V. 70. - № 5. - P. 927–933.
174. Mogilevskaya E.L. The crystal structure of chitin and chitosan / E.L. Mogilevskaya, T.A. Akopova, A.N. Zelenetskii, A.N. Ozerin // Polym. Sci. Ser. A. - 2006. - V. 48. - № 2. - P. 116–123.
175. Роговина С.З. Исследование взаимодействия хитозана с твердыми органическими кислотами в условиях сдвиговых деформаций / С.З. Роговина, Г.А. Вихорева, Т.А. Аكوпова, И.Н. Горбачева, А.Н. Зеленецкий // Высокомолекулярные соединения. - 1997. - Т. 39. - № 6. - С. 941–946.
176. Аكوпова Т.А. Получение карбоксиметилловых эфиров хитина и хитозана в условиях пластического течения / Т.А. Аكوпова, С.З. Роговина, Г.А. Вихорева, С.Н. Зеленецкий // Высокомолекулярные соединения. - 1995. - Т. 37. - № 10. - С. 1797-1801.
177. Леснякова Л.В. Влияние условий твердофазного получения привитых сополимеров хитозана и поливинилового спирта на их строение и растворимость / Л.В. Леснякова, Т.А. Аكوпова, Г.А. Вихорева, Н.С. Перов, А.Н. Зеленецкий // Композиты и наноструктуры. - 2012. - Т. 1. - № 13. - С. 44–55.
178. Akopova T.A. Solid-state synthesis of amphiphilic chitosan-polyethylene systems

- by the maleinization of both components / T.A. Akopova, L.V. Vladimirov, V.A. Zhorin, A.N. Zelenetskii // *Polym. Sci. Ser. B.* - 2009. - V. 51. - № 3–4. - P. 124–134.
179. Zaytseva-Zotova D. Biocompatible smart microcapsules based on chitosan-poly(vinyl alcohol) copolymers for cultivation of animal cells / D. Zaytseva-Zotova, V. Balysheva, A. Tsoy, M. Drozdova, T.A. Akopova, L. Vladimirov, I. Chevalot, A. Marc, J.L. Goergen, E. Markvicheva // *Adv. Eng. Mater.* - 2011. - V. 13. - № 12. - P. 493–503.
180. Ozerin A.N. Nanocomposites based on modified chitosan and titanium oxide / A.N. Ozerin, A.N. Zelenetskii, T.A. Akopova, O.B. Pavlova-Verevkina, L.A. Ozerina, N.M. Surin, A.S. Keчек'yan // *Polym. Sci. Ser. A.* - 2006. - V. 48. - № 6. - P. 638–643.
181. Ozerin A.N. Hybrid nanocomposites based on graft copolymer of chitosan with poly(vinyl alcohol) and titanium oxide / A.N. Ozerin, N.S. Perov, A.N. Zelenetskii, T.A. Akopova, L.A. Ozerina, A.S. Keчек'yan, N.M. Surin, L.V. Vladimirov, V.D. Yulovskaya // *Nanotechnologies Russ.* - 2009. - V. 4. - № 5–6. - P. 331–339.
182. O'Brien F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering / F.J. O'Brien // *Mater. Today.* - 2011. - V. 14. - № 3. - P. 88–95.
183. Севастьянов В.И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины / В.И. Севастьянов // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* - 2014. - Т. 16. - № 3. - С. 93–108.
184. K.H. Hussein Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application / K.H. Hussein, K.-M. Park, K.-S. Kang, H.-M. Woo // *Mater. Sci. Eng. C.* - 2016. - V. 67. - P. 766–778.
185. Hunsberger J.G. An industry-driven roadmap for manufacturing in regenerative medicine / J.G. Hunsberger, T. Shupe, A. Atala // *Stem Cells Transl. Med.* - 2018. - V. 7. - № 8. - P. 564–568.
186. Holzapfel B.M. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view / B.M. Holzapfel, J.C. Reichert, J.-T. Schantz, U.

- Gbureck, L. Rackwitz, U. Nöth, F. Jakob, M. Rudert, J. Groll, D.W. Hutmacher // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2013. - V. 65. - № 4. - P. 581–603.
187. Mujtaba M. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review / M. Mujtaba, R.E. Morsi, G. Kerch, M.Z. Elsabee, M. Kaya, J. Labidi, K.M. Khawar // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2019. - V. 121. - P. 889–904.
188. Elsabee M.Z. Chitosan based edible films and coatings: A review / M.Z. Elsabee, E.S. Abdou // *Mater. Sci. Eng. C.* - 2013. - V. 33. - № 4. - P. 1819–1841.
189. Van Den Broek L.A.M. Chitosan films and blends for packaging material / L.A.M. Van Den Broek, R.J.I. Knoop, F.H.J. Kappen, C.G. Boeriu // *Carbohydr. Polym.* - 2015. - V. 116. - P. 237–242.
190. Ali A. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery / A. Ali, S. Ahmed // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2018. - V. 109. - P. 273–286.
191. Miguel S.P. Chitosan based-asymmetric membranes for wound healing: A review / S.P. Miguel, A.F. Moreira, I.J. Correia // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2019. - V. 127. - P. 460–475.
192. Mengatto L.N. Recent advances in chitosan films for controlled release of drugs / L.N. Mengatto, I.M. Helbling, J.A. Luna // *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* - 2012. - V. 6. - № 2. - P. 156–170.
193. Ruprai H. Porous chitosan films support stem cells and facilitate sutureless tissue repair: research-article / H. Ruprai, S. Romanazzo, J. Ireland, K. Kilian, D. Mawad, L. George, R. Wuhner, J. Houang, D. Ta, S. Myers, A. Lauto // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* - 2019. - V. 11. - № 36. - P. 32613–32622.
194. De Masi A. Chitosan films for regenerative medicine: fabrication methods and mechanical characterization of nanostructured chitosan films / A. De Masi, I. Tonazzini, C. Masciullo, R. Mezzena, F. Chiellini, D. Puppi, M. Cecchini // *Biophys. Rev.*, - 2019. - V. 11. - № 5. - P. 807–815.
195. Kholkhoev B.C. Convenient approach to making nanocomposites based on a chitosan-poly(vinyl pyrrolidone) polymer matrix and a graphene nanofiller / Kholkhoev B.C., S.A. Bal'zhinov, V.G. Makotchenko, V.E. Fedorov, I.A. Farion,

- M.N. Kozlova, P.S. Timashev, V.F. Burdukovskii // *J. Appl. Polym. Sci.* - 2017. - V. 134. - № 27. - P. 45038.
196. Banerjee S. Antimicrobial and biocompatible fluorescent hydroxyapatite-chitosan nanocomposite films for biomedical applications / S. Banerjee, B. Bagchi, S. Bhandary, A. Kool, N.A. Hoque, P. Biswas, K. Pal, P. Thakur, K. Das, P. Karmakar, S. Das // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* - 2018. - V. 171. - P. 300–307.
197. Spasova M. Electrospun chitosan-coated fibers of poly(L-lactide) and poly(L-lactide)/poly(ethylene glycol): preparation and characterization / M. Spasova, D. Paneva, N. Manolova, P. Radenkov, I. Rashkov // *Macromol. Biosci.* - 2008. - V. 8. - № 2. - P. 153–162.
198. Zhu Y. Surface modification of polycaprolactone membrane via aminolysis and biomacromolecule immobilization for promoting cytocompatibility of human endothelial cells / Y. Zhu, C. Gao, X. Liu, J. Shen // *Biomacromolecules.* - 2002. - V. 3. - № 6. - P. 1312–1319.
199. Lao L. Chitosan modified poly(l-lactide) microspheres as cell microcarriers for cartilage tissue engineering / L. Lao, H. Tan, Y. Wang, C. Gao // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* - 2008. - V. 66. - № 2. - P. 218–225.
200. Chen P. Influence of plasticiser type and nanoclay on the properties of chitosan-based materials / P. Chen, F. Xie, F. Tang, T. McNally // *Eur. Polym. J.* - 2021. - V. 144. - P. 110225.
201. Silva S.S. Plasma surface modification of chitosan membranes: Characterization and preliminary cell response studies / S.S. Silva, S.M. Luna, M.E. Gomes, J. Benesch, I. Pashkuleva, J.F. Mano, R.L. Reis // *Macromol. Biosci.* - 2008. - V. 8. - № 6. - P. 568–576.
202. Zhang H.Y. Effects of Ar-H₂-N₂ microwave plasma on chitosan and its nanoliposomes blend thin films designed for tissue engineering applications / H.Y. Zhang, F. Cleymand, C. Noël, C.J.F. Kahn, M. Linder, A. Dahoun, G. Henrion, E. Arab-Tehrany // *Carbohydr. Polym.* - 2013. - V. 93. - № 2. - P. 401–411.
203. Lahann J. Vapor-based polymer coatings for potential biomedical applications / J.

- Lahann // *Polym. Int.* - 2006. - V. 55. - № 12. - P. 1361–1370.
204. Zefirov V.V. Deposition of a chitosan coating on celgard porous matrices in the presence of carbon dioxide under pressure / V.V. Zefirov, M.A. Pigaleva, V.G. Sergeyev, M.O. Gallyamov // *Polym. Sci. Ser. A.* - 2020. - V. 62. - № 2. - P. 123–131.
205. Oliveira J.A.M. Characterization of the chitosan-tungsten composite coating obtained by electrophoretic deposition / J.A.M. Oliveira, R.A.C. de Santana, N.A. Wanderley // *Prog. Org. Coatings.* - 2020. - V. 143 - P. 105631.
206. 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.Y. Yablokov, V.A. Altynov, L.I. Kravets, A.B. Gilman, T.A. Akopova, P.S. Timashev // *J. Appl. Polym. Sci.* - 2020. - V. 137. - № 3. - P. 48287.
207. Demina T.S. Plasma treatment of poly(ethylene terephthalate) films and chitosan deposition: DC- vs. AC-discharge / T.S. Demina, M.S. Piskarev, O.A. Romanova, A.K. Gatin, B.R. Senatulin, E.A. Skryleva, T.M. Zharikova, A.B. Gilman, A.A. Kuznetsov, T.A. Akopova, P.S. Timashev // *Materials (Basel).* - 2020. - V. 13. - № 3. - P. 508.
208. S. Park Improvements in barrier properties of poly(lactic acid) films coated with chitosan or chitosan/clay nanocomposite / S. Park, H.S. Lee, J.H. Choi, C.M. Jeong, M.H. Sung, H.J. Park // *J. Appl. Polym. Sci.* - 2012. - V. 125. - № S1. - P. 2658–2667.
209. Cui Y.L. Biomimetic surface modification of poly(L-lactic acid) with chitosan and its effects on articular chondrocytes in vitro / Y.L. Cui, A.D. Qi, W.G. Liu, X.H. Wang, H. Wang, D.M. Ma, K.D. Yao // *Biomaterials.* - 2003. - V. 24. - № 21. - P. 3859–3868.
210. Khorshidi S. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications / S. Khorshidi, A. Solouk, H. Mirzadeh, S. Mazinani, J.M. Lagaron, S. Sharifi, S. Ramakrishna // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* - 2016. - V. 10. - № 9. - P. 715–738.

211. Kishan A.P. Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review / A.P. Kishan, E.M. Cosgriff-Hernandez // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* - 2017. - V. 105. - № 10. - P. 2892–2905.
212. Kitsara M. Fibers for hearts: A critical review on electrospinning for cardiac tissue engineering / M. Kitsara, O. Agbulut, D. Kontziampasis, Y. Chen, P. Menasché // *Acta Biomater.* - 2017. - V. 48. - P. 20–40.
213. Pham Q.P. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review / Q.P. Pham, U. Sharma, A.G. Mikos // *Tissue Eng.* - 2006. - V. 12. - № 5. - P. 1197–1211.
214. Elsabee M.Z. Chitosan based nanofibers, review / M.Z. Elsabee, H.F. Naguib, R.E. Morsi // *Mater. Sci. Eng. C.* - 2012. - V. 32. - № 7. - P. 1711–1726.
215. Li Q. Genipin-crosslinked electrospun chitosan nanofibers: Determination of crosslinking conditions and evaluation of cytocompatibility / Q. Li, X. Wang, X. Lou, H. Yuan, H. Tu, B. Li, Y. Zhang // *Carbohydr. Polym.* - 2015. - V. 130. - P. 166–174.
216. Cui Z. Electrospinning and crosslinking of polyvinyl alcohol/chitosan composite nanofiber for transdermal drug delivery / Z. Cui, Z. Zheng, L. Lin, J. Si, Q. Wang, X. Peng, W. Chen // *Adv. Polym. Technol.* - 2018. - V. 37. - № 6. - P. 1917–1928.
217. Schiffman J.D. One-step electrospinning of cross-linked chitosan fibers / J.D. Schiffman, C.L. Schauer // *Biomacromolecules.* - 2007. - V. 8. - № 9. - P. 2665–2667.
218. Au H.T. Fabrication of an antibacterial non-woven mat of a poly(lactic acid)/chitosan blend by electrospinning / H.T. Au, L.N. Pham, T.H.T. Vu, J.S. Park // *Macromol. Res.* - 2012. - V. 20. - № 1. - P. 51–58.
219. Hardiansyah A. Electrospinning and antibacterial activity of chitosan-blended poly(lactic acid) nanofibers / A. Hardiansyah, H. Tanadi, M.-C. Yang, T.-Y. Liu // *J. Polym. Res.* - 2015. - V. 22. - № 4. - P. 59.
220. Stoleru E. Novel procedure to enhance PLA surface properties by chitosan irreversible immobilization / E. Stoleru, R.P. Dumitriu, B.S. Munteanu, T. Zaharescu, E.E. Tănase, A. Mitelut, G.-L. Ailiesei, C. Vasile // *Appl. Surf. Sci.* -

2016. - V. 367. - P. 407–417.
221. Zhang L. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments / L. Zhang, F. Gu, J. Chan, A. Wang, R. Langer, O. Farokhzad // *Clin. Pharmacol. Ther.* - 2008. - V. 83. - № 5. - P. 761–769.
222. Das S.S. Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for drug / S.S. Das, P. Bharadwaj, M. Bilal, M. Barani, A. Rahdar, P. Taboada, S. Bungau, G. Kyzas // *Polymers (Basel)*. - 2020. - V. 12. - P. 1–45.
223. Tong X. Recent advances in natural polymer-based drug delivery systems / X. Tong, W. Pan, T. Su, M. Zhang, W. Dong, X. Qi // *React. Funct. Polym.* - 2020. - V. 148. - P. 104501.
224. Nasongkla N. Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems / N. Nasongkla, E. Bey, J. Ren, H. Ai, C. Khemtong, J.S. Guthi, S.F. Chin, A.D. Sherry, D.A. Boothman, J. Gao // *Nano Lett.* - 2006. - V. 6. - № 11. - P. 2427–2430.
225. Жаворонок Е.С., Кедик С.А., Панов А.В., Петрова Е.А., Суслов В.В. Полимерные микрочастицы для медицины и биологии. Москва: ИФТ, - 2014. - 480 с.
226. Yuan S. Polymeric composites for powder-based additive manufacturing: Materials and applications / S. Yuan, F. Shen, C.K. Chua, K. Zhou // *Prog. Polym. Sci.* - 2019. - V. 91. - P. 141–168.
227. Derakhti S. Attachment and detachment strategies in microcarrier-based cell culture technology: A comprehensive review / S. Derakhti, S.H. Safiabadi-Tali, G. Amoabediny, M. Sheikhpour // *Mater. Sci. Eng. C*. - 2019. - V. 103. - P. 109782.
228. Markvicheva E., Grandfils C. Microcarriers for animal cell culture // *Fundamentals of cell immobilization biotechnology, focus on biotechnology* / ed. Nedovich V., Villaert R. Springer, - 2004. - V. 007. - № 095. - P. 141–161.
229. Van Wezel A.L. Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture / A.L. Van Wezel // *Nature*. - 1967. - V. 216. - P. 64–65.
230. Li B. Past, present, and future of microcarrier-based tissue engineering / B. Li, X. Wang, Y. Wang, W. Gou, X. Yuan, J. Peng, Q. Guo, S. Lu // *J. Orthop. Transl.* -

2015. - V. 3. - № 2. - P. 51–57.
231. Chen X.-Y. Recent advances in the use of microcarriers for cell cultures and their ex vivo and in vivo applications / X.-Y. Chen, J.-Y. Chen, X.-M. Tong, J.-G. Mei, Y.-F. Chen, X.-Z. Mou // *Biotechnol. Lett.* - 2020. - V. 42. - № 1. - P. 1–10.
232. Tavassoli H. Large-scale production of stem cells utilizing microcarriers: A biomaterials engineering perspective from academic research to commercialized products / H. Tavassoli, S.N. Alhosseini, A. Tay, P.P.Y. Chan, O.S.K. Weng, M.E. Warkiani // *Biomaterials.* - 2018. - V. 181. - P. 333–346.
233. Neto M.D. Microparticles in contact with cells: from carriers to multifunctional tissue modulators / M.D. Neto, M.B. Oliveira, .F. Mano J// *Trends Biotechnol.* - 2019. - V. 37. - № 9. - P. 1011–1028.
234. Privalova A. Biodegradable polyester-based microcarriers with modified surface tailored for tissue engineering / A. Privalova, E. Markvicheva, C. Sevrin, M. Drozdova, C. Kottgen, B. Gilbert, M. Ortiz, C. Grandfils // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* - 2015. - V. 103. - № 3. - P. 939–948.
235. He T. 5-Fluorouracil monodispersed chitosan microspheres: Microfluidic chip fabrication with crosslinking, characterization, drug release and anticancer activity / T. He, W. Wang, B. Chen, J. Wang, Q. Liang, B. Chen // *Carbohydr. Polym.* - 2020. - V. 236. - P. 116094.
236. Amiri A. Fabrication of cumin loaded-chitosan particles: Characterized by molecular, morphological, thermal, antioxidant and anticancer properties as well as its utilization in food system / A. Amiri, A. Mousakhani-Ganjeh, Z. Amiri, Y. Guo, S.A. Pratap, K.R. Esmailzadeh // *Food Chem.* - 2020. - V. 310. - P. 125821.
237. Rescignano N. Use of alginate, chitosan and cellulose nanocrystals as emulsion stabilizers in the synthesis of biodegradable polymeric nanoparticles / N. Rescignano, E. Fortunati, I. Armentano, R. Hernandez, C. Mijangos, R. Pasquino, J.M. Kenny // *J. Colloid Interface Sci.* - 2015. - V. 445. - P. 31–39.
238. Rosca I.D. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation / I.D. Rosca, F. Watari, M. Uo // *J. Control. Release.* - 2004. - V. 99. - № 2. - P. 271–280.

239. Bandari S. Continuous twin screw granulation – An advanced alternative granulation technology for use in the pharmaceutical industry / S. Bandari, D. Nyavanandi, V.R. Kallakunta, K.Y. Janga, S. Sarabu, A. Butreddy, M.A. Repka // *Int. J. Pharm.* - 2020. - V. 580. - P. 119215.
240. Sahoo S.K. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake / S.K. Sahoo, J. Panyam, S. Prabha, V. Labhasetwar // *J. Control. Release.* - 2002. - V. 82. - № 1. - P. 105–114.
241. Messai I. Adsorption of chitosan onto poly(D,L-lactic acid) particles: A physico-chemical investigation / I. Messai, T. Delair // *Macromol. Chem. Phys.* - 2005. - V. 206. - № 16. - P. 1665–1674.
242. Guo C. Understanding the adsorption mechanism of chitosan onto poly(lactide-co-glycolide) particles / C. Guo, R.A. Gemeinhart // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* - 2008. - V. 70 - № 2. - P. 597–604.
243. Satpute S.K. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms / S.K. Satpute, I.M. Banat, P.K. Dhakephalkar, A.G. Banpurkar, B.A. Chopade // *Biotechnol. Adv.* - 2010. - V. 28. - № 4. - P. 436–450.
244. Bouyer E. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? / E. Bouyer, G. Mekhloufi, V. Rosilio, J.-L. Grossiord, F. Agnely // *Int. J. Pharm.* - 2012. - V. 436. - № 1–2. - P. 359–378.
245. Rodriguez M.S. Emulsification capacity of chitosan / M.S. Rodriguez, L.A. Albertengo, E. Agullo // *Carbohydr. Polym.* - 2002. - V. 48. - № 3. - P. 271–276.
246. Del Blanco L.F. Influence of the deacetylation degree on chitosan emulsification properties / L.F. Del Blanco, M.S. Rodriguez, P.C. Schulz, E. Agulló // *Colloid Polym. Sci.* - 1999. - V. 277. - № 11. - P. 1087–1092.
247. Li X. Effects of concentration, degree of deacetylation and molecular weight on emulsifying properties of chitosan / X. Li, W. Xia // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2011. - V. 48. - № 5. - P. 768–772.
248. Jiang T. Chitosan–poly(lactide-co-glycolide) microsphere-based scaffolds for

- bone tissue engineering: In vitro degradation and in vivo bone regeneration studies / T. Jiang, S.P. Nukavarapu, M. Deng, E. Jabbarzadeh, M.D. Kofron, S.B. Doty, W.I. Abdel-Fattah, C.T. Laurencin // *Acta Biomater.* - 2010. - V. 6. - № 9. - P. 3457–3470.
249. Chevalier Y. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions / Y. Chevalier, M.A. Bolzinger // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* - 2013. - V. 439. - P. 23–34.
250. Yang Y. An overview of pickering emulsions: Solid-particle materials, classification, morphology, and applications / Y. Yang, Z. Fang, X. Chen, W. Zhang, Y. Xie, Y. Chen, Z. Liu, W. Yuan // *Front. Pharmacol.* - 2017. - V. 8. - P. 1–20.
251. Wu J. Recent studies of Pickering emulsions: particles make the difference / J. Wu, G.-H. Ma // *Small.* - 2016. - V. 12. - № 34. - P. 4633–4648.
252. Momziakova K.S. Preparation of nanocellulose from nonwood plant raw materials / K.S. Momziakova, T.R. Deberdeev, M.S. Vershinin, V.V. Leksin, A.A. Momziakov, R.Y. Deberdeev // *Russ. J. Bioorganic Chem.* - 2020. - V. 46. - № 7. - P. 1304–1309.
253. Sotnikova Y.S. Application of micro- and nanocrystalline cellulose / Y.S. Sotnikova, T.S. Demina, A.V. Istomin, G.P. Goncharuk, C. Grandfils, T.A. Akopova, A.N. Zelenetskii, P.G. Babayevsky // *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* - 2018. - V. 347. - № 1. - P. 012006.
254. Calabrese V. Pickering emulsions stabilized by naturally derived or biodegradable particles / V. Calabrese, J.C. Courtenay, K.J. Edler, J.L. Scott // *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* - 2018. - V. 12. - P. 83–90.
255. Asfour M.H. Chitosan based Pickering emulsion as a promising approach for topical application of rutin in a solubilized form intended for wound healing: In vitro and in vivo study / M.H. Asfour, H. Elmotasem, D.M. Mostafa, A.A.A. Salama // *Int. J. Pharm.* - 2017. - V. 534. - № 1–2. - P. 325–338.
256. Wang J. Fabrication of monodisperse drug-loaded poly(lactic-co-glycolic acid)–chitosan core-shell nanocomposites via pickering emulsion / J. Wang, W.-C. Law,

- L. Chen, D. Chen, C.-Y. Tang // *Compos. Part B Eng.* - 2017. - V. 121. - P. 99–107.
257. Sharkawy A. Chitosan-based Pickering emulsions and their applications: A review / A. Sharkawy, M.F. Barreiro, A.E. Rodrigues // *Carbohydr. Polym.* - 2020. - V. 250. - P. 116885.
258. Costa A.M.S. Extremely strong and tough hydrogels as prospective candidates for tissue repair - A review / A.M.S. Costa, J.F. Mano // *Eur. Polym. J.* - 2015. - V. 72. - P. 344–364.
259. Ahmed E.M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review / E.M. Ahmed // *J. Adv. Res.* - 2015. - V. 6. - № 2. - P. 105–121.
260. Saboktakin M. Supramolecular hydrogels as drug delivery systems / M. Saboktakin, R.M. Tabatabaei // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2015. - V. 75. - P. 426–436.
261. Buwalda S.J. Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials / S.J. Buwalda, K.W.M. Boere, P.J. Dijkstra, J. Feijen, T. Vermonden, W.E. Hennink // *J. Control. Release.* - 2014. - V. 190. - P. 254–273.
262. Ullah F. Classification, processing and application of hydrogels: A review / F. Ullah, M.B.H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, H.M. Akil // *Mater. Sci. Eng. C.* - 2015. - V. 57. - P. 414–433.
263. Kirchhof S. Hydrogels in ophthalmic applications / S. Kirchhof, A.M. Goepferich, F.P. Brandl // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* - 2015. - V. 95. - P. 227–238.
264. Dragan E.S. Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review / E.S. Dragan // *Chem. Eng. J.* - 2014. - V. 243. - P. 572–590.
265. Caló E. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products / E. Caló, V.V. Khutoryanskiy // *Eur. Polym. J.* - 2015. - V. 65. - P. 252–267.
266. Nguyen Q.V. Injectable polymeric hydrogels for the delivery of therapeutic agents: A review / Q.V. Nguyen, D.P. Huynh, J.H. Park, D.S. Lee // *Eur. Polym. J.* - 2015. - V. 72. - P. 602–619.
267. Sivashanmugam A. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue

- engineering / A. Sivashanmugam, R. Arun Kumar, M. Vishnu Priya, S.V. Nair, R. Jayakumar // *Eur. Polym. J.* - 2015. - V. 72. - P. 543–565.
268. Radhakrishnan J. Hydrogel based injectable scaffolds for cardiac tissue regeneration / J. Radhakrishnan, U.M. Krishnan, S. Sethuraman // *Biotechnol. Adv.* - 2014. - V. 32. - № 2. - P. 449–461.
269. Lou X. Swelling behavior and mechanical properties of chemically cross-linked gelatin gels for biomedical use / X. Lou, T.V. Chirila // *J. Biomater. Appl.* - 1999. - V. 14. - № 2. - P. 184–191.
270. Anseth K.S. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination / K.S. Anseth, C.N. Bowman, L. Brannon-Peppas // *Biomaterials.* - 1996. - V. 17. - № 17. - P. 1647–1657.
271. Gholamali I. Stimuli-responsive polysaccharide hydrogels for biomedical applications: a review / I. Gholamali // *Regenerative Engineering and Translational Medicine.* - 2021. - V. 7. - № 1. - P. 91–114.
272. Koetting M.C. Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications / M.C. Koetting, J.T. Peters, S.D. Steichen, N.A. Peppas // *Mater. Sci. Eng. R* - 2015. - V. 93. - P. 1–49.
273. Berger J. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications / J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas, R. Gurny // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* - 2004. - V. 57. - № 1. - P. 19–34.
274. Bhattarai N. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery / N. Bhattarai, J. Gunn, M. Zhang // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2010. - V. 62. - № 1. - P. 83–99.
275. Croisier F. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering / F. Croisier, C. Jérôme // *Eur. Polym. J.* - 2013. - V. 49. - № 4. - P. 780–792.
276. Shariatnia Z. Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications / Z. Shariatnia, A.M. Jalali // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2018. - V. 115. - P. 194–220.
277. Giri T.K.T.K. Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications / T.K.T.K. Giri, A. Thakur,

- A.A.A. Alexander, H. Badwaik, D.K.D.K. Tripathi, Ajazuddin, H. Badwaik, D.K.D.K. Tripathi // *Acta Pharm. Sin. B.* - 2012. - V. 2. - № 5. - P. 439–449.
278. Dang Q.F. Controlled gelation temperature, pore diameter and degradation of a highly porous chitosan-based hydrogel / Q.F. Dang, J.Q. Yan, J.J. Li, X.J. Cheng, C.S. Liu, X.G. Chen // *Carbohydr. Polym.* - 2011. - V. 83. - № 1. - P. 171–178.
279. Shu X. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure / X. Shu, K. Zhu // *Int. J. Pharm.* - 2002. - V. 233. - № 1–2. - P. 217–225.
280. Shen E.C. Tetracycline release from tripolyphosphate-chitosan cross-linked sponge: A preliminary in vitro study / E.C. Shen, C.Wang, E. Fu, C.Y. Chiang, T.T. Chen, S. Nieh // *J. Periodontal Res.* - 2008. - V. 43. - № 6. - P. 642–648.
281. Brack H.P. A spectroscopic and viscometric study of the metal ion-induced gelation of the biopolymer chitosan / H.P. Brack, S.A. Tirmizi, W.M. Risen // *Polymer.* - 1997. - V. 38. - № 10. - P. 2351–2362.
282. Dambies L. Preparation of chitosan gel beads by ionotropic molybdate gelation / L. Dambies, T. Vincent, A. Domard, E. Guibal // *Biomacromolecules.* - 2001. - V. 2. - № 4. - P. 1198–1205.
283. de Oliveira H.C.L. Chitosan-poly(acrylic acid) polyelectrolyte complex membranes: preparation, characterization and permeability studies / H.C.L. de Oliveira, J.L.C. Fonseca, M.R. Pereira // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* - 2008. - V. 19. - № 2. - P. 143–160.
284. Luo Y. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery / Y. Luo, Q. Wang // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2014. - V. 64. - P. 353–367.
285. Zaytseva-Zotova D.S. Polyelectrolyte microcapsules with entrapped multicellular tumor spheroids as a novel tool to study the effects of photodynamic therapy / D.S. Zaytseva-Zotova, O.O. Udartseva, E.R. Andreeva, A. Bartkowiak, L.N. Bezdetnaya, F. Guillemin, J.L. Goergen, E.A. Markvicheva // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* - 2011. - V. 97. - № 2. - P. 255–262.
286. Li J. Iota -carrageenan/chitosan/gelatin scaffold for the osteogenic differentiation

- of adipose-derived MSCs in vitro / J. Li, B. Yang, Y. Qian, Q. Wang, R. Han, T. Hao, Y. Shu, Y. Zhang, F. Yao, C. Wang // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* - 2015. - V. 103. - № 7. - P. 1498–1510.
287. Araujo J.V. Novel porous scaffolds of pH responsive chitosan/carrageenan-based polyelectrolyte complexes for tissue engineering / J.V. Araujo, N. Davidenko, M. Danner, R.E. Cameron, S.M. Best // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* - 2014. - V. 102. - № 12.
288. Barroso N. Self-healable hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte complex hydrogels and multilayers / N. Barroso, O. Guaresti, L. Pérez-Álvarez, L. Ruiz-Rubio, N. Gabilondo, J.L. Vilas-Vilela // *Eur. Polym. J.* - 2019. - V. 120. - № April. - P. 109268.
289. Cascone M.G. Effect of chitosan and dextran on the properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels / M.G. Cascone, S. Maltinti, N. Barbani, M. Laus // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* - 1999. - V. 10. - № 7. - P. 431–435.
290. Подорожко Е.А. Изучение криоструктурирования полимерных систем. Особенности микроструктуры хитозан-содержащих комплексных и композитных криогелей поливинилового спирта / Е.А. Подорожко, Г.Р. Ульябаева, В.Е. Тихонов, А.В. Грачев, Л.В. Владимиров, Ю.А. Антонов, Н.Р. Кильдеева, В.И. Лозинский // *Коллоидный журнал.* - 2016. - Т. 78. - № 6. - С. 760–771.
291. Yap L.-S. Evaluation of hydrogel composing of Pluronic F127 and carboxymethyl hexanoyl chitosan as injectable scaffold for tissue engineering applications / L.-S. Yap, M.-C. Yang // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* - 2016. - V. 146. - P. 204–211.
292. Garnica-Palafox I.M. Influence of natural and synthetic crosslinking reagents on the structural and mechanical properties of chitosan-based hybrid hydrogels / I.M. Garnica-Palafox, F.M. Sánchez-Arévalo // *Carbohydr. Polym.* - 2016. - V. 151. - P. 1073–1081.
293. Silva R.M. Preparation and characterisation in simulated body conditions of glutaraldehyde crosslinked chitosan membranes / R.M. Silva, G.A. Silva, O.P.

- Coutinho, J.F. Mano, R.L. Reis // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* - 2004. - V. 15. - № 10. - P. 1105–1112.
294. Heris H.K. Investigation of Chitosan-glycol/glyoxal as an injectable biomaterial for vocal fold tissue engineering / H.K. Heris, N. Latifi, H. Vali, N. Li, L. Mongeau // *Procedia Eng.* - 2015. - V. 110. - P. 143–150.
295. Sadeghi M. Comparison of using formaldehyde and carboxy methyl chitosan in preparation of Fe₃O₄ superparamagnetic nanoparticles-chitosan hydrogel network: Sorption behavior toward bovine serum albumin / M. Sadeghi, F. Hanifpour, R. Taheri, H. Javadian, M. Ghasemi // *Process Saf. Environ. Prot.* - 2016. - V. 102. - P. 119–128.
296. Gough J.E. Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis / J.E. Gough, C.A. Scotchford, S. Downes // *J. Biomed. Mater. Res.* - 2002. - V. 61. - № 1. - P. 121–130.
297. Кильдеева Н.Р. О механизме реакции глутарового альдегида с хитозаном / Н.Р. Кильдеева, П.А. Перминов, Л.В. Владимиров, В.В. Новиков, С.Н. Михайлов // *Биоорганическая химия.* - 2009. - Т. 35. - № 3. - С. 397–407.
298. Muzzarelli R.A.A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids / R.A.A. Muzzarelli // *Carbohydr. Polym.* - 2009. - V. 77. - № 1. - P. 1–9.
299. Muzzarelli R.A.A. Genipin-crosslinked chitosan gels and scaffolds for tissue engineering and regeneration of cartilage and bone / R.A.A. Muzzarelli, M. El Mehtedi, C. Bottegoni, A. Aquili, A. Gigante // *Mar. Drugs.* - 2015. - V. 13. - № 12. - P. 7314–7338.
300. Heimbuck A.M. Development of responsive chitosan-genipin hydrogels for the treatment of wounds: / A.M. Heimbuck, T.R. Priddy-Arrington, M.L. Padgett, C.B. Llamas, H.H. Barnett, B.A. Bunnell, M.E. Caldorera-Moore // *ACS Appl. Bio Mater.* - 2019. - V. 2. - № 7. - P. 2879–2888.
301. Lai J.Y. In vitro response of retinal pigment epithelial cells exposed to chitosan materials prepared with different cross-linkers / J.Y. Lai, Y.T. Li, T.P. Wang // *Int. J. Mol. Sci.* - 2010. - V. 11. - № 12. - P. 5256–5272.

302. Gao L. Effects of genipin cross-linking of chitosan hydrogels on cellular adhesion and viability / L. Gao, H. Gan, Z. Meng, R. Gu, Z. Wu, L. Zhang, X. Zhu, W. Sun, J. Li, Y. Zheng, G. Dou // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. - 2014. - V. 117. - P. 398–405.
303. Delmar K. BThe dramatic effect of small pH changes on the properties of chitosan hydrogels crosslinked with genipin / K. Delmar, H. Bianco-Peled // *Carbohydr. Polym.* - 2015. - V. 127. - P. 28–37.
304. Зоткин М.А. Термомодификация хитозановых пленок в форме солей с различными кислотами / М.А. Зоткин, Г.А. Вихорева, А.С. Кечекьян // *Высокомолекулярные соединения С*. - 2004. - Т. 46. - № 2. - С. 359–363.
305. Su W.-T. Osteogenic differentiation and mineralization of human exfoliated deciduous teeth stem cells on modified chitosan scaffold / W.-T. Su, P.-S. Wu, C.-S. Ko, T.-Y. Huang // *Mater. Sci. Eng. C*. - 2014. - V. 41. - P. 152–160.
306. Nwe N. The mechanical and biological properties of chitosan scaffolds for tissue regeneration templates are significantly enhanced by chitosan from *Gongronella butleri* / N. Nwe, T. Furuike, H. Tamura // *Materials*. - 2009. - V. 2. - № 2. - P. 374–398.
307. Nath S.D. Chitosan-hyaluronic acid polyelectrolyte complex scaffold crosslinked with genipin for immobilization and controlled release of BMP-2 / S.D. Nath, C. Abueva, B.Kim, B.T. Lee // *Carbohydr. Polym.* - 2015. - V. 115. - P. 207–214.
308. Li L. Biodegradable and injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for postoperative adhesion prevention / L. Li, N. Wang, X. Jin, R. Deng, S. Nie, L. Sun, Q. Wu, Y. Wei, C. Gong // *Biomaterials*. - 2014. - V. 35. - № 12. - P. 3903–3917.
309. Collins M.N. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering - A review / M.N. Collins, C. Birkinshaw // *Carbohydr. Polym.* - 2013. - V. 92. - № 2. - P. 1262–1279.
310. Coimbra P. Sodium hyaluronate/chitosan polyelectrolyte complex scaffolds for dental pulp regeneration: Synthesis and characterization / P. Coimbra, P. Alves, T.A.M. Valente, R. Santos, I.J. Correia, P. Ferreira // *Int. J. Biol. Macromol.* -

2011. - V. 49. - № 4. - P. 573–579.
311. Ramesh N. Hydroxyapatite-polymer biocomposites for bone regeneration: A review of current trends / N. Ramesh, S.C. Moratti, G.J. Dias // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* - 2018. - V. 106. - № 5. - P. 2046–2057.
312. Swetha M. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering / M. Swetha, K. Sahithi, A. Moorthi, N. Srinivasan, K. Ramasamy, N. Selvamurugan // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2010. - V. 47. - № 1. - P. 1–4.
313. Haider A. Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review / A. Haider, S. Haider, S.S. Han, I.-K.K. Kang // *RSC Adv.* - 2017. - V. 7. - № 13. - P. 7442–7458.
314. Sun F. Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration / F. Sun, H. Zhou, J. Lee // *Acta Biomater.* - 2011. - V. 7. - № 11. - P. 3813–3828.
315. Qian L. Controlled freezing and freeze drying: a versatile route for porous and micro-/nano-structured materials / L. Qian, H. Zhang // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* - 2011. - V. 86. - № 2. - P. 172–184.
316. Annabi N. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering / N. Annabi, J.W. Nichol, X. Zhong, C. Ji, S. Koshy, A. Khademhosseini, F. Dehghani // *Tissue Eng. - Part B Rev.* - 2010. - V. 16. - № 4. - P. 371–383.
317. Qu H. Additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds / H. Qu // *Mater. Today Commun.* - 2020. - V. 24. - P. 101024.
318. Melchels F.P.W. Additive manufacturing of tissues and organs / F.P.W. Melchels, M.A.N. Domingos, T.J. Klein, J. Malda, P.J. Bartolo, D.W. Huttmacher // *Prog. Polym. Sci.* - 2012. - V. 37. - № 8. - P. 1079–1104.
319. Pahlevanzadeh F. Three-dimensional printing constructs based on the chitosan for tissue regeneration: State of the art, developing directions and prospect trends / F. Pahlevanzadeh, R. Emadi, A. Valiani, M. Kharaziha, S.A. Poursamar, H.R. Bakhsheshi-Rad, A.F. Ismail, S. RamaKrishna, F. Berto // *Materials.* - 2020. - V.

13. - № 11. - P. 2663.
320. Melchels F.P.W. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering / F.P.W. Melchels, J. Feijen, D.W. Grijpma // *Biomaterials*. - 2010. - V. 31. - № 24. - P. 6121–6130.
321. Koroleva A. Two-photon polymerization-generated and micromolding-replicated 3D scaffolds for peripheral neural tissue engineering applications / A. Koroleva, A.A. Gill, I. Ortega, J.W. Haycock, S. Schlie, S.D. Gittard, B.N. Chichkov, F. Claeysens // *Biofabrication*. - 2012. - V. 4 - № 2.
322. Skoog S.A. Stereolithography in tissue engineering / S.A. Skoog, P.L. Goering, R.J. Narayan // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* - 2014. - V. 25. - № 3. - P. 845–856.
323. Malinauskas M. Ultrafast laser nanostructuring of photopolymers: A decade of advances / M. Malinauskas, M. Farsari, A. Piskarskas, S. Juodkazis // *Phys. Rep.* - 2013. - V. 533. - № 1. - P. 1–31.
324. Huang J. A review of stereolithography: Processes and systems / J. Huang, Q. Qin, J. Wang // *Processes*. - 2020. - V. 8 - № 9.
325. Lee H. Lasers in additive manufacturing: A review / H. Lee, C.H.J. Lim, M.J. Low, N. Tham, V.M. Murukeshan, Y.J. Kim // *Int. J. Precis. Eng. Manuf. Green Technol.* - 2017. - V. 4. - № 3. - P. 307–322.
326. Liao C. A material odyssey for 3D nano/microstructures: two photon polymerization based nanolithography in bioapplications / C. Liao, A. Wuethrich, M. Trau // *Appl. Mater. Today*. - 2020. - V. 19. - P. 100635.
327. Do A.-V. Controlled drug delivery from 3D printed two-photon polymerized poly(ethylene glycol) dimethacrylate devices / A.-V. Do, K.S. Worthington, B.A. Tucker, A.K. Salem // *Int. J. Pharm.* - 2018. - V. 552. - № 1–2. - P. 217–224.
328. Ovsianikov A. Three-dimensional laser micro- and nano-structuring of acrylated poly(ethylene glycol) materials and evaluation of their cytotoxicity for tissue engineering applications / A. Ovsianikov, M. Malinauskas, S. Schlie, B. Chichkov, S. Gittard, R. Narayan, M. Löbner, K. Sternberg, K.-P. Schmitz, A. Haverich // *Acta Biomater.* - 2011. - V. 7. - № 3. - P. 967–974.
329. Field J. A tuneable, photocurable, poly(caprolactone)-based resin for tissue

- engineering—synthesis, characterisation and use in stereolithography / J. Field, J.W. Haycock, F.M. Boissonade, F. Claeysens // *Molecules*. - 2021. - V. 26. - № 5. - P. 1199.
330. Claeysens F. Three-dimensional biodegradable structures fabricated by two-photon polymerization / F. Claeysens, E.A. Hasan, A. Gaidukeviciute, D.S. Achilleos, A. Ranella, C. Reinhardt, A. Ovsianikov, X. Shizhou, C. Fotakis, M. Vamvakaki, B.N. Chichkov, M. Farsari // *Langmuir*. - 2009. - V. 25. - № 5. - P. 3219–3223.
331. Kaplin V.S. Photocurable methacrylate derivatives of polylactide: A two-stage synthesis in supercritical carbon dioxide and 3D laser structuring / V.S. Kaplin, N.N. Glagolev, V.T. Shashkova, I.A. Matveeva, I.V. Shershnev, T.S. Zarkhina, A.B. Solovieva, N.V. Minaev, N.A. Aksenova, B.S. Shavkuta, A.S. Kopylov, D.S. Kuznetsova, P.S. Timashev, A.I. Shpichka, E.A. Bezrukov // *Polymers*. - 2020. - V. 12. - № 11. - P. 1–19.
332. Koroleva A.V. Polylactide-based biodegradable scaffolds fabricated by two-photon polymerization for neurotransplantation / A.V. Koroleva, D.S. Guseva, N.A. Konovalov, T.M. Zharikova, E.G. Ponimaskin, B.N. Chichkov, V.N. Bagratashvili, P.S. Timashev // *Sovrem. Tehnol. v Med.* - 2016. - V. 8. - № 4. - P. 23–29.
333. Bardakova K.N. Tailoring the collagen film structural properties via direct laser crosslinking of star-shaped polylactide for robust scaffold formation / K.N. Bardakova, E.A. Grebenik, N.V. Minaev, S.N. Churbanov, Z. Moldagazyeva, G.E. Krupinov, S.V. Kostjuk, P.S. Timashev // *Mater. Sci. Eng. C*. - 2020. - V. 107. - P. 110300.
334. Morris V.B. Mechanical properties, cytocompatibility and manufacturability of chitosan:PEGDA hybrid-gel scaffolds by stereolithography / V.B. Morris, S. Nimbalkar, M. Younesi, P. McClellan, O. Akkus // *Ann. Biomed. Eng.* - 2017. - V. 45. - № 1. - P. 286–296.
335. Seo J.W. Hydrogel production platform with dynamic movement using photo-crosslinkable/temperature reversible chitosan polymer and stereolithography 4D

- printing technology / J.W. Seo, S.R. Shin, Y.J. Park, H. Bae // *Tissue Eng. Regen. Med.* - 2020. - V. 17. - № 4. - P. 423–431.
336. Kufelt O. Water-soluble photopolymerizable chitosan hydrogels for biofabrication via two-photon polymerization / O. Kufelt, A. El-Tamer, C. Sehring, M. Meißner, S. Schlie-Wolter, B.N. Chichkov // *Acta Biomater.* - 2015. - V. 18. - P. 186–195.
337. Roehm K.D. Bioprinted chitosan-gelatin thermosensitive hydrogels using an inexpensive 3D printer / K.D. Roehm, S.V. Madihally // *Biofabrication.* - 2017. - V. 10. - № 1. - P. 015002.
338. Mania S. The production possibility of the antimicrobial filaments by co-extrusion of the PLA pellet with chitosan powder for FDM 3D printing technology / S. Mania, J. Ryl, J.-R. Jinn, Y.-J. Wang, A. Michałowska, R. Tylingo // *Polymers.* - 2019. - V. 11. - № 11. - P. 1893.
339. Wu C.-S. Modulation, functionality, and cytocompatibility of three-dimensional printing materials made from chitosan-based polysaccharide composites / C.-S. Wu // *Mater. Sci. Eng. C.* - 2016. - V. 69. - P. 27–36.
340. Awad A. 3D printing: Principles and pharmaceutical applications of selective laser sintering / A. Awad, F. Fina, A. Goyanes, S. Gaisford, A.W. Basit // *Int. J. Pharm.* - 2020. - V. 586. - P. 119594.
341. Jiang T. In vitro evaluation of chitosan/poly(lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering / T. Jiang, W.I. Abdel-Fattah, C.T. Laurencin // *Biomaterials.* - 2006. - V. 27. - № 28. - P. 4894–4903.
342. Antonov E.N. Fabrication of polymer scaffolds for tissue engineering using surface selective laser sintering / E.N. Antonov, V.N. Bagratashvili, S.M. Howdle, A.N. Konovalov, V.K. Popov, V.Y. Panchenko // *Laser Phys.* - 2006. - V. 16. - № 5. - P. 774–787.
343. Antonov E.N. Three-dimensional bioactive and biodegradable scaffolds fabricated by surface-selective laser sintering / E.N. Antonov, V.N. Bagratashvili, M.J. Whitaker, J.A. Barry, K.M. Shakesheff, A.N. Konovalov, V.K. Popov, S.M. Howdle // *Adv. Mater.* - 2005. - V. 17. - № 3. - P. 327–330.
344. Antonov E.N. Surface-selective laser sintering of thermolabile polymer particles

- using water as heating sensitizer / E.N. Antonov, L.I. Krotova, N.V. Minaev, S.A. Minaeva, A.V. Mironov, V.K. Popov, V.N. Bagratashvili // *Quantum Electron.* - 2015. - V. 45. - № 11. - P. 1023–1028.
345. Kanczler J.M. Biocompatibility and osteogenic potential of human fetal femur-derived cells on surface selective laser sintered scaffolds / J.M. Kanczler, S.-H. Mirmalek-Sani, N.A. Hanley, A.L. Ivanov, J.J.A. Barry, C. Upton, K.M. Shakesheff, S.M. Howdle, E.N. Antonov, V.N. Bagratashvili, V.K. Popov, R.O.C. Oreffo // *Acta Biomater.* - 2009. - V. 5. - № 6. - P. 2063–2071.
346. Churbanov S.N. Features of polymeric structures by surface-selective laser sintering of polymer particles using water as sensitizer / S.N. Churbanov, N.V. Minaev, V.D. Grinchenko, S.A. Minaeva, V.N. Bagratashvili, P.S. Timashev // *KnE Energy.* - 2018. - V. 3. - № 2. - P. 64.
347. 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 Adv.* - 2019. - V. 9. - № 36. - P. 20968–20975.
348. 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 Commun.* - 2015. - V. 25. - № 4. - P. 280–282.
349. Акопова Т.А. Синтез, структура и оптические свойства аллилзамещенных производных хитозана / Т.А. Акопова, А.В. Истомин, М.А. Хавпачев, Т.С. Демина, Е.А. Свидченко, Г.В. Черкаев, Н.М. Сурин, А.Н. Зеленецкий // *Известия Уфимского научного центра РАН.* - 2016. - V. 3. - № 1. - P. 5–8.
350. Akopova T.A. Solid state synthesis of chitosan and its unsaturated derivatives for laser microfabrication of 3D scaffolds / T.A. Akopova, 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 Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* - 2015. - V. 87. - № 1. - P. 012079.

351. Bellamy L.J. *The Infra-red Spectra of Complex Molecules*. Dordrecht: Springer Netherlands, - 1975.
352. 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. - P. 995–1008.
353. Demina T.S. Polylactide-based microspheres prepared using solid-state copolymerized chitosan and D,L -lactide / T.S. Demina, T.A. Akopova, L.V. Vladimirov, A.N. Zelenetskii, E.A. Markvicheva, C. Grandfils // *Mater. Sci. Eng. C*. - 2016. - V. 59. - P. 333–338.
354. 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 // *Surf. Coatings Technol.* - 2012. - V. 207. - P. 508–516.
355. Demina T. Two-photon-induced microstereolithography of chitosan-g-oligolactides as a function of their stereochemical composition / T. Demina, K. Bardakova, N. Minaev, E. Svidchenko, A. Istomin, G. Goncharuk, L. Vladimirov, A. Grachev, A. Zelenetskii, P. Timashev, T. Akopova // *Polymers*. - 2017. - V. 9. - № 7. - P. 302.
356. Demina T.S. Chitosan- g -oligo/poly lactide 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 Adv.* - 2019. - V. 9. - № 64. - P. 37652–37659.
357. 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, C. Grandfils, N.S. Perov, A.S. Kechekyan, A.N. Zelenetskii // *Int. J. Polym. Sci.* - 2012. - V. 2012. - P. 1–10.

358. Демина Т.С. Твердофазная сополимеризация L,D-лактида с хитозаном / Т.С. Демина, Л.В. Владимиров, Т.А. Аكوпова, А.Н. Зеленецкий // Химия в интересах устойчивого развития. - 2013. - V. 21. - P. 631–637.
359. Pan P. Temperature-variable FTIR and solid-state ^{13}C NMR investigations on crystalline structure and molecular dynamics of polymorphic poly(L-lactide) and Poly(L-lactide)/poly(D-lactide) stereocomplex / P. Pan, J. Yang, G. Shan, Y. Bao, Z. Weng, A. Cao, K. Yazawa, Y. Inoue // *Macromolecules*. - 2012. - V. 45. - № 1. - P. 189–197.
360. Krikorian V. Crystallization behavior of poly(L-lactic acid) nanocomposites: Nucleation and growth probed by infrared spectroscopy / V. Krikorian, D.J. Pochan // *Macromolecules*. - 2005. - V. 38. - № 15. - P. 6520–6527.
361. Aliotta L. Effect of nucleating agents on crystallinity and properties of poly (lactic acid) (PLA) / L. Aliotta, P. Cinelli, M.B. Coltelli, M.C. Righetti, M. Gazzano, A. Lazzeri // *Eur. Polym. J.* - 2017. - V. 93. - P. 822–832.
362. 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. - № 9. - P. 1911.
363. Demina T.S. DC discharge plasma modification of chitosan films: an effect of chitosan chemical structure / T.S. Demina, M.G. Drozdova, M.Y. Yablokov, A.I. Gaidar, A.B. Gilman, D.S. Zaytseva-Zotova, E.A. Markvicheva, T.A. Akopova, A.N. Zelenetskii // *Plasma Process. Polym.* - 2015. - V. 12. - № 8. - P. 710–718.
364. Демина Т.С. Привитые сополимеры хитозана с олиго(L,L-/L,D-лактидом): синтез и применение / Т.С. Демина, А.Ю. Порицкая, А.В. Истомина, Г.П. Гончарук, Т.А.Акопова, А.Н. Зеленецкий // Известия Уфимского научного центра РАН. - 2016. - Т. 3. - № 1. - С. 27–29.
365. Matienzo L.J. Dry processes for surface modification of a biopolymer: Chitosan / L.J. Matienzo, S.K. Winnacker // *Macromol. Mater. Eng.* - 2002. - V. 287. - № 12. - P. 871–880.
366. 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, T.A. Akopova, P.S. Timashev, Bagratashvili V.N., A.B. Solovieva // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* - 2016. - V. 27. - № 9. - P. 141.
367. 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.
368. Коженков В.И. Электрогидродинамическое распыление жидкости / В.И. Коженков, Н.А. Фукс // *Успехи химии.* - 1976. - Т. 45. - P. 2274–2284.
369. Ramos Avilez H.V. Production of chitosan coatings on metal and ceramic biomaterials / H.V. Ramos Avilez, D.A. Castilla Casadiego, A.L. Vega Avila, O.J. Perales Perez, J. Almodovar // *Chitosan Based Biomaterials* - 2017. - V. 1. - P. 255–293.
370. 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. - P. 18–22.
371. Akopova T. Water-soluble copolymer compositions of polysaccharides for electrospinning of biomaterials / T. Akopova, T. Demina, P. Ivanov, T. Kurkin, G. Goncharuk, A. Kuryanova, P. Timashev // *Mater. Today Proc.* - 2020. - V. 25. - P. 395–397.
372. 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.V. Sytina, A.D. Shepelev, S.G. Rudyak, O.I. Klein, S.V. Krasheninnikov, E.I. Safronova, R.A. Kamyshinsky, V.G. Mamagulashvili, T.A. Akopova, S.N. Chvalun, A.A. Panteleyev // *Cell Prolif.* - 2019. - V. 52. - № 3. - P. 12598.
373. Demina T.S. Preparation of poly(L,L-lactide) microparticles via Pickering emulsions using chitin nanocrystals / T.S. Demina, Y.S. Sotnikova, A.V. Istomin, C. Grandfils, T.A. Akopova, A.N. Zelenetskii // *Adv. Mater. Sci. Eng.* - 2018. - V.

2018. - P. 1–8.
374. 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. - № 8. - P. 1949.
375. 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 // *Macromol. Mater. Eng.* - 2019. - V. 304. - № 10. - P. 1900203.
376. 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 // *Mater. Today Proc.* - 2020. - V. 25. - P. 490–492.
377. Demina T.S., Grandfils C. Solid-state modified polylactides for processing of 3D materials with enhanced biocompatibility / T.S. Demina, C. Grandfils // *Mater. Today Proc.* - 2019. - V. 12. - P. 93–96.
378. 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, C. Sevrin, E.A. Svidchenko, N.M. Surin, E.A. Markvicheva, C. Grandfils, T.A. Akopova // *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* - 2015. - V. 87. - № 1. - P. 012074.
379. 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.
380. Кильдеева Н.Р. Биодegradируемые 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.

381. Дроздова М.Г. Макропористые биodeградируемые матриксы на основе хитозана и гиалуроновой кислоты для тканевой инженерии / М.Г. Дроздова, М.А. Водякова, Т.С. Демина, М.В. Маслова, С.А. Успенский, Н.Р. Кильдеева, Е.А. Марквичева // Известия Уфимского научного центра РАН. - 2016. - Т. 3 - № 1. - С. 33–35.
382. 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 // J. Appl. Polym. Sci. - 2017. - V. 134. - № 13. - P. 17–19.
383. Ishikawa Y. Properties of hydroxyapatite - hyaluronic acid nano-composite sol and its interaction with natural bones and collagen fibers / Y. Ishikawa, J. Komotori, M. Senna // Curr. Nanosci. - 2006. - V. 2. - № 3. - P. 191–196.
384. Mao J. Study of novel chitosan-gelatin artificial skin in vitro / J. Mao, L. Zhao, K. Yao, Q. Shang, G. Yang, Y. Cao // J. Biomed. Mater. Res. - 2003. - V. 64. - № 2. - P. 301–308.
385. Dainiak M.B. Gelatin–fibrinogen cryogel dermal matrices for wound repair: Preparation, optimisation and in vitro study / M.B. Dainiak, I.U. Allan, I.N. Savina, L. Cornelio, E.S. James, S.L. James, S.V. Mikhalovsky, H. Jungvid, I.Y. Galaev // Biomaterials. - 2010. - V. 31. - № 1. - P. 67–76.
386. Zhang H. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation / H. Zhang, S.H. Neau // Biomaterials. - 2001. - V. 22. - № 12. - P. 1653–1658.
387. Chitosan-based systems for biopharmaceuticals // Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals / ed. Sarmiento B., das Neves J. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, - 2012.
388. 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. Соловьёва, В.Я. Панченко, В.Н. Баграташвили // Современные технологии в медицине. - 2015. - Т. 7. - № 3. - С. 20–31.
389. Тимашев П.С. Микроструктурирование производных хитозана методами микромолдинга и двухфотонной полимеризации / П.С. Тимашев, К.Н. Бардакова, Н.В. Минаев, Г.И. Пудовкина, Т.М. Жарикова, Д.В. Бутнару, Т.С. Демина, Т.А. Акопова, В.Н. Баграташвили // Известия Уфимского научного центра РАН. - 2016. - Т. 3. - № 1. - С. 91–95.
390. 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. Акопова, В.Н. Баграташвили // Химия высоких энергий. - 2015. - Т. 49. - № 4. - С. 337–340.
391. 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 Conf. Ser. Mater. Sci. Eng. - 2018. - V. 347. - № 1. - P. 012009.
392. 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. Королёва, Д.С. Асютин, Л.Ф. Пименова, Н.А. Коновалов, Т.А. Акопова, А.Б. Соловьёва, И.В. Мухина, М.В. Ведунова, Б.Н., Чичков В.Н. Баграташвили // Прикладная биохимия и микробиология. - 2016. - Т. 52. - № 5. - С. 495–503.
393. 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.
394. 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 Eng. Part A.* - 2020. - V. 26. - № 17–18. - P. 953–963.
395. Grebenik E.A. Chitosan-g-oligo(L,L-lactide) copolymer hydrogel for nervous tissue regeneration in glutamate excitotoxicity: in vitro feasibility evaluation / E.A. Grebenik, A.M. Surin, K.N. Bardakova, T.S. Demina, N.V. Minaev, N.N. Veryasova, M.A. Artyukhova, I.A. Krasilnikova, Z.V. Bakaeva, E.G. Sorokina, D.P. Boyarkin, T.A. Akopova, V.G. Pinelis, P.S. Timashev // *Biomed. Mater.* - 2020. - V. 15. - № 1. - P. 015011.
396. Tenchurin T.K. Rheological features of fiber spinning from polyacrylonitrile solutions in an electric field. Structure and properties / T.K. Tenchurin, S.N. Krashennnikov, A.S. Orekhov, S.N. Chvalun, A.D. Shepelev, S.I. Belousov, A.I. Gulyaev // *Fibre Chem.* - 2014. - V. 46. - № 3. - P. 151–160.
397. Минаев Н.В. Установка для исследования процессов поверхностно-селективного лазерного спекания порошковых биосовместимых материалов / Н.В. Минаев, Е.Н. Антонов, С.А. Минаева, С.Н. Чурбанов // *Приборы и техника эксперимента.* - 2019. - № 1. - С. 150–152.
398. Wu S. *Polymer interface and adhesion.* New York: Marcek Dekker, - 1982. - 152 p.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю благодарность всем сотрудникам ИСПМ РАН за помощь в проведении исследований как по теме диссертационной работы, так и в рамках других совместных работ. Особенно благодарна родной лаборатории №4 и ее флагманам д.х.н. Зеленецкому А.Н., д.ф.-м.н. Александрову А.И. и самому лучшему научному консультанту и замечательному человеку д.х.н. Т.А. Акоповой!

Огромная благодарность коллегам из дружественных институтов:

– А.С. Курьянова, к.х.н. Н.А. Аксенова, к.х.н. А.В. Черкасова, д.х.н. А.Б. Соловьева (ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН);

– М.Г. Дроздова, к.х.н. Д.С. Зайцева-Зотова, д.х.н. Е.А. Марквичева (Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН);

– С.А. Минаева, К.Н. Бардакова, к.ф.-м.н. Н.В. Минаев (ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН);

– П.Ю. Бикмулина, А.А. Фролова, Б.С. Шавкута, к.б.н. Н.В. Кошелева, к.х.н. С.Л. Котова, к.б.н. А.И. Шпичка, к.ф.н. Е.В. Истранова, д.х.н. С.В. Костюк, д.ф.н. Л.П. Истранов, Т.М. Хлебникова, д.х.н. П.С. Тимашев (Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет));

– к.х.н. А.Н. Шеголихин (ИБХФ РАН им. Н.М. Эмануэля РАН);

– д.х.н. Г.А. Вихорева, д.х.н. Н.Р. Кильдеева (РГУ им. А.Н. Косыгина);

– к.б.н. О.А. Романова, к.б.н. А.А. Пантелеев (НИЦ «Курчатовский институт»);

– С. Sevrin, Prof. Ch. Grandfils (CEIB de l'Université de Liège);

– все механохимики и специалисты по химии твердого тела из Института химии твердого тела и механохимии СО РАН.

Выражаю бесконечную благодарность ВСЕМ коллегам из российских и зарубежных институтов за возможность вместе работать, учиться, открывать новое, проводить междисциплинарные исследования и развиваться.

Особую благодарность выражаю своей семье за мотивацию.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ОТЧЕТ

по гистологическим исследованиям биосовместимости матрицков из привитых сополимеров хитозана с полилактидом, на модели подкожной имплантации крысам

Целью гистологических исследований было изучение взаимодействия матрицков с живыми тканями в опытах *in vivo* на модели подкожной имплантации крысам. Образцы матрицков имплантировали в спинную область под кожу крыс на срок 7, 14 и 21 день.

Гистологические исследования не дают каких-либо количественных характеристик и тем более не пригодны для оценки скорости биodeградации матрицков, однако только эти исследования позволяют предсказать судьбу полимерного матрицка в организме (растворится, будет инкапсулирован в соединительно тканую капсулу или вызовет некроз), а кроме того именно эти исследования позволяют оценить характер взаимодействия имплантата с окружающими живыми тканями организма.

Введение имплантата под кожу крысы – хирургическая операция, связанная с нарушением целостности живой ткани. Операция инициирует развитие во времени трех основных процессов: воспаления, биodeградации имплантата и изоляции имплантата в тканевую капсулу. Все три начинаются одновременно, но затем какой либо из них становится главным. Основные процессы могут сопровождаться (а могут и не сопровождаться) побочными. К ним относятся: исторжение (выталкивание) имплантата в ближайшую полость, некроз окружающей ткани с отторжением имплантата, внутренний кальциноз или образование внешней кальций фосфатной капсулы, динамическое взаимодействие с окружающими тканями вызывающее вибросаркому, выделение токсинов из имплантата с последующим токсическим синдромом.

Указанные выше процессы развиваются во времени. Стандартный срок подкожной имплантации крысам с учетом ускоренного по отношению к человеку метаболизма составляет - 3 недели (21 день). По гистологическому результату этот тест, весьма условно, можно сравнить с имплантацией в мышечную ткань человека на срок около года. Это период, по истечении которого в большинстве случаев начинают проявляться биосовместимые свойства имплантата, и становится ясной его дальнейшая судьба: приживется, покроется капсулой, деградирует (растворится), прорастет соединительной тканью или будет отторгнут с некрозом окружающими тканями.

Реакция тканей на оперативное вмешательство так же развивающаяся во времени начинается с воспаления, которое в нормальных условиях продолжается у крысы не более 7 дней. Оно характеризуется нарушением микроциркуляции, изменением реакции соединительной ткани и элементов системы крови. Реакция направлена на ограничение, локализацию очага повреждения, уничтожение повреждающего фактора и восстановление поврежденной ткани.

Первые образцы извлекали через 7 дней по окончании воспалительного процесса, который в нормальном случае завершается за 3 дня. Через 14 дней имплантации образуется капсула вокруг недеградирующих имплантатов, а к 21 дню завершается регенерация и васкуляризация в области раны. Таков положительный сценарий для биосовместимых имплантатов. Именно развитие воспалительного процесса в первую очередь определяет дальнейшую судьбу имплантата.

Взаимосвязанные явления, протекающие при воспалении параллельно: это первичная альтерация - разрушение окружающих тканей в результате травмы (рассечения тканей при имплантации), вторичная альтерация – повреждение ткани в результате воспаления, экссудация - нарушение микроциркуляции и пролиферация - восстановление поврежденных тканей. Интенсивность протекания этих процессов и оценивали в гистологических исследованиях образцов полимерных подложек.

Первоначально визуально оценивали немедленную реакцию на травму и на имплантат.

Первая немедленная реакция на травму – локальный спазм сосудов замедление кровотока. Кислородное голодание тканей, нарушение работы митохондрий, переход к гликолизу (анаэробное неполное окисление) накопление молочной кислоты, закисление тканевой жидкости.

При несильном воспалении нет значительного закисления (на периферии очага воспаления) нет летальных повреждений клеток кислотой, более того незначительный сдвиг рН в кислую область стимулирует разрастание грануляционной ткани - образуется грануляционный вал на периферии, здоровая ткань ограничивается от поврежденной. Она богата фиксированными макрофагами, способна поглощать поврежденные клетки, токсины, очищая очаг. Активируются тромбоциты, образуются локальные тромбы, вслед за этим тромбоциты освобождают из себя факторы ранозаживления. Равновесие сдвигается на путь инкапсулирования имплантата в тканевую капсулу.

При усиливающемся воспалении. Медленно расширяются мелкие артериолы, в них усиливается кровоток, растягиваются стенки артерий, увеличивается их проницаемость для белков и клеток крови. В ткань выходит белок и все виды клеток иммунной системы способные к хемотаксису (движению в очаг воспаления) – экссудация, отек, покраснение, повышение температуры. На этой стадии еще возможно избежать отторжения трансплантата.

Сильное воспаление, белок в тканях блокирует вены – кровоток падает, нарастает дефицит кислорода, гликолиз достигает рН =6-5.8 активируются кислые ферменты. Это убивает клетки, начинается некроз тканей – вторичная альтерация. Из клеток выходит белок, соли, митохондриальные и лизосомальные ферменты, повышается осмотическое давление, и концентрация белка это усиливает некроз замыкая круг воспаления. На этой стадии возможно только отторжение имплантата.

Затем оценивали скорость атаки имплантата клетками макрофагической системы

Она определяет уровень развития воспаления и ее оценивали по уровню активации макрофагов. Скорость атаки имплантата при прочих равных условиях целиком зависит от качества поверхности и от места введения имплантата. В описываемом эксперименте место введения имплантата не изменялось от одного экспериментального животного к другому.

Образование капсулы.

Образование соединительнотканной капсулы начинается вокруг имплантата, если он не подвержен биодеградации (растворению), не замещается соединительной тканью и достаточно биосовместим. Сразу после альтерации макрофаги начинают выделять интерлейкин-1, стимулирующий фибробласты. К 14 дню имплантации число макрофагов на поверхности снижается и увеличивается число фибробластов – клеток синтезирующих коллаген. Лимфоциты и лейкоциты мигрируют из лимфы и крови соответственно и становятся заметны на гистологических снимках как форменные элементы «рыхлой соединительной ткани» - основы капсулы. Клетки внедряются в каналы и поры имплантата прорастают сосудами, начинается васкуляризация, которая завершается к 21 дню. В костной системе капсула сначала состоит из соединительной ткани, а затем замещается на костную.

На образование капсулы влияют: в первую очередь, химическое строение самого материала и химическая или плазмохимическая обработка его поверхности, степень биодеградации поверхности, тип фрагментирования поверхности, ворсистость, поры, инфицированность и антигенность поверхности. А кроме этого место имплантации и относительный размер имплантата.

Взаимосвязь капсулирования и биодеградации

Капсулирование - альтернатива биодеградации, причем для организма биодеградация предпочтительнее. Процессы идут параллельно, но с участием разных ферментных систем. Высокая активность кислой фосфатазы – признак деградации. Активность щелочной фосфатазы в тканях признак образования новой соединительной ткани. Измерение относительной активности ферментных систем так же возможно провести в рамках гистологических исследований

образцов полимеров после подкожной имплантации. К сожалению, ферментные исследования остались вне рамок настоящей работы.

Испытаниям способом подкожной имплантации крысам подвергали образцы из следующих полимеров/сополимеров:

1. Пленочный образец из не модифицированного поли(L,L-лактида) (PLLA).
2. Пленочный образец из сополимера хитозана с (PLLA).
3. Пленочный образец из сополимера хитозана с (PLLA) с добавкой желатина.
4. Нетканый материал из сополимера хитозана с (PLLA) с добавкой желатина.

№1
3×6 см



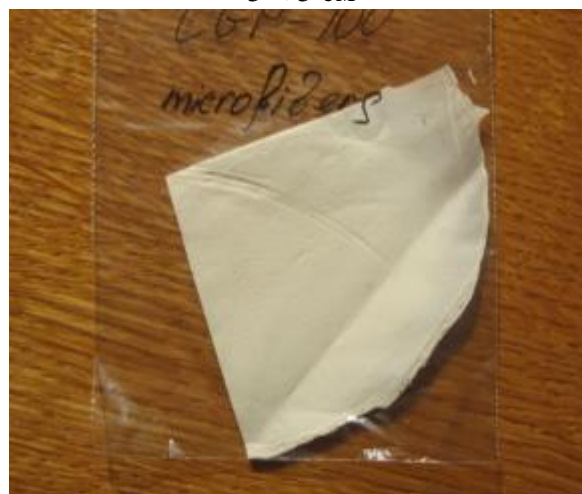
№2
d ~ 5 см



№3
d ~ 5 см



№4
5 × 5 см



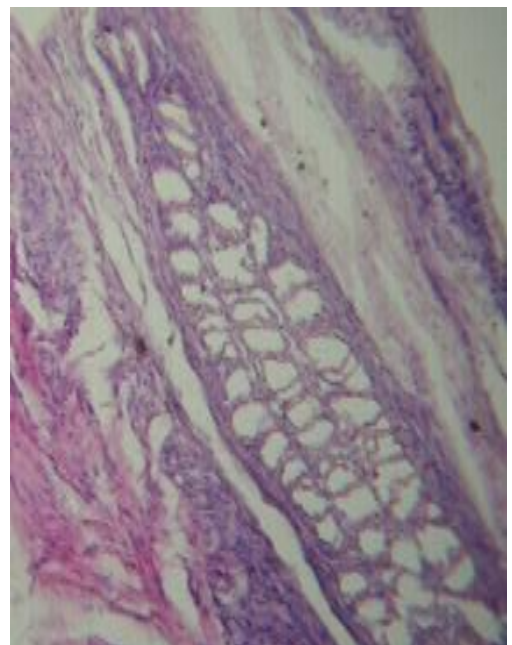
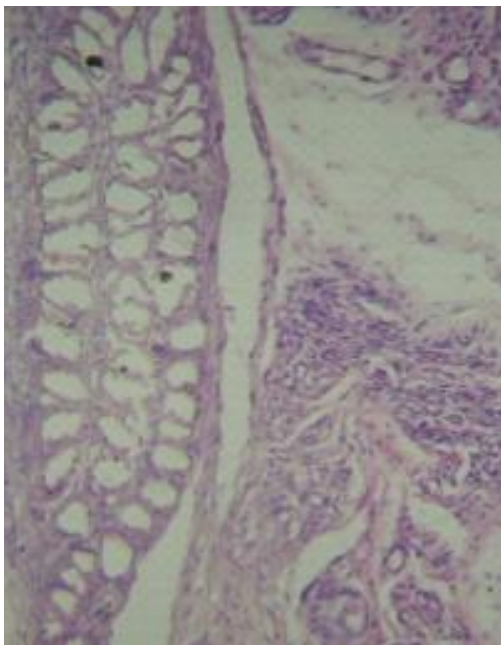
Круглые образцы диаметром 5 мм имплантировали крысам подкожно в область спины. Использовали по 3 образца каждого типа, 3 повторности 3

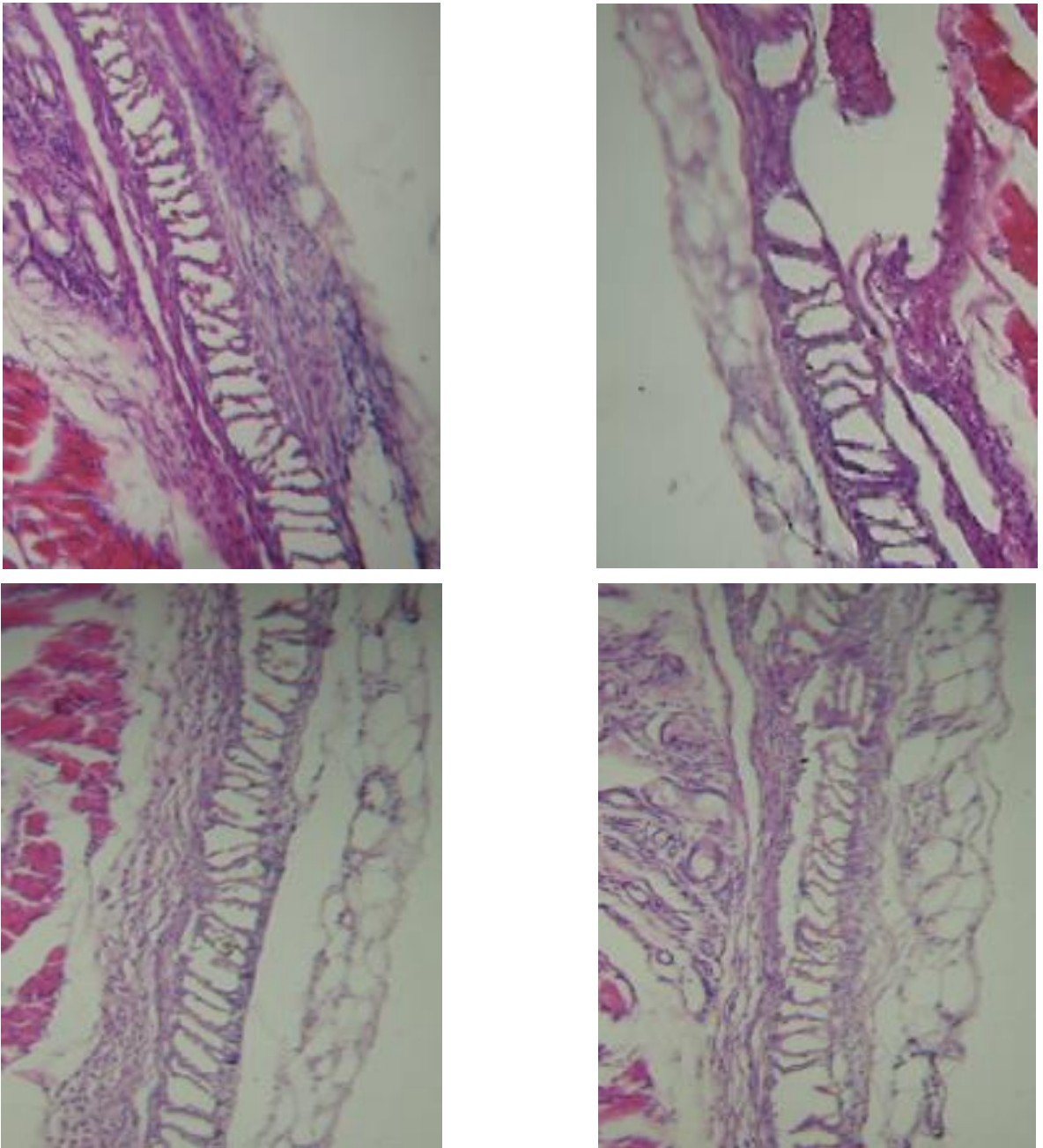
животных в серии. Образцы на гистологию извлекали на 7, 14 и 21^й день соответственно. Гистологические срезы красили гематоксилином и эозином. Исследовали ограниченную область контакта полимерного матрикса с тканью. Наилучшие результаты получены для образца 4.

Образец № 4. Хитозан-желатин-PLLA, 7 дней имплантации, нетканый материал

Опыт 1 (Животное 1)

Слабо выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация по краю образца, не по всем полям зрения. Образец материала окрашивается гематоксилином и эозином, что затрудняет оценку биоинтеграции собственной соединительной ткани. Однако можно предположить активное вращение собственной соединительной ткани в образец. В толще имплантата, имеются симметричные полости заполненные воздухом. Также по краю имплантата встречаются клеточные элементы фибробластического ряда. Используя доступные методы окраски, соли кальция не выявлены. Следовательно, имплантат не подвергается кальцификации. Инкапсуляция с отграничением от собственной ткани не выражена. Встречаются единичные новообразованные кровеносные сосуды в собственной соединительной ткани по краю контакта с образцом.



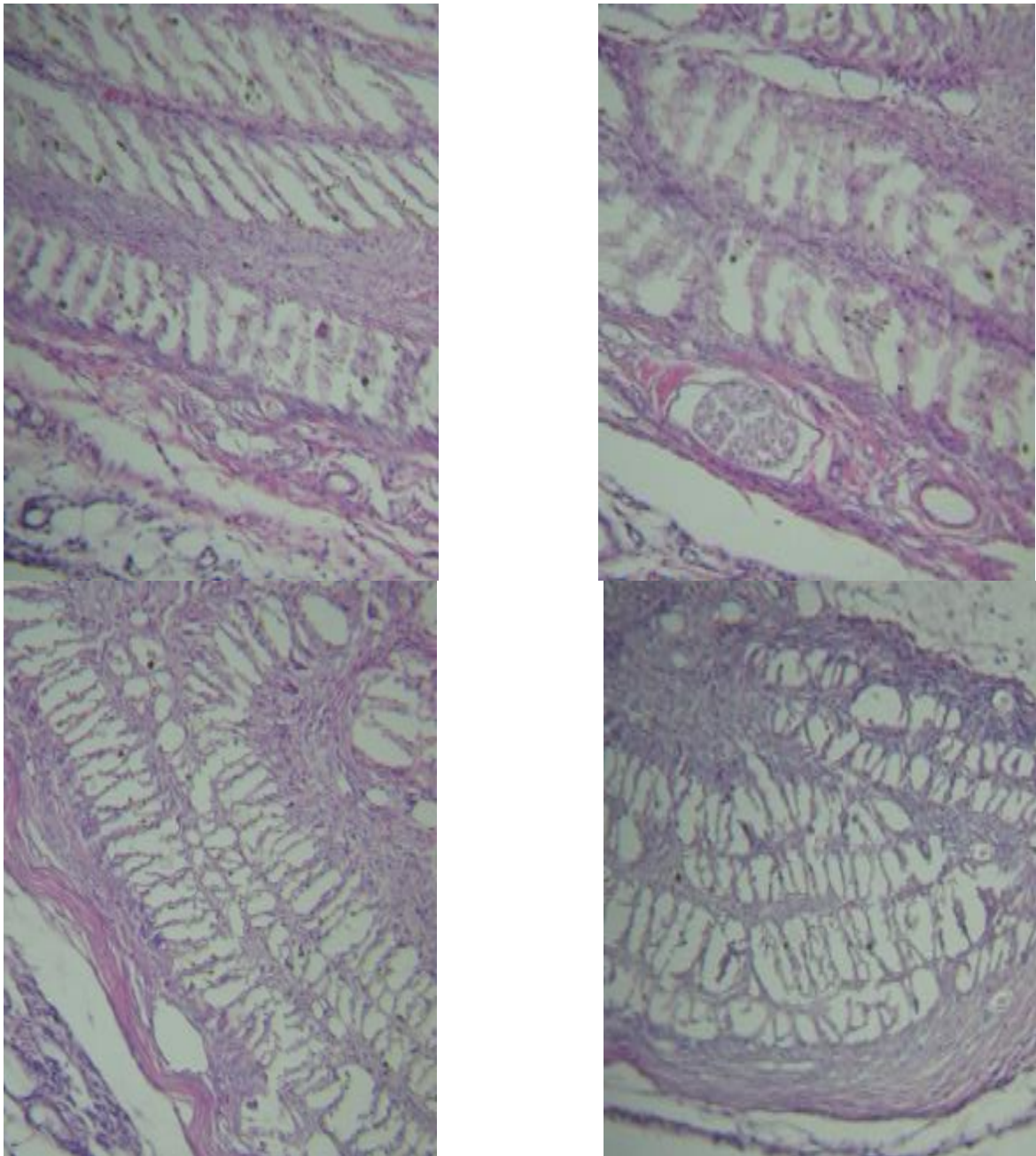


Образец № 4. Хитозан-желатин-PLLA, 14 дней имплантации, нетканый материал

Опыт 2 (Животное 1)

Общая гистологическая картина мало отличается от опыта 1. Хорошо заметны срезы волокон нетканого материала. Воспалительная реакция не выражена. Признаки инкапсуляции в соединительно-тканую капсулу отсутствуют. Заметно начало прорастания новообразованными кровеносными сосудами. Образец активно прорастает собственной соединительной тканью. Пустоты, заполненные воздухом, в гистологических образцах имеются, но в небольшом

количестве. Отложений фосфатов кальция не выявлено. Нет признаков кальцификации как самого образца, так и окружающих тканей.

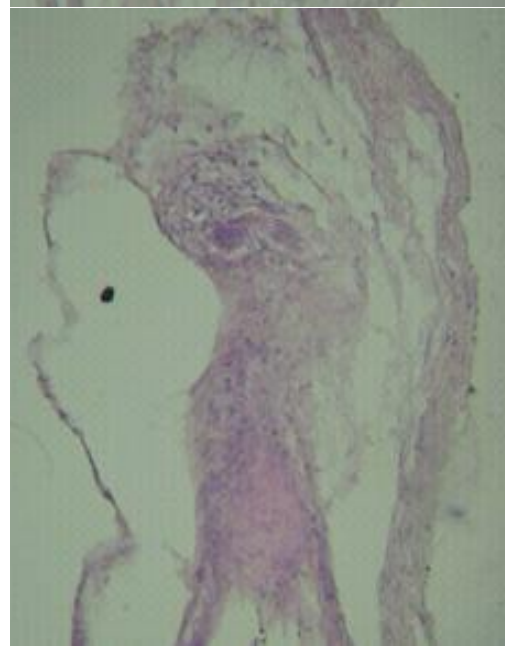
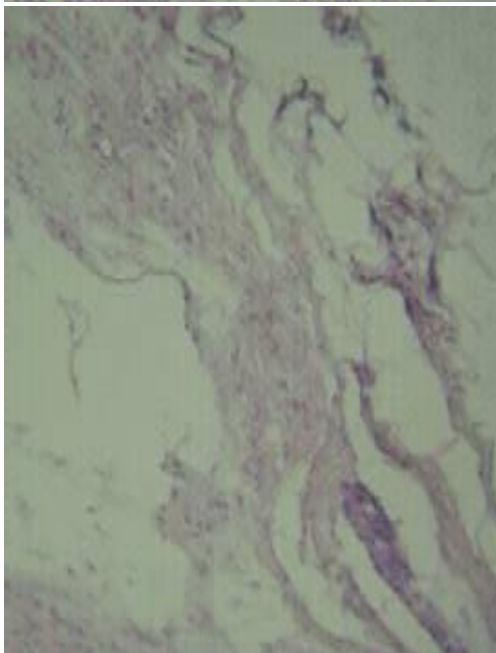
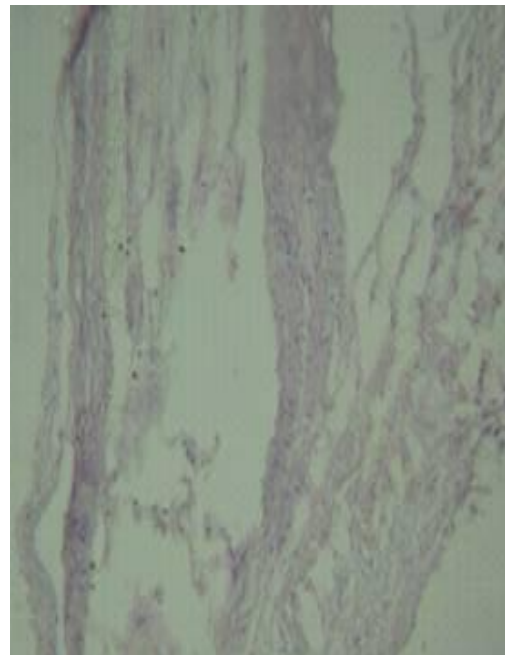
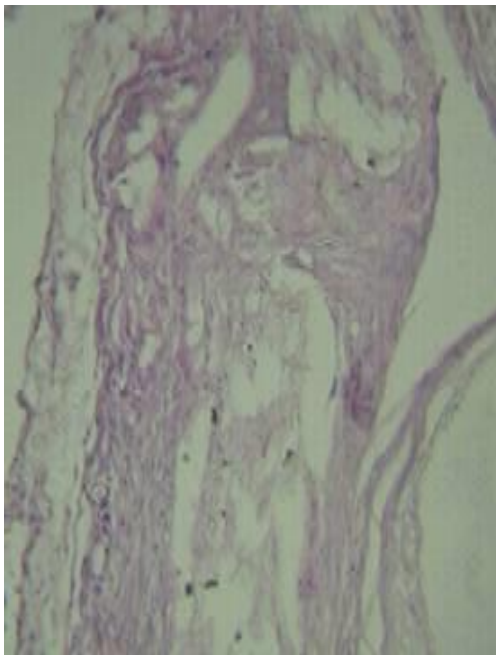


Образец № 4. Хитозан-желатин-PLLA, 21 день имплантации, нетканый материал

Опыт 3(Животное 1)

Общая гистологическая картина существенно отличается от опытов 1 и 2. Срезы волокон нетканого материала выражены значительно слабее, чем в опытах 1 и 2. Материал частично деградировал. Воспалительная реакция не выражена. Признаки инкапсуляции в соединительно-тканую капсулу отсутствуют. Граница

раздела нетканого материала и волокон соединительной ткани выражена слабо. Заметно интенсивное прорастание новообразованными кровеносными сосудами. Образец активно прорастает собственной соединительной тканью на всю глубину. Пустоты, заполненные воздухом, в гистологических образцах не выявлены. Отложений фосфатов кальция не выявлено. Нет признаков кальцификации как самого образца, так и окружающих тканей.

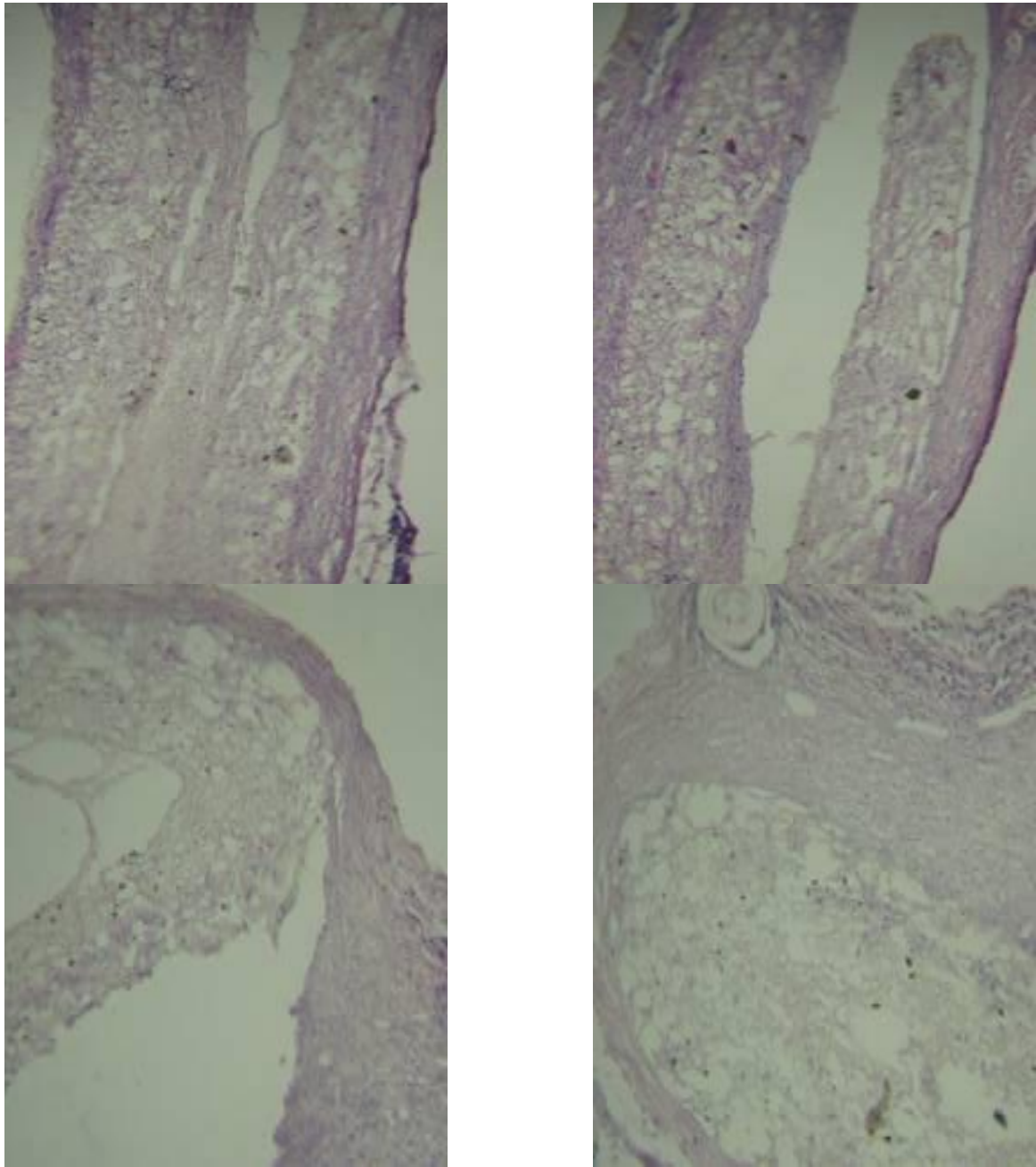


Общий вывод по образцу № 4. Хитозан-желатин-PLLA, нетканый материал.

Нетканый материал на основе сополимера хитозан-желатин-PLLA показал слабый воспалительный ответ организма на его имплантацию, причем к 21 суткам воспалительные процессы стихли. Судя по клеточному составу, происходило прорастание материала собственной соединительной тканью на всю глубину образца. Наблюдается деградация волокон нетканого материала с замещением собственной соединительной тканью. Относительно кровеносного русла, отмечался активный неоангиогенез, что свидетельствует о благоприятном исходе имплантации. Материал подходит для использования в качестве матрикса для выращивания клеток (например, кератиноцитов кожи при лечении ожогов) а также в качестве вспомогательного биodeградирующего материала для замещения мягких тканей при имплантации. Кроме того его можно применять в клеточной биологии в качестве основы для выращивания клеток.

Образец № 3. Хитозан–желатин-PLLA, 7 дней имплантации, пленочный образец
Опыт 1 (Животное 1)

Выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация по краю среза пленочного образца. Образец материала окрашивается гематоксилином и эозином, что затрудняет оценку биоинтеграции в собственную соединительную ткань (необходима окраска специфичными красителями на соединительную ткань). Наблюдается начало врастания собственной соединительной ткани в образец по его краю. Вростание локальное. В толще имплантата, имеются включения полигональной формы. Возможно, это один из компонентов смеси образовавший собственную микрофазу. По краю имплантата встречаются клеточные элементы фибробластического ряда. Отмечается слабое явление инкапсуляции материала. Используя доступные методы окраски, соли кальция не выявлены. Кальциноз не наблюдается. Встречаются единичные новообразованные кровеносные сосуды в собственной соединительной ткани по краю контакта с образцом.

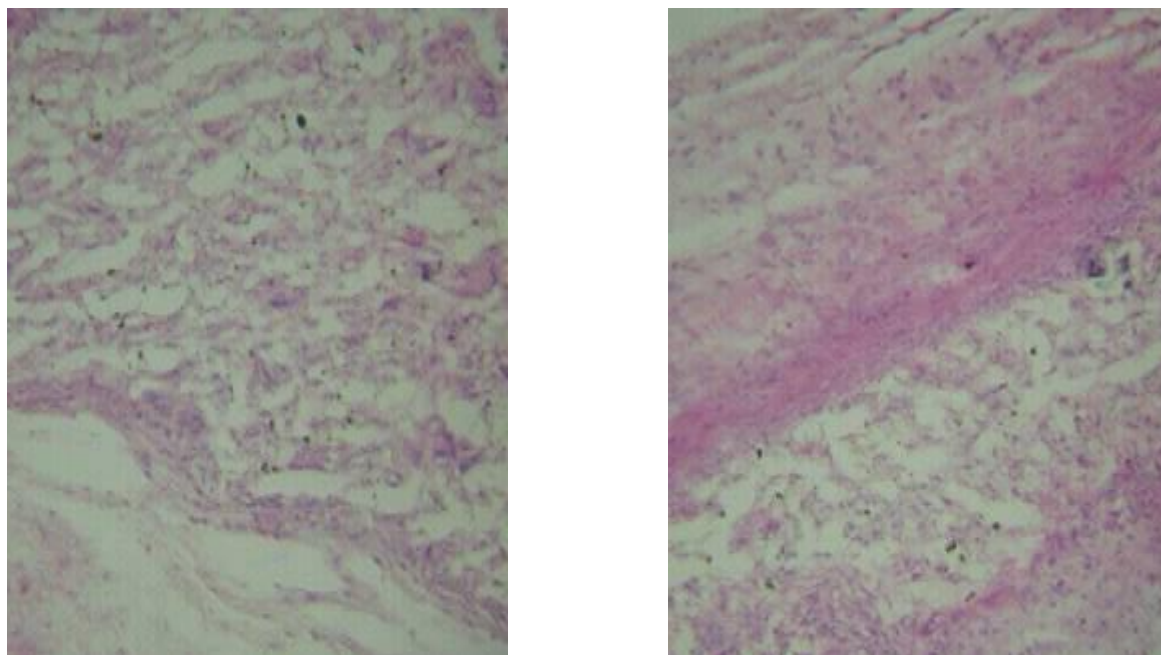


Образец № 3. Хитозан–желатин-PLLA, 14 дней имплантации, пленочный образец

Опыт 2 (Животное 1)

Выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация по краю образца. Наблюдается врастание собственной соединительной ткани по краю пленочного образца по всей площади, однако вглубь образца ткань не проникает. В толще имплантата, сохраняются ячейки полигональной формы. По краю имплантата

встречаются клеточные элементы фибробластического ряда. Отмечается слабое явление инкапсуляции материала. Используя доступные методы окраски, соли кальция не выявлены. Кальциноз не наблюдается. Наблюдается усиливающаяся васкуляризация новообразованными кровеносными сосудами в области собственной соединительной ткани по краю контакта с образцом.

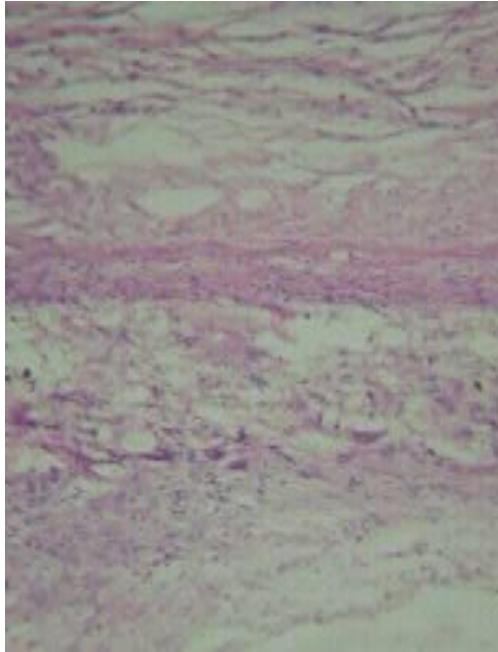


Образец № 3. Хитозан–желатин-PLLA, 21 день имплантации, пленочный образец

Опыт 3 (Животное 1)

Наблюдается врастание собственной соединительной ткани по краю пленочного образца по всей его площади. В толще имплантата сохраняются включения гетерофазы полигональной формы. По краю имплантата встречаются клеточные элементы фибробластического ряда, характерные для новообразованной соединительной ткани. Явлений отторжения и инкапсуляции не наблюдается. Используя доступные методы окраски, соли кальция не выявлены. Кальциноз не наблюдается. Встречаются новообразованные кровеносные сосуды в собственной соединительной ткани по краю контакта с образцом. Врастание пленочного образца в соединительную ткань и его частичная биodeградация

привели к трудности извлечения экспериментального образца и его частичной утрате.



Общий вывод по образцу № 3. Хитозан-желатин-PLLA, пленочный образец.

Пленочный образец материала из сополимера хитозан-желатин-PLLA показал слабый воспалительный ответ организма на его имплантацию, причем к 21 суткам воспалительные процессы практически прекратились. Судя по клеточному составу соединительной ткани по краю пленочного образца, происходило приповерхностное прорастание материала собственной соединительной тканью. Этот процесс начинался как локальный и к 21-му дню прорастание соединительной ткани наблюдалось по всей площади контакта имплантата с тканью. Наблюдается частичная деградация имплантата с потерей пленочным образцом прочности. Относительно кровеносного русла, наблюдается активный неоангиогенез соединительной ткани в зоне контакта с образцом, что свидетельствует о благоприятном исходе имплантации. Ангиогенез внутри имплантата, равно как и прорастание соединительной тканью не наблюдаются. Материал подходит для использования в качестве матрикса для выращивания клеток, например кератиноцитов кожи при лечении ожогов. Кроме того его можно

рекомендовать для применения в клеточной биологии в качестве основы для выращивания клеток.

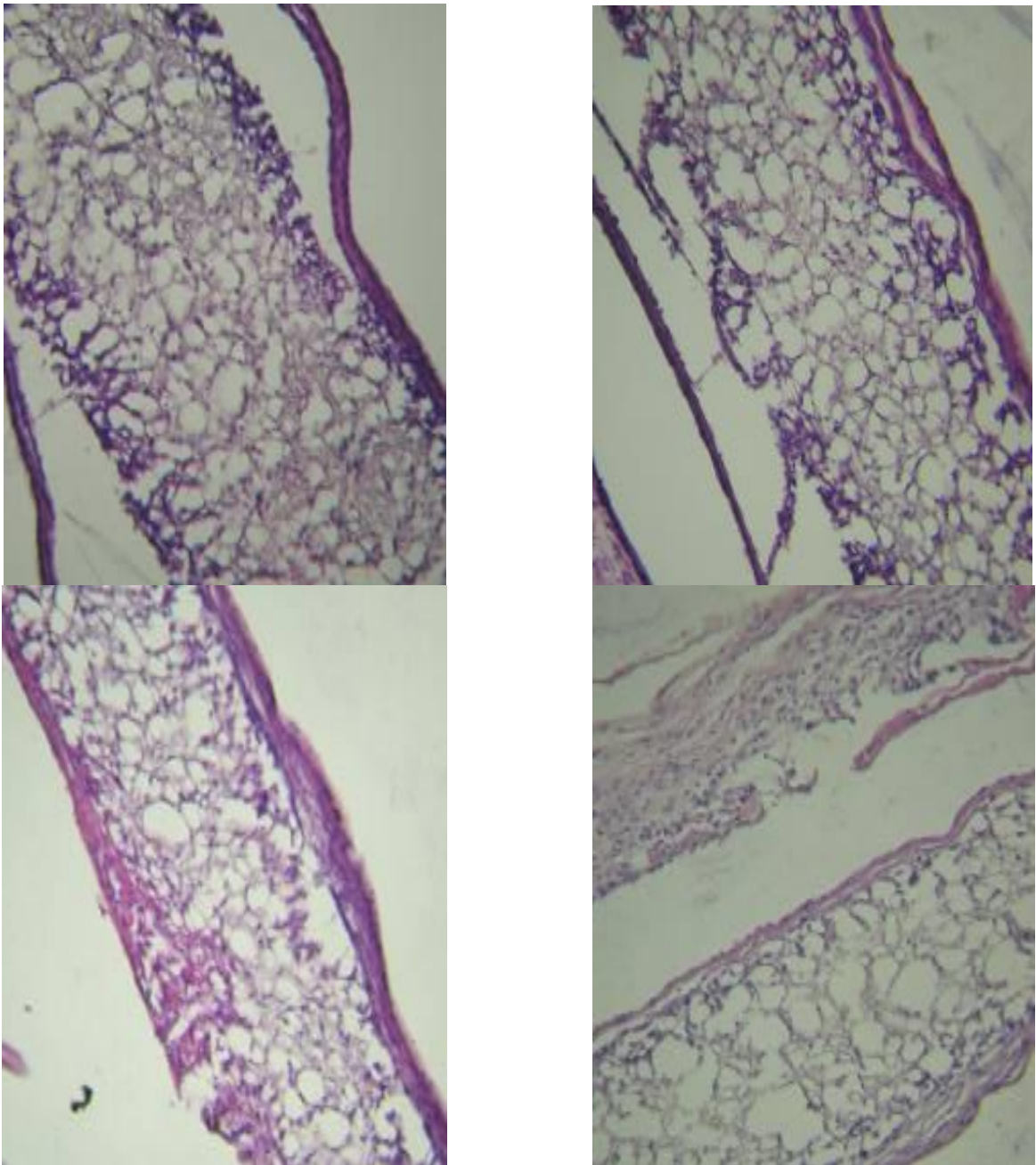
Подтверждение возможности использования материала в восстановительной хирургии качестве биodeградирующего материала для замещения костных и мягких тканей при имплантации требует дальнейших исследований. Такие испытания выходят за рамки настоящего исследования. Использование пленочного материала в качестве разделительной мембраны в абдоминальной хирургии невозможно.

Образец № 2. Пленочный образец из сополимера хитозана с PLLA, 7 дней

имплантации

Опыт 1 (Животное 1)

Слабо выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация по краю образца. Образец материала окрашивается гематоксилином и эозином, что затрудняет оценку биоинтеграции собственной соединительной ткани (необходима окраска специфичными красителями на соединительную ткань), однако по краю образца видно хорошо выраженную полосу соединительной ткани. Это свидетельствует об отсутствии врастания собственной соединительной ткани в образец, а так же является следствием начала процесса инкапсуляции материала. По краю имплантата встречаются клеточные элементы частично фибробластического ряда, что также косвенно подтверждает начало процесса образования соединительно-тканной капсулы вокруг образца. Используя доступные методы окраски, соли кальция не выявлены. Встречаются единичные новообразованные кровеносные сосуды в тонкой соединительно-тканой капсуле образованной собственной соединительной тканью по краю контакта с образцом. Общая картина характерна для первой стадии инкапсулирования образца в соединительно-тканную капсулу в условиях отсутствия выраженного воспаления.

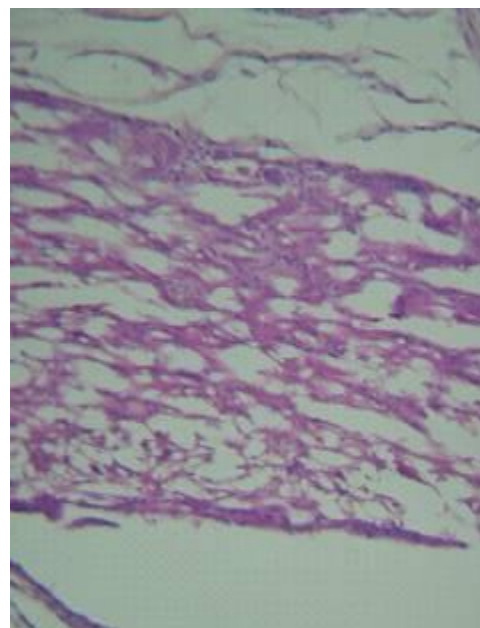
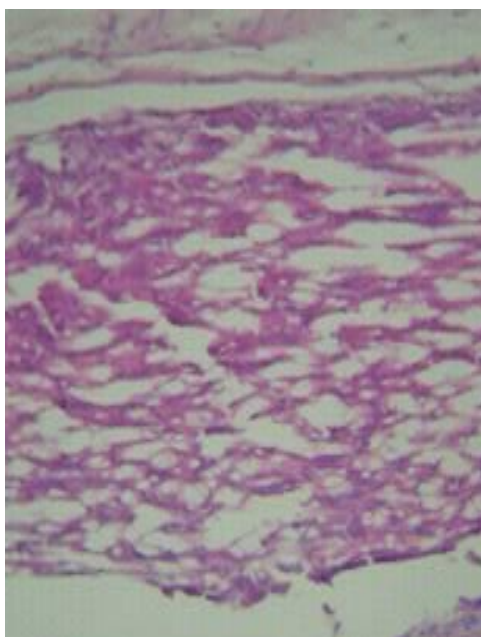


Образец № 2. Пленочный образец из сополимера хитозана с PLLA, 14 дней имплантации

Опыт 1 (Животное 1)

После двух недель имплантации картина инкапсулирования образца выражена значительно отчетливее. Лимфогистиоцитарная инфильтрация по краю образца выражена по-прежнему слабо. Интенсивное воспаление не наблюдается, напротив первичное воспаление закончилось, его гистологические признаки отсутствуют. Вращение собственной соединительной ткани в образец так же отсутствует. По краю имплантата встречаются клеточные элементы

фибробластического ряда. Слой новообразованной соединительной ткани вокруг имплантата выражен значительно отчетливее, его толщина и плотность существенно увеличены по сравнению с образцом после 7 дней имплантации, что является прямым указанием на наличие активно текущего процесса образования соединительнотканной капсулы вокруг образца. Используя доступные методы окраски, соли кальция не выявлены как внутри образца, так и во вновь образованной ткани. Кальциноз образца и соединительнотканной капсулы не наблюдается. Встречаются множественные новообразованные кровеносные сосуды в капсуле образованной собственной соединительной тканью по краю контакта с образцом. Общая картина характерна для интенсивно развивающегося инкапсулирования образца в соединительнотканную капсулу в условиях отсутствия выраженного воспаления. Биодegradация образца не выявляется.

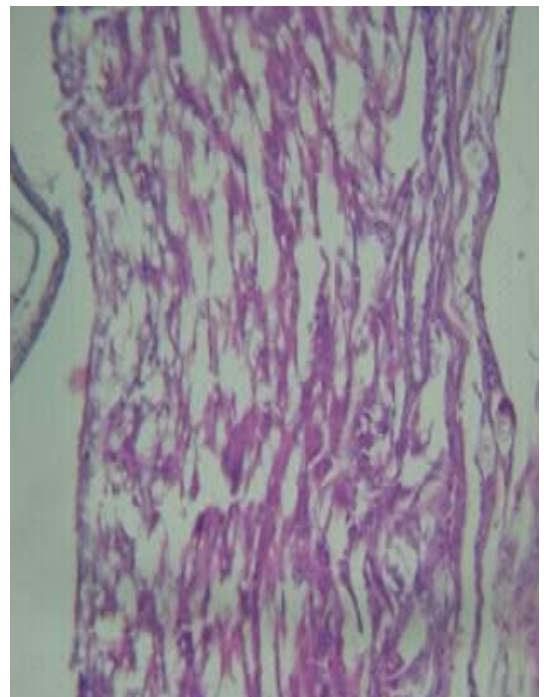
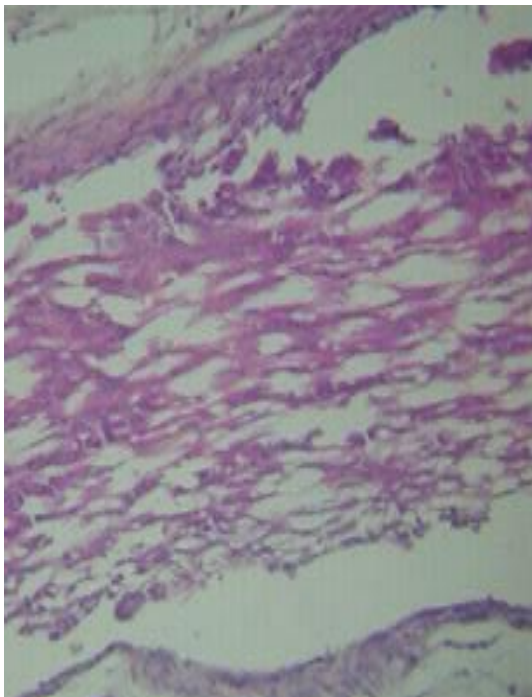


Образец № 2. Пленочный образец из сополимера хитозана с PLLA, 21 день имплантации

Опыт 1 (Животное 1)

После трех недель имплантации образец практически полностью инкапсулирован в уплотненную соединительнотканную капсулу. Лимфогистиоцитарная инфильтрация по краю образца отсутствует. Процесс

инкапсулирования продолжается, но значительно замедлен. Это свидетельствует о его нормальном развитии. Вращения соединительной ткани в толщу образца не наблюдается. Признаков остаточного воспаления не наблюдается. По краю имплантата встречаются клеточные элементы фибробластического ряда, что свидетельствует о продолжающемся процессе регенерации в этой области. Слой новообразованной соединительной ткани вокруг имплантата выражен отчетливо, его толщина и плотность существенно увеличены по сравнению с образцом после 14 дней имплантации. Наблюдается его интенсивная васкуляризация. Кальциноз образца и соединительнотканной капсулы не наблюдается. Встречаются множественные новообразованные кровеносные сосуды в капсуле образованной собственной соединительной тканью по краю контакта с образцом. Общая картина характерна для интенсивно развивающегося инкапсулирования образца в соединительнотканную капсулу в условиях отсутствия выраженного воспаления. Биодegradация образца не выявляется. Прогноз положительный.



Общий вывод по образцу № 2. Пленочный образец из сополимера хитозана с

PLLA

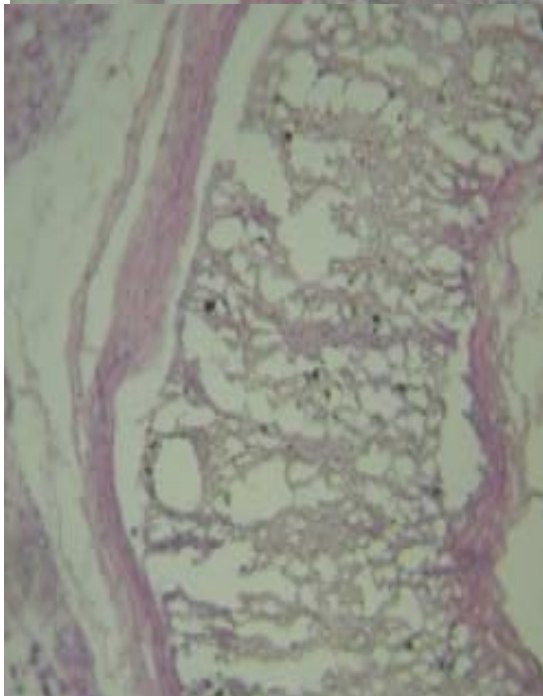
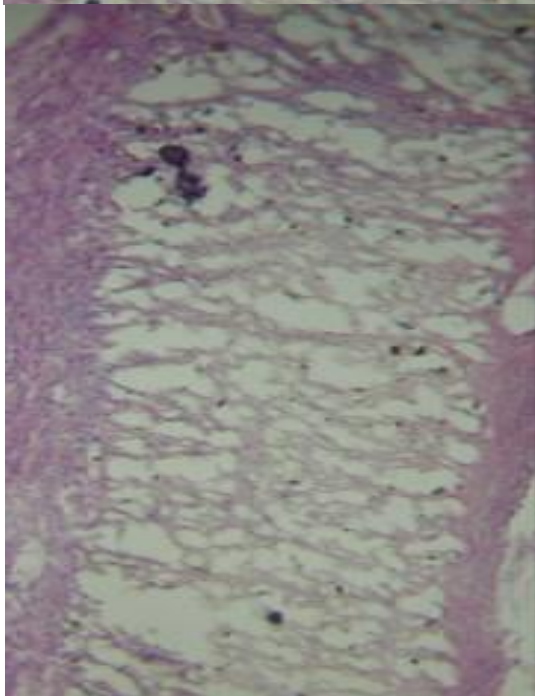
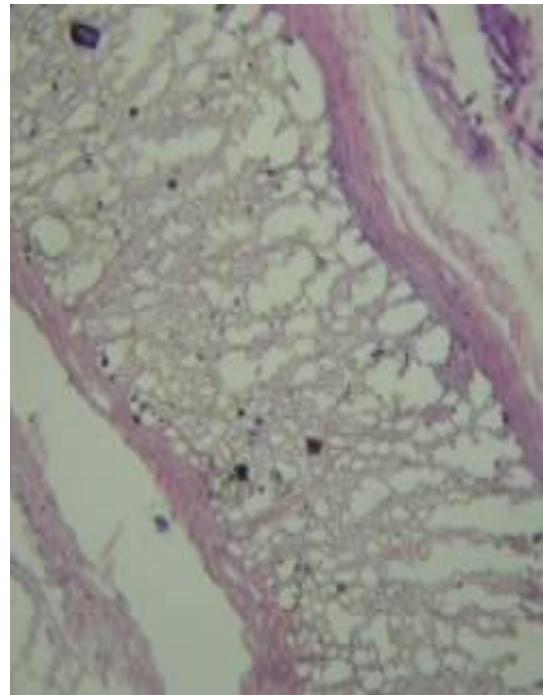
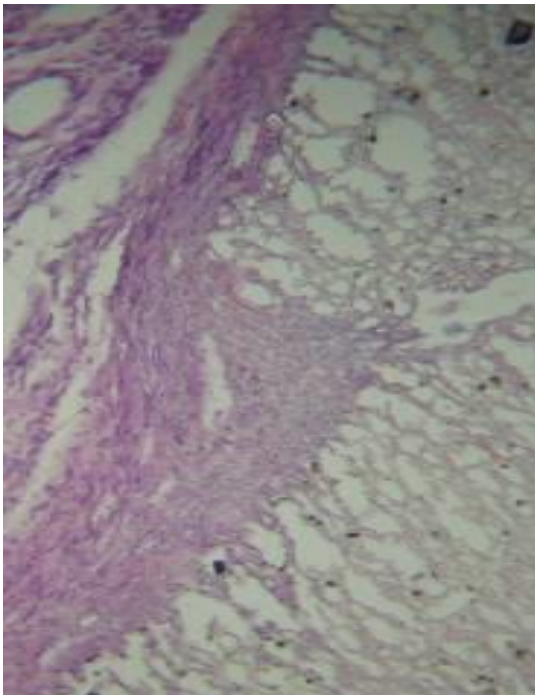
Пленочный образец материала из сополимера Хитозан-PLLA показал слабый воспалительный ответ организма на его имплантацию, причем к 21 суткам воспалительные процессы практически прекратились. В отличие от желатин содержащих образцов поверхностное прорастание материала собственной соединительной тканью не наблюдалось. Так же не наблюдалась биodeградация образца за период имплантации 21 день. Наблюдается инкапсуляция образца в соединительнотканную капсулу. На 21 сутки имплантации соединительнотканная капсула уплотнена и вполне сформирована. Относительно кровеносного русла, наблюдается активный неоангиогенез соединительной ткани капсулы в зоне контакта с образцом, что свидетельствует о благоприятном исходе имплантации. Ангиогенез внутри имплантата, равно как и его прорастание соединительной тканью не наблюдаются. Материал подходит для использования в качестве разделительной мембраны в абдоминальной хирургии. Он достаточно инертен, но его использование в качестве матрикса для выращивания клеток, например кератиноцитов кожи при лечении ожогов, требует дальнейших исследований. Необходимо прояснить способность клеток иммобилизоваться на поверхности материала. Материал не подходит для использования в восстановительной хирургии качестве биodeградирующего материала для замещения костных и мягких тканей при имплантации.

Образец №1. Пленочный образец из немодифицированного поли(L,L-лактида), 7 дней имплантации

Опыт 1 (животное 1)

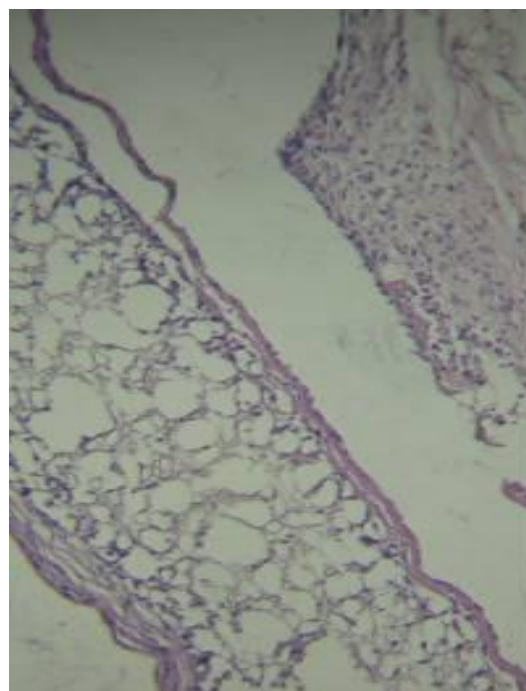
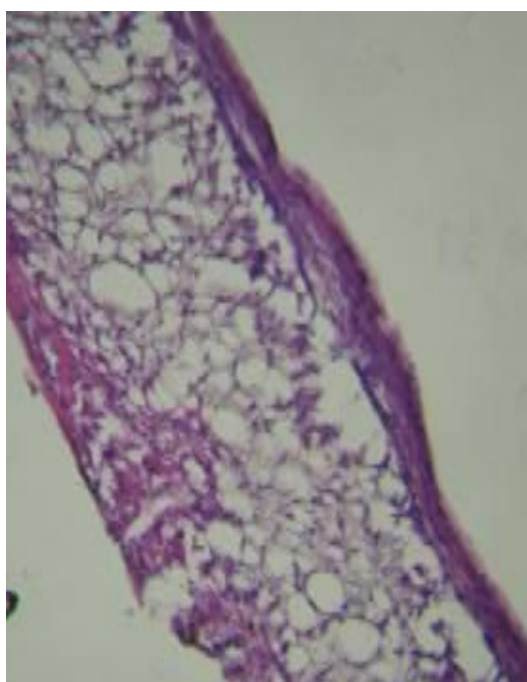
Наблюдается выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация по краю образца, которая вероятно связана с начальной фазой образования отграничивающего отечного соединительнотканного вала вокруг имплантата, при этом не наблюдается формирование новообразованной соединительнотканной капсулы, а лишь развитие воспаления. При этом вдоль края имплантата отсутствуют клеточные элементы фибробластического типа характерные для начала регенеративного процесса. Дополнительная васкуларизация в собственной

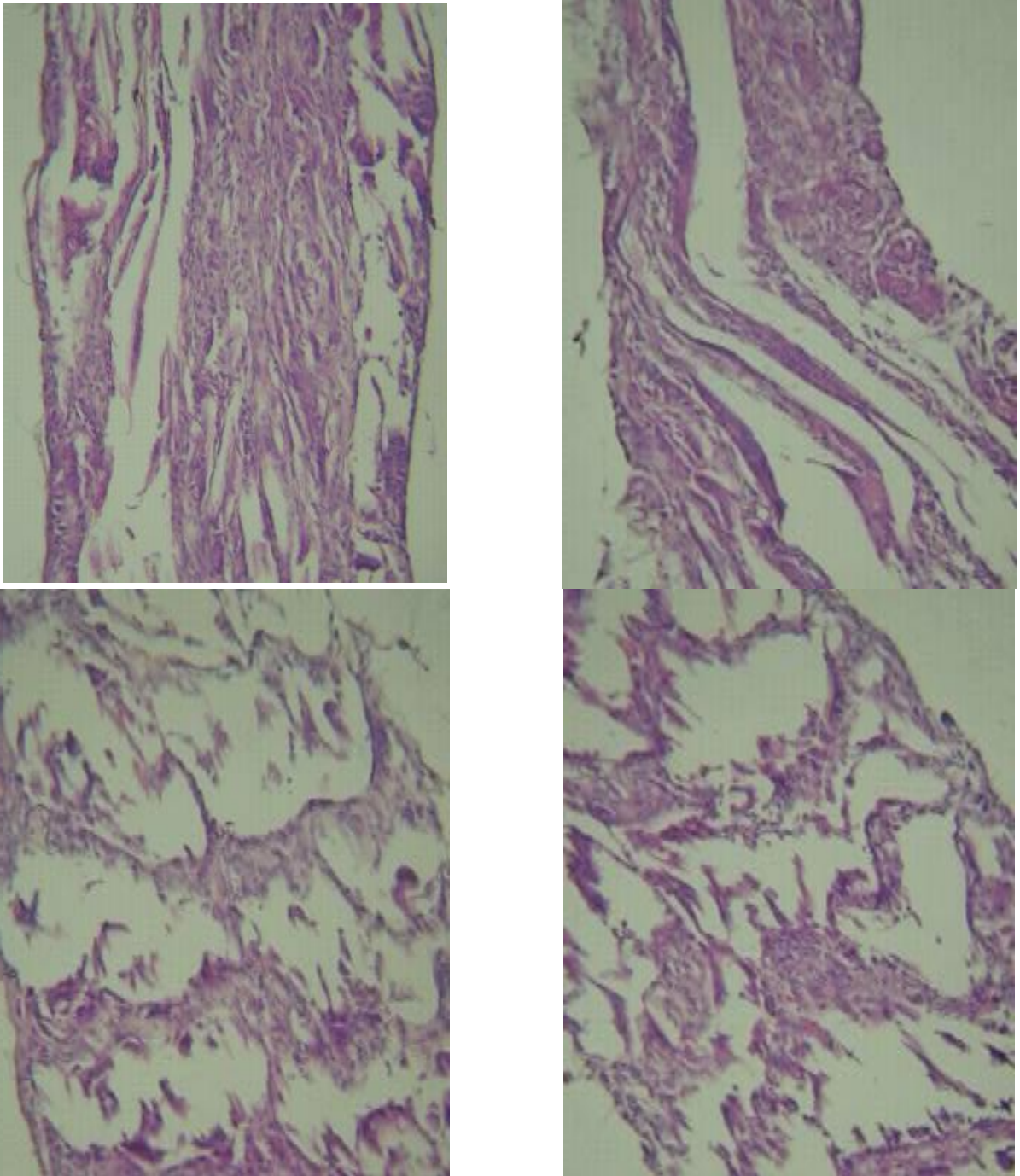
соединительной ткани по краю контакта с образцом отсутствует. Имплантат не инкапсулируется, а лишь вызывает воспалительную реакцию. Образец материала окрашивается гематоксилином и эозином, что затрудняет оценку биоинтеграции собственной соединительной ткани (необходима окраска специфичными красителями на соединительную ткань), однако можно предположить, что врастание собственной соединительной ткани в образец практически отсутствует. Используя доступные методы окраски, соли кальция не выявлены. Кальциноз не наблюдается. Заметной биодеградации образца не наблюдается.



***Образец №1. Пленочный образец из не модифицированного поли(L,L-лактида),
14 дней имплантации
Опыт 1(животное 1)***

Наблюдается выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация по краю образца характерная для развивающегося воспаления. Кроме того, наблюдается образование отечного отграничивающего соединительнотканного вала вокруг имплантата. Новообразованная ткань по краю имплантата отсутствует. В целом воспаление усиливается. Наблюдается нагноение в месте имплантации. Край образца неровный, что характерно для начала биоэрозии имплантата. Инкапсулирование отсутствует, при этом вдоль края имплантата отсутствуют клеточные элементы фибробластического типа характерные для регенеративного процесса. Встречаются единичные новообразованные кровеносные сосуды в собственной соединительной ткани. Имплантат не инкапсулируется, а лишь вызывает усиливающуюся воспалительную реакцию. Вростание собственной соединительной ткани в образец практически отсутствует. Кальциноз не наблюдается.



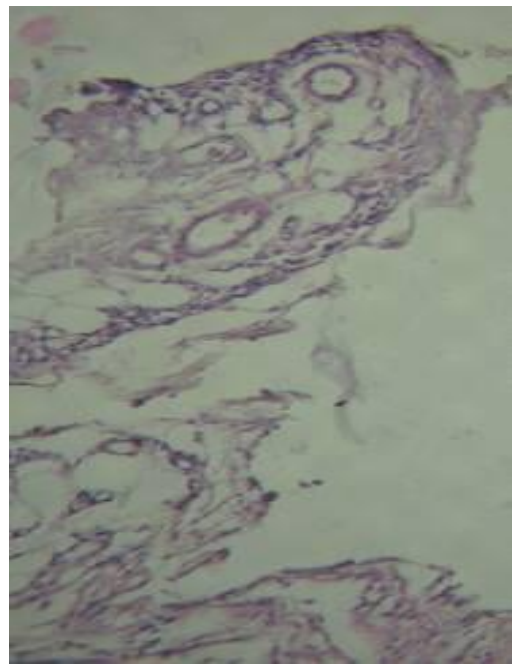
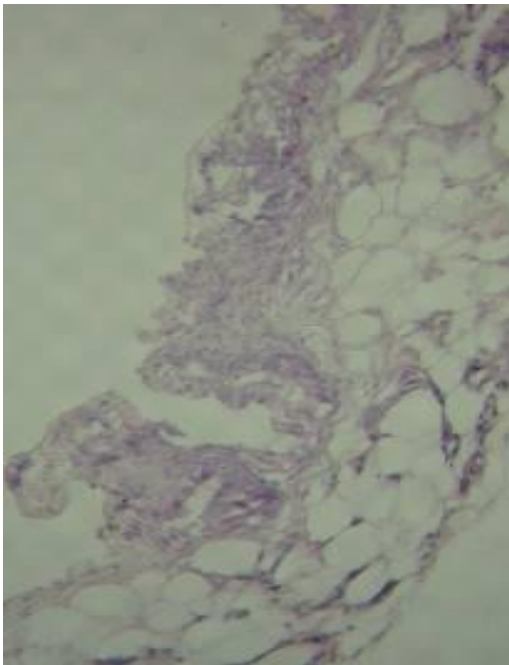


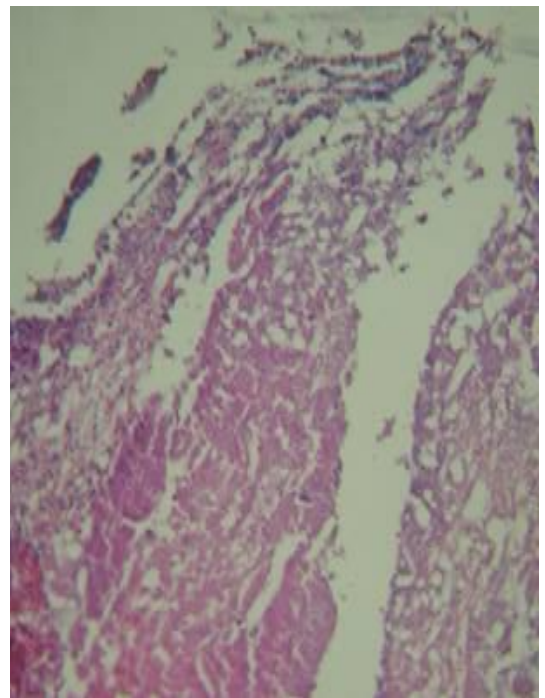
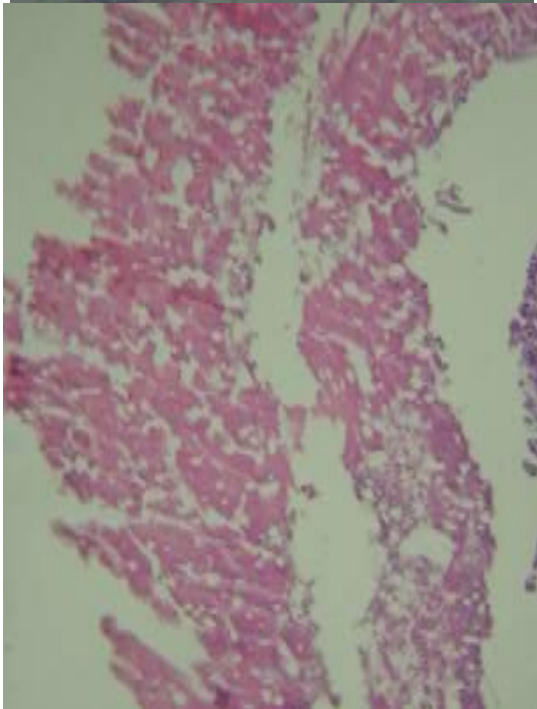
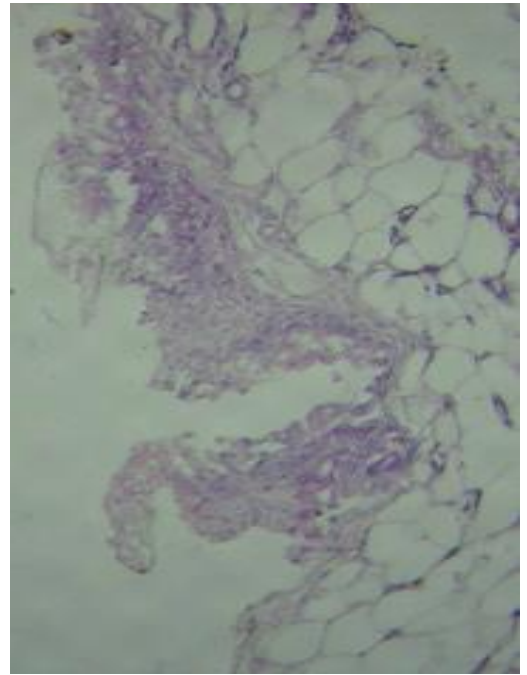
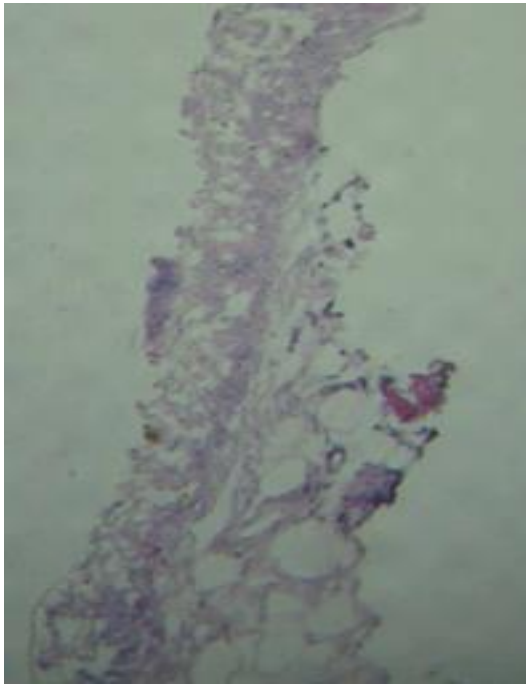
***Образец №1. Пленочный образец из не модифицированного поли(L,L-лактида),
21 день имплантации.***

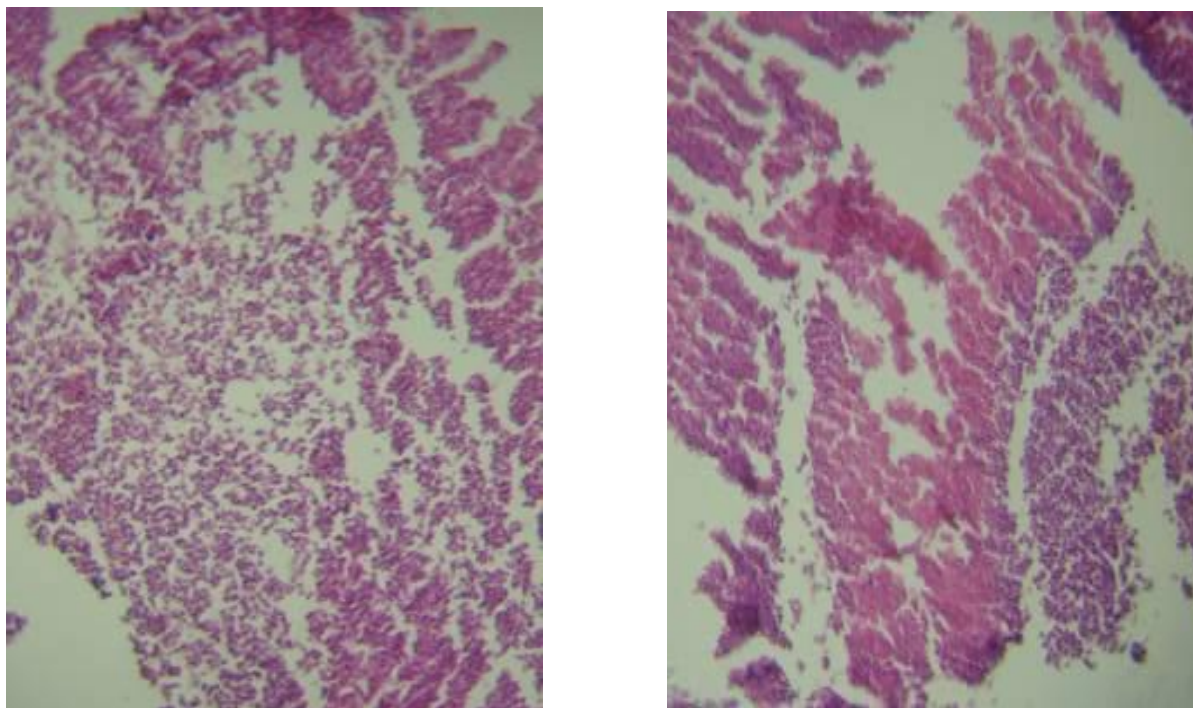
Опыт 1(животное 1)

Гнойно-некротическое расплавление тканей по краю образца. Наблюдается выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация по краю образца характерная для развивающегося воспаления. Она сопровождается активным нагноением по всей площади контакта имплантата с окружающей тканью с образованием

отечного, воспаленного отграничивающего соединительнотканного вала вокруг имплантата. Новообразованная ткань по краю имплантата отсутствует. Воспаление усиливается и имеет характер некроза, вызванного закислением области имплантации. Край образца неровный, он фрагментирован, наблюдается активная биоэрозия имплантата. Инкапсулирование отсутствует, при этом вдоль края имплантата отсутствуют клеточные элементы фибробластического типа характерные для регенеративного процесса. Имплантат и продукты биоэрозии кислотного типа вызывают усиливающуюся воспалительную реакцию. Динамика развития воспаления отрицательная. Прогноз отрицательный.







Общий вывод по образцу № 1. Пленочный образец из не модифицированного поли(L,L-лактида)

Пленочный образец материала из сополимера PLLA показал весьма сильный воспалительный ответ организма на его имплантацию. В начальный период через 7 дней имплантации не наблюдалось значительного воспаления, которое сильно прогрессировало к 14-му дню имплантации и затем перешло в гнойную фазу. К 21-м суткам воспалительный процесс сопровождался нагноением с признаками некроза окружающих тканей. Воспалительный процесс нарастал параллельно с биодеградацией имплантата, которая вероятно сопровождалась выделением кислых продуктов способствовавших локальному закислению с усилением некроза. В отличие от желатин содержащих имплантатов приповерхностное прорастание материала собственной соединительной тканью не наблюдалось. Усиливающаяся биодеградация образца к концу имплантации сопровождалась его частичной фрагментацией. Инкапсуляция образца в соединительнотканную капсулу не наблюдалась. Рост новой соединительной ткани не наблюдался даже в спокойный первый период имплантации 7 суток. На 14-е сутки наблюдалось начало гнойного процесса, который и развился в обильное нагноение. На 21-е

сутки имплантации появились признаки некроза окружающих тканей. Относительно кровеносного русла, неоангиогенез соединительной ткани в зоне имплантации не наблюдался. Ангиогенез внутри имплантата, равно как и его прорастание соединительной тканью не наблюдаются. С учетом отрицательной динамики развития воспаления прогноз пребывания имплантата в организме негативный.

С высокой долей вероятности можно предположить, что дальнейшая биодegradация материала будет вызывать лавинообразное закисление в области имплантата, некроз окружающих тканей, сопровождающийся выходом в тканевую жидкость протеолитических ферментов клеток, гидролиз внеклеточных белков и лавинообразное дальнейшее закисление сопровождающееся гибелью клеток соединительной ткани. Материал не подходит для использования в восстановительной хирургии ни в качестве биодegradирующего материала для замещения костных и мягких тканей, ни при создании разделительных мембран для абдоминальной хирургии, однако, при более углубленном исследовании он может быть использован для создания цитостатических покрытий стентов для сердечно-сосудистой хирургии и других изделий медицинской техники, которым требуется придание цитостатических свойств поверхности.

Рекомендации по применению материалов и выводы

из исследований по подкожной имплантации с гистологическим контролем на срок 7, 14 и 21 сутки пленочных и нетканых образцов сополимеров хитозана с поли(L,L-лактидом) и желатиной, хитозана с поли(L,L-лактидом) и гомополимера поли(L,L-лактида)

1. Образец № 4 – нетканый материал на основе тройного сополимера полилактид-хитозан-желатин. Не вызывает интенсивного воспаления и замещается собственной соединительной тканью без образования отграничивающей капсулы. Он способен к умеренной биодegradации вследствие пористой структуры и вследствие наличия в материале биодegradирующих блоков желатины. Материал перспективен в качестве биоразлагаемой матрицы для

замещения мягких тканей организма, а так же для выращивания клеточных культур. Представляет интерес в первую очередь в качестве тканезамещающих губок в восстановительной хирургии, а так же в качестве покровного материала и основы для выращивания кератиноцитов в ожоговой хирургии.

2. Образец №3 – пленочный материал на основе тройного сополимера полилактид-хитозан-желатин. Не вызывает интенсивного воспаления и замещается собственной соединительной тканью без образования отграничивающей капсулы. В условиях подкожной имплантации материал подвержен замедленной биodeградации вследствие наличия в материале биodeградирующих блоков желатины, однако биodeградирует и прорастает тканью существенно медленнее по сравнению с нетканым материалом изготовленным из того же сополимера. Материал перспективен в качестве биоразлагаемой матрицы для выращивания клеточных культур, в качестве покровного материала при лечении ран и ожогов и может быть перспективен в качестве стоматологической мембраны для лечения осложненного периодонтита.

3. Образец № 2– пленочный материал на основе двойного сополимера полилактид-хитозан. Материал не вызывает интенсивного воспаления, не замещается и не прорастает собственной соединительной тканью. Наблюдается отчетливое образование отграничивающей капсулы, не вросшей в полимерную матрицу. В условиях подкожной имплантации материал подвержен замедленной биodeградации вследствие наличия в материале биodeградирующих блоков желатины, однако он биodeградирует существенно медленнее по сравнению с тройным сополимером и процесс проходит без прорастания соединительной тканью. Материал перспективен в качестве отграничивающей против спаечной мембраны в абдоминальной хирургии, краниопластике и множестве других областей, а так же в качестве хирургической мембраны в стоматологии.

4. Образец № 1 – пленочный материал на основе гомополимера полилактида. Материал не вызывает существенного воспаления в течение первых 7 дней, не замещается собственной соединительной тканью однако к 14-му дню наблюдается отчетливое нарастающее во времени воспаление с нагноением и образованием

отграничивающего вала соединительной ткани которое к 21-му дню переходит в гнойное воспаление с началом некроза окружающих тканей. Внутри материала соединительная ткань отсутствует. Материал биodeградирует с образованием соединений кислого характера потенцирующих развитие лавинообразного воспаления. В ряду исследованных материалов Образец №1 деградирует медленнее остальных без прорастания соединительной тканью. Это типично для пленочных образцов полилактидов. Материал не пригоден в качестве отграничивающей, против спаечной мембраны в абдоминальной хирургии. Области возможного применения совпадают с другими сложноэфирными медицинскими полимерами обладающими цитостатическими свойствами.

Заместитель директора
по научной работе
ООО «Ксеноплант»
Ведущий научный сотрудник
ЦИТО им. Н.Н.Приорова



к.м.н. Зайцев В.В.