

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ НИЖЕГОРОДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. Н.И. ЛОБАЧЕВСКОГО»

На правах рукописи

Леднев Иван Родионович

**БИОРАЗЛАГАЕМЫЕ, БИОСОВМЕСТИМЫЕ КОМПОЗИЦИИ
НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И СМЕСЕЙ С ПОЛИЛАКТИДОМ И
ПОЛИКАПРОЛАКТОНОМ. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА**

1.4.7. – Высокомолекулярные соединения (химические науки)

Научный руководитель:

доктор химических наук

Смирнова Лариса Александровна

Нижний Новгород – 2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. Литературный обзор.....	10
1.1. Полимеры для медицинского применения.....	10
1.2. Хитозан	12
1.3. Полилактид	16
1.4. Поли(ϵ -капролактон)	22
1.5 Катализаторы ROP-полимеризации лактида и ϵ -капролактона	27
1.6. Модификация хитозана по реакциям полимераналогичных превращений	29
1.7 Полимерные смеси на основе хитозана	31
1.8 Полимерные материалы медико-биологического назначения на основе биodeградируемых полиэфиров и хитозана	33
Глава 2. Экспериментальная часть.....	39
2.1. Используемые вещества и их характеристики.....	39
2.2. Методы исследования.....	39
2.2.1. Определение молекулярной массы и степени деацетилирования хитозана.....	39
2.2.2. Получение пористых образцов на основе хитозана	41
2.2.3. Модификация хитозана энантовым альдегидом.....	42
2.2.4 Синтез салицилата титана	42
2.2.5 MALDI масс-спектроскопия	42
2.2.6 ЯМР-спектроскопия.....	42
2.2.7. Синтез полилактида и поли- ϵ -капролактона.....	43
2.2.8. Определение молекулярной массы полиэфиров	43
2.2.9. Получение ДМСО-растворимого хитозана и смесевых композиций на его основе.....	43
2.2.10 Получение пленок	43
2.2.11. Исследование структуры образцов	44
2.2.12. Изучение смачиваемости	45
2.2.13. Исследование теплофизических свойств композиций.....	45
2.2.14. Исследование клеточной адгезии.....	45
2.2.15. Оценка цитотоксичности – МТТ-тест.....	46

2.2.16. Исследование биосовместимости и биоразлагаемости композиций	49
3. Результаты и обсуждение	51
3.1. Получение трехмерных пористых образцов на основе хитозана	51
3.2. Модификация хитозана энантовым альдегидом	61
3.3. Синтез полиэфиров	71
3.4. Получение ДМСО-растворимой формы хитозана и смесевых композиций	83
ВЫВОДЫ	103
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	105

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Создание новых полимерных материалов биомедицинского назначения для регенерации поврежденных тканей является одной из актуальных проблем современной науки о полимерах. Это обусловлено возрастающим комплексом требований к физико-химическим, биологическим и структурным свойствам, как пленочных образцов, так и объемных полимерных каркасов (скаффолдов). Наряду с указанными свойствами, в рамках современных тенденций перехода к персонализированной медицине, стоит задача получения термопластичных композиций для изделий индивидуальной формы методами аддитивных технологий (3D-печать). Одним из перспективных полимеров для биомедицинских приложений является хитозан, что обусловлено уникальным набором его свойств, к которым относятся отсутствие токсичности, гипоаллергенность, биоразлагаемость, наличие в структуре основного повторяющегося звена макромолекулы первичной аминогруппы – нуклеофильного центра, удобного для химической модификации. Успешное применение хитозана в качестве основы тканезамещающих материалов сдерживается низкой прочностью и сложностью формования изделий из него и может быть решено путем модификации полисахарида, либо по реакциям полимераналогичных превращений, либо совмещением с термопластичными биоразлагаемыми и биосовместимыми полимерами. В последнем случае перспективным представляется комплексное использование свойств хитозана и полиэфигов, в частности полилактида (ПЛА) и поликапролактона (ПКЛ), которые уже широко применяются в биомедицине. При этом к недостаткам полиэфигов можно отнести плохую клеточную адгезию, и образование при их ферментативном гидролизе в организме молочной или 6-гексанкапроновой кислоты, что приводит к локальному «закислению» и, как следствие, возможному развитию воспалительных процессов в тканях.

Хитозан, как полиаминогликан, способен связывать образующиеся кислоты и позволит избежать негативных эффектов продуктов разложения полиэфиров.

Степень разработанности темы исследования. Среди способов получения трехмерных пористых каркасов на основе хитозана в настоящее время можно выделить два основных – лиофилизация и использование сверхкритического диоксида углерода. Однако указанные методы многостадийны, энергозатратны и требуют специализированного оборудования. Известно, что улучшить свойства пленок из хитозана можно путем поверхностной модификации альдегидами с образованием оснований Шиффа, однако это не позволяет изменять свойства полимера в объеме. К настоящему времени разработаны методы получения смесевых композиций хитозана с полиэфирами через растворы. Так, известны примеры получения пленок из растворов смешанного состава, полиэфиров в хлороформе и водных растворов хитозана, образующих нестабильную эмульсию, что приводит к неудовлетворительным свойствам. Однородные по структуре пленки хитозана с поликапролактоном были получены с использованием единого растворителя – гексафторизопропилового спирта. Однако этот растворитель является коммерчески недоступным и токсичным, что усложняет получение материалов в большом количестве. Ввиду отсутствия доступного общего растворителя для хитозана и полиэфиров, наиболее распространенным методом получения материалов на их основе является твердофазный синтез, который обеспечивает улучшение свойств композиции, но прививка полилактида осуществляется только на поверхности частиц хитозана. Таким образом, остается задача по разработке и развитию стратегии новых методов модификаций хитозана, обеспечивающих получение высокопрочных, биосовместимых и биоразлагаемых композиций на его основе различного функционального назначения.

Цель работы заключалась в разработка биосовместимых, биоразлагаемых материалов на основе хитозана и однородных смесей его с полилактидом и поликапролактоном, перспективных в тканевой инженерии.

В рамках поставленной цели решались следующие **задачи**:

1) разработка одностадийного метода получения трехмерных высокопористых структур из растворов хитозана в присутствии гидрокарбонатов щелочных металлов или аммония;

2) модификация хитозана энантовым альдегидом, получение на его основе биосовместимых композиций и изучение физико-механических, теплофизических и структурных свойств;

3) синтез устойчивого на воздухе и к влаге салицилата титана, как нового катализатора полимеризации с раскрытием цикла, обеспечивающего получение полиэфиров с высокими молекулярными массами и низким параметром полидисперсности;

4) получение из раствора однородных по структуре биосовместимых и термопластичных композиций на основе хитозана и полиэфиров с различными соотношениями компонентов в виде пленок и трехмерных пористых образцов, изучение их физико-механических, теплофизических и реологических свойств.

Научная новизна.

1. Предложен эффективный метод получения высокопористых, биосовместимых и биоразлагаемых композиций на основе хитозана.

2. Разработан простой метод синтеза салицилата титана в качестве катализатора ROP-полимеризации циклических эфиров (L-лактид, D,L-лактид, ϵ -капролактон).

3. Впервые получены однородные по структуре термопластичные и биосовместимые композиции с высокими механическими свойствами на основе хитозана с полиэфирами формированием их из растворов в диметилсульфоксиде.

Практическая значимость. Разработан конкурентоспособный метод получения трехмерных пористых композиций на основе хитозана, перспективных для применения как органической составляющей скаффолдов. Композиции на основе модифицированного хитозана могут применяться в качестве основы материалов для закрытия раневых поверхностей. Разработан способ получения катализатора на основе салициловой кислоты и изопророксида титана. Катализатор характеризуется стабильностью на воздухе и перспективен для его применения в промышленном синтезе поли(L-лактида), поли(D,L-лактида) и поликапролактона. Полученные однородные по структуре термопластичные композиции на основе хитозана с полиэфирами могут быть использованы для изготовления персонализированных имплантатов.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Разработка метода получения пористых структур на основе хитозана и исследование свойств образцов.
2. Получение модифицированного хитозана взаимодействием с энантиоым альдегидом с образованием основания Шиффа и изучение его свойств.
3. Синтез устойчивого на воздухе салицилата титана на основе изопророксида титана и салициловой кислоты как катализатора полимеризации лактида и капролактона. Получение полиэфиров с высокой молекулярной массой и низким параметром полидисперсности.
4. Получение однородных композиционных термопластичных материалов с улучшенными прочностными характеристиками на основе смесей хитозана и полиэфиров через единый растворитель.
5. Результаты комплексного исследования свойств композиций на основе хитозана и полиэфиров.

Личный вклад автора и благодарности. Автор принимал участие во всех этапах диссертационной работы, включая постановку целей и задач

исследования, планирование и выполнение экспериментов, обработку и интерпретацию результатов, формулирование выводов по результатам работы и их обобщение в виде научных статей и тезисов докладов. Постановка задач, а также обобщение и анализ результатов проводились совместно с научным руководителем д.х.н. Смирновой Л.А. Автор выражает благодарность д.х.н., проф. Маркину А.В. (ННГУ) за проведение анализов образцов методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК); д.х.н. Чеснокову С.А. и к.х.н. Ковылину Р.С. (ИМХ им. Г.А. Разуваева РАН) за анализ образцов методом интрузионной ртутной порометрией; к.ф-м.н. Юнину П.А. (ИФМ РАН) за помощь при изучении структурных свойств; к.х.н. Фукиной Д.Г. (НИИ Химии ННГУ) за помощь в изучении поверхности пленок методом сканирующей электронной микроскопии; к.х.н. Малышевой Ю.Б.(ННГУ) за проведение исследований методом ЯМР; д.х.н. Гришину И.Д. (ННГУ) за проведение исследований методом MALDI-TOF; д.б.н., проф. Корягину А.С. (ННГУ) за помощь при изучении биосовместимости композитов *in vivo*; к.б.н. Егорихиной М.Н. и к.м.н. Олейник Д.Я. (ПИМУ) за исследование цитотоксичности и пролиферативной активности образцов.

Степень достоверности и апробации результатов. Материалы диссертационных исследований были представлены на научных конкурсах, по результатам которых автору присуждалась именная стипендия академика Г.А. Разуваева (2019/2020, 2020/2021, 2021/2022 гг. Основные положения работы доложены и обсуждены на мероприятиях: IX Международном симпозиуме «Молекулярный порядок и подвижность в полимерных системах» (23-27 мая 2017, Санкт-Петербург); XV Международной научно-практической конференции «Новые полимерные композиционные материалы» (4-9 июля 2019, Эльбрус); *Frontiers in Polymer Chemistry and Biopolymers 2019* (18-19 ноября 2019, Рим, Италия); 8-й Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры – 2020», II Зезинской школе-конференции для молодых ученых «Химия и физика полимеров» (24-26 ноября 2022, Москва).

Структура диссертации. Диссертация включает введение, литературный обзор по выбранной тематике, экспериментальную часть, обсуждение полученных результатов, выводы, список сокращений и цитируемой литературы (261 наименование). Работа изложена на 128 страницах, включает 15 таблиц и 36 рисунков.

Соответствие диссертации паспорту специальности. Диссертационная работа по своей актуальности, целям, решаемым задачам и полученным результатам соответствует пунктам 4, 6, 7 и 9 паспорта специальности 1.4.7. Высокомолекулярные соединения.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки РФ (код проекта 1537), Научно-исследовательской работы в рамках проектной части государственного задания в сфере научной деятельности (задание № 4.3760.2017/ПЧ), УМНИК-2020, СТАРТ-2022, Российского научного фонда (№ 23-13-00342).

Глава 1. Литературный обзор

1.1. Полимеры для медицинского применения

Потребность в создании новых биосовместимых полимеров и композиций на их основе остается актуальной, поскольку эти материалы широко востребованы в различных областях биомедицины, прежде всего в тканевой инженерии и регенеративной медицине [1–3].

До недавнего времени не было чёткого определения понятия «биосовместимость» для материалов, используемых в биомедицины. Под данным термином прежде всего понимают способность материала, обладать рядом необходимых свойств и не вызывать развития негативных процессов в организме носителя. Обобщая литературные данные о том, как имплантируемый материал взаимодействует с биологическими структурами организма [4, 5], можно определить ключевые характеристики, которыми должен обладать биосовместимый материал:

- не вызывать воспаление в организме;
- не являться аллергеном и канцерогеном;
- не проявлять цитотоксичные свойства;
- не вызывать развитие инфекции;
- сохранять свои эксплуатационные свойства в течение предусмотренного срока использования.

В настоящее время существует особая потребность в специализированных биосовместимых полимерах и материалах на их основе, для активно развивающейся в последние годы области медицинского материаловедения — тканевой инженерии [6-10]. Эта сфера связана с регенеративной медициной и созданием искусственных органов и восстановлением поврежденных тканей [11-13]. Эти исследования проходят на стыке химии полимеров, ряда биомедицинских дисциплин, а также химии твердого тела, в случае если

необходимо обеспечить регенерацию твердых тканей, таких как костная ткань или зубы [14, 15]. Таким образом, тканевая инженерия требует решения комплекса взаимосвязанных фундаментальных и прикладных задач: разработку новых полимерных и неорганических материалов, способов модификации и их переработки в изделия биомедицинского назначения; исследование механизма взаимодействия биоматериалов с организмом реципиента; оценку физико-химических и медико-биологических свойств биоматериалов и изделий из них; экспериментально-клиническое исследование поведения материала при имплантации [16-20].

В соответствии с разнообразием устройств и предметов медицинского назначения существует большое разнообразие биосовместимых полимеров. Эти полимеры делятся на две категории: биоинертные (или биостабильные) и биоразлагаемые (или биодеградируемые, биорезорбируемые), в зависимости от поведения в организме реципиента [21, 22].

Биоинертные полимеры, не разлагаются в жидкостях, не подвержены ферментативному гидролизу и предназначены для изготовления биомедицинских материалов с большим сроком службы. К ним можно отнести синтетические полимеры, такие как полиэтилен, полипропилен, полиуретаны и др. [23-25].

Создание новых полимерных материалов, которые не только биосовместимы, но и способны к биоразложению в организме, представляет собой задачу, более комплексную, по сравнению с проблемами, возникающими при разработке биоинертных полимерных материалов, не подверженных биодеградации в организме [26-30]. В настоящий момент наибольшее применение нашли природные полимеры, такие как полисахариды (хитозан, целлюлоза, альгинаты и гиалуроновая кислота) и белки (коллаген, желатин, фиброин, шелк), а также синтетические биоразлагаемые полиэфиры (полилактид, полилактид-со-гликолид, поликапролактон и т.д.) [31-35].

Потенциальная опасность применения для этих целей материалов белковой природы вызвала ряд законодательных запретов [36-38] и, соответственно, возросла актуальность к использованию изделий на основе полисахаридов и полиэфиров. Особый интерес среди последних представляют хитозан, полилактид и поликапролактон, как наиболее коммерчески доступные и каждый из которых обладает рядом свойств, удовлетворяющих для применения в регенеративной медицине, а совокупное их использование позволит нивелировать недостатки индивидуальных компонентов. [39, 40].

1.2. Хитозан

Хитозан – представляет собой деацетилированную форму природного биополимера хитина [41]. Хитин и его производное хитозан являются линейными полисахаридами [42]. Исследованиями хитина и хитозана занимаются ученые по всему миру, при этом наблюдается рост количества публикаций по хитозану каждый год, что свидетельствует об актуальности данных исследований [43, 44]. Хитин по своему химическому строению схож с целлюлозой и является вторым по распространённости природным полисахаридом после неё [45]. Биосферные запасы хитина в мировом океане в среднем оцениваются более чем в 2 млрд. тонн/год. Источником хитинсодержащего сырья в России являются ряд морских членистоногих, таких как крабы, креветки и криль [46].

По своей химической структуре хитин и хитозан относятся к полисахаридам, мономерами которых являются N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамин, соответственно. Однако, в научной терминологии термином хитозан называют полимеры с содержанием D-глюкозаминных звеньев более 60% и именно растворимость в разбавленных кислотах считают практическим критерием различия между хитином и хитозаном (Рис. 1).

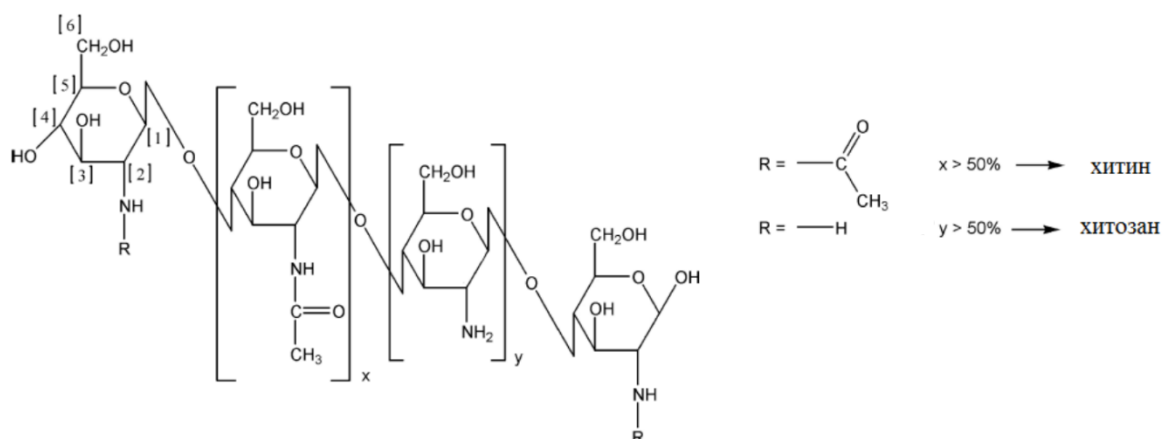


Рис. 1 Схематическое представление структуры макромолекул хитина и хитозана

Хитин и хитозан являются аморфно-кристаллическими полимерами, а степень их кристалличности зависит от степени деацетилирования (СД). Кристалличность максимальна для полностью ацетилированного хитина (СД = 0 %) и составляет приблизительно 0.9 – 0.95, для полностью деацетилированного хитозана (СД = 100 %), характерны значения индекса кристалличности в пределах 0.8 – 0.85[47]. Значение индекса кристалличности уменьшается для промежуточных значений степени деацетилирования [48].

Хитозан растворяется в водных растворах ряда неорганических и органических кислот благодаря протонированию первичных аминогрупп с образованием водорастворимой солевой формы. Растворимость хитозана в основном определяется его СД и распределением ацетилированных и деацетилированных звеньев в цепи полисахарида. Гидродинамический радиус макромолекул хитозана в растворах может варьироваться от нескольких десятков до нескольких сотен нанометров [49]. В зависимости от молекулярных характеристик хитозан из растворов (солевая форма) начинает осаждаться при значениях рН среды в диапазоне 6-6.5 и эта способность используется для перевода материалов на его основе в нерастворимую форму (основная форма) (Рис. 2) [50-52].

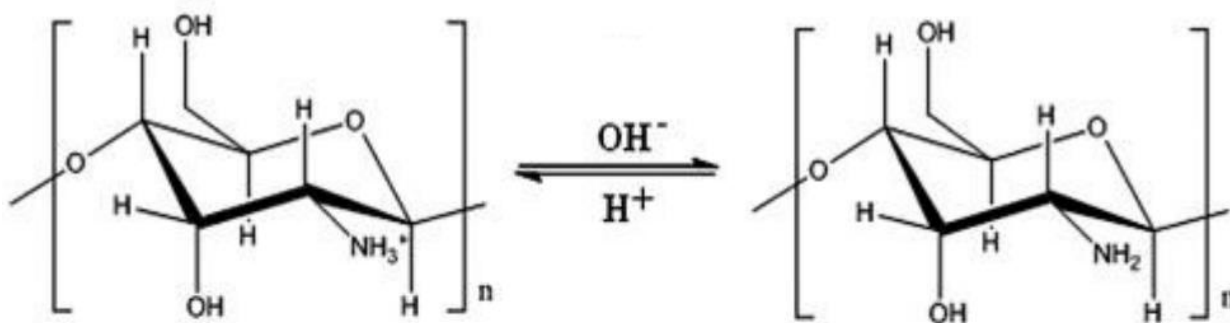


Рис. 2 Схема перевода хитозана в основную форму из солевой формы.

Макромолекулы хитозана, как и хитина, образуют прочную систему водородных связей. Температура стеклования хитозана варьируется от 140 °С до 150 °С [53]. Важно отметить, что температура плавления хитозана выше температуры разложения, поэтому формование материалов возможно только из его растворов или из смесей с большим количеством термопластичного полимера как второго компонента.

В дополнение к вышесказанному, хитозан как природный полимер, обладает способностью к биodeградации [54-56], отсутствием возникновения воспаления или аллергической реакции при имплантации [57, 58], нетоксичностью [59], ранозаживляющим и кровоостанавливающими свойствами [60-63], высокой реакционной способностью [64], что, вместе с большими источниками хитина, делает этот полимер одним из самых интересных и перспективных природных полимеров для различных областей применения. Хитозан и его производные используются в сельском хозяйстве [65, 66], для очистки воды как сорбент и флокулянт [67-70], в косметике [71], пищевой промышленности [72, 73], в медицине [74-80].

Хитозан, ввиду низких механических свойств и сложности формования изделий из него, все чаще подвергается химической и физической модификации для создания новых материалов с заданными свойствами. Это позволяет создать новые материалы с необходимыми характеристиками и расширить области применения хитозана, особенно в сфере биомедицины.

[81-82]. Исследования показывают перспективность хитозана и его производных для регенерации мягких тканей. Хитозан способствует клеточной адгезии и образованию внеклеточного матрикса, улучшая восстановление тканей [83, 84]. Композитные гидрогели на основе хитозана и кальций фосфатных керамик исследуются для костной тканевой инженерии и для терапии костных заболеваний [85, 86].

Значительный интерес представляет получение пленок на основе хитозана и исследование их свойств, ввиду его пленкообразующей способности пленки из хитозана являются одной из основных форм в которой применяется хитозан. Одним из основных направлений исследования пленок из хитозана являются работы по созданию биodeградируемых пленок с антимикробными свойствами для пищевой промышленности [87–90]. Пленочные материалы на основе хитозана важны для биомедицины, так как, они используются для культивирования клеток или в качестве раневых повязок, чему способствуют гемостатические и антибактериальные свойства хитозана [91, 92]. Особым случаем применения хитозана в виде пленок, являются покрытия на его основе, используемые для металлических или керамических имплантов, с целью повышения их биологической активности и предотвращения биообрастания [93-95].

Свойства поверхности пленок хитозана сильно зависят от молекулярной массы и степени деацетилирования полисахарида. Согласно литературным данным краевые углы смачивания водой для пленок из различных образцов немодифицированного хитозана могут варьироваться в пределах 65-100 градусов [96–100].

При формовании пленок и нанесении покрытий из хитозана для биомедицинского назначения следует учесть несколько моментов:

1. Зависимость свойств, как от химической структуры полисахарида, так и от природы подложки.

2. Необходимость формирования пленок/покрытий из растворов хитозана в солевой форме, что обуславливает их дальнейший перевод в основную форму.

Как итог вышесказанному, надо отметить, что хитозан является крайне перспективным полимером для биомедицины, поскольку он является коммерчески доступным полисахаридом, который можно легко модифицировать по разным функциональным группам и как следствие придавать разные свойства. Несмотря на ряд положительных свойств, низкие механические свойства, нерастворимость основной формы хитозана и отсутствие термопластичности остаются основными проблемами, требующими решения, для применения материалов из хитозана. Данные недостатки можно решить совмещением хитозана с полиэфирами.

1.3. Полилактид

Самым распространённым на сегодняшний день биоразлагаемым полимером является полилактид (ПЛА), гидрофобный полимер линейного строения, который относится к группе алифатических сложных полиэфиров. (рис. 3) [101].

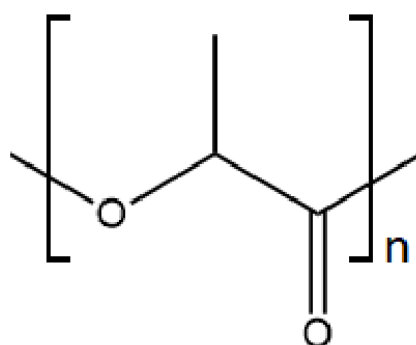


Рис. 3 Структурная формула повторяющегося звена ПЛА

Для синтеза полилактида используется растительное сырье (сахарный тростник и крахмалосодержащие растения и др.), что делает его альтернативой полимерам, получаемым из нефтехимического сырья [102-105]. Согласно

статистике на полилактид приходится около половины мирового рынка биоразлагаемых пластиков, а мировое его потребление растет с каждым годом [106].

Ввиду своей гидрофобности, полилактид не растворяется в воде и этаноле, но обладает хорошей растворимостью в ряде органических растворителях [107, 108].

ПЛА обладает значительным преимуществом: его можно перерабатывать почти всеми способами, которые используются для крупнотоннажных промышленных полимеров. Изделия из этого полимера широко распространены в быту [109-115]. Важно отметить, что ПЛА уже используется как биоразлагаемый материал для аддитивных технологий (3D-печати), как в биомедицинских, так и в бытовых изделиях.

В последние годы наблюдается все большее применение ПЛА для биомедицинских целей [116-120]. Низкая токсичность и биоразлагаемость делают ПЛА привлекательным полимером для трехмерных скаффолдов, в частности костных имплантатов.

В качестве исходных веществ для получения ПЛА используются молочная кислота (МК) или циклический димер – лактид. Молочная кислота, из-за наличия асимметрического атома углерода в ее молекуле существует в двух оптически активных формах (L-МК и D-МК), а лактид может существовать в виде оптически активных D- и L-форм (D-лактид и L-лактид) и оптически неактивной мезо-формы (D, L-лактид) (рис. 4) [121, 122].

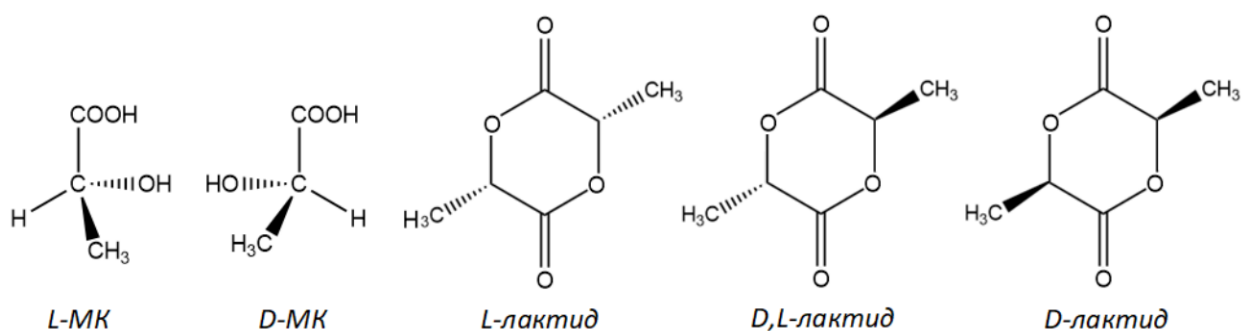


Рис. 4. Оптические изомеры МК и лактида.

Известно о нескольких методах получения полилактида, применяемых в настоящее время.

Самый экономичный вариант синтеза — это прямая поликонденсация молочной кислоты при высоких температурах, особенностью этого метода является низкая молекулярная масса полимера (ММ 1-5 кДа) из-за сложностей отвода низкомолекулярного побочного продукта поликонденсации — воды [123, 124]. Проведение процесса азеотропной поликонденсации молочной кислоты в условиях вакуума, позволяет удалять воду и как следствие получать полимер с достаточно высокой ММ (до 300 кДа), однако полученный полимер обладает большим индексом полидисперсности [125].

Другим методом синтеза полилактида с высокой молекулярной массой является использование удлинителей цепи. Из продукта поликонденсации молочной кислоты получают два типа олигомеров с концевыми гидроксильными группами и с концевыми карбоксильными, соответственно. Повторная конденсация полученных олигомеров между собой, позволяет получать продукт, ММ которого складывается из ММ используемых олигомеров [126, 127].

Наиболее распространенным способом синтеза высокомолекулярного ПЛА является полимеризация лактида по реакции с раскрытием цикла (ROP-полимеризация) в присутствии катализатора — чаще октаноата олова (II) и спирта, как со-инициатора [128-132].

Механизм данной реакции, предполагает, что на первом этапе образуется комплекс между мономером, катализатором и со-инициатором (спиртом) (рис.5). Затем, мономер присоединяется через атом кислорода карбонильной группы к атому металла катализатора, с последующим раскрытием цикла.

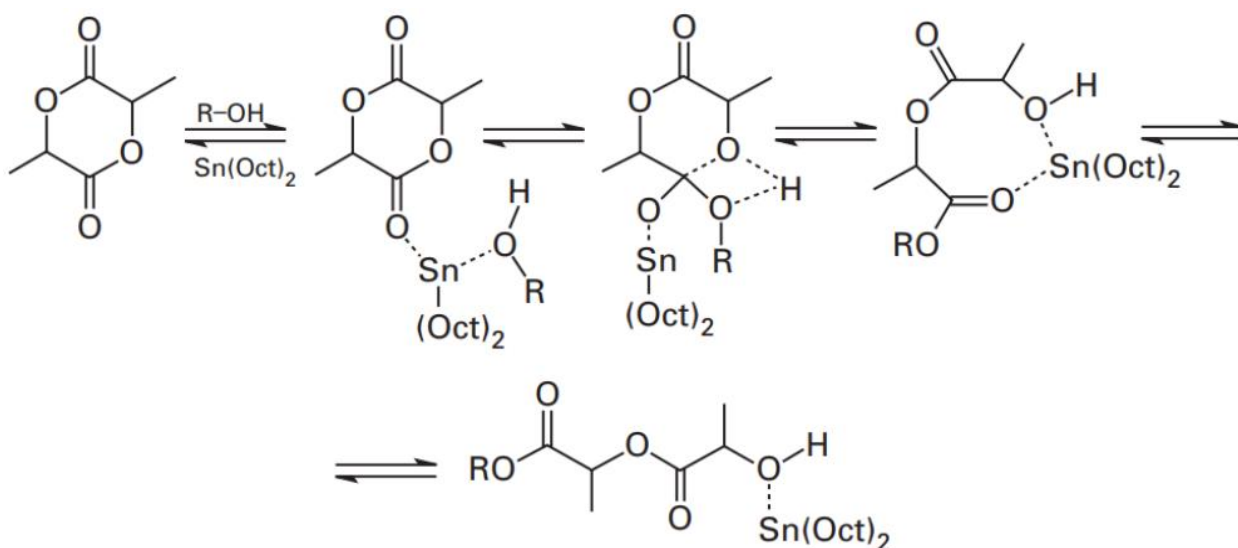


Рис. 5 Схема реакции полимеризации лактидов по координационному механизму в присутствии октаноата олова (II) и предельного спирта [130].

Ряд свойств полилактида, таких как растворимость, степень кристалличности, прочность и эластичность определяются его стереорегулярностью, которая определяется стереохимическим составом мономеров и способом получения. Поли (L-лактид) и поли (D-лактид) получают из соответствующих циклических димеров (L- и D-формы лактидов). Поли (D, L-лактид) характеризующийся аморфной структурой получают из оптически неактивной мезо-формы (D, L-лактида). [133-136].

Немодифицированные поли (L-лактид) и поли (D-лактид) имеют температуру плавления кристаллической фазы 207 °С, но обычно температура плавления находится в диапазоне 160-180 °С. Подобная разница температур обусловлена примесями, рацемизацией и дефектами кристаллитов [137].

При комнатной температуре поли (L-лактид) – полимер в стеклообразном состоянии, со степенью кристалличности от 40 до 80% [138]. Полимер

демонстрирует высокие значения прочности на разрыв (50-70 МПа) и модуля упругости (2.7-4.2 ГПа), но низкое удлинение (2-4%), что делает его пригодным для изготовления изделий, не требующих высокой эластичности, например в ортопедии [139, 140].

Поли (D, L-лактид) – аморфный полимер, прочность на разрыв которого немного уступает кристаллическому поли (L-лактиду), но при этом обладает большей эластичностью. [141-143].

Среди способов решения проблемы низкой эластичности ПЛА выделяют следующие: пластификация полимера, проведение ориентационной вытяжки при высоких температурах смешение с другими полимерами [144]. Высокоэластичные материалы также могут быть получены путем сополимеризации лактида с другими циклическими эфирами [145-150].

Одной из главных характеристик ПЛА является то, что он способен к биоразложению под воздействием факторов окружающей среды. [151]. Продукты деструкции полилактида — это естественные продукты метаболизма, которые могут быть переработаны как одноклеточными, так и многоклеточными организмами без ущерба для них. Деструкция полилактида в организме проходит за счет ферментативного гидролиза, с образованием молочной кислоты и растворимых олигомеров, которые разлагаются до углекислого газа и воды, которые выводятся из организма. Однако иногда возможно закисление тканей при разложении до молочной кислоты и как следствие развитие негативных воспалительных процессов при регенерации тканей [152-155]. Ферменты, выделяемые микроорганизмами, обуславливают разложение ПЛА в почве. В результате нерастворимый в воде полимер разлагается с образованием водорастворимых органических кислот и олигомеров, которые превращаются в углекислый газ и воду [156-158].

Значение pH среды влияет на механизм и скорость деструкции ПЛА [159]. В сильноокислых средах (при $\text{pH} \leq 2$) преобладает механизм разложения,

сопровождающийся отщеплением концевого звена цепи. В то же время в сильнощелочной среде ($\text{pH} > 8$) происходит отщепление димера молочной кислоты (лактида). В слабокислых или нейтральных средах деструкция проходит через расщепление сложноэфирных групп и олигомеризацию. Скорость разложения полилактида (ПЛА) резко увеличивается при температурах выше температуры стеклования, что часто используют для изучения его кинетических особенностей [160].

В водных растворах разложение высокомолекулярного ПЛА происходит через случайный разрыв сложноэфирных связей, который регулируется четырьмя основными параметрами: величиной константы скорости реакции, количеством поглощенной воды, коэффициентом диффузии продуктов разложения в объеме полимера и их растворимостью в реакционной среде [161]. Разложение ПЛА протекает в четыре стадии [162]:

1. Диффузия молекул воды преимущественно в аморфные области ПЛА. Кристаллические области полимера демонстрируют большую устойчивость к гидролизу, поскольку доступ молекул воды в эти области затруднен;
2. Гидролитическое расщепление сложноэфирных групп макромолекул, находящихся в аморфных областях полимера. В ходе этого процесса наблюдается некоторое увеличение степени кристалличности;
3. Снижение ММ и образование водорастворимых соединений с последующим удалением. Водорастворимые олигомеры, расположенные ближе к поверхности, диффундируют, в то время как олигомеры в объеме остаются «захваченными». И в дальнейшем, олигомеры в объеме будут разлагаться до молочной кислоты, что приведет к закислению и ускорению разложения (автокатализ);
4. Разложение кристаллической фазы полимера по автокаталитическому механизму с участием продуктов разложения [163, 164].

Молекулярная масса (ММ) и степень кристалличности существенно влияют на время разложения полилактида (ПЛА). При этом биоразложение высокомолекулярного L-полилактида может проходить в течение десятков месяцев, а низкомолекулярного — всего несколько недель. В сравнении с ними для деструкции аморфного высокомолекулярного D, L-ПЛА требуется 1-1.5 года [165].

Отмечая ряд положительных свойств полилактида, таких, как высокие механические свойства, возможность регулировать скорость биоразложения, легкость формования изделий, следует сказать, что продукты разложения полимера в организме могут вызывать закисление и воспаление тканей, что может помешать их успешной регенерации.

1.4. Поли(ε-капролактон)

Поли(ε-капролактон) (ПКЛ) также, как полилактид, является представителем класса биоразлагаемых сложных полиэфиров алифатического ряда (Рис. 6) [166].

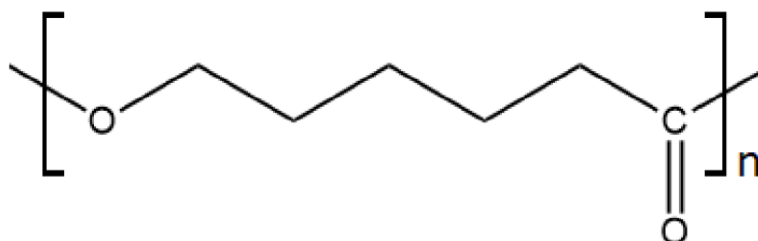


Рис. 6. Структурная формула повторяющегося звена ПКЛ

Исходным сырьем для ПКЛ, в отличие от ПЛА, являются только продукты нефтехимического синтеза. Поликапролактон представляет собой частично кристаллический (степень кристалличности 50-70%), линейный, гидрофобный, термопластичный полимер с температурой стеклования аморфной фазы -60 °С и температурой плавления 60 °С [167].

Поликапролактон не растворяется в воде и этаноле, ввиду своей гидрофобности, но хорошо растворим в хлороформе, ТГФ, ДМСО и др. органических растворителях [168-170].

Поликапролактон это полимер, который вызывает интерес своими ценными качествами, такими как биосовместимость, биоразлагаемость, относительно низкая стоимость (самая низкая на рынке по сравнению с другими полиэфирами), высокая эластичность, термостабильность и простота переработки [171]. Из литературы известна его способность образовывать смеси с большим числом полимеров как природного (желатин, альгинаты и др.), так и синтетического происхождения (поливинилхлорид, полиэтилентерефталат, полиэтиленгликоль и др.) [172-175].

ПКЛ был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) для применения в биомедицинских целях, в качестве систем доставки лекарств с контролируемым высвобождением, стентов для сосудов скаффолдов для тканевой инженерии, микрокапсул, имплантатов длительного действия и др. [176-180].

ПКЛ не обладает цитотоксичностью и является биоразлагаемым полимером, однако, выраженная гидрофобность и низкая смачиваемость затрудняют клеточную адгезию и пролиферацию клеток на поверхности скаффолдов, изготовленных из него [181, 182]. Для увеличения гидрофильности ПКЛ используют модификацию аминогруппами, плазменную обработку поверхности, получение сополимеров ϵ -капролактона (ϵ -КЛ) с другими гидрофильными мономерами или смесевых композиций с гидрофильными полимерами [183, 184]

Исходными мономерами для синтеза ПКЛ выступают 6- гидроксикапроновая кислота (6-ГКК) и ϵ -КЛ (Рис. 7).

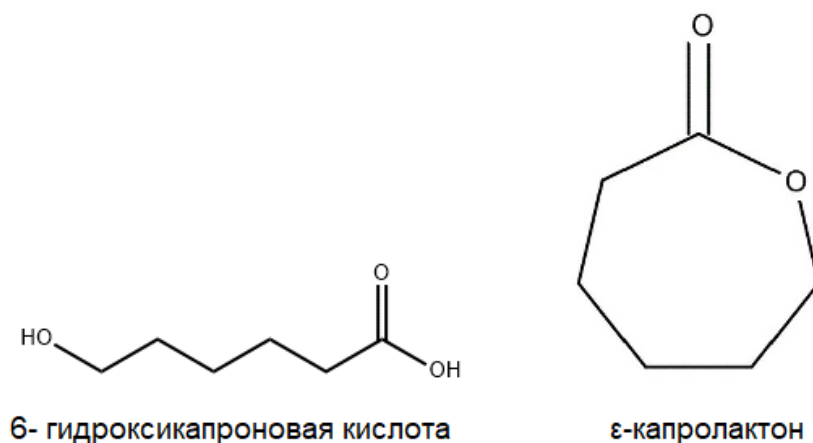


Рис. 7. Структурные формулы 6- гидроксикапроновой кислоты и ε-капролактона.

Также, как и для полилактида существуют два основных способа синтеза поликапролактона – гомополиконденсация 6-ГГК и полимеризация ε-КЛ с раскрытием цикла [185].

Реакцию поликонденсации проводят в вакууме, который позволяет удалять воду, образующуюся в процессе реакции и сместить равновесие в сторону получения высокомолекулярного продукта [186]. Реакция проходит в отсутствие катализатора при температуре от 120 до 150 °С, и времени синтеза 6 часов. В литературе описан ферментативный способ синтеза поликапролактона из 6- гидроксикапроновой кислоты [187]. В результате использования фермента-липазы *Candida Antarctica* образуется олигомер со средней молекулярной массой около 9000 и дисперсностью 1.6 за 48 часов. Однако этот метод не так распространен, как полимеризация ε-капролактона, поскольку образуется полимер с низкой молекулярной массой за большой промежуток времени.

В зависимости от катализатора предлагают четыре основных механизма полимеризации простых циклических эфиров: анионный, катионный, мономер-активация и координация-вставка [188-190].

Анионный механизм (Рис. 8) подразумевает образование анионных комплексов, с последующим раскрытием цикла. Основным недостатком данного метода является значительная внутримолекулярная переэтерификация, на поздних стадиях полимеризации. Это приводит к снижению молекулярной массы полимера, остановке полимеризации или получению полимеров с циклической структурой.

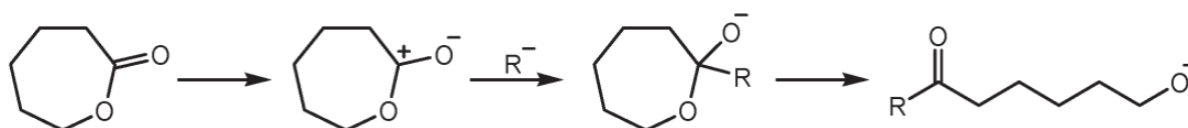


Рис. 8. Схема анионного механизма синтеза поликапролактона

Катионный механизм (Рис. 9) заключается в образовании активного катиона, который затем атакует атом кислорода карбоксильной группы мономера по реакции нуклеофильного бимолекулярного замещения:

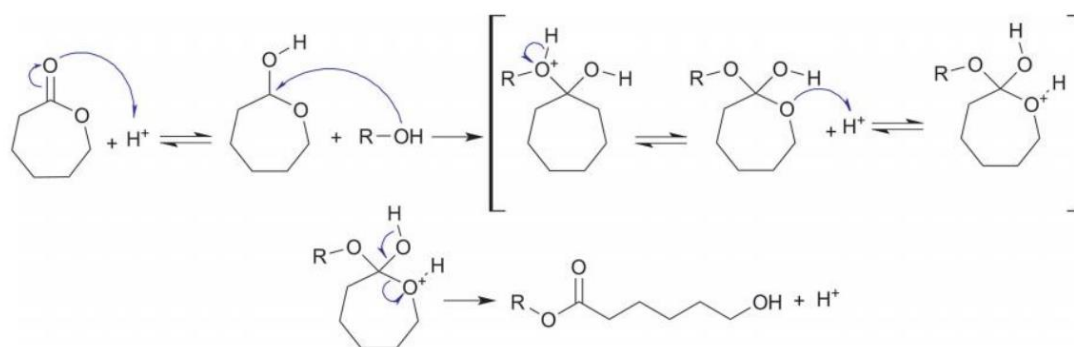


Рис. 9. Схема катионного механизма синтеза поликапролактона

Активация мономера (Рис. 10), предполагает активацию мономера с помощью катализатора и последующим присоединением активированного мономера к концу полимерной цепи.

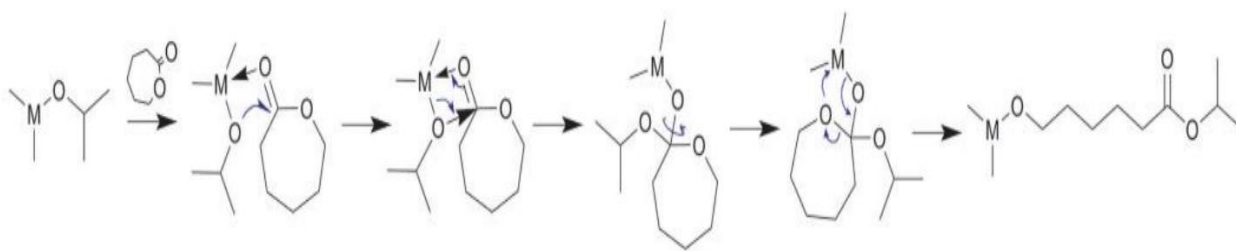


Рис. 10. Схема синтеза поликапролактона по механизму активации мономера

Координация-вставка (coordination-insertion mechanism) – наиболее распространенный вид полимеризации циклических эфиров и по существу является частным случаем анионного механизма. Авторы [191] предполагают, что процесс проходит через образование комплекса мономера и катализатора с последующим образованием связи металл-кислород между катализатором и молекулой мономера. В процессе полимеризации, благодаря присутствию катализатора может протекать реакция переэтерификации, которая бывает, как межмолекулярная, так и внутримолекулярная. Как правило, эти реакции начинаются на поздних стадиях реакции полимеризации в условиях высоких температур. Это приводит к росту индекса полидисперсности и потери контроля над процессом [192].

Молекулярная масса поликапролактона, индекс полидисперсности и наличие функциональных групп могут варьироваться в зависимости от способа проведения полимеризации [193]. Как правило, ПКЛ получают с молекулярной массой от 30 000 до 80 000 [194].

Синтез и использование катализаторов полимеризации по механизму координации-вставки, является наиболее перспективным ввиду того, что наиболее широко используется полимеризация лактида и ϵ -капролактона. Поэтому остановимся более подробно на катализаторах, используемых в данном процессе.

1.5 Катализаторы ROP-полимеризации лактида и ϵ -капролактона

Полиэфирсы могут быть синтезированы с использованием различных катализаторов. В обзоре [195] упоминаются более чем 100 катализаторов для синтеза полилактида и поликапролактона. Ключевыми параметрами при выборе катализатора являются скорость полимеризации, стереоконтроль желательными характеристиками являются низкая стоимость, распространенность, отсутствие цвета, запаха и низкая токсичность [196]. Поскольку, наиболее используемый механизм по которому происходит реакции полимеризации, является механизм coordination-insertion (координация-вставка) [197], рассмотрим более подробно каталитические системы, используемые для данного варианта.

Стандартный катализатор для синтеза высокомолекулярных полилактидов – октаноат олова [198-200]. Этот катализатор имеет ряд преимуществ, такие как, растворимость в органических растворителях и в расплаве с лактидом, стабильность при хранении, а также возможность проведения полимеризации при температурах до 180 °С.

Следует отметить, что несмотря, на то что октаноат олова был одобрен как катализатор для синтеза полиэфиров Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, в литературе встречаются противоречивые данные, свидетельствующие как о нетоксичности октаноата олова в каталитических количествах в получаемых полимерах, так и о нежелательности его использования ввиду его токсичности [201-203]. Поэтому видится перспективным разработка каталитических систем, которые являлись бы нетоксичными и как следствие не вызывали подобных споров.

Обширные исследования по полимеризации эфиров ведутся в направлении использования новых металлоорганических катализаторов [204,205]. В работе [206] обсуждается реакционная способности алкоксигрупп, при реакциях полимеризации. Было установлено, что алкоксиды металлов, такие как Al(O-

$iPr)_3$ и $Ti(O-iPr)_4$ способны к образованию структур, различающихся по реакционной способности. В последнее время активно исследуется использование органических соединений титана как катализаторов, поскольку они характеризуются нетоксичностью, в отличие от алкоксидов алюминия. Авторы [207] предполагают, что высокая каталитическая активность алкоксидов титана при полимеризации лактида обусловлена образованием комплексов схожих по структуре с полититаноксидом. Работа [208] показала возможность синтеза полилактида при использовании алкоксидов титана как катализаторов, полученный полимер характеризовался невысокой молекулярной массой ($35-40 \times 10^3$) и индексом полидисперсности (1.7-2.2). В работе [209] рассмотрена полимеризация лактида на хлор-замещенном изопроксиде титана. Молекулярная масса полилактида достигала ($85-90 \times 10^3$) при индексе полидисперсности (1.3 – 1.5), однако выход реакции составил всего (20-30%). Несмотря на ряд положительных свойств таких как высокая молекулярная масса и нетоксичность, катализаторы на основе алкоксидов титана активно гидролизуются при контакте с влагой, а образующийся при том TiO_2 не обладает каталитическими свойствами, поэтому перспективным видится, замена лигандов на атоме титана, обеспечивающих стабильность катализатора на воздухе.

Установлено, что титан-карбоксилатные комплексы более стабильны, чем алкоксиды титана [210]. Каталитическая активность карбоксилатов титана рассмотрена в работах [211,212]. Авторами был получен полилактид с молекулярной массой ($M_w = 55000-60000$), однако поскольку синтез проводили при относительно низкой температуре синтеза ($T = 90 \text{ C}$), скорость процесса была сравнительно низкой и составляла 48 часов. Введение ароматических заместителей в качестве лигандов повышает термическую стабильность катализатора, что важно с точки зрения их использования в условиях промышленной высокотемпературной полимеризации [213]. Таким образом значительный интерес вызывают, производные в которых атом титана

координирован на карбоксилатные группы, поскольку вследствие индуктивных эффектов (электроотрицательность), электронная плотность на атоме титана понижается. В результате увеличивается льюисовская кислотность атома титана [214]. Следовательно, мономеры ϵ -капролактон и D, L - лактид легче координируются на атом титана, сопровождающиеся иницированием полимеризации с раскрытием цикла.

С учетом результатов вышеупомянутых работ, крайне перспективным является получение эффективных каталитических систем на основе титана с лигандами производных салициловой кислоты, что должно обеспечивать термическую стабильность, и хорошие биологические свойства. Наряду с этим салициловая кислота является одной из коммерчески доступных органических кислот с ароматическими заместителями [215].

Таким образом, разработка новых коммерчески доступных и нетоксичных катализаторов на основе производных салициловой кислоты и алкоксидов титана, является перспективным направлением для получения полиэфиров – полилактида и поликапролактона.

1.6. Модификация хитозана по реакциям полимераналогичных превращений

Наличие в хитозане двух типов реакционноспособных групп позволяет проводить реакции полимераналогичных превращений как по аминогруппе, так и по гидроксильным группам. В настоящее время данный метод используют, как для прямой модификации с целью получить различные материалы в зависимости от необходимых свойств, так и использовать эти производные для защиты функциональных групп с целью направленной модификации. (рис.5) [216-220].

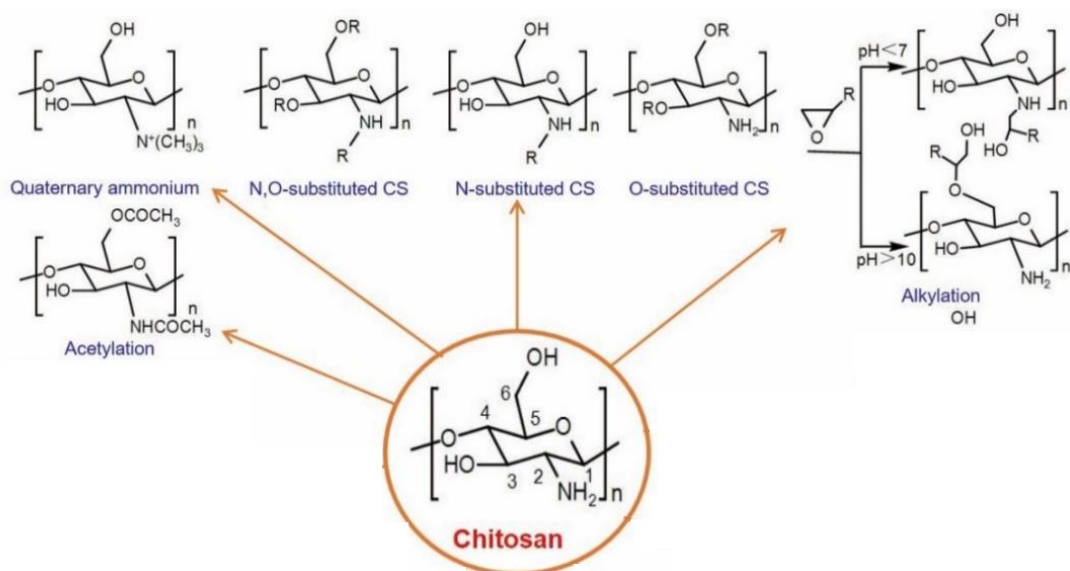


Рис. 11. Возможные пути модификации хитозана по реакциям полимераналогичных превращений.

Ряд новых биологически активных материалов был создан путём химической модификации хитозана. Эти продукты вызывают особый интерес, поскольку они сохраняют основные физико-химические и биологические свойства исходного полимера, но при этом приобретают новые свойства в зависимости от типа вводимых групп.

Остановимся более подробно, на модификации хитозана по аминогруппе, поскольку это позволяет проводить модификацию с большей степенью замещения, чем по гидроксильной группе [221]. Хитозан, благодаря наличию аминогрупп в своем составе, может вступать в реакцию с альдегидами, в результате чего образуются основания Шиффа [222]. Структура основания Шиффа представляет собой аналог карбонильного соединения, в котором группа (C=O) заменена имино- или азометиновой группой [223]. Образование оснований Шиффа в результате реакции аминогрупп хитозана с альдегидами, позволяет достаточно легко вводить алкильные или арильные фрагменты в макромолекулы хитозана, что повышает их механические свойства и может способствовать лучшей совместимости с синтетическими линейными полимерами.

Производные хитозана, модифицированные альдегидами, представляются перспективными ввиду ряда специфических свойств:

1. Биodeградируемость, которая обусловлена строением как хитозана, так и используемых альдегидов.
2. Биосовместимость, применение некоторых альдегидов в качестве модификаторов хитозана обусловлено тем, что эти материалы могут быть использованы в биомедицине.
3. Возможность регулировки гидрофильно-гидрофобного баланса. Хитозан — это гидрофильный полимер. При использовании альдегидов с объёмными заместителями в качестве модификаторов, то можно придать модифицированному хитозану гидрофобность. Это свойство важно при использовании подобных материалов в медицине, при условии прямого контакта материала с кровью и тканями организма.

1.7 Полимерные смеси на основе хитозана

Среди природных полимеров, хитозан занимает особое положение благодаря своей универсальности и пригодности для большого числа применений. По этой причине большое внимание в последние годы привлекло исследование смесей хитозана с синтетическими и природными полимерами [224-230].

Несмотря на то, что смеси полимеров - привлекательная альтернатива для сополимеров, при совмещении некоторых полимеров могут возникать сложности, поскольку иногда один из полимеров не является термопластичным, либо невозможно подобрать единый растворитель для двух полимеров. Существует три основных метода получения смесевых композиций:

- 1) растворение в растворителе с последующим выпариванием (смешивание растворов полимеров)
- 2) смешивание полимеров в условиях плавления (смешивание в расплаве)

3) смешивание полимеров в условиях высоких сдвиговых деформаций

Согласно литературным данным, смешивание растворов хитозана и других полимеров является наиболее применяемым методом получения смесей из-за его простоты. Метод получения смесей через смешивание в расплаве, ограничен тем, что хитозан не является термопластичным полимером и распределение полимеров в смеси будет неоднородным [231].

Свойства смесей хитозана, как и других полимерных смесей, зависят от совместимости его компонентов на макромолекулярном уровне, что обусловлено специфическими взаимодействиями между ними. Наиболее распространенными взаимодействиями в смесях полимеров с хитозаном являются: водородные связи, ионные и дипольные взаимодействия, взаимодействие с π -электронами и комплексы с переносом заряда [232].

Различные методы, такие как термический анализ [233], электронная микроскопия [234], вискозиметрические измерения [235] и динамические механические исследования [236], были использованы для исследования совместимости полимеров в растворе и в твердом состоянии.

Смеси хитозана с синтетическими водонерастворимыми полимерами представляют собой перспективные материалы, однако процесс их получения достаточно затруднителен. В настоящее время наиболее широко используемый способ совмещения хитозана с подобными полимерами, заключается в растворении синтетического полимера в хлороформе или дихлорметане с дальнейшим прибавлением к водному раствору хитозана [237], в результате образуется эмульсия, которая является неустойчивой и как следствие неудовлетворительные свойства получаемых материалов, а также невозможность ввести большие количества синтетического полимера.

1.8 Полимерные материалы медико-биологического назначения на основе биodeградируемых полиэфиров и хитозана

Получение материалов на основе хитозана с полиэфирами, как в виде сополимеров, так и в виде смесевых композиций остается актуальной проблемой, несмотря на большое количество имеющихся работ.

В работах [238-240] были получены сополимеры хитозана путем привитой сополимеризации с лактидом. Полученные проявляли цитосовместимость, обладали хорошими свойствами и являются перспективными для тканевой инженерии [239].

Авторами работы [241], были получены привитые сополимеры L-лактида с хитозаном в диметилсульфоксиде с использованием буюксида титана как катализатора. Прививка L-лактида позволяла придать хитозану гидрофобность, за счет боковых цепей, что позволяет использовать сополимер в качестве носителя гидрофобных лекарств и их контролируемого высвобождения.

Авторами [242] был получен привитой сополимер хитозана и L-лактида в диметилформамиде в атмосфере азота при $T = 80^{\circ}\text{C}$. Для этого синтезировали изоцианатный прекурсор полилактида, который взаимодействовал с аминогруппами хитозана образуя сополимер. Авторы подчеркивают, что этот способ удобен для объединения биологических функций хитозана с хорошими механическими свойствами синтетических биоразлагаемых полимеров. Несмотря на это, авторами не удалось достичь совместимости компонентов.

В последнее время наблюдается рост интереса к созданию сополимеров хитозана и лактида, которые получают с помощью твердофазного синтеза. Достоинствами метода отмечаются не только простота и эффективность используемого метода получения, но и отсутствие необходимости использования растворителей [243-246].

Авторами работы [243] получены привитые сополимеры хитозана с олиго (L- и D, L-лактидами) с использованием двухшнекового экструдера. Степень прививки варьировалась, в зависимости от условий проведения синтеза и используемого оптического изомера лактида. Важным явилось выявление зависимости прочностных характеристик привитых сополимеров от строения полилактида. Степень замещения аминогрупп хитозана и степень полимеризации привитых цепей олиголактида варьировали в пределах 1,9–4,1 и 3,0–9,7 соответственно. Сопolíмеры использовали для формования материалов для тканевой инженерии в виде частиц-микросфер и макропористых гидрогелей. В исследовании [244] твердотельный метод сополимеризации использовали для прививки до 160 мас. % D, L-лактида на цепи хитозана. Показано, что прививка протекала в результате ацетилирования аминогруппы хитозана, максимальная степень замещения составила 41%.

Наряду с синтезом сополимеров, ведутся работы по получению смесей на основе хитозана и полиэфиров [245-247], поскольку, как видно из работ выше, сополимеризация мономеров лактида и капролактона с хитозаном, достаточно затруднительна и требует значительный избыток мономеров. Особое внимание необходимо уделить тем работам, в которых удалось получить смеси, обладающие хорошими физико-механическими свойствами [245, 246].

В работе [245] получили смесевую композицию хитозан: ПЛА с весовыми соотношениями 1:1 при смешении гомополимеров в двухшнековом экструдере. Показано, что добавление хитозана приводило к снижению как величины прочности на растяжение, так и удлинения относительно исходного полилактида.

Авторы статьи [246] исследовали композиционные смесевые материалы ПЛА: хитозан с весовыми соотношениями от 10: 1 до 10: 4 соответственно, получали путем твердофазного смешения гомополимеров. Показана возможность

изменять скорость деградации композитов путем изменения соотношения компонентов. С увеличением массовой доли хитозана в композите скорость его разложения снижалась. Это обусловлено тем, что хитозан, являясь поликатионитом, способен связывать молочную кислоту, образующуюся при деградации ПЛА.

Смеси полимеров обычно получают либо смешением расплавов, либо растворов гомополимеров. Поскольку хитозан – не является термопластичным полимером и температура его плавления выше температуры разложения, способ получения смесевых композиций через расплав для них практически не реализуется и возможен только через смешение растворов гомополимеров. Для этого необходимо решить вопрос о совместимости этих двух полимеров и подборе соответствующих растворителей или единого растворителя.

В работе [247] на основе смесей хитозана и поли(L-лактида) были изготовлены пористые мембраны. Авторы показали, что для эффективного смешивания двух гомополимеров необходимо использовать несколько растворителей с учетом растворимости органических растворителей в воде. Было выявлено, что с увеличением доли хитозана прочность на растяжение и модуль Юнга пористых мембран снижаются (с 3.1 МПа до 2 МПа, для прочности на растяжение и с 90 до 37 МПа для модуля Юнга), а их удлинение при растяжении возрастало. (с 5.1 до 13%).

Авторы [248] получали биоразлагаемые композиции на основе смеси поли(L-лактида) и хитозана с различным соотношением компонентов. Поли(L-лактид) растворяли в диметилсульфоксиде, хитозан в смеси водного раствора уксусной кислоты и диметилсульфоксида и после перемешивания смеси осаждали холодным ацетоном. Авторами показано образование межмолекулярных водородных связей между двумя компонентами через взаимодействие карбонильных групп поли(L-лактида) и аминогрупп хитозана. Однако, данная работа вызывает много вопросов, так как поли-L-лактид

нерастворим в ДМСО, и кроме того, при добавлении воды полилактид будет высаживаться из растворителя. Методом ИК-спектроскопии доказано образование межмолекулярных водородных связей в смеси поли(L-лактид): хитозан и изучено их влияние на кристаллическую структуру.

В работах [249 - 251] были предприняты попытки разработки тройных систем на основе смесевых композиций хитозана и полилактида с третьим полимером в качестве компатибилизатора, для использования в качестве упаковочных материалов.

Авторы работы [249] получили смесевые композиции из эмульсий на основе водного раствора хитозана с ПЛА, в хлороформе с использованием полиэтиленгликоля в качестве компатибилизатора. Выявлено, что введение полиэтиленгликоля незначительно улучшало механические свойства пленок хитозана и ПЛА, увеличивая гибкость материалов. В то же время, авторы отмечают, что несмотря на хорошие биологические свойства, низкий уровень прочностных свойств, ввиду неоднородности пленок ограничивает их применение.

Авторы исследования [250] показали, что смеси хитозана и ПЛА с увеличением содержания последнего показывают уменьшение значения модуля Юнга, прочности на растяжение σ и увеличение удлинения при разрыве ϵ . В статье указано что, исходя из анализа теплофизических свойств, уменьшение значения модуля упругости при увеличении доли ПЛА, может быть следствием разделения фаз системы, следовательно, авторам не удалось совместить гомополимеры в смесевой композиции.

В работе [251] представлен способ совмещения хитозана и ПЛА с целью получения смесевых, через совмещение их растворов в условиях высоких сдвиговых напряжений в течение 60 секунд с образованием устойчивой эмульсии. Поливиниловый спирт (ПВС) использовали в качестве компатибилизатора для стабилизации эмульсии. Раствор хитозана в 1 %

CH_3COOH и ПВС в воде смешивали с раствором ПЛА в хлороформе. Прочность на разрыв для пленок из чистых хитозана, ПВС и ПЛА составляют ~ 28 , ~ 17 и 18 МПа, соответственно. Для бинарных смесей ПВС: ПЛА и хитозан: ПЛА исследование механических свойств не было проведено, ввиду несовместимости компонентов. Для тройных смесей хитозан: ПВС: ПЛА при соотношении компонентов 1: 2: 2, 6: 1: 1, 1: 6: 1 по массе величина прочности на разрыв составляет 16.0, 20.5 и 11.0 МПа, соответственно. Анализируя данные сканирующей электронной микроскопии, авторы расположили смеси хитозан: ПВС: ПЛА от наименее до наиболее совместимых в порядке 1: 2: 6 < 6: 1: 1 < 1: 2: 2 < 1: 6: 1, что согласуется с данными ДСК и ИК-спектроскопии. Эти результаты подтверждают необходимость использования поливинилового спирта, который обеспечивает не только стабилизацию эмульсии, но и компатибилизацию полилактида и хитозана в смеси.

Авторы работы [252] предложили метод, в котором совместимость между хитозаном и полилактидом была достигнута посредством химических реакций между функциональными группами хитозана (-ОН и $-\text{NH}_2$) и ПЛА (-ОН и $-\text{COOH}$) с образованием компатибилизатора *in situ*. В процессе смешивания в систему добавляли метилендифенилдиизоцианат (МФИ).

Показано, что смеси, полученные с компатибилизатором, более гомогенны и с меньшим размером частиц ПЛА, включенных в матрицу хитозана по сравнению со смесями хитозана с ПЛА без МФИ. Выявлено, что добавление изоцианата отражается на физико-механических свойствах композиций хитозана с ПЛА. Прочность на разрыв смеси хитозан: ПЛА с МФИ выше, чем в смесях без изоцианата, независимо от количества ПЛА. Авторами отмечено, что совместимые с изоцианатом смеси хитозан: ПЛА имеют более высокое значение модуля Юнга, чем несовместимые. Способ, представленный в этой работе, дает возможность при использовании изоцианата, повысить совместимость гомополимеров и получить смеси хитозана с ПЛА, обладающие водостойкостью и хорошими механическими свойствами.

В работе [252] в качестве решения задачи совмещения хитозана и полиэфиров предложено использование единого растворителя, с последующим формированием однородных материалов из него. В качестве растворителя использовался гексафторизопропанол, полученные пленки обладали большей гидрофильностью и лучшей однородностью, по сравнению с пленками полученными из эмульсии хитозана и полиэфиров, однако использование, такого токсичного и коммерчески дорогого растворителя, как гексафторизопропанол, значительно ограничивает применимость данных материалов.

В заключение следует сказать, что с одной стороны имеется широкий спектр работ, посвященных созданию композиции на основе хитозана и полиэфиров, однако продолжающийся рост публикаций по данной теме, а также проблемы совмещения данных полимеров свидетельствуют об актуальности исследования по получению композиций на основе хитозана и полиэфиров, однородных по структуре.

Решение этой задачи может обеспечить получение однородного материала, с хорошими механическими и биологическими свойствами, а также обладающего термопластичностью, что позволит формировать изделия из него.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1. Используемые вещества и их характеристики

В работе использовали хитозан (ЗАО «Биопрогресс», Россия) с $MM = 2.5 \times 10^5$ и $CD = 82 \%$ без дополнительной очистки. Массовая доля минеральных веществ в хитозане не превышала 0.1% . влаги – 6% , нерастворимых веществ – 0.1% . Для приготовления растворов хитозана использовали уксусную кислоту «х.ч.» ГОСТ 61-75 (99.5% , плотность 1.049 г/см^3), соляную кислоту «х.ч.» (ООО «Химреактив»), молочную кислоту «х.ч.» (ООО «Азур», содержание основного вещества 80%), салициловую кислоту «х.ч.» (ООО «Химреактив»).

В качестве растворителей для хитозана использовали, либо дистиллированную воду, либо диметилсульфоксид (ДМСО) «х.ч.» (ООО «Химреактив»).

Основания Шиффа на основе хитозана были получены по реакции взаимодействия с энантиковым альдегидом («Sigma-Aldrich»)

Синтез салицилата титана, как катализатора для полимеризации полиэфиров проводили, используя следующие вещества изопророксид титана («Acros Organics»), изопропиловый спирт, салициловая кислота («Химреактив»). Для синтеза полилактида и поликапролактона использовали D, L – лактид и ϵ – капролактон, («Новохим»).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Определение молекулярной массы и степени деацетилирования хитозана

MM хитозана определяли методами вискозиметрии и гель-проникающей хроматографии

Вискозиметрический метод.

ММ хитозана определяли вискозиметрическим методом на вискозиметре Уббеллоде при температуре 25°C. Навеску хитозана 0.1 г растворяли в 30 мл раствора уксусной кислоты с концентрацией 0.33 моль/л в дистиллированной воде. Для подавления полиэлектролитного эффекта в раствор хитозана предварительно вводили хлорид натрия (концентрация соли в растворе составляла 0.3 моль/л). Расчет средневязкостной ММ проводили по уравнению Марка-Куна-Хаувинка $[\eta] = 3.41 \times 10^{-5} M^{1.02}$ [47].

Метод гель-проникающей хроматографии.

ММ хитозана определяли, используя его растворы в уксусной кислоте. Хроматографический анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы Shimadzu CTO20A/20AC (Япония) с программным модулем LC-Solutions-GPC с применением колонки Tosoh Bioscience TSKgelG3000SWx1 с диаметром пор 5 мкм, детектор - низкотемпературный светорассеивающий детектор ELSD-LT II. Раствор уксусной кислоты с концентрацией 0.5 М использовали в качестве элюентом. Скорость потока 0.8 мл/мин. Калибровку выполняли, используя узкодисперсные образцы декстрана в диапазоне ММ от 1000 до 410000 Да (Fluca).

Определение степени деацетилирования

Степень деацетилирования хитозана определяли методом потенциометрического титрования с использованием рН-метра Mettler Toledo LE902. На аналитических весах с точностью до 0.001 г взвешивали определенное количество хитозана и растворяли в 0.1 М растворе HCl, заранее приготовленного из фиксанала. Раствор титровали 0.1 М NaOH при постоянном перемешивании. На основании полученных результатов строили график зависимости рН раствора от объёма титранта (NaOH). Кривая

потенциометрического титрования раствора хитозана имеет два перегиба, первый перегиб кривой соответствует $V_1(\text{NaOH})$, пошедшему на титрование избыточного количества HCl , несвязанной с аминогруппами хитозана, а второй - $V_2(\text{NaOH})$ – на титрование HCl , связанной с аминогруппами хитозана.

$$\text{СД} = (v_{\text{прак}}/v_{\text{теор}}) \times 100 \%,$$

$$v_{\text{прак}} = \Delta V \times C \times 10^{-3},$$

$$v_{\text{теор}} = m / \text{ММ}$$

где $\Delta V = V_2(\text{NaOH}) - V_1(\text{NaOH})$, мл, соответствует нейтрализации аминогрупп хитозана, C – концентрация NaOH , моль/л, m – навеска хитозана, г; ММ звена глюкозамина = 161 г/моль.

2.2.2. Получение пористых образцов на основе хитозана

Хитозан (3 мас. %) растворяли в водных растворах кислот с $\text{pH} = 5 - 5.5$. После полного растворения полимера, образцы центрифугируют для удаления пузырьков воздуха, после чего при перемешивании добавляют вспениватель. Трехмерный пористый матрикс образуется за счет порообразования с одновременным переходом хитозана из солевой формы в основную. В качестве вспенивателя используют гидрокарбонат натрия, калия или аммония от 75 до 150% от массы сухого хитозана.

Влагопоглощающая способность губки проверяли по поглощению ей физиологического раствора (0,9% раствор NaCl). Для визуализации процесса раствор окрашивали бриллиантовым зеленым. Губку погружали в раствор на 5 мм. Степень набухания губки рассчитывали по формуле:

$$\Delta W = \frac{m(w) - m(d)}{m(d)} \times 100\%$$

Где $m(w)$ – масса набухшей губки

$m(d)$ – масса сухой губки

2.2.3. Модификация хитозана энантовым альдегидом

Приготовили 3 мас. % раствор хитозана в 1.2 мас. % водном растворе уксусной кислоты, энантовый альдегид растворяли в спирте в объемном соотношении 1:1, после чего по каплям вводили расчетное количество (от 1 до 10 мас. % от хитозана) альдегида в раствор хитозана при постоянном перемешивании, реакцию проводили в течение 1 часа при температуре 50°C. После завершения реакции высаживали продукт ацетоном, сушили до постоянной массы и взвешивали. Выход реакции определяли весовым методом.

Однородность растворов контролировали спектрофотометрическим методом. Спектры в видимой и УФ-областях регистрировали с помощью спектрофотометра UV-1650 («Shimadzu»).

2.2.4 Синтез салицилата титана

Тетраизопропоксид титана (5.3 г, 18.1 ммоль) растворяли в диметилсульфоксиде (100 мл), после чего, при комнатной температуре при постоянном перемешивании прибавляли салициловую кислоту (5 г, 36.2 ммоль). Получаемый продукт желто-оранжевого цвета сушили от растворителя до постоянной массы.

2.2.5 MALDI масс-спектроскопия

Анализ соединения титана методом времяпролетной масс-спектрометрии с источником МАЛДИ проводили в линейном режиме на приборе «Bruker MicroflexLT», снабженном азотным лазером (длина волны 337.1 нм), используя DCTB в качестве матрицы.

2.2.6 ЯМР-спектроскопия

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали в DMSO- d_6 , D_2O , CDCl_3 на спектрометре Bruker ARX 200 на рабочих частотах 200 и 50 МГц соответственно. Химические сдвиги приведены относительно Me_4Si .

2.2.7. Синтез полилактида и поли- ε-капролактона

Полимеризацию в массе лактида или ε-капролактона проводили в присутствии салицилата титана, как катализатора и бензилового спирта (0.1 мол. % от мономера), как соинициатора, при мольном соотношении [катализатор] : [мономер] от 1:50 до 1:200 при температуре 120 °С, в течение 24 часов, при постоянном перемешивании.

2.2.8. Определение молекулярной массы полиэфиров

Анализ молекулярно-массовых характеристик полимеров проводили на геле-проникающем хроматографе Shimadzu с колонками, наполненными полистирольным гелем с размером пор 1×10^5 и 1×10^4 Å. Полиэфиры растворяли в тетрагидрофуране, элюентом использовали тетрагидрофуран. В качестве детектора использовали дифференциальный рефрактометр. Хроматограммы обрабатывали с помощью программного обеспечения LCsolution. Для калибровки применяли узкодисперсные стандарты полистирола.

2.2.9. Получение ДМСО-растворимого хитозана и смесевых композиций на его основе

Хитозан 1.5 мас. % растворяли в 1.5 мас. % растворе салициловой кислоты в ДМСО. Растворение проводили в течение 24 часов при комнатной температуре. После получения гомогенного прозрачного раствора, к нему добавляли соответствующие количества полилактида или/и поликапролактона и перемешивали смесь до полного растворения, при температуре 50°С.

2.2.10 Получение пленок

Пленки получали на машине Xiamen TMAX-TMH путем полива раствора на лавсановую подложку, предварительно растворы центрифугировали для удаления пузырьков воздуха. Пленки сушили в условиях равномерного испарения при температуре 50°С и атмосферном давлении до постоянной

массы. Для перевода хитозана из солевой формы в основную пленки, имеющие в своем составе хитозан погружали на 30 минут в 10% водно-спиртовой (50 - 50 об. %) раствор NaOH, после чего промывали дистиллированной водой до нейтральных значений pH. Затем пленки в вакуумном шкафу до постоянных значений массы.

Физико-механические характеристики образцов в виде пленок определяли на универсальной разрывной машине «Zwick/Roell Z005» (Германия) Испытания проводили при скорости растяжения 10 мм/мин на образцах толщиной 60 ± 5 мкм в виде прямоугольников шириной 15 мм. Для каждого состава пленок измеряли не менее 10 образцов.

2.2.11. Исследование структуры образцов

Рентгенофазовый анализ образцов выполняли на рентгеновском дифрактометре «Bruker D8 Discover», с использованием $\text{CuK}\alpha$ излучения. Пленки измельчали и помещали в кювету из плавленого кварца. Регистрацию дифрактограмм проводили для углового диапазона $10\text{-}60^\circ$ по углу дифракции 2θ в симметричной геометрии со щелью 0.6 мм на первичном пучке и линейным позиционно-чувствительным детектором LynxEye. Эксперименты выполнены в Институте физики микроструктур РАН к.ф.-м.н. Юниным П.А.

Исследования микроструктуры образцов проводили на растровом электронном микроскопе JEOL JSM-IT300LV при высоком вакууме в режиме регистрации вторичных электронов при ускоряющем напряжении 20 кВ. Эксперименты выполнены к.х.н. Фукиной Д.Г.

Пористость, размер и распределение пор образцов определяли, используя ртутный интрузионный порометр Pascal 140 and 440 (ThermoFisherScientific, Rodano, Italy). Использование уникального ультрамакропористого дилатометра делает возможным анализ пор в размере от 3.6 нм до 1200 мкм. Для измерений, образцы нарезались на маленькие части (100-200 мг).

Эксперименты выполнены в Институте металлоорганической химии РАН к.х.н. Ковылиным Р.С.

2.2.12. Изучение смачиваемости

Исследование смачиваемости образцов изучали по изменению краевого угла смачивания их поверхности водой с помощью цифрового USB-микроскопа Levenhuk DTX 30 (увеличение в 200 раз). Образцы помещали на ровную поверхность, а на поверхность плёнки наносили каплю воды объёмом 1 мкл. Определяли размеры капли: высоту (h) и диаметр основания (d). Значение косинуса краевого угла смачивания (θ) рассчитывали по формуле:

$$\cos \theta = \frac{(d/2)^2 - h^2}{(d/2)^2 + h^2}$$

2.2.13. Исследование теплофизических свойств композиций

Теплофизические свойства образцов в области температур 0–350°C изучали с использованием дифференциального сканирующего калориметра DSC 204 F1 Phoenix (NETZSCH Gerätebau, Германия). Измерения проводили в атмосфере аргона при скорости нагревания 5°C/мин. Поверку надежности работы калориметра осуществляли посредством стандартных калибровочных экспериментов по определению термодинамических характеристик плавления. В соответствии с NETZSCH Proteus Software, используемая аппаратура и методика ТГ-измерений позволяет зафиксировать изменение массы образцов до ± 0.1 мкг. Методика проведения ТГ-анализа стандартная, согласно Netzsch Software Proteus.

2.2.14. Исследование клеточной адгезии

Были исследованы адгезия и цитотоксичность на поверхности пленок при культивировании фибробластов человека клеточной линии hTERT BJ-5ta. Пленки материала, после стерилизации автоклавированием при температуре 110 °C, помещали в лунки планшета для культивирования клеток и заполняли

500 мкл среды DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium). Клетки высевали на поверхность пленки с плотностью $1.6 \times 10^5/\text{см}^2$ и культивировали в течение 24 часов. Визуализацию клеток и оценку их жизнеспособности оценивали методом люминесцентной микроскопии. В качестве красителя для окрашивания фибробластов использовали 2×10^{-4} мас. % раствор акридина оранжевого в фосфатном буфере. Этот краситель путем интеркаляции или электростатического притяжения избирательно взаимодействует с ДНК и РНК, расположенными в ядре и митохондриях клетки, соответственно. Это позволяет оценить общее состояние клеток - активность, пролиферацию и апоптоз. Микросэмплирование пленок проводили на инверторном микроскопе Olympus IX71 (Япония / Германия) с использованием «зеленого» фильтра (эмиссия 510–555 нм, возбуждение 460 – 495 нм), что позволяет визуализировать зеленый цвет ядра живых клеток

2.2.15. Оценка цитотоксичности – МТТ-тест

В качестве тестовой культуры для исследования использовали охарактеризованную культуру фибробластов дермы человека (ДФЧ), полученную в лаборатории биотехнологий ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России. Источником для выделения клеток были биоптаты утильной кожи здоровых пациентов, полученные во время косметических операций в операционной отделения реконструктивной хирургии Университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России. Каждый пациент, предоставивший материал для исследования, представил добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Для тестирования использовали культуру 4 пассажа. Перед вводом в эксперимент клетки культуры представляли собой конфлюэнтный монослой, сформированный клетками преимущественно веретеновидной формы с выраженными отростками, плотными ядрами. Жизнеспособность клеток

составляла 98%. Фенотип клеток был типичен для клеток мезенхимального ряда: CD90+, CD105+, CD73+, CD 10+, CD 34-, CD 45-, CD14-, CD HLA-DR-.

Первоначально оценивали уровень цитотоксичности пленок, сформированных на основе тройной системы (хитозан-поликапролактон-полилактид). Для оценки цитотоксичности использовали стандартный МТТ-тест. Для получения экстрактов испытываемые образцы заливали средой DMEM с добавлением 2%-ной эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина и 1% антибиотиков (пенициллина-стрептомицин) и помещали в инкубатор на 1 сутки и на 7 суток при стандартных условиях (37°C, 5% CO₂, увлажненная атмосфера). Клетки тестовой культуры засеивали в лунки плоскодонного 96 луночного планшета в количестве 10x10³ кл/см² и культивировали в стандартных условиях в течение 24 часов. Через 24 часа ростовую среду над клетками заменяли 1-суточным и/или 7-суточным экстрактом испытываемых образцов в нескольких разведениях (0:1 – контроль; 1:0; 1:1; 1:2; 1:3 и 1:4 – экстракт : ростовая среда, соответственно) и культивировали ещё 72 часа при стандартных условиях. Затем, в каждую лунку планшета добавляли рабочий раствор МТТ (5 мг/мл), и после 3 часов инкубации среду с МТТ полностью заменяли на ДМСО. Через 30 минут регистрировали оптическую плотность (ОП) на планшетном ридере TECAN (Sanraais, Austria) при длине волны 540 нм. Интенсивность роста клеток (ОИР) определяли по следующей формуле:

$$\text{ОИР (\%)} = \frac{\text{средняя ОП в тестовой культуре}}{\text{средняя ОП в контроле}} \times 100$$

Далее оценивали цитотоксичность материала на основе ранговой шкалы, представленной в таблице 1

Таблица 1. Ранговая шкала оценки цитотоксичности.

Относительная интенсивность роста (ОИР,%)	Уровень (ранг) цитотоксичности
100	0
75 – 99	1

50 – 74	2
25 – 49	3
1 – 24	4
0	5

Ранги 0 и 1 свидетельствуют об отсутствии цитотоксичности, а ранги 2, 3, 4 и 5 соответствуют различным уровням цитотоксичности

Оценка взаимодействия клеток с тестируемым материалом при культивировании клеток на поверхности пленок.

Для исследования образцы тестируемого материала помещали в лунки плоскодонного 24-луночного планшета, а на их поверхность высевали тестовую культуру с плотностью 2×10^4 клеток/см² и культивировали в стандартных условиях. Для каждого срока исследования брали по 3 образца исследуемого материала. В качестве контроля использовали клетки той же культуры, культивируемые на пластике. Через 1, 3 и 7 суток клетки на поверхности образцов и клетки в контрольных лунках окрашивали флуоресцентными красителями. Для визуализации ядер использовали флуорохром Hoechst 3334 (BD Pharmingen™), отличающийся специфичностью к двухцепочечной молекуле ДНК (максимумы возбуждения/эмиссии 377/447 нм). Для маркировки погибших клеток использовали TO-PRO™3 Ready Flow™ (Invitrogen, USA), специфически окрашивающий только ядра мертвых клеток (максимумы возбуждения/эмиссии 642/661 нм). Визуализацию и видеоархивирование проводили на цифровом имиджере Cytation™5 (Biotec, USA). С каждого образца делали не менее 10 микрофотографий. Используя полученные микрофотографии, проводили количественный анализ с подсчетом общего количества ядер клеток, количества ядер мертвых клеток и последующим их пересчетом на 1мм².

2.2.16. Исследование биосовместимости и биоразлагаемости композиций

Работа по исследованию биосовместимости и биоразлагаемости была проведена на белых нелинейных крысах-самках трехмесячного возраста массой 150-200 г. Полученные образцы были имплантированы экспериментальным животным в межлопаточную область спины. Все работы проводились на наркотизированных животных.

Все процедуры на лабораторных животных осуществлялись в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986); Международными рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1993); Правила лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003) и Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (МЗ №755 от 12.03.1977).

У всех животных проводился отбор крови для анализа на развитие воспалительных и аллергических процессов. Оценку функционального состояния организма

Кровь для анализов забирали на 7, 14, 21 сутки после введения имплантата. В крови определяли количество лейкоцитов, эритроцитов и гемоглобина при помощи гематологического анализатора Abacus Junior 30(Diatron, Австрия). На мазках крови, окрашенных по общепринятому методу Романовского-Гимзе определяли процентное содержание лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов. Увеличение количества лимфоцитов наблюдается при острых инфекциях, уменьшение при стрессе. Увеличение количества нейтрофилов связано с воспалением и стрессом, снижение с септическими состояниями. Увеличение моноцитов наблюдается при хронических инфекциях и воспалительных процессах. Увеличение эозинофилов наблюдается при аллергии.

Биосовместимость оценивали по отсутствию или наличию фиброзной капсулы вокруг имплантата.

Биорезорбируемость оценивалась по уменьшению массы введенного имплантата спустя 1, 2 и 3 недели после введения.

Результаты исследований статистически обрабатывали с помощью программы BIOSTAT. Независимые выборки сравнивали с помощью однофакторного анализа, t-критерия Стьюдента и непараметрического критерия Крускала-Уоллиса. При расчете t-критерия Стьюдента применяли поправку Бонферрони, позволяющую установить ошибку первого рода, возникающую при сравнении более чем двух выборок данным методом.

3. Результаты и обсуждение

Синтезированы биоразлагаемые и биосовместимые материалы в виде пленок и трехмерных пористых образцов на основе хитозана, его производных и смесевых композиций с синтетическими полиэфирами.

3.1. Получение трехмерных пористых образцов на основе хитозана

Получение на основе хитозана пористых образцов трехмерной структуры для применения в регенеративной медицине, перспективно ввиду ряда его положительных свойств для использования в этой сфере, при этом приходится решать проблемы, связанные с низкой прочностью и сложностью формования изделий из него. Наряду с этим, для успешного применения пористого материала для регенерации поврежденной ткани, необходимо не только само наличие пор, но также степень пористости и диаметр пор. Известно, что возможность получения необходимой микроструктуры является чрезвычайно важным аспектом, поскольку для роста клеток ткани диаметр пор лежат в пределах от 50 до 300 мкм, а их структура должна быть открытой, чтобы клетки могли проникать внутрь материала и успешно пролиферировать внутри него для обеспечения успешной регенерации.

Как правило, получение изделий из хитозана, происходит из его водно-кислотных растворов, что сопровождается переводом хитозана в солевую форму. Одноименно заряженные протонированные аминогруппы хитозана, затрудняют образование трехмерной структуры. Эта проблема может решаться или использованием сшивающих агентов или переводом хитозана в основную форму. В последнем случае образование большого количества внутри- и межмолекулярных водородных связей, приводит к формированию прочного трехмерного каркаса, без использования сшивающих агентов и устойчивого при $pH > 5.5$.

Этот подход был использован в работах по получению трехмерных пористых структур на основе хитозана, методом лиофильной сушки и методом использования сверхкритического диоксида углерода. Более широко используемым из них, является метод лиофильной сушки, требующий двукратного проведения лиофилизации. Сначала лиофилизируют раствор хитозана, после чего образец погружают в раствор щелочи, промывают водой и повторно лиофилизируют. Данный метод позволяет получить пористые структуры на основе хитозана, для применения в биомедицине. Однако такой метод не только энергозатратен и требует специального оборудования, но и требует достаточно много времени на получение образца, поскольку процесс лиофилизации занимает более 24 часов, следовательно, для получения готовой пористой структуры на основе хитозана, необходимо потратить более 48 часов. В последнее время развивается также направление по получению трехмерных пористых структур на основе хитозана в сверхкритическом CO_2 , однако данный метод требует специального оборудования и высоких давлений, что затрудняет использование в практике, а также перевода полисахарида, как и в первом случае, из солевой формы в основную форму.

В работе представлен одностадийный метод получения трехмерной пористой структуры из растворов хитозана в диапазоне рН 4.5-5.5 и в интервале температур от 15 до 30 °С, добавлением гидрокарбонатов щелочных металлов или аммония.

При добавлении к раствору хитозана соответствующего гидрокарбоната, происходит реакция, приводящая к переводу хитозана в основную форму и одновременному выделению углекислого газа как порообразователя, в результате чего образуется прочная трехмерная пористая структура(рис.12).

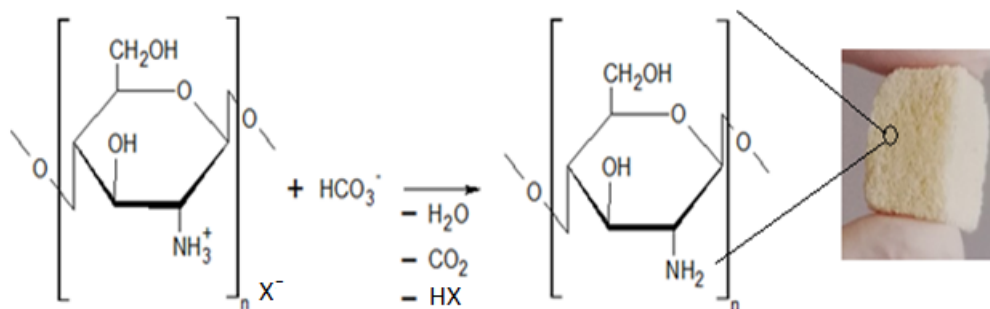


Рис. 12. Схема реакции взаимодействия солевой формы хитозана с гидрокарбонатом

Для получения трехмерных пористых структур по разработанному методу, хитозан (от 1 до 4 мас. %) растворяют в разбавленном растворе органической или неорганической кислоты ($\text{pH} = 4.5-5.5$) при комнатной температуре, при постоянном перемешивании. Полученный раствор центрифугируют в течение 5 минут при 8000 об/мин для удаления пузырьков воздуха, после чего к раствору прибавляют гидрокарбонат в мольном соотношении 1:1 относительно количества кислоты, в которой растворен хитозан, и активно перемешивают в течение 7-10 секунд. Полученную вспененную композицию обрабатывают водно-этанольной смесью (1:1 по объему) от образовавшихся солей и сушат в вакуумном шкафу при $t = 30\text{ }^\circ\text{C}$, либо лиофилизируют при $t = -70\text{ }^\circ\text{C}$ до постоянной массы.

Данный метод может составить конкуренцию методу, основанному на использовании для формирования пор сверхкритического диоксида углерода.

На рисунке 13 представлены микрофотографии пористых образцов, полученных из растворов хитозана в различных кислотах. Из представленных фотографий видно, что при использовании во всех случаях, хитозана с идентичными параметрами (молекулярная масса и степень ацетилирования), как природа кислоты, так и гидрокарбоната, влияют на структурные параметры образующейся трехмерной губки, такие как степень пористости и средний диаметр пор. Наиболее крупный размер пор характерен для ацетата

хитозана (рис. 13а) с диаметром от 70 до 300 мкм, диаметр пор для хлорида хитозана (рис. 13б) он составлял от 50 до 200 мкм, а для лактата хитозана (рис. 13с) от 30 до 250 мкм. Структура пор в полученных образцах является открытой, что вместе с результатами, представленными ниже, определяет перспективность использования материала, как полимерной составляющей скаффолдов для регенерации поврежденных тканей, так и для кровоостанавливающих губок.

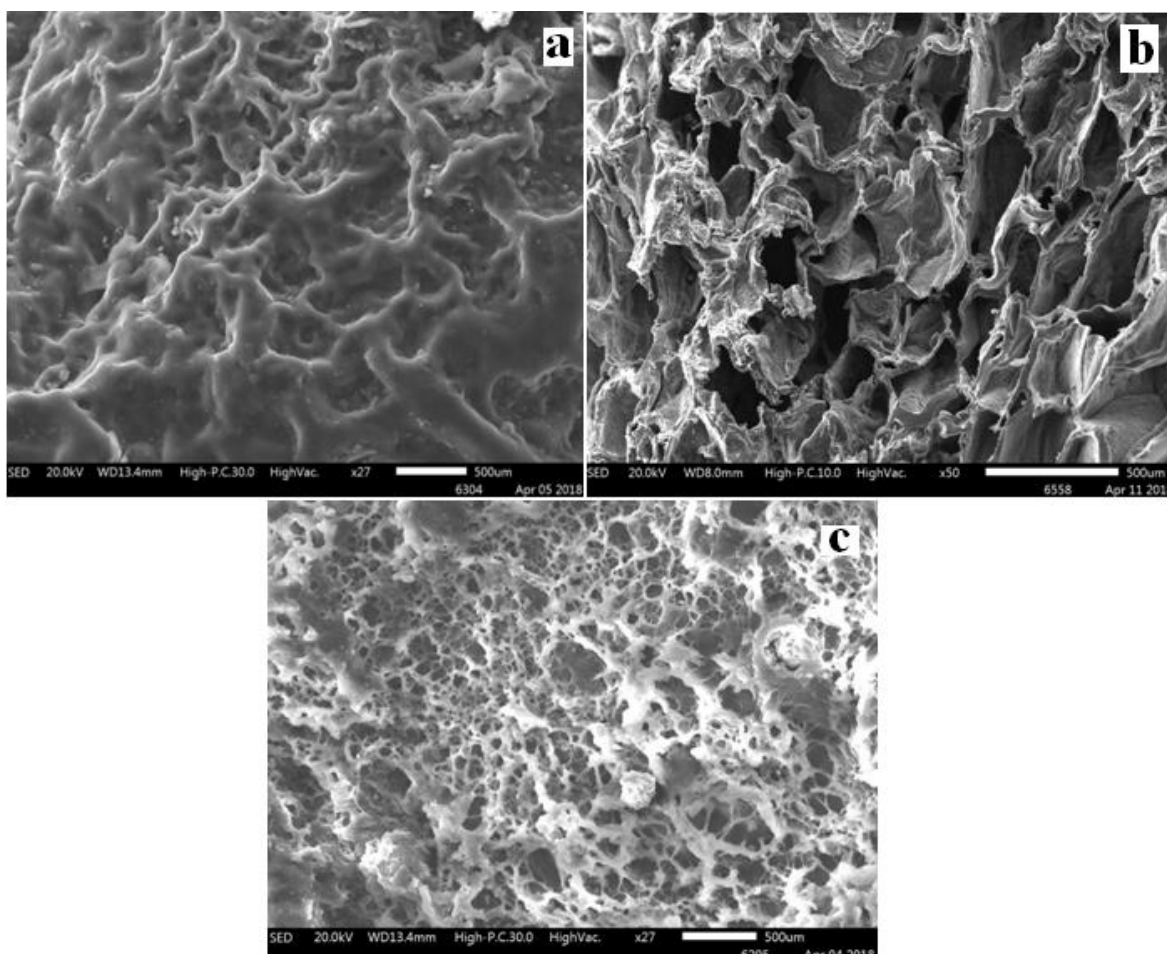


Рис. 13. Микрофотографии губок из а – из ацетата хитозана; б – хлорида хитозана; с – лактата хитозана.

Количественные данные по пористости образцов трехмерной структуры были получены методом ртутной интрузионной порометрии (рис.14). Установлено, что наряду с природой кислоты, на структуру материала оказывает влияние природа гидрокарбонатов. При использовании гидрокарбоната натрия как

вспенивателя получены наиболее узкие кривые распределения пор по размерам в материале (рис. 14а), пористость 85,2 %, объем пор 3,8 см³/г. При использовании гидрокарбоната аммония (рис. 14б), пористость составила 86,2%, объем пор 3,9 см³/г. При использовании гидрокарбоната калия (рис. 15в), пористость составила 85,7%, объем пор 3,7 см³/г.

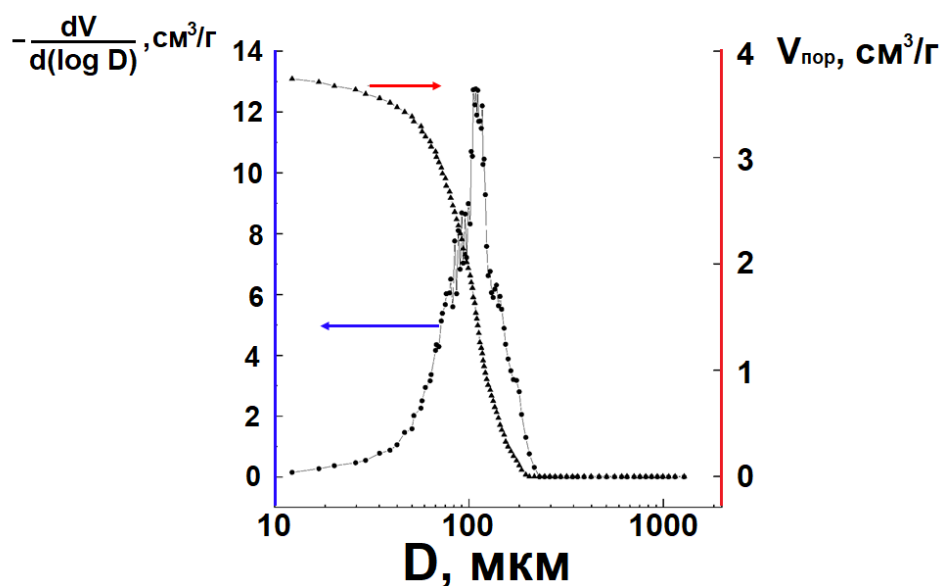


Рис.14. (а) Кривые инфузий для образца, полученного при взаимодействии гидрокарбоната натрия и хитозана.

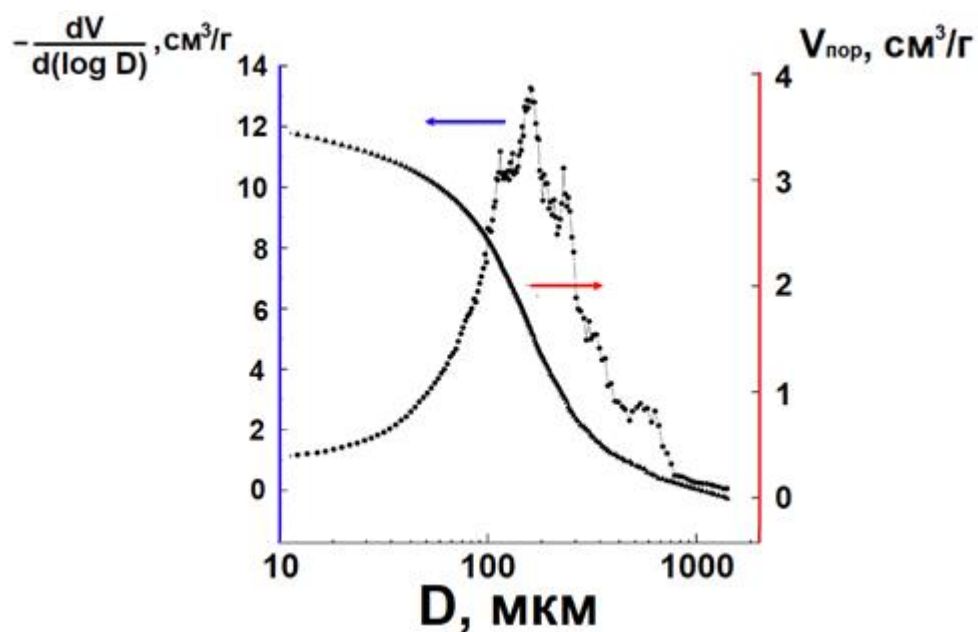


Рис.14. (б) Кривые инфузий для образца, полученного при взаимодействии гидрокарбоната калия и хитозана.

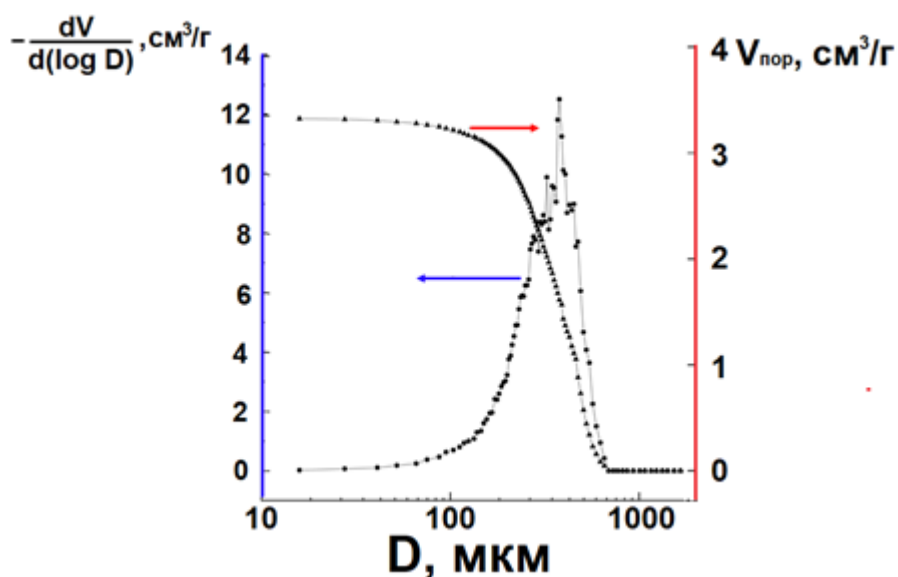


Рис.14. (в) Кривые инфузий для образца, полученного при взаимодействии гидрокарбоната аммония и хитозана.

Совокупность полученных результатов по исследованию структуры образцов, показывает, что предлагаемый одностадийный метод получения трехмерных пористых хитозановых матриц, позволяет получать трехмерные пористые структуры, которые схожи по структурным свойствам с пористыми

структурами, полученными методом лиофилизации. Существенно, что варьирование кислоты для растворения хитозана и гидрокарбоната, определяет возможность создания пористых материалов на основе хитозана, с необходимым размером пор по данному методу.

Пористость образцов, представленных выше сопоставима с результатами из литературы для хитозановых трехмерных пористых структур, полученных методом лиофилизации.

Для сопоставления других свойств, в работе были получены образцы методом лиофилизации из раствора ацетата хитозана, в соответствии с методикой, описанной в литературе [83]. Результаты по исследованию влагопоглощения и прочности на сжатие представлены в таблице 2.

Таблица 2. Степень влагопоглощения и прочность пористых образцов на основе хитозана

Название композиции	Влагопоглощение(%)	Прочность на сжатие, МПа
Ацетат хитозана + NaHCO ₃	217.3±1.4	0.85 ± 0.04
Хлорид хитозана + NaHCO ₃	211.5±6.8	0.79 ± 0.08
Лактат хитозана + NaHCO ₃	213.2±10.3	0.83 ± 0.13
Ацетат хитозана + KHCO ₃	208.6±7.2	0.85 ± 0.11
Ацетат хитозана	216.4±8.7	0.84 ± 0.09

+ NH ₄ HCO ₃		
Лиофилизированный хитозан	210.4±5.6	0.85 ± 0.10

Как видно из таблицы, значения влагопоглощения и прочности образцов, полученных по предложенному методу и путем лиофилизации сопоставимы.

Медико-биологическая направленность работы определяет необходимость исследования биосовместимости и биоразлагаемости полученных образцов.

Исследования были выполнены на экспериментальных животных на базе ИББМ ННГУ совместно с группой профессора д.б.н. А.С. Корягина

Биоразлагаемость оценивали по изменению массы образцов (табл.3).
Материал имплантировали в межлопаточную область спины крыс и наблюдали уменьшение массы через 1, 2 и 3 недели соответственно

Таблица 3. Изменение массы образцов в опытах *in vivo*

Состав композиции	Масса образца (г)	Через 1 неделю (г)	Через 2 недели (г)	Через 3 недели (г)
Ацетат хитозана + NaHCO ₃	5.061	4.289	3.561	2.748
Хлорид хитозана + NaHCO ₃	4.983	4.223	3.493	2.531
Лактат хитозана + NaHCO ₃	5.011	4.237	3.531	2.562
Ацетат хитозана + KHCO ₃	5.029	4.262	3.428	2.571
Ацетат хитозана + NH ₄ HCO ₃	5.034	4.267	3.437	2.568

Из результатов видно, что материал обладает биоразлагаемостью и способен к медленной биодеградации, что позволяет использовать его как органическая составляющая скаффолдов.

Биосовместимость оценивали по показателям крови (табл.4). Индикаторным показателем стресса служит увеличение количества нейтрофилов, понижение количества лимфоцитов, а повышенной иммунной активностью служит увеличение количества эозинофилов. У животных контрольной и опытной групп количество лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов не превышает уровня интактных животных, что свидетельствует о том, что животные находятся в состоянии относительной нормы (близком к интактной группе), а практически одинаковое количество эозинофилов указывает на отсутствие у животных аллергической реакции, то есть имплант не вызывает гипериммунного ответа.

Таблица 4.1. Показатели крови крыс через неделю после введения имплантата

Показатели	Интактные	Контроль	Группа 1	Группа2
Лейкоциты ($\times 10^9$ кл/л)	12.18 \pm 0.98	10.88 \pm 1.22	9.1 \pm 0.54*	10.08 \pm 1.02
Лимфоциты %	48.76 \pm 2.09	54.76 \pm 6.64	53.86 \pm 3.20	60.94 \pm 3.74
Моноциты %	9.87 \pm 1.10	16.16 \pm 1.64*	14.04 \pm 0.94*	10.94 \pm 0.67**
Нейтрофилы %	37.8 \pm 1.96	26.56 \pm 2.09*	28.93 \pm 1.67*	27.14 \pm 2.77*
Эозинофилы %	3.6 \pm 1.08	2.5 \pm 1.04	2.17 \pm 0.87	1 \pm 0.41*
Эритроциты ($\times 10^{12}$ кл/л)	4.7 \pm 0.73	4.93 \pm 0.26	4.88 \pm 0.31	4.07 \pm 0.24**
Гемоглобин (г/л)	103.56 \pm 12.62	103.92 \pm 3.99	104.64 \pm 6.31	88.08 \pm 5.53**

Таблица 4.2. Показатели крови крыс через три недели после введения имплантата

Показатели	Контроль	Группа 1	Группа2
Лейкоциты($\times 10^9$ кл/л)	8.80 \pm 2.48*	9.50 \pm 0.14*	11.58 \pm 0.96
Лимфоциты %	62.36 \pm 3.64*	52.15 \pm 3.06	63.2 \pm 2.10*
Моноциты %	10.8 \pm 1.27	12.5 \pm 0.4*	9.1 \pm 0.13
Нейтрофилы %	26.23 \pm 3.70*	34.05 \pm 1.74**	25.45 \pm 1.11*
Эозинофилы %	0.6 \pm 0.4*	1.25 \pm 0.94	2.25 \pm 0.85**
Эритроциты($\times 10^{12}$ кл/л)	5.76 \pm 0.43	5.72 \pm 0.34	6.26 \pm 0.31*
Гемоглобин (г/л)	125.62 \pm 11.86	130.8 \pm 3.76 *	137.6 \pm 4.76 *

Показатели крови интактных животных см.табл. 4.1

Примечание: * - статистически значимые различия ($p \leq 0.05$) относительно интактной группы, ** - статистически значимые различия ($p \leq 0.05$) относительно контрольной группы

Спустя неделю после имплантации в контрольной и опытных группах наблюдали схожие изменения показателей крови. Из таблицы 4.1 видно, что снижение количества лимфоцитов, и увеличение количества нейтрофилов спустя неделю после введения имплантата не наблюдается. Это свидетельствует о том, что крысы не находились в состоянии стресса.

Спустя три недели значительных изменений в показателях лейкоцитарных клеток не происходило (Таблица 4.2). Гипериммунного ответа в виде аллергии у опытных животных на имплант не развивалось. Характерно, что во всех группах с операционным вмешательством наблюдалось значимое ($p < 0.05$) увеличение концентрации гемоглобина крови. Это указывает на увеличение интенсивности энергетического обмена и метаболизма в целом. Как и в предыдущие временные интервалы не констатировали аллергического ответа на материал имплантата, и животные не находились в состоянии стресса.

Подводя итог, нужно сказать, что в ходе эксперимента у животных не наблюдалось отторжения имплантированного материала, показатели биохимии крови свидетельствовали об отсутствии воспалительной реакции или стресса. После извлечения имплантов, образование фиброзной капсулы не наблюдалось, что указывало на отсутствие отторжения (биосовместимость).

Таким образом, разработан новый метод получения трехмерных пористых объектов на основе хитозана. Полученный матрикс является биоразлагаемым, биосовместимым и гипоаллергенным и характеризуется микроструктурой сходной с пористыми структурами, полученными методом лиофилизации. Разработанный метод может составить конкуренцию лиофилизации и для получения трехмерных пористых структур на основе хитозана. Основные результаты исследований, представленные в данном разделе, опубликованы в работе [261].

3.2. Модификация хитозана энантовым альдегидом

Актуальной остается задача создания пленочных материалов с механическими свойствами, сравнимыми с заменяемой тканью и контролируемой скоростью биodeградации. Для решения этой проблемы используется два метода: один из них получение композиций на основе хитозана и других более прочных биоразлагаемых полимеров, в частности полиэфиров, второй метод повышения механической прочности - химическая модификация хитозана. Последняя может быть легко реализована полимераналогичными превращениями, особый интерес среди которых представляют реакции алкилирования и арилирования хитозана, в частности через его взаимодействие с альдегидами с образованием оснований Шиффа. В качестве алкилирующего агента был выбран энантовый альдегид (гептаналь), поскольку введение алкильных заместителей с малой углеводородной цепочкой не смогло бы обеспечить достаточный пластифицирующий и не повысило бы прочность материала, а введение «жирных» алкильных

заместителей приведет к повышению гидрофобности, что снизило бы биологические свойства хитозана. Кроме того, энантиомерный альдегид является относительно нетоксичным ($LD_{50} = 3200$ мг/кг) и коммерчески более доступным продуктом, по сравнению с альдегидами с алкильным заместителем (C_5-C_{10}).

Реакцию с образованием основания Шиффа, проводили при разном количестве альдегида по массе от хитозана (от 2 до 20%). Схема реакции представлена на рисунке 15.

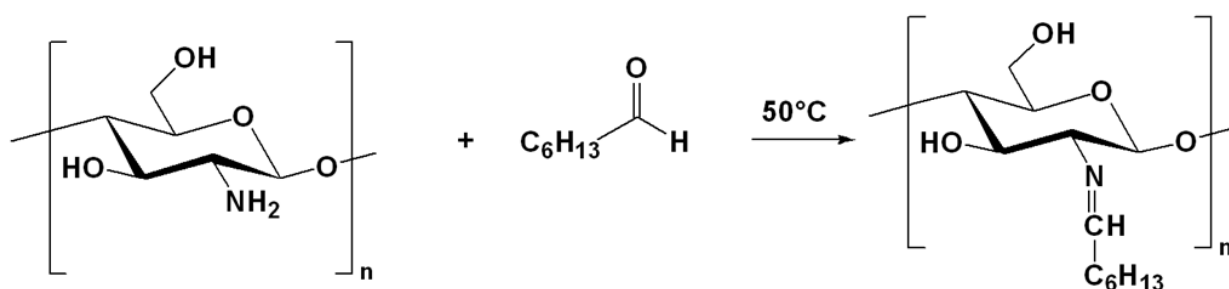


Рис. 15. Схема реакции нуклеофильного присоединения энантиомерного альдегида к аминогруппе хитозана с образованием основания Шиффа.

Следует отметить, что в синтезах с большим количеством альдегида ($>10\%$), наблюдалось фазовое расслоение системы, что снижало эффективность замещения. Поэтому синтез проводили в водно-кислотных средах при концентрации энантиомерного альдегида до 10% .

Образование N-гепталиден хитозана подтверждено методами ИК- и ЯМР-спектроскопии.

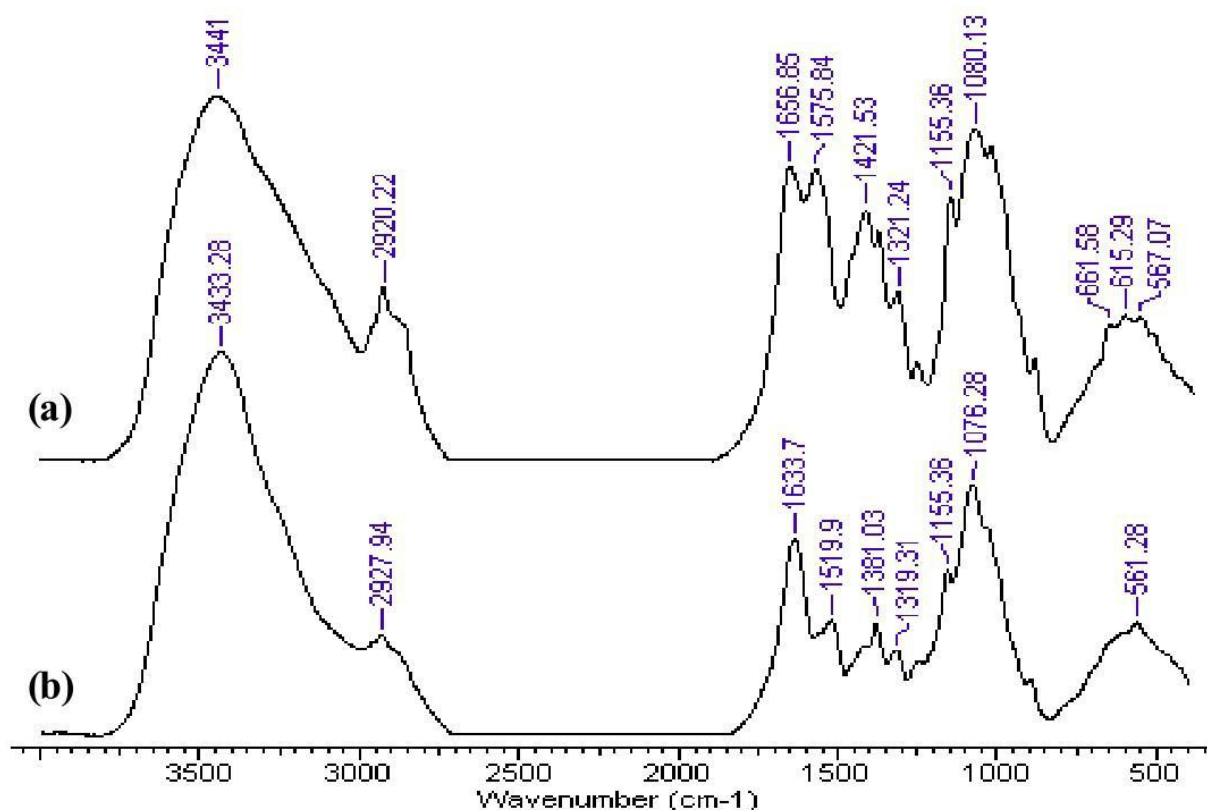


Рис.16. ИК-спектры хитозана (а) и хитозана, модифицированного энантиомерным альдегидом (б).

На рисунке 16 представлены спектры исходного хитозана (а) и хитозана, модифицированного энантиомерным альдегидом, при его содержании в синтезе – 10% (б). В спектре хитозана наблюдали пик, ассиметричных валентных колебаний С-О относящийся к структуре полисахарида, при 1154 см⁻¹ и характерный для аминогруппы пик ассиметричных деформационных колебаний около 1575 см⁻¹. Очевидные изменения спектра наблюдаются после алкилирования хитозана, о чем можно судить по новому пику, появляющемуся при 1519 см⁻¹, соответствующий деформационным колебаниям С-Н в метильных группах.

Другим подтверждением N-алкилирования хитозана явились данные ЯМР-спектроскопии. ЯМР спектры исходного хитозана (А) и модифицированного (В) представлены на рисунке 17.

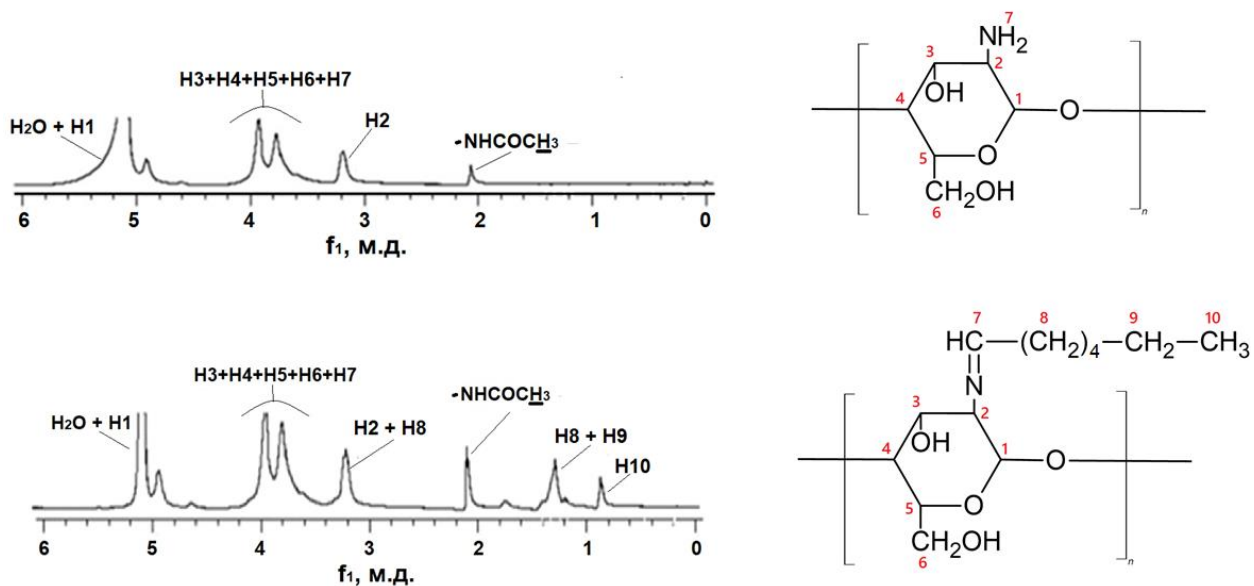


Рис.17. ЯМР-спектр (А) исходного хитозана и (В) модифицированного хитозана

Пики на 0,8, 1,3 и 1,7 м.д. были характерны только для модифицированного хитозана и отнесены, соответственно, к CH_3 , $-\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_2-(\text{C}-\text{N})$ алкильного остатка. Пик при 5,08 м.д. относится к воде, в то время как пики при 4,6 и 4,8 м.д. относятся к протонам Н-1 остатков глюкозамина и N-ацетилглюкозамина соответственно. Кольцевые протоны (Н-3, 4, 5, 6, 7) резонируют при 3,7–3,9 м.д., в то время как пик при 3,1–3,2 м.д. относится к протону Н2 N-ацетилглюкозамина или остаткам глюкозамина. Пики при 2,0–2,1 м.д. могут относиться к трем N-ацетильным протонам N-ацетилглюкозамина.

Результаты ИК- и ЯМР-спектроскопии показывают, что при замещении водорода в аминогруппе алкильным заместителем образуется N-гепталиден хитозана, как основание Шиффа.

Была изучена степень и эффективность замещения при разном количестве энантиомерного альдегида. Степень замещения определяли по элементному

составу методом CHNS-анализа. Для этого использовали значения содержания элементов для исходного хитозана, а также сравнивали реальные и теоретические значения для хитозанов, модифицированных 2% (Хитозан-М1), 5% (Хитозан-М2) и 10% (Хитозан-М3) энантиомерного альдегида, соответственно (таблица 5).

Таблица 5. Результаты элементного CHNS-анализа образцов

Название	Состав исходной смеси	Содержание элементов			Эффективность процесса (%)	Доля модифицированных звеньев (%)
		C (%)	H (%)	N (%)		
Хитозан	Хитозан	46,0 ± 4,0	7,0 ± 0,8	9,0 ± 0,9	-	0
Хитозан-М1	Хитозан + 2 мас.% ЭА	49,2 ± 3,1	6,7 ± 0,5	8,4 ± 0,3	93 ± 2,7	1,8
Хитозан-М2	Хитозан + 5 мас.% ЭА	50,4 ± 3,8	6,8 ± 0,4	8,1 ± 1,0	89 ± 4,3	4,5
Хитозан-М3	Хитозан + 10 мас.% ЭА	53,9 ± 5,1	6,6 ± 0,7	7,6 ± 0,8	91 ± 3,4	9,0

Из таблицы видно, что в исследованном диапазоне концентраций энантиомерного альдегида в реакционной смеси, эффективность процесса практически одинакова и составляет около 90% и обеспечивает получение продукта с различной долей замещенных звеньев.

Поскольку в ходе химической модификации хитозана, были введены гидрофобные алкильные фрагменты, встает вопрос насколько, сохраняется его гидрофильность, так как известно, что супергидрофильные и супергидрофобные поверхности не позволяют обеспечивать достаточную клеточную адгезию. Были отлиты пленки из модифицированного хитозана и

исследованы их свойства на влагопоглощение, контактный угол смачивания и клеточную адгезию (Таблица 6).

Таблица 6. Степень влагопоглощение пленок на основе хитозана

Состав	Влагопоглощение, (%)	Угол смачивания, град
Хитозан	217.3±1.4	76.1 ±1.1
Хитозан-М1	211.5±6.8	78.4±0.7
Хитозан-М2	213.2±10.3	75.8±0.4
Хитозан-М3	208.6±7.2	80±5

Из таблицы видно, что степень влагопоглощения и смачиваемость пленок на основе модифицированного и исходного хитозана практически не отличаются, что позволяет предположить сопоставимость их биологических свойств.

В связи с этим были проведены исследования пленок *invitro* по адгезии и пролиферации клеток фибробластов в качестве предшественников соединительной ткани. На рисунках 18 (а, б) показаны фотографии пленок после 24 часов инкубации клеток. Как видно из рисунков, пленка на основе модифицированного хитозана обладает более равномерным распределением фибробластов на поверхности, что указывало на более высокую степень адгезии, а более активный рост и деление клеток, на большую биосовместимость по сравнению с пленкой из чистого хитозана. Для сравнения роста клеток на поверхности пленок, использовали программу ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Рост клеток

фибробластов на поверхности пленки из модифицированного хитозана был активнее в 3 раза.

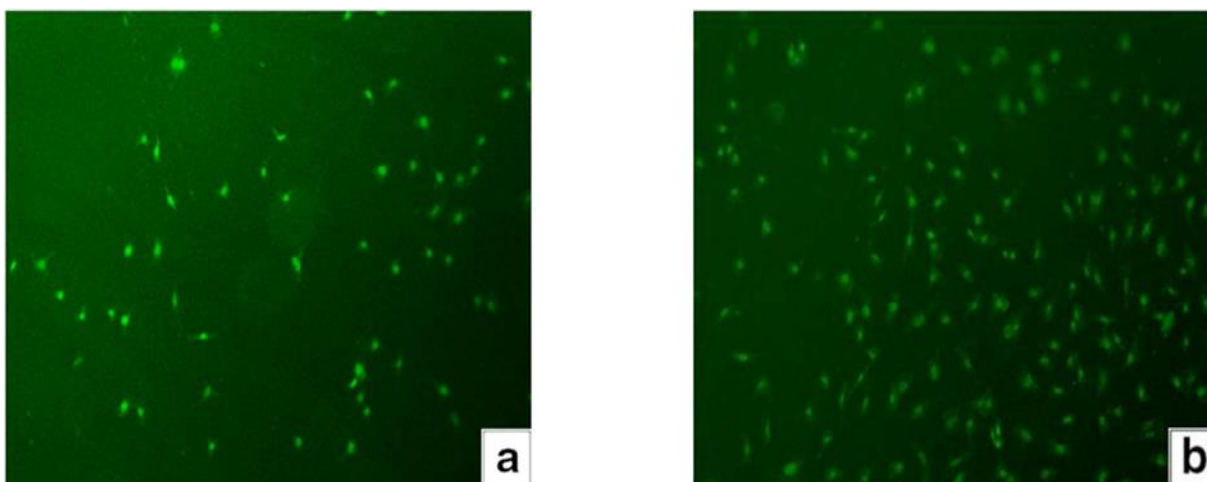


Рис. 18. Фотографии пленок, заселенные фибробластами через 24ч. (а) – пленка из чистого хитозана, (б) – пленка из хитозан-М3

Поскольку, для материалов в регенеративной медицине важны не только биологические свойства, но и определенный уровень механических свойств, сопоставимых со значениями замещаемой ткани, были исследованы механические свойства образцов в виде пленок (Таблица 7.1). Существенно, что уже при небольших количествах введенного альдегида наблюдается резкое повышение прочности, которая достигает максимальных значений при 9% доли модифицированных звеньев.

Таблица 7.1. Механические характеристики пленок хитозана и модифицированного хитозана.

Состав	Предел прочности при разрыве, σ (МПа)	Относительное удлинение, ε (%)
Хитозан	15.5±1.7	1,51±0.2
Хитозан-М1	52.4±3.5	6.9±0.5

Хитозан-М2	68.1±4.8	8.1±0.6
Хитозан-М3	99.7±6.1	13.8±1.1

На основе растворов хитозана с разной долей N-гепталиден хитозановых звеньев, были приготовлены также трехмерные пористые образцы методом лиофилизации и методом с использованием гидрокарбонатов и исследована их прочность на сжатие и влагопоглощение. (Таблица 7.2.)

Таблица 7.2. Механические характеристики и влагопоглощение трехмерных пористых композиций.

Название композиции	Влагопоглощение(%)	Прочность на сжатие, МПа
Ацетат хитозана + NaHCO ₃	217.3±1.4	0.85 ± 0.04
Лиофилизированный ацетат хитозана	210.4±5.6	0.84 ± 0.10
Ацетат хитозана-М1 + NaHCO ₃	211.6±10.3	1.53 ± 0.13
Ацетат хитозана-М3+ NaHCO ₃	209.6±5.2	2.07 ± 0.11
Ацетат хитозана-М1 лиофилизированный	212.4±8.7	1.48 ± 0.16
Ацетат хитозана-М3-лиофилизированный	214.8±3.7	2.05 ± 0.13

Из таблицы видно, что, как и в случае пленочных образцов, для пористых образцов модифицированного хитозана по сравнению с исходным наблюдается увеличение прочности, которая зависит от степени замещения. При максимальной степени замещения прочность на сжатие возрастает в 2.5 раза независимо от метода получения.

Можно предположить, что существенное изменение физико-механических свойств, связано с изменением структурных свойств у модифицированного хитозана по сравнению с исходным хитозаном. Методом рентгенофазового анализа (Рис.19) была определена структура полимерных пленок на основе чистого хитозана, и модифицированных хитозанов с добавлением 2% и 10% энантового альдегида.

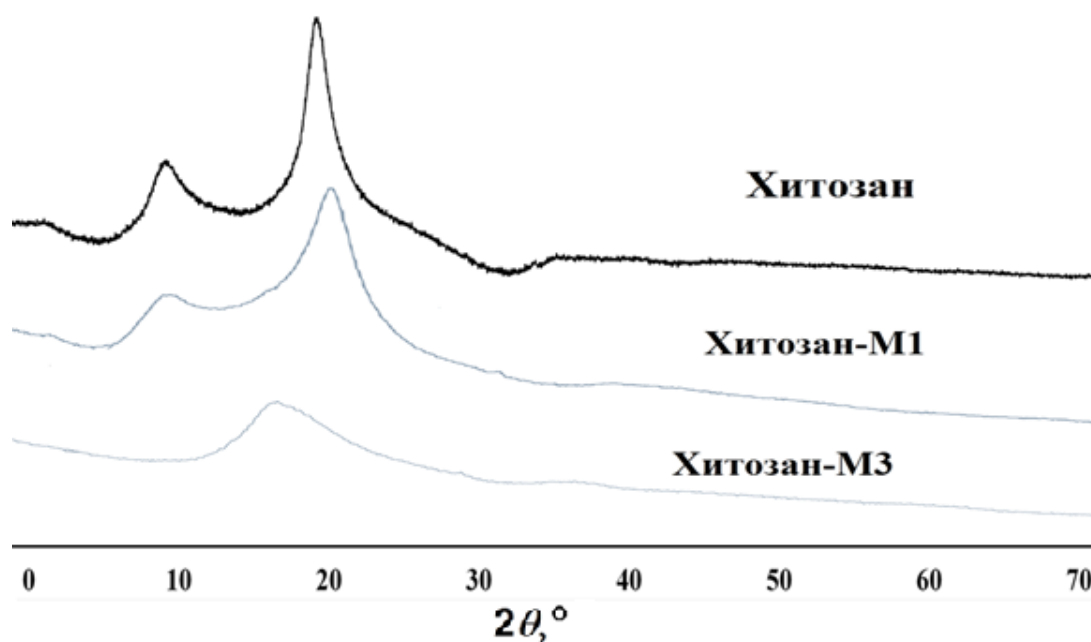


Рис.19. Рентгенофазовый анализ образцов

Исходный хитозан представляет собой полимер с высокой степенью кристалличности. Введение 2% ЭА (Хитозан – М1) приводит к частичному снижению степени кристалличности образца, на дифрактограмме наблюдается два размытых пика. Образец, полученный введением 10% ЭА (Хитозан – М3), представляет собой аморфный полимер - на рентгенограмме данного образца наблюдается аморфное гало. Можно предположить, что

аморфизация модифицированных хитозанов, обусловлена наличием достаточно длинных алкильных фрагментов, замещающих атом водорода в аминогруппе и препятствующих образованию межцепных водородных связей, являющихся одной из причин высокой кристалличности характерной для полисахаридов и хитозана, в частности.

Совокупность представленных результатов, показывает, что модификация энантиомером альдегидом по реакции с образованием основания Шиффа, крайне перспективна для разработки материалов на основе хитозана, поскольку позволяет в несколько раз повысить механические свойства образцов при сохранении биосовместимости и биоразлагаемости, базируется на использовании коммерчески доступного сырья и отличается простотой синтеза. Главные результаты исследований, описанные в данном разделе, представлены в работе [258].

3.3. Синтез полиэфиров

Большинство исследуемых каталитических систем для полимеризации полиэфиров, представляют собой карбоксилаты металлов, а наиболее используемый в промышленности катализатор для получения полиэфиров - октаноат олова. Как следует из данных, приведенных в литературном обзоре, синтез новых катализаторов для получения полилактида и поликапролактона не теряет актуальности. В работе в качестве такой каталитической системы, на основании ряда факторов, подробно изложенных выше, был выбран салицилат титана и исследованы его каталитические свойства.

Салицилат титана, как индивидуальное вещество, известно довольно давно и использовалось для лечения болезней [253]. В указанных работах салицилат титана получали из сульфата титана (IV) и салициловой кислоты. Известны смешанные металлоорганические соединения [254], содержащие атомы титана, салицилат и алкоксидные лиганды, которые исследовались на каталитическую активность при полимеризации капролактона, однако ввиду наличия связей Ti-OR, можно говорить об их гидролитической неустойчивости.

Предложен новый метод синтеза салицилата титана, который в дальнейшем был использован в качестве катализатора в ROP-полимеризации циклических эфиров.

Изопропоксид титана растворяли в диметилсульфоксиде, после чего в раствор внесли салициловую кислоту при постоянном перемешивании, при мольном соотношении компонентов 1:2 соответственно. В результате реакции наблюдалось окрашивание раствора в оранжевый цвет. Образовавшийся раствор сушили, после чего промывали этанолом от непрореагировавших изопропоксида титана и салициловой кислоты и сушили в вакууме до постоянной массы. Продукт представлял собой порошок желто-оранжевого цвета.

Состав и строение продукта были исследованы методами: ИК- и ЯМР-спектроскопии, РФА, МАЛДИ-масс-спектрометрии.

Наиболее используемый метод для исследования структуры металлоорганических соединений является рентгеноструктурный анализ, в связи с чем, были проведены попытки получения монокристаллов из различных растворителей (ДМСО, ДМФА, хлороформ, диоксан) путем медленного испарения, однако во всех случаях образовывался аморфный порошок. Рентгенофазовый анализ показывает отсутствие кристалличности в образце (рис. 20).



Рис.20. Рентгенограмма салицилата титана

Из литературы [254] известно, что при взаимодействии алкоксидов титана с салициловой кислотой возможно образование смешанных соединений, которые содержат в свое составе, как алкоксидные группы, так и салицилатные. Для определения строения полученного продукта, было исследовано методом ИК- и ЯМР-спектроскопии.

В ИК-спектре образца (Рис.21) проявлялись характерные полосы поглощения при волновом числе 3233 см^{-1} для $\nu(\text{O-Ti})$ и 2925 см^{-1} , для $\nu(\text{C-H})$, соответственно. Полосы поглощения при 1600 см^{-1} , 1242 см^{-1} , относятся к $\nu(\text{C=O})$ симметричных валентных колебаний, $\nu(\text{C-O})$ деформационных колебаний карбоксильной группы соответственно, а 1217 см^{-1} к связи $\nu(\text{C(O)-}$

O-Ti). Наличие бензольного кольца, подтверждалось полосой поглощения при 1440 см^{-1} .

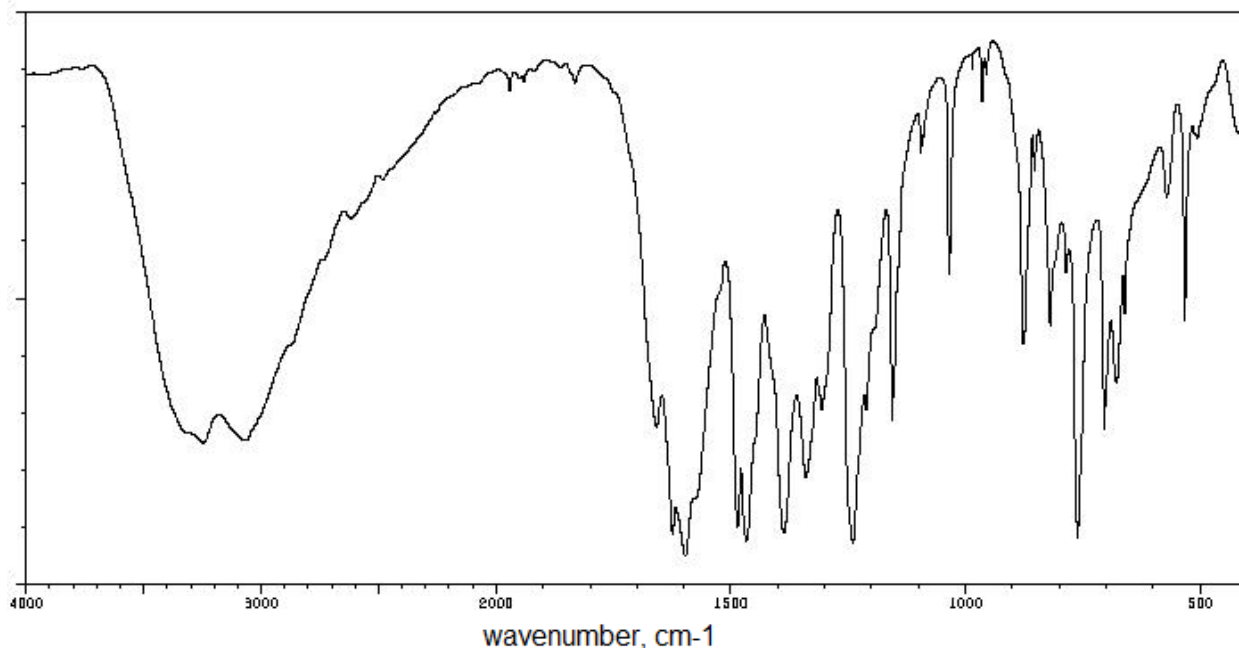


Рис.21. ИК-спектр салицилата титана

Данные ЯМР-спектроскопии представлены на рис. 22. В спектре отсутствуют резонансные пики, отвечающие свободным атомам водорода в гидроксильной и карбоксильной группе салициловой кислоты. Химические сдвиги при 7.78 м.д. и 7.45 м.д. являются дублетными и относятся к протонам в положении 1 и 4, соответственно, мультиплетный пик при 6.92 м.д. относится к протонам в положении 2 и 3.

Из результатов ИК- и ЯМР-спектроскопии и из того факта, что салициловая кислота двухосновная, анион которой обладает способностью связываться, как через атом кислорода в карбоксилатной фрагменте, так и фенольном, можно предположить, что атом титана в полученном соединении связан с салицилатным фрагментом бидентатно.

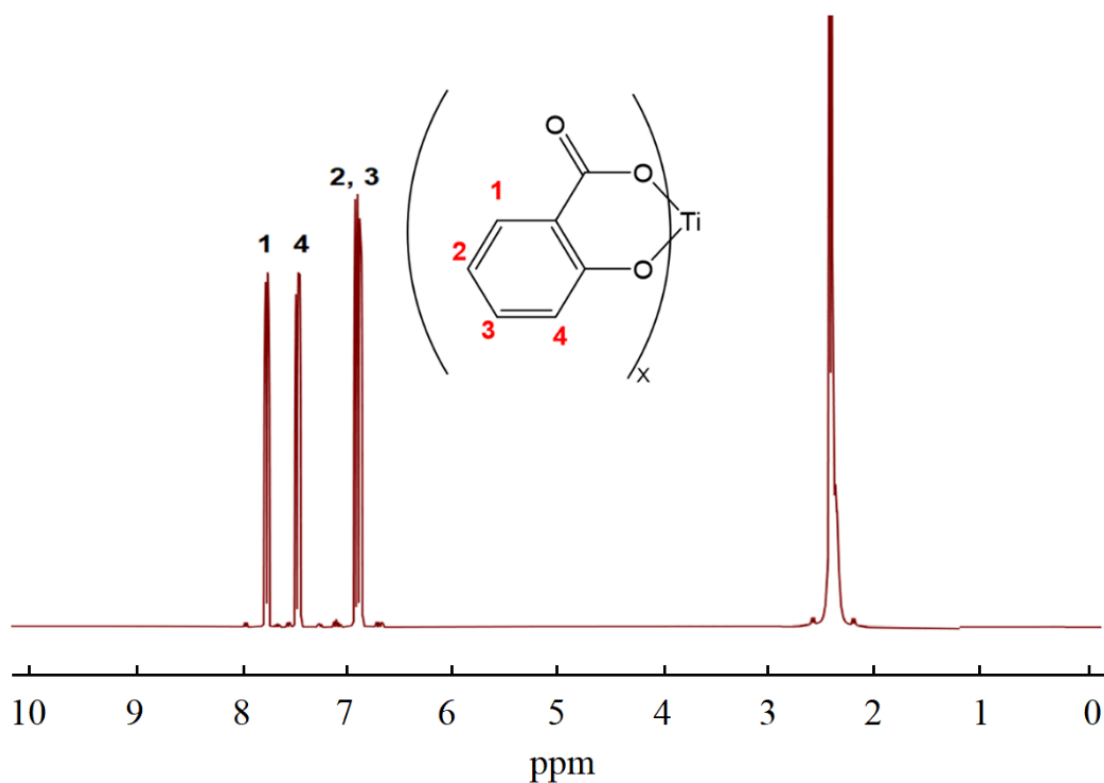


Рис.22. ЯМР-спектр салицилата титана

Из литературы известно, о соединениях титана с арилоксидными лигандами, имеющие в своем составе как две, так и три группы, поэтому для уточнения структуры, образец исследовали методами MALDI-TOF масс-спектрометрии и элементным анализом.

Анализ соотношения салицилатных фрагментов к атому титана был проведен элементным CHNS-анализом и MALDI-TOF масс-спектрометрией. Результаты исследования элементного состава представлены в таблице 8.

Таблица 8. Результаты элементного анализа комплекса

Вещество	Массовая доля элементов (%)		
	C	H	S
Салицилат титана (эксперимент.)	45,71±1,17	4,16±0,08	13,52±0.63
(Салицилат) ₂ титана +2 ДМСО (теор.)	45,39	4,23	13,44
(Салицилат) ₂ титана (теор.)	52,54	2,52	0

Как видно из результатов элементного анализа, содержание элементов в образце близко к теоретически рассчитанным значениям для салицилата титана с двумя салицилатными фрагментами.

Результаты анализа соединения методом MALDI-TOF масс-спектрометрии приведены на рисунке 23, зарегистрированного в режиме фиксации анионов. В масс-спектре отчетливо появляется сигнал при 476.7 Да, отвечающий комплексу $[\text{Ti}(\text{OC}_6\text{H}_4\text{COO})_2(\text{C}_2\text{H}_6\text{SO})_2]$, образуемому при координации двух молекул диметилсульфоксида к молекуле $\text{Ti}(\text{OC}_6\text{H}_4\text{COO})_2$ в процессе лазерного возбуждения, что согласуется с предполагаемой структурой катализатора.

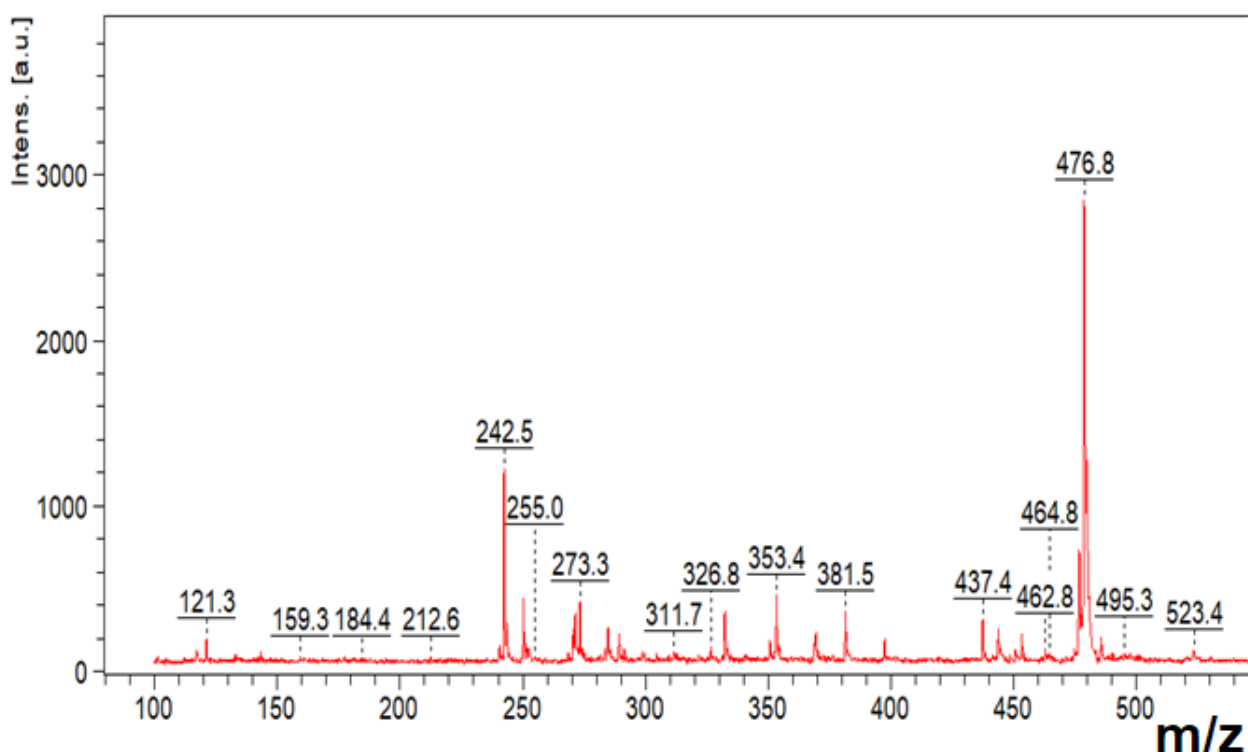


Рис. 23. MALDI-спектр салицилата титана

Таким образом, можно предположить, что в состав комплекса входят 2 салицилатных лиганда, связанных бидентатно с атомом титана и 2 молекулы ДМСО, связанные с атомом титана координационно, что находится в соответствии с координационным числом титана равным 6. Результаты MALDI масс-спектрометрии по молекулярной массе образцов ($M=476.8$) и

согласуется теоретически рассчитанной молекулярной массе (320.1(салицилат титана) + 2* 78.1 (ДМСО)=476.3).

На основании полученных данных можно предполагать, что продукт представляет собой соединение титана, ковалентно связанный с двумя салицилатными группами и координационно связанный с двумя молекулами ДМСО (Рис.24).

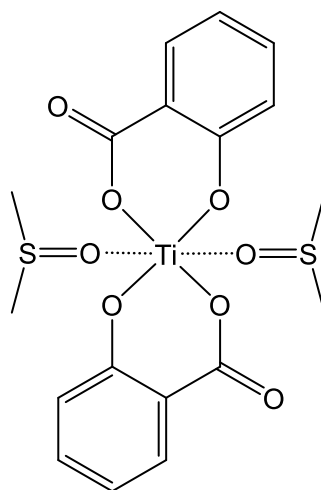


Рис.24. Предполагаемая структура катализатора

Полученное вещество представляло собой салицилат титана с молекулярной массой 476 г/моль. Продукт растворим в ДМСО, устойчив к влаге и на воздухе, имеет оранжевую окраску.

Синтезированный салицилат титана, был использован в качестве катализатора для ROP-полимеризации циклических эфиров и изучены молекулярно-массовые характеристики полимеров.

Полимеризацию проводили в массе при температуре 120 °С, в диапазоне мольных соотношений [Катализатор] : [Мономер] от 1:50 к 1:200, в качестве соинициатора использовали бензиловый спирт. Полученные полилактид и поликапролактон, характеризовались высокой и молекулярной массой, и относительно узким индексом полидисперсности (Таблица 9). Как видно из таблицы, введение меньшего, чем 1:50 количества катализатора

незначительно снижает молекулярную массу продукта, однако она остается достаточно высокой, при этом индекс полидисперсности практически не изменяется и не превышает значения 1,3. При концентрации катализатора, меньше, чем 1:200 наблюдалось образование низкомолекулярных продуктов. Увеличение концентрации катализатора больше, чем 1:50, нецелесообразно, поскольку практически не приводит к изменению как молекулярно-массовых характеристик полимера, так и конверсии.

Таблица 9. Молекулярно-массовые характеристики получаемых полимеров

Мономер (М)	[Катализатор] : [М]	Mw, * 10 ⁻³	Mn, * 10 ⁻³	Mw/Mn
D, L- лактид	1:50	83,8	66,1	1,27
D, L- лактид	1:100	78,9	64,6	1,24
D, L- лактид	1:200	74,3	62,4	1,29
ε-капролактон	1:50	82,7	65,9	1,25
ε-капролактон	1:100	77,5	64,0	1,21
ε-капролактон	1:200	73,2	61,3	1,3
L - лактид	1:50	89.6	75.9	1.18
L - лактид	1:100	86.3	70.7	1.22
L - лактид	1:200	78.7	68.4	1.15

Известно, что поли-L-лактид нерастворим в ДМСО, который предполагалось использовать как общий растворитель для совмещения с хитозаном, поэтому дальнейшие работы вели с D, L-лактидом и ε-капролактоном.

Для полимеризации D,L-лактида и ε-капролактона были исследована зависимость молекулярно-массовых характеристик от времени, при соотношении [Катализатор] : [Мономер] = 1 : 50 (Таблица 10)

Таблица 10. Молекулярно-массовые характеристики в процессе синтеза полиэфиров

	4 часа	8 часов	16 часов	20 часов	24 часа
Полимеризация D,L-лактида					
M _w , *10 ⁻³	13,8	26,1	56,4	65,5	83,8
M _n , *10 ⁻³	11,7	19,8	44,8	51,2	66,1
M _w /M _n	1,18	1,31	1,25	1,28	1,27
Конверсия, %	14	25	58	69	90
Полимеризация ε-капролактона					
M _w , *10 ⁻³	12,6	24,1	55,3	62,3	82,7
M _n , *10 ⁻³	11,1	19,0	45,4	47,9	65,3
M _w /M _n	1,13	1,27	1,22	1,31	1,25
Конверсия, %	13	25	59	66	87

Как видно из рисунков 25, зависимость молекулярной массы от глубины конверсии подчиняется строго линейной зависимости, что согласуется с кинетикой для полимеризации с раскрытием цикла. Увеличение времени реакции, по сравнению с 24 часами, не приводило к увеличению конверсии. Предельная конверсия, для полимеризации лактидов и капролактона составила 90 и 87% соответственно.

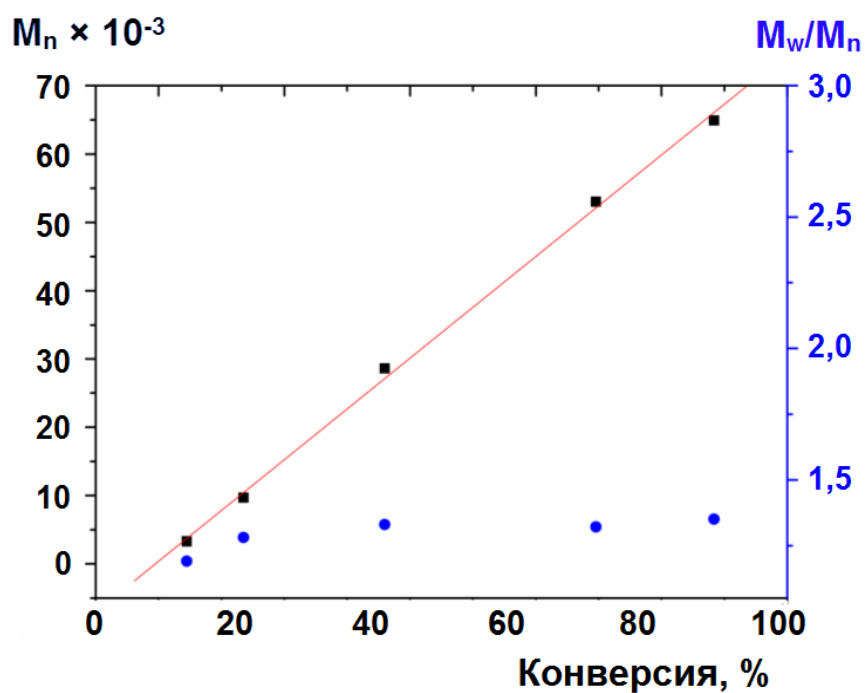


Рис.25.1. Зависимость среднечисловой молекулярной массы поли-D, L-лактида от конверсии

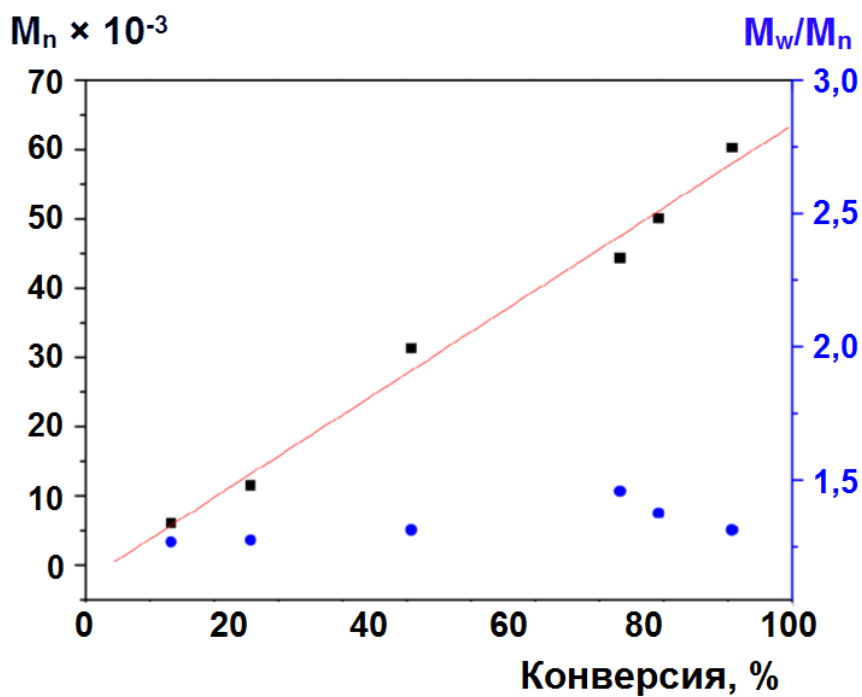


Рис.25.2 Зависимость среднечисловой молекулярной массы поли-капролактона от конверсии

Из линейного роста молекулярной массы от конверсии полимера (рис.25) следует, что реакция имеет первый порядок по мономеру, что характерно для ROP-полимеризации [108]. Полученные полимеры исследовали методом ЯМР-спектроскопии (рис.26).

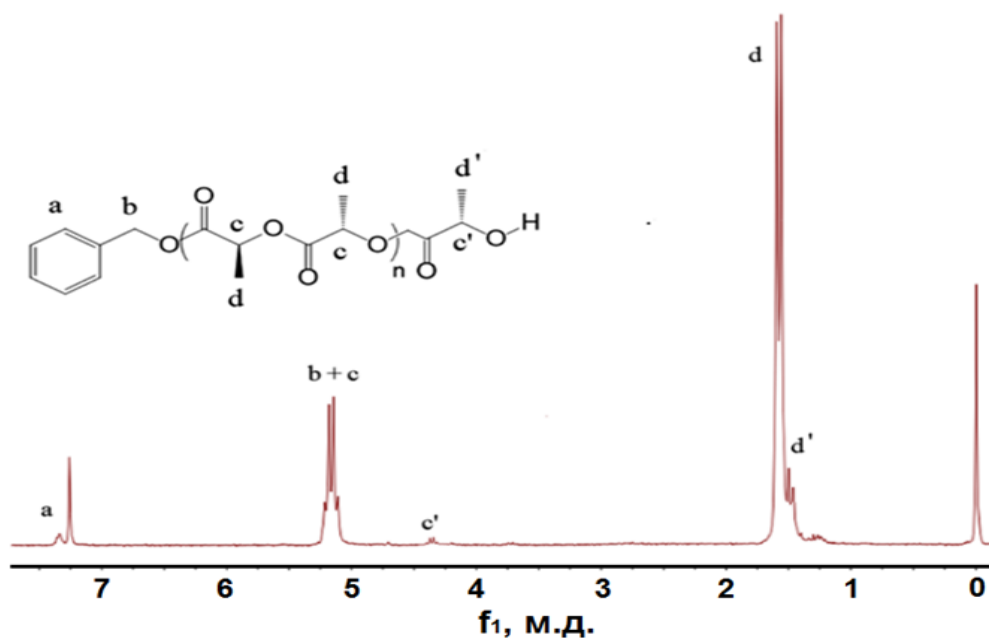


Рис.26.1. ЯМР-спектр полилактида

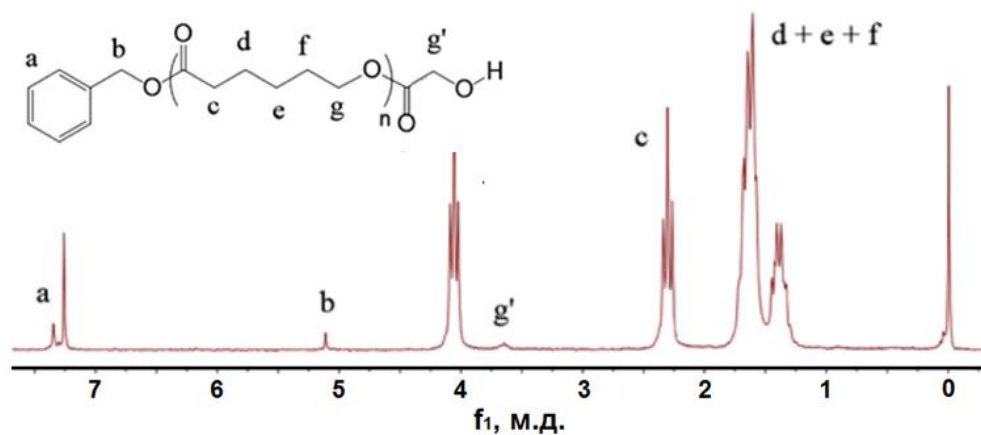


Рис.26.2. ЯМР-спектр поликапролактона

Из спектров, помимо пиков характерных для мономерных звеньев соответствующих полимеров, видны пики, относящиеся к остатку соинициатора и отсутствуют пики, которые могли бы быть отнесены к катализатору.

На основании полученных результатов можно предположить следующую схему полимеризации (рис.27).

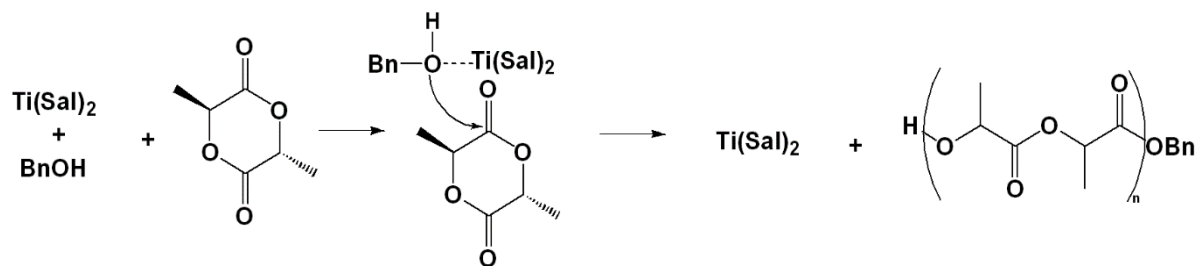


Рис.27. Схема реакции полимеризации

Было изучено строение синтезированного полилактида, поскольку известно, что при полимеризации лактида возможно образование различных изомерных форм (поли-L-лактид или поли-D-лактид) являющихся полимерами с высокой степенью кристалличности, так и рацемата (поли-D, L-лактид). Соответственно биологические и механические свойства полилактида зависят от стереонаправленности, которую можно определить по углу вращения методом оптической поляризации. Все измерения проводили в растворе хлороформа. Опыты для образцов каждого из синтезов повторяли 3 раза, а затем определяли среднее арифметическое значение α . По среднему значению α определяли удельное вращение полученных полимеров. Угол оптического вращения и удельное оптическое вращение растворов полилактида в хлороформе определяли на автоматическом поляриметре АТАГО АР-300 при длине волны линии D спектра натрия ($\lambda = 589,3$ нм) при температуре 25 °C и длине трубки $L = 99,96$ мм. Количество D-звеньев (D %) в полилактиде вычисляли по формуле.

$$D\% = \frac{([\alpha]_D^{25}(PLLA) - [\alpha]_D^{25}(PLA))}{2[\alpha]_D^{25} PLLA} * 100\%$$

Где $[\alpha]_D^{25} PLA$ и $[\alpha]_D^{25} PLLA$ - удельное оптическое вращение полилактида и поли-L-лактида в образце соответственно.

Таблица 11. Результаты поляриметрии полилактида

Содержание L-лактида в смеси мономеров, масс.%	Угол вращения $[\alpha]_D^{25}$	Содержание L-звеньев в полилактиде по данным поляриметрии
50 (D,L –лактид)	-48±3	50±3
100 (L – лактид)	-153±1	99±1

Теоретически рассчитанный угол соответствует значению для полилактида с содержанием D-лактида порядка 50%. Содержание L-звеньев в полилактиде, определенное методом поляриметрии, совпадает с рассчитанным по составу мономерной смеси, следовательно, продукт реакции является поли-D,L-лактидом.

Результаты, представленные в данном разделе, показывают перспективность использования салицилата титана как катализатора для полимеризации циклических эфиров. Полученный катализатор является нетоксичным и химически устойчивым, при этом он обеспечивает получение продукта высокомолекулярного продукта - $80 \cdot 10^3$ Да при полимеризации циклических эфиров и позволяет получать полилактид с необходимой стереорегулярностью, в зависимости от строения исходных циклических эфиров. Основные результаты исследований, описанные в данном разделе, представлены в работе [259].

3.4. Получение ДМСО-растворимой формы хитозана и смесевых композиций

Получение гомогенной системы на основе природных и синтетических биосовместимых полимеров, таких как хитозан, полилактид и поликапролактон в мягких условиях без использования специального оборудования, остается актуальной проблемой. Оптимальным решением проблемы является получение материалов на основе хитозана и полиэфиров из единого растворителя. Ряд авторов [238] считает невозможным получение однородных материалов на основе указанных полимеров ввиду их несовместимости. На нашей кафедре [246] на основе расчета параметров растворимости была доказана совместимость хитозана и полилактида. Более того, авторами [255] были получены однородные композиции хитозана и полкапролактона из единого растворителя, в качестве которого использовали гексафторизопропанол. Однако этот растворитель характеризуется токсичностью и высокой стоимостью.

Более перспективным растворителем для совмещения хитозана и полиэфиров видится диметилсульфоксид (ДМСО) ($\epsilon = 47$). С одной стороны, в ДМСО хорошо растворимы полиэферы и органические кислоты необходимые, для обеспечения растворимости хитозана, а с другой стороны ввиду биомедицинского назначения разрабатываемых материалов, важно было использовать нетоксичные вещества и растворители. ДМСО это один из немногих органических растворителей, одобренных для использования в медицине.

Были приготовлены растворы разной концентрации нескольких органических кислот (уксусная (1-5%), муравьиная (1-5%), молочная (1-5%), салициловая (1-5%)) в ДМСО и исследована растворимость хитозана в них. Хитозан растворялся только в растворе салициловой кислоты в ДМСО, при его концентрации в 1.5 мас.% начиная с концентрации кислоты – 2 мас.%, с

образованием соли – салицилата хитозана. После получения гомогенного, прозрачного раствора хитозана, в него добавляли расчетные количества полилактида и/или поликапролактона (табл.12).

Таблица 12. Соотношения полимеров в композитах

Композиция	Содержание компонентов в растворе, масс. %*		
	Хитозан	Полилактид	Поликапролактон
ХТЗ+ПЛА(1:1)	50	50	0
ХТЗ+ПЛА(1:2)	33	67	0
ХТЗ+ПКЛ(1:1)	50	0	50
ХТЗ+ПКЛ(1:2)	33	0	67
ХТЗ+ПЛА+ПКЛ(2:1:1)	50	25	25
ХТЗ+ПЛА+ПКЛ(1:1:1)	34	33	33

*-концентрация хитозана в растворе всегда составляла 1.5 мас.%

Из полученных растворов заливали пленки с целью дальнейшего исследования их свойств. По достижении постоянной массы, пленки обрабатывали водным раствором NaOH, для перевода хитозана из солевой формы в основную, а затем дистиллированной водой, доводя смывные воды до значения pH 7.

Авторами [256] показана возможность прививки салициловой кислоты на хитозан в суспензии в изопропанолу при $t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 48 часов.

Поэтому, в нашем случае нельзя было исключить возможность прививки салициловой кислоты на хитозан в процессе формирования пленок. Для подтверждения отсутствия образования привитого сополимера, методом ИК-спектроскопии были исследованы пленки хитозана полученные из раствора

салициловой кислоты в ДМСО, по вышеописанной методике и исходного хитозана (рис.28).

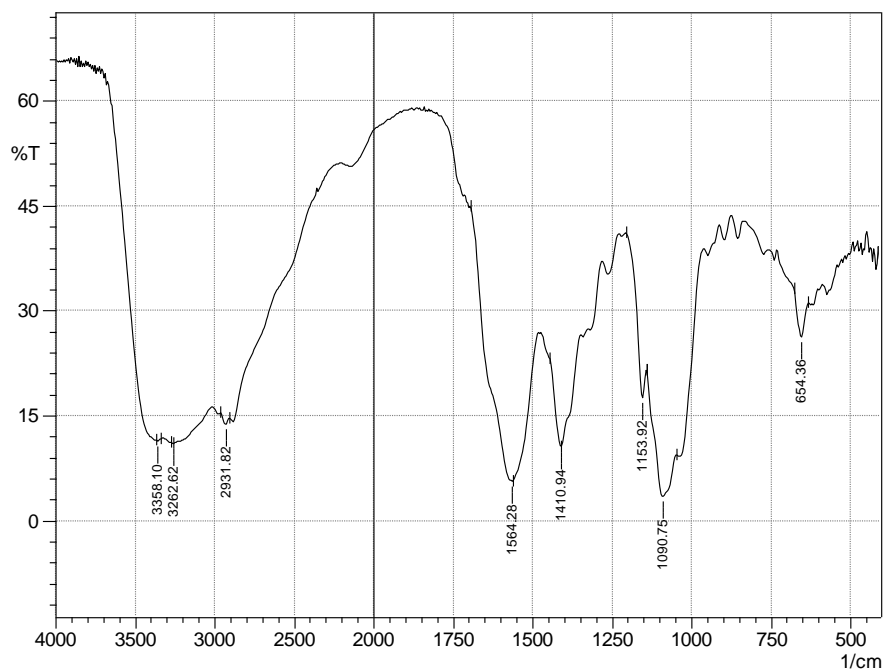


Рис.28.1. ИК-спектр исходного порошка хитозана

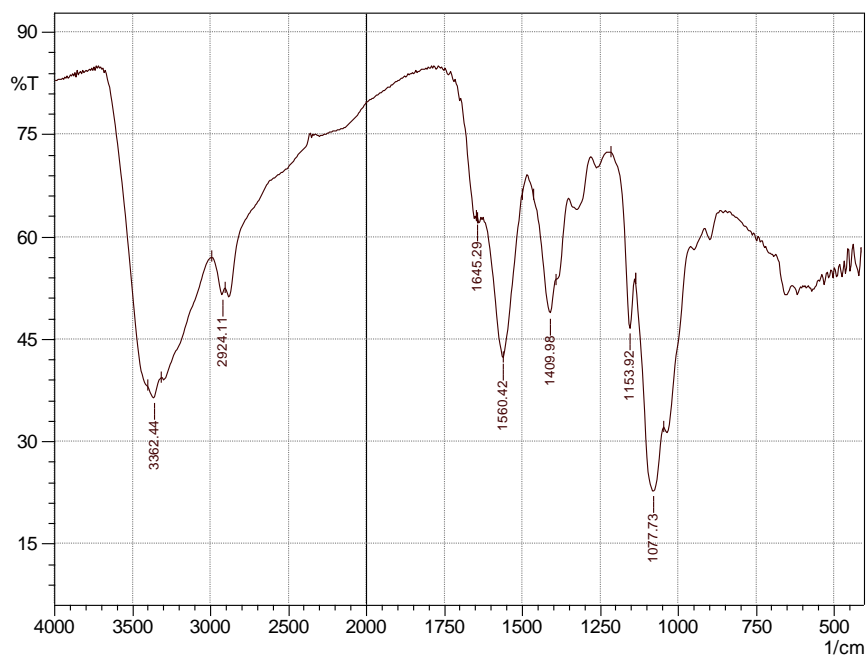


Рис.28.2. ИК-спектр пленки основной формы хитозана, полученной из раствора ДМСО-салициловая кислота

Как видно из рисунков, в спектре пленки из хитозана, отсутствуют характерные полосы поглощения для бензольного кольца, что свидетельствует как об отсутствии прививки салициловой кислоты, так и полном переводе хитозана в основную форму. Таким образом, можно говорить об растворимости хитозана в ДМСО с использованием салициловой кислоты для перевода хитозана в солевую форму.

Конечной целью было придание материалу термопластичности при сохранении его биологических свойств, поэтому был выбран путь получения смесей хитозана с полилактидом и поликапролактоном, которые уже активно используются в биомедицине и являются термопластичными полимерами. Из смесевых композиций были получены пленки и исследованы методом ИК-спектроскопии (рис.29)

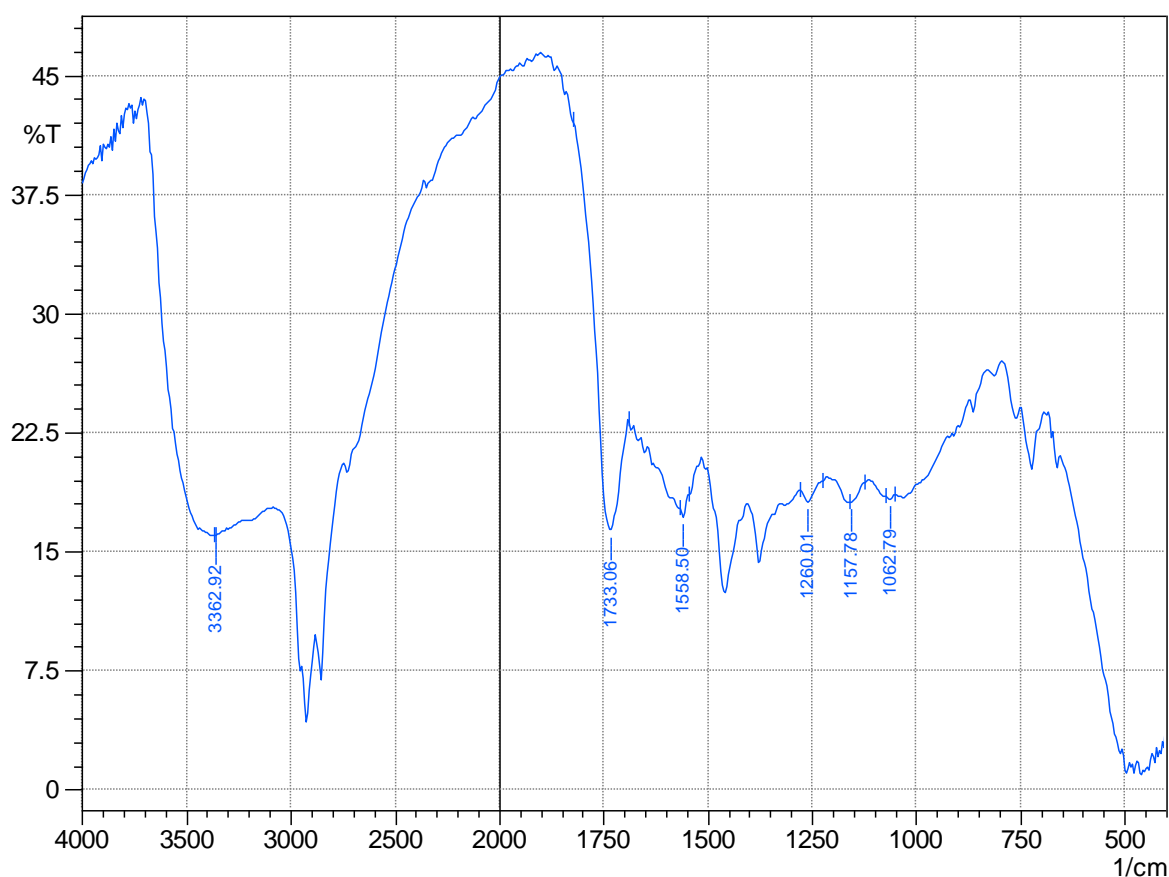


Рис.29.1. ИК-спектр смесевой композиции ХТЗ:ПЛА (1:2)

Как видно из рис. 29.1, в спектре смесевой композиции присутствуют полосы поглощения, характерные как для ХТЗ, так и для ПЛА, а именно:

1733.06 см^{-1} - Полоса валентных колебаний C=O, связана с валентными колебаниями карбонильной группы в сложноэфирной связи

1558.50 см^{-1} - Колебания амидной связи и валентных колебаний связи N-H в хитозане

1157.78 см^{-1} - Полоса растяжения CO, связана с колебаниями связи CO в сложноэфирной группе

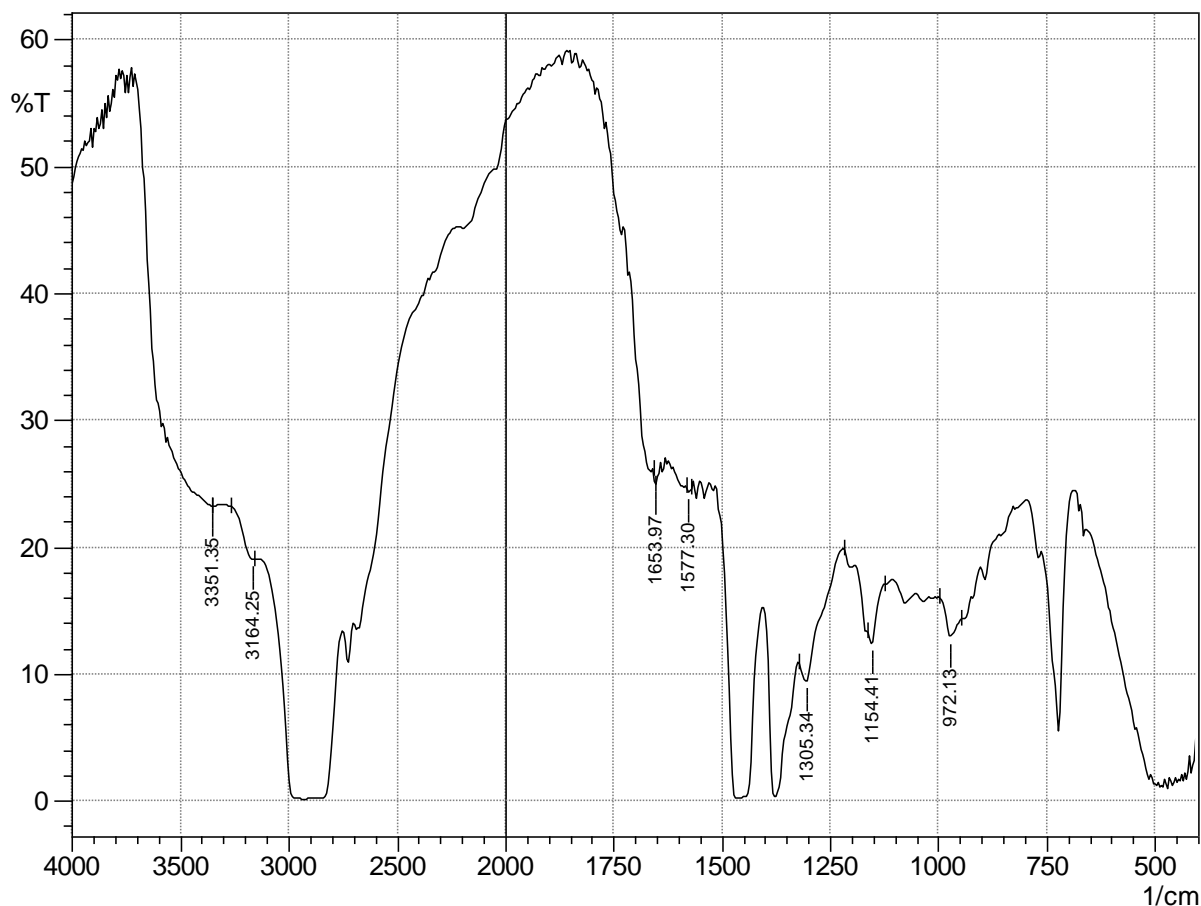


Рис. 29.2. ИК-спектр смесевой композиции ХТЗ:ПКЛ (1:2)

Как видно из рис. 29.2, в спектре смесевой композиции присутствуют полосы поглощения, характерные как для ХТЗ, так и для ПКЛ, а именно:

1577.30 см^{-1} - Колебания амидной связи и валентных колебаний связи N-H ХТЗ

1154.41 см^{-1} - Колебания CO, представляющей сложноэфирную связь в ПКЛ

720 cm^{-1} - Растяжение $\text{C}=\text{C}$, соответствует колебаниям растяжения связей углерод-углерод ($\text{C}-\text{C}$) в цепи ПКЛ

Несмотря на наличие полос поглощения характерных для гомополимеров в смеси, этот факт не говорит о совместимости данных полимеров. Поэтому поскольку, получаемая пленочная композиция является полимерной смесью, необходимо было оценить ее однородность. Была исследована микроструктура пленки на электронном микроскопе. Из полученных фотографий видно (Рис.30), что полимеры распределены равномерно и отсутствуют видимые дефекты.

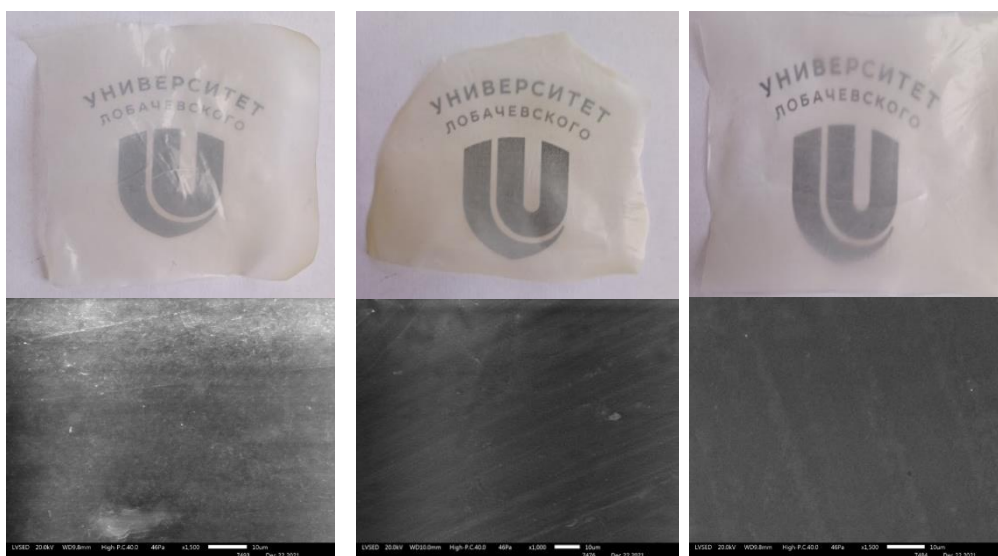


Рис. 30. – Фотографии пленок составов ХТЗ : ПЛА (1:2), ХТЗ : ПКЛ (1:2), ХТЗ : ПЛА : ПКЛ (1:1:1) соответственно

Другим доказательством совместимости полиэфиров с хитозаном служило понижение температуры плавления поликапролактона в смеси (Рис. 31). Данный эффект известен достаточно давно [257] и является доказательством совместимости полимеров в смесях. В исследовании были взяты только смесевые композиции с поликапролактоном, поскольку он кристаллический полимер и имеет температуру плавления по понижению которой можно судить о совместимости, а поскольку параметры растворимости

поликапролактона и полилактида близки по значению, при совместимости с одним из полиэфиров, можно говорить о совместимости и с другим.

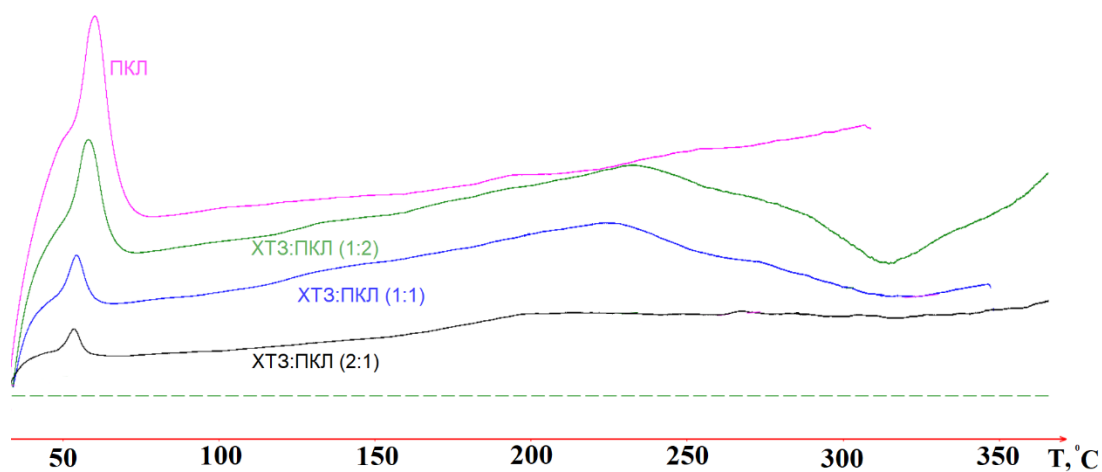


Рис. 31. – ДСК-кривые смесевых композиций хитозана с поликапролактоном

Из рисунка видно, что с увеличением доли хитозана в смеси, температура плавления понижается, что, по-видимому, объясняется уменьшением кристаллической фазы поликапролактона. Совокупность результатов микроскопии и ДСК исследований, позволяют говорить о совместимости хитозана с полиэфирами.

Хитозан во всех пленках с полиэфирами характеризуется аморфной структурой, о чем можно судить по отсутствию пиков характерных для рентгенограммы чистого хитозана (рис.32). Полностью аморфная структура характерна для пленки из хитозана и полилактида, поскольку последний является аморфным полимером. В противоположность полилактиду поликапролактон является кристаллическим полимером и в пленке с хитозаном сохраняет способность к образованию кристаллических структур, о чем свидетельствуют интенсивные пики в области 20 и 25 градусов, характерные для рентгенограмм полиэфира. В то же время, пленка из хитозана и обоих полиэфиров является аморфной.

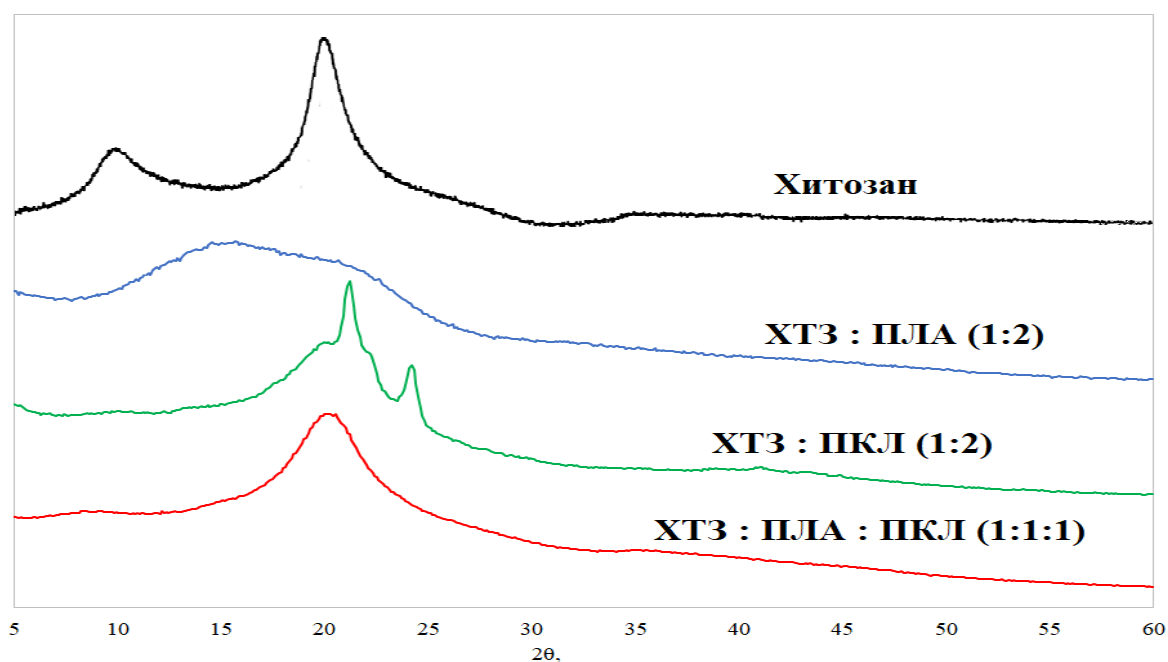


Рис.32. Рентгенофазовый анализ образцов

Материалы, используемые в тканевой инженерии, должны обладать механическими свойствами, сравнимыми с заменяемой тканью. Результаты измерения механических свойств пленок, приготовленных на основе смесевых композиций с различным соотношением компонентов представлены в (таблица 13).

Таблица 13. Физико-механические характеристики образцов

Состав композиции	Предел прочности при разрыве, σ (МПа)	Удлинение при разрыве, ϵ (%)
ХТЗ	14.4 ± 0.8	1.2 ± 0.1
ПЛА	53.8 ± 2.6	33.1 ± 1.8
ПКЛ	32.3 ± 1.5	45.9 ± 2.0
ХТЗ+ПЛА(1:1)	44.9 ± 2.3	9.6 ± 0.7
ХТЗ+ПЛА(1:2)	67.5 ± 3.1	19.2 ± 1.3

ХТЗ+ПКЛ(1:1)	37.4 ±1.7	14.4 ±1.2
ХТЗ+ПКЛ(1:2)	63.2 ±2.8	33.6 ±1.6
ХТЗ+ПЛА+ПКЛ(1:0.5:0.5)	42.1 ±2.1	12.2 ±1.1
ХТЗ+ПЛА+ПКЛ(1:1:1)	65.3 ±3.0	30.5 ±1.5

Как видно из результатов исследования механических свойств, введение полиэфиров значительно повышает механическую прочность и эластичность материалов по сравнению с пленками из чистого хитозана, причем введение ПЛА больше повышает предел прочности при разрыве, тогда как добавление ПКЛ значительно повышает эластичность. В то же время наличие в пленках хитозана, характеризующегося аморфной структурой, при соотношении ХТЗ:ПЭ - 1:1, приводит к «усреднению» механических свойств, а при соотношении ХТЗ:ПЭ - 1:2 приводит к повышению прочности на разрыв, значения которых превосходят значения для исходных гомополимеров.

Важно отметить, что в литературе не встречаются работы, где представлено введение значительной доли термопластичных полиэфиров к хитозану, поэтому достигнутый результат обуславливает возможность наличия термопластичности у полученных композиций.

Известно, что материалы из хитозана характеризуются проблематичностью формования изделий из них. Совмещение хитозана с термопластичными полиэфирами, обуславливает возможность переработки материала литьевыми методами. Была исследована термопластичность композиций на основе хитозана с полиэфирами в соотношении 1:2 по массе, соответственно.

С этой целью были получены гранулы из растворов смеси полимеров в ДМСО, с общей концентрацией 4.5 мас.%, добавлением его по каплям к водно-

спиртовому раствору 5% NaOH. Гранулы многократно обрабатывали водой для удаления щелочи и сушили до постоянной массы. Были определены показатели текучести расплавов (индекс расплавов) на установке XNR-400AM Melt Flow Indexer при температуре 130 °С (таблица 14).

Таблица 14. Значения ПТР для композиций

Образец	ПТР, г/10 мин
ХТЗ	-
ПКЛ	8
ПЛА	10
ХТЗ:ПЛА(1:2)	3
ХТЗ:ПКЛ (1:2)	3
ХТЗ : ПЛА : ПКЛ (1:1:1)	4

Несмотря на термопластичность, выявлено, что двухкомпонентные смеси хитозана с поликапролактоном или полилактидом при плавлении претерпевали фазовое расслоение, которое не наблюдалось для тройной системы: хитозан – полилактид – поликапролактон, что определило её как материал для формования филамента.

Гранулы из тройной системы смеси гомополимеров, загружали в лабораторный экструдер и при температуре 130 °С получали нить толщиной 1.75 мм (рис.33).

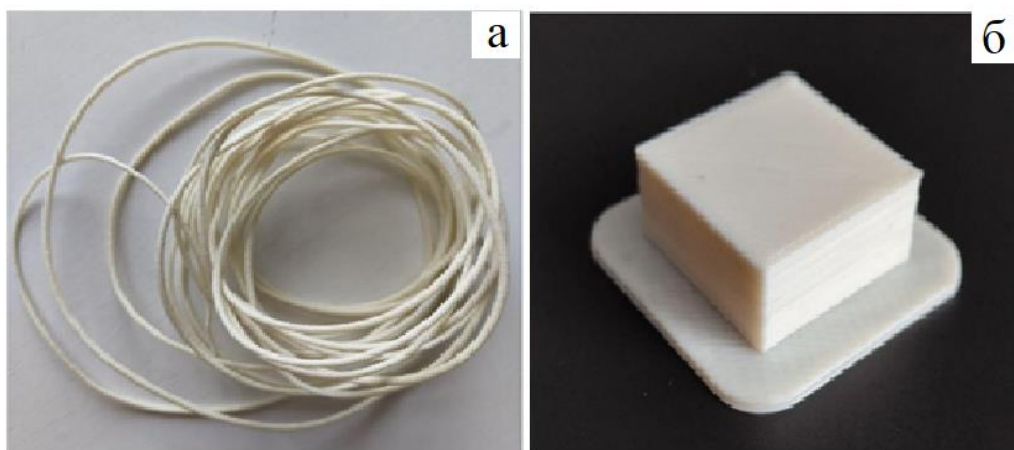


Рис. 33. Фотографии образца филамента состава ХТЗ :ПЛА : ПКЛ (1:1:1) (а), и объемного образца полученного из него (б)

Полученный филамент исследовали на возможность получения изделий методом 3D-печати.

Были проведены исследования печати в диапазоне температур от 120 до 180 °С.

В диапазоне 120-140 °С происходил выход филамента из экструдера, однако наблюдалась плохая межслоевая адгезия. При температуре выше 180 °С наблюдался перегрев филамента, что обусловлено процессами деградации хитозана. Оптимальные температуры для печати лежат в диапазоне 140-170 °С, когда печать проходила устойчиво.

Температура платформы не оказывала существенного влияния на качество печати, проверены температурные диапазоны от 25 до 65 °С. Оптимальной температурой можно определить диапазон 40-55 °С, при котором наблюдается наилучшая адгезия композиции к платформе.

Оптимальным параметром высоты слоя является 0,2 мм (при сопле 0.4) – при уменьшении толщины слоя наблюдался неустойчивый выход филамента из сопла, увеличение толщины приводило к необходимости поднимать температуру печати и уменьшению скорости печати.

Скорость печати проверялась в диапазоне от 10 мм/с до 90 мм/с. Наиболее стабильная печать наблюдалась при скоростях до 60 мм/с. Уменьшение скорости не приводило к значительному улучшению качества печати.

Таким образом решена задача получения материалов на основе хитозана с высокими механическими свойствами путем совмещения с биоразлагаемыми и биосовместимыми полиэфирами. Наилучшие физико-механические показатели, достигаются в композиции хитозана с двумя полиэфирами при равных массовых долях гомополимеров. Закономерно встает вопрос, какими биологическими свойствами (биосовместимость и биоразлагаемость) будут характеризоваться композиции хитозана с полиэфирами, поскольку последние характеризуются относительно низкой клеточной адгезией. О биосовместимости материала судили по результатам оценки клеточной адгезии и роста фибробластов.

Были проведены исследования пленок *in vitro* по адгезии и пролиферации клеток фибробластов в качестве предшественников образования соединительной ткани для образцов из чистого хитозана, хитозан-полилактид, и хитозан-поликапролактон, и тройной системы.

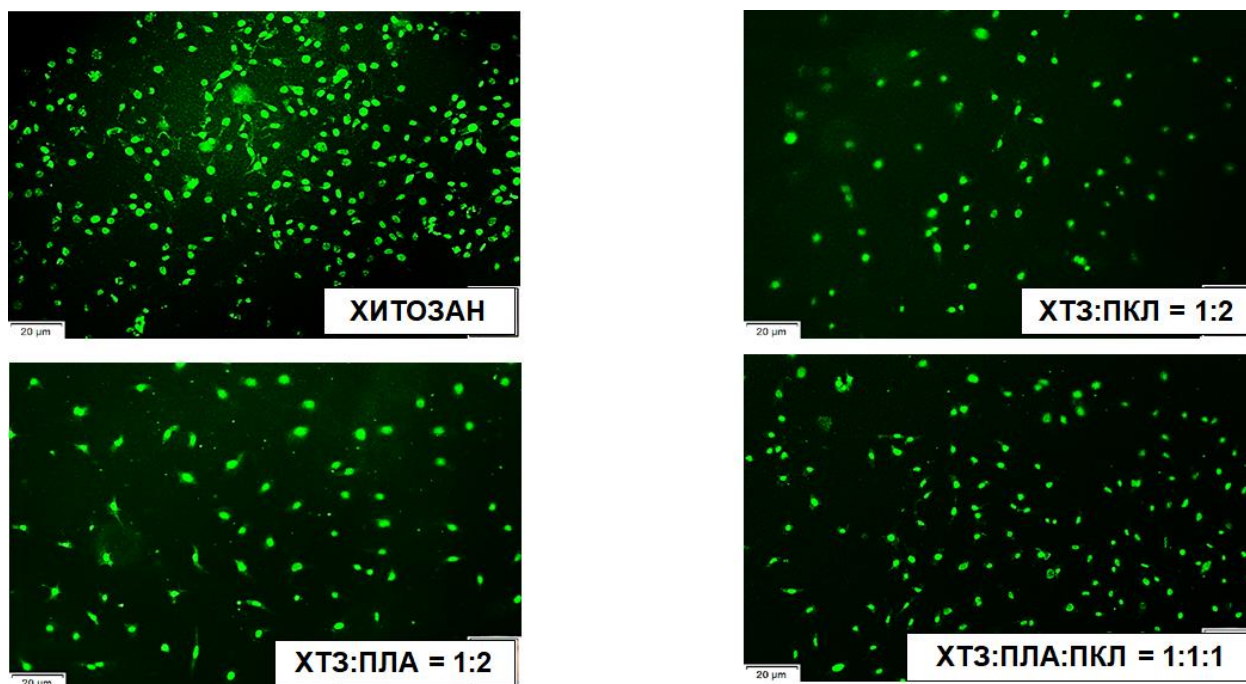


Рис. 34. Фотографии пленок после 24 часов инкубации клеток

На рисунке 34 представлены фотографии пленок после 24 часов инкубации клеток. Пленки на основе полиэфира без хитозана, обладали низкой клеточной адгезией по сравнению с чистым хитозаном. Материалы комбинированного состава являются нетоксичными для клеток, обладают достаточными адгезивными свойствами для прикрепления и развития клеток на их поверхности. Пленки на основе двухкомпонентных смесей характеризуются несколько худшим распределением фибробластов на поверхности, по сравнению с пленкой на основе трехкомпонентной системы, результаты для которой, несколько хуже, чем для исходного хитозана, однако сравнимы.

Поскольку пленки на основе тройной системы (хитозан-поликапролактон-полилактид) продемонстрировали лучшие результаты при анализе в скрининговом тесте, образцы этих пленок были исследованы на цитотоксичность и биосовместимость при длительном культивировании (МТТ-тест).

При оценке цитотоксичности мы руководствовались шкалой уровня цитотоксичности, где значения 0 и 1 соответствуют нетоксичным материалам; значение 2 - материалу с легкой степенью цитотоксичности; значение 3 - средней степени; и значения 4-5 - выраженной токсичности. Повышение уровня цитотоксичности через сутки после экстракции, но без сохранения цитотоксичности через 7 дней, обычно отражает влияние присутствия быстorableазгаемых компонентов или может указывать на недостаточную очистку материала перед исследованием.

Результаты, полученные для всех исследованных материалов, показывают оценку 0 или 1 как для 1-дневных экстрактов (таблица 15.1.), так и для 7-дневных экстрактов (таблица 15.2), соответствующую нулевой цитотоксичности. Отмечается что экстракты полимерных материалов на основе тройной смеси и для исходного хитозана, полученные в течение 1 дня, демонстрируют тенденцию стимулировать пролиферацию тест-культуры.

Таблица 15.1. Оценка цитотоксичности материалов после выдержки в 1 день.

Серия	Параметры	Состав композиции			
		Хитозан	ХТЗ:ПЛА (1:2)	ХТЗ:ПКЛ (1:2)	ХТЗ:Пэ (1:2)
Контроль (n = 8)	ОП (M ± m)	0.559 ± 0.018	0.627 ± 0.054	0.584 ± 0.022	0.679 ± 0.041
	ОИМ, %	100	100	100	100
	Ранг цитотоксичности	0	0	0	0
Экстракт (n = 8)	ОП (M ± m)	0.455 ± 0.08	0.524 ± 0.021	0.454 ± 0.029	0.537 ± 0.014
	ОИМ, %	122	119	129	126
	Ранг цитотоксичности	0	0	0	0
Экстракт 1:1 (n = 8)	ОП (M ± m)	0.496 ± 0.012	0.57 ± 0.041	0.517 ± 0.017	0.615 ± 0.023
	ОИМ, %	109	108	114	115
	Ранг цитотоксичности	0	0	0	0
Экстракт 1:2 (n = 8)	ОП (M ± m)	0.485 ± 0.016	0.602 ± 0.027	0.585 ± 0.013	0.674 ± 0.018
	ОИМ, %	106	115	129	126
	Ранг цитотоксичности	0	0	0	0
Экстракт 1:4 (n = 8)	ОП (M ± m)	0.507 ± 0.018	0.612 ± 0.028	0.533 ± 0.027	0.722 ± 0.022
	ОИМ, %	111	117	117	134
	Ранг цитотоксичности	0	0	0	0

Таблица 15.2. Оценка цитотоксичности материалов после выдержки в 7 день.

Серия	Параметры	Состав композиции			
		Хитозан	ХТЗ:ПЛА (1:2)	ХТЗ:ПКЛ (1:2)	ХТЗ:Пэ (1:2)
Контроль (n = 8)	ОП (M ± m)	0.494 ± 0.014	0.405 ± 0.021	0.427 ± 0.011	0.484 ± 0.023
	ОИМ, %	100	100	100	100
	Ранг цитотоксичности	0	0	0	0
Экстракт (n = 8)	ОП (M ± m)	0.472 ± 0.023	0.380 ± 0.010	0.386 ± 0.014	0.417 ± 0.016
	ОИМ, %	98	84	94	97
	Ранг цитотоксичности	0	0	0	0
Экстракт 1:1 (n = 8)	ОП (M ± m)	0.506 ± 0.014	0.385 ± 0.009	0.416 ± 0.012	0.483 ± 0.024
	ОИМ, %	103	125	99	125
	Ранг цитотоксичности	0	0	0	0
Экстракт 1:2 (n = 8)	ОП (M ± m)	0.481 ± 0.015	0.420 ± 0.013	0.429 ± 0.008	0.422 ± 0.010
	ОИМ, %	112	119	103	109
	Ранг цитотоксичности	0	0	0	0
Экстракт 1:4 (n = 8)	ОП (M ± m)	0.439 ± 0.013	0.367 ± 0.023	0.407 ± 0.007	0.417 ± 0.014
	ОИМ, %	118	103	100	95
	Ранг цитотоксичности	0	0	0	0

Из результатов исследования биологических свойств видно, что композиция, состоящая из трех гомополимеров, обладает не только лучшими

механическими свойствами, но и характеризуется хорошей клеточной адгезией и пролиферативной активностью.

Доля погибших клеток на всех исследуемых образцах практически не отличалась от контроля на пластике в течение 7 дней культивирования. Низкий процент погибших клеток свидетельствует об отсутствии цитотоксичности используемых композиций. Также выявлено, что клетки на всех образцах продолжают пролиферировать в течение 7 дней культивирования.

При визуализации клеток культуры ее характеристики через 72 часа инкубации с экстрактами образцов подтверждали результаты, полученные при проведении МТТ-теста. На рис.35 представлены репрезентативные фотографии тестовой культуры после инкубации с 1-суточным (рис.35 b) и 7-суточным экстрактами (рис.35 d) по сравнению с контролем (рис 35 а, с). В контрольных лунках фиксировался субконфлюэнтный монослой, образованный клетками типичной веретеновидной формы, характерной для фибробластов. При сравнении клеток в контрольных лунках и клеток, которые взаимодействовали с экстрактами исследуемых образцов, можно было отметить определенные различия. Так конфлюэнтность монослоя в лунках с 1-суточным экстрактом была значительно меньше. Морфологически клетки были не однородны: наряду с типичными веретеновидными клетками фиксировалось незначительное количество клеток с измененной морфологией, в том числе “ошареных” клеток. Кроме того, можно было увидеть большое количество клеточного детрита. После взаимодействия с 7-суточным экстрактом клетки культуры не достигали полной конфлюэнтности, но монослой был визуальнее плотнее, по сравнению с культурой клеток после взаимодействия с 1-суточным экстрактом. Морфологическая неоднородность клеток в опытных лунках сохранялась. Форма клеток варьировала от веретеновидной до шарообразной. Плотность монослоя и изменение морфологии клеток не зависели от разведения экстрактов. В качестве примера

на рисунке 35 представлены репрезентативные фотографии клеток после взаимодействия с 1-суточным и 7-суточными экстрактами.

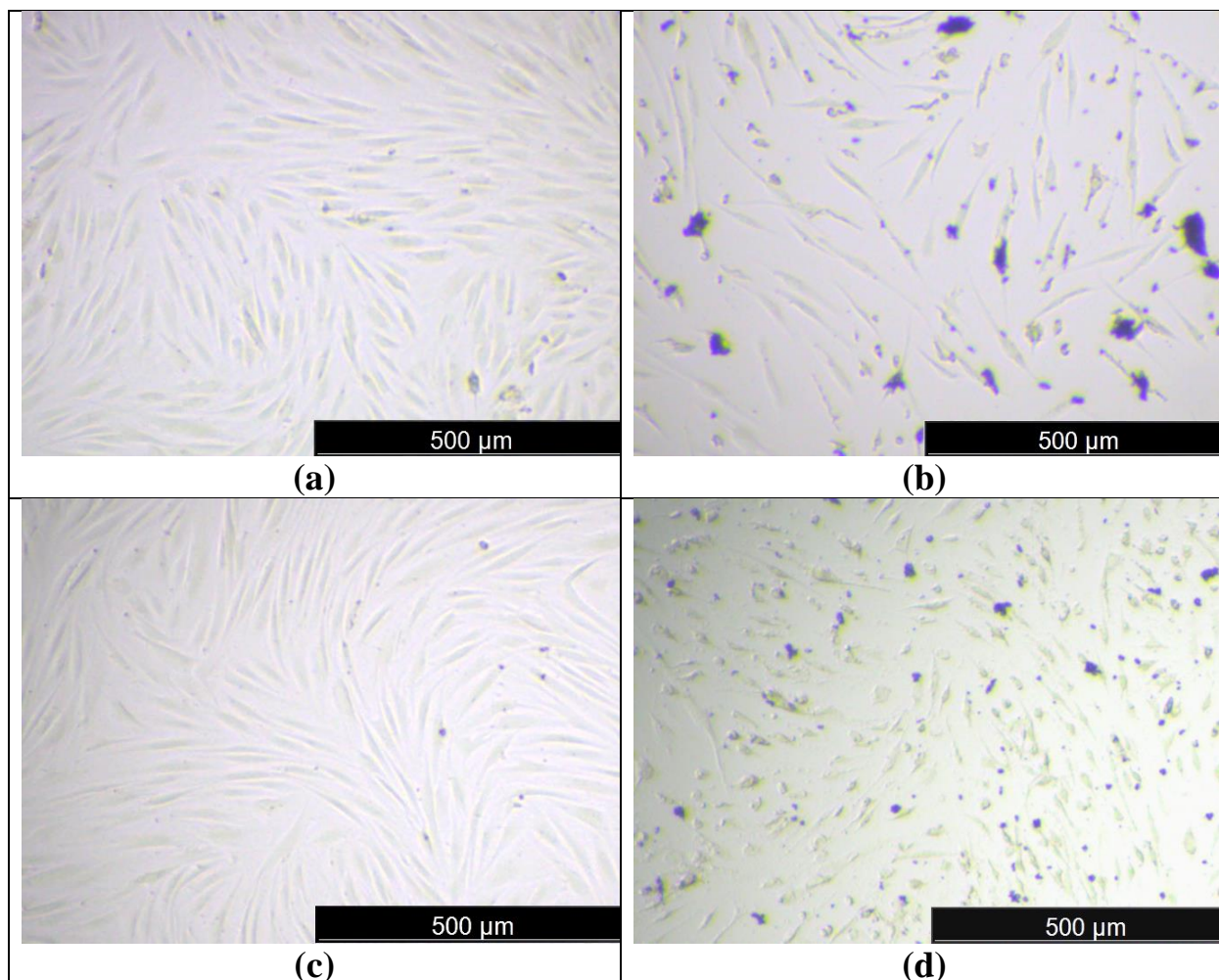


Рис.35. Дермальные фибробласты человека после 72-часовой инкубации с экстрактами. Репрезентативные фотографии: (а, с) – клетки в контрольных лунках; (b) – клетки после взаимодействия с 1-суточным экстрактом, (d) – клетки после взаимодействия с 7-суточным экстрактом.

При визуализации клеток через 24 часа культивирования на поверхности образцов исследуемого материала фиксировалась адгезия клеток к поверхности. По-видимому, выявленное ранее отсутствие полной конфлюэнтности экстракта образцов не является критичной для начального этапа прикрепления клеток к поверхности. В то же время количественный анализ показал, что доля жизнеспособных клеток среди прикрепившихся была

незначительно снижена по сравнению с долей жизнеспособных клеток в контрольных лунках (Таблица 15). Состояние клеток на поверхности образцов и на пластике иллюстрируется на рис. 36.

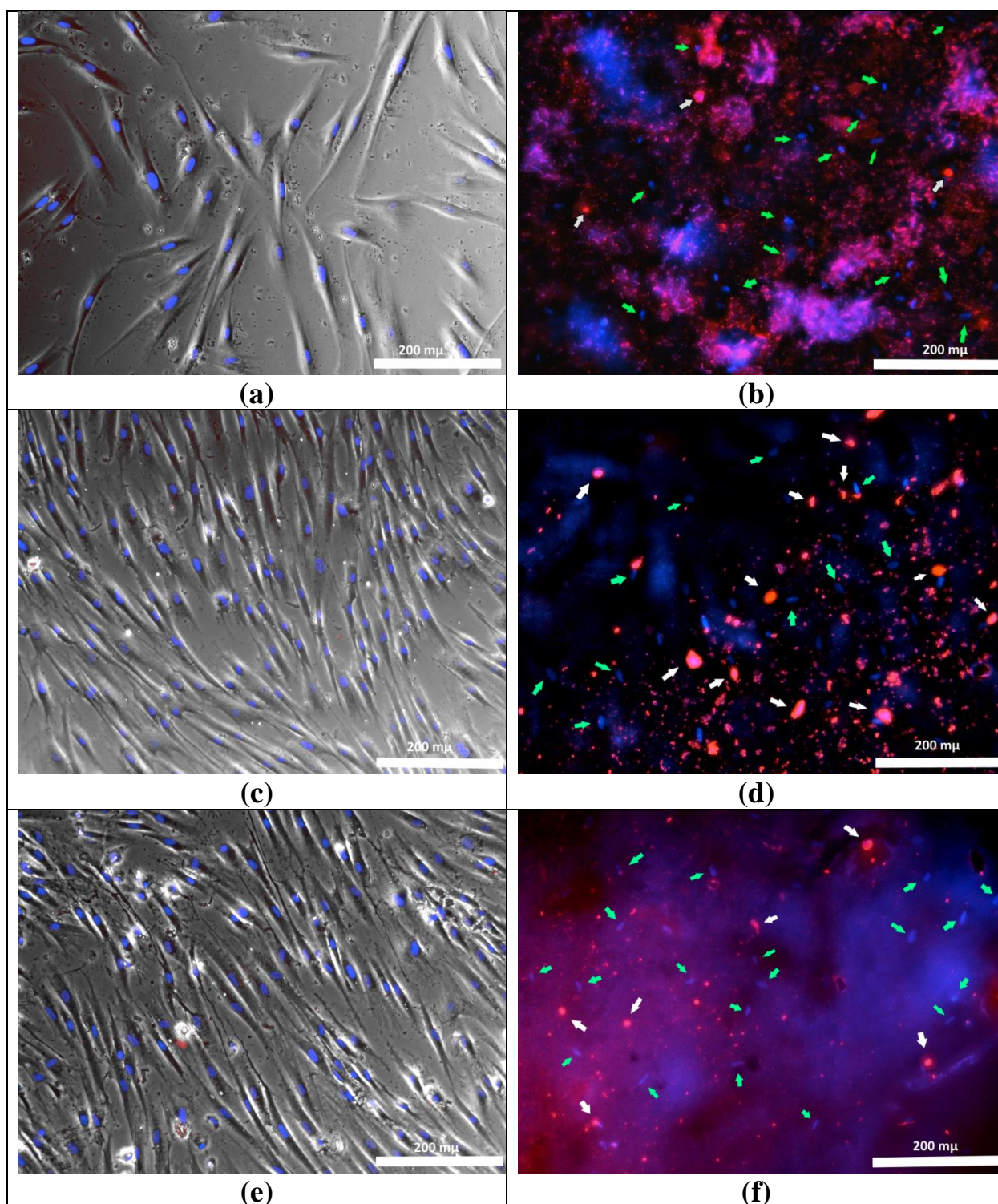


Рис. 36. Оценка жизнеспособности и пролиферативной активности клеток. Репрезентативные фотографии. (a) – контроль 1 сутки, (b) – опыт 1 сутки, (c) – контроль 3 сутки, (d) – опыт 3 сутки, (e) – контроль 7 сутки, (f) – опыт 7

сутки. Синим, окрашены ядра клеток (флуоресцентный краситель Hoechst 3334). Красным, окрашены ядра мертвых клеток (флуоресцентный краситель TO-PRO™3 Ready Flow™). Зелёными стрелками обозначены живые клетки, белыми – мёртвые.

Клетки тестовой культуры (ДФЧ) на пластике уже к 3 суткам достигали состояния субконфлюэнтного монослоя. На 7 сутки их количество не отличалось от количества клеток, определяемого на 3 сутки исследования, что было связано с известным эффектом зависящего от плотности торможения.

Таким образом, разработана однородная композиция на основе смеси трех гомополимеров (хитозан – полилактид – поликапролактон), которая обладает высокими механическими свойствами, хорошей биологической активностью, а также термопластичностью, что перспективно для получения изделий методом 3D-печати в регенеративной медицине. Данные автора по синтезу и исследованию биоразлагаемых, биосовместимых композиций на основе хитозана и смесей с полилактидом и поликапролактоном представлены в опубликованных работах [258-261].

ВЫВОДЫ

1. Разработан новый метод получения трехмерных высокопористых образцов на основе хитозана со степенью пористости 85–88%. Материалы являются биоразлагаемыми, биосовместимыми и перспективны в качестве органической составляющей скаффолдов.

2. Синтезирован N-гепталиден хитозана и изучены его свойства. Модифицированный хитозан характеризуется высокими механическими свойствами (предел прочности при разрыве до 100 МПа при относительном удлинении до 10%), биосовместимостью и биоразлагаемостью. Материалы могут быть использованы для регенерации поврежденных тканей.

3. Разработан новый метод синтеза салицилата титана; продукт характеризуется устойчивостью к влаге воздуха и высоким температурам, растворим в органических растворителях. Салицилат титана является эффективным катализатором ROP-полимеризации циклических эфиров с образованием высокомолекулярного продукта с низким параметром полидисперности.

4. Получены однородные термопластичные композиции на основе хитозана и биоразлагаемых полиэфиров (поли-D,L-лактид, поли(ϵ -капролактон)). Образцы характеризуются высокими механическими свойствами (предел прочности до 70 МПа при относительном удлинении 25–30%) и биосовместимостью. Материалы удовлетворяют требованиям для получения изделий методами аддитивных технологий.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ХТЗ – хитозан

ПЛА – полилактид

ПКЛ – поликапролактон

МК – молочная кислота

ЭА – энантовый альдегид

ДМСО - диметилсульфоксид

РФА – рентгенофазовый анализ

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

СЭМ – сканирующий электронный микроскоп

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nerem R. M. Regenerative medicine: the emergence of an industry // *Journal of the Royal Society Interface*. – 2010. – Vol. 7. – No. 6. – P.771-775.
2. Chocholata P., Kulda V., Babuska V. Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration // *Materials*. – 2019. – Vol. 12. – No. 4. – P. 568.
3. Khademhosseini A., Langer R. A decade of progress in tissue engineering // *Nature Protocols*. – 2016. – Vol. 11. – No. 10. – P. 1775-1781.
4. Huzum B., Puha B., Necoara R., Gheorghevici S., Puha G., Filip A., Sirbu P., Alexa O. Biocompatibility assessment of biomaterials used in orthopedic devices: An overview (Review) // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2021. – Vol. 22. – No. 5. – P. 1315.
5. Bruinink A., Luginbuehl R. Evaluation of Biocompatibility Using In Vitro Methods: Interpretation and Limitations // *Tissue Engineering III: Cell - Surface Interactions for Tissue Culture : Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology/* Ed. P. Kasper, F. Witte, R. Pörtner. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. – Vol.126. – Evaluation of Biocompatibility Using In Vitro Methods. – P. 117-152.
6. Del Bakhshayesh A.R., Asadi N., Alihemmati A., Tayefi Nasrabadi H., Montaseri A., Davaran S., Saghati S., Akbarzadeh A., Abedelahi A. An overview of advanced biocompatible and biomimetic materials for creation of replacement structures in the musculoskeletal systems: focusing on cartilage tissue engineering // *Journal of Biological Engineering*. – 2019. – Vol. 13. – No. 1. – P. 85.
7. Asadi N., Del Bakhshayesh A.R., Davaran S., Akbarzadeh A. Common biocompatible polymeric materials for tissue engineering and regenerative medicine // *Materials Chemistry and Physics*. – 2020. – Vol. 242. – 122528.
8. Terzopoulou Z., Zamboulis A., Koumentakou I., Michailidou G., Noordam M.J., Bikiaris D.N. Biocompatible Synthetic Polymers for Tissue Engineering Purposes // *Biomacromolecules*. – 2022. – Vol. 23. – No. 5. – P. 1841-1863.
9. Arif U., Haider S., Haider A., Khan N., Alghyamah A.A., Jamila N., Khan I.M., Almasry A.W., Kang I.-K. Biocompatible Polymers and their Potential Biomedical Applications: A Review // *Current Pharmaceutical Design*. – 2019. – Vol. 25. – No. 34. – P. 3608-3619.
10. Asghari F., Samiei M., Adibkia K., Akbarzadeh A., Davaran S. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review // *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. – 2017. – Vol. 45. – No. 2. – P. 185-192.
11. Shanmugam D.K., Anitha S.P., Souresh V., Madhavan Y., Sampath S., Catakapatri Venugopal D., Saravanan M. Current advancements in the development

of bionic organs using regenerative medicine and 3D tissue engineering // *Materials Technology*. – 2023. – Vol. 38. – No. 1. – P. 2242732.

12. Ishihara K. Successful Development of Biocompatible Polymers Designed by Nature's Original Inspiration // *The International Conference on Innovation in Polymer Science and Technology*. – 2012. – Vol. 4. – P. 34-38.

13. Kawakami H. Polymeric membrane materials for artificial organs // *Journal of Artificial Organs*. – 2008. – Vol. 11. – P. 177-181.

14. Guo L., Liang Z., Yang L., Du W., Yu T., Tang H., Li P., Qiu H. The role of natural polymers in bone tissue engineering // *Journal of Controlled Release*. – 2021. – Vol. 338. – P. 571-582.

15. Hamdy T.M. Dental Biomaterial Scaffolds in Tooth Tissue Engineering: a Review // *Current Oral Health Reports*. – 2023. – Vol. 10. – No. 1. – P. 14-21.

16. Roach P., Eglin D., Rohde K., Perry P.P. Modern biomaterials: a review—bulk properties and implications of surface modifications // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2007. – Vol. 18. – No. 7. – P. 1263-1277.

17. Othman Z., Cillero Pastor B., van Rijt S., Habibovic P. Understanding interactions between biomaterials and biological systems using proteomics // *Biomaterials*. – 2018. – Vol. 167. – P. 191-204.

18. Du J., Katti D., Thomas V. Interactions between Biomaterials and Biological Tissues and Cells, Part I // *JOM*. – 2022. – Vol. 74. – No. 9. – P. 3334-3335.

19. Capurro M., Barberis F. 9 - Evaluating the mechanical properties of biomaterials // *Biomaterials for Bone Regeneration/* Ed. P. Dubruel, S. Van Vlierberghe. – Woodhead Publishing, 2014. – P. 270-323.

20. Roeder R.K. Chapter 3 - Mechanical Characterization of Biomaterials // *Characterization of Biomaterials/* Ed. A. Bandyopadhyay, S. Bose. – Oxford: Academic Press, 2013. – P. 49-104.

21. Hsu S., Xu J., Lin S.-H., Wu S.-D., Cheng Q.-P., Wong P.-W. Creative transformation of biomedical polyurethanes: from biostable tubing to biodegradable smart materials // *Journal of Polymer Research*. – 2022. – Vol. 29. – No. 2. – P. 70.

22. Atwa A., Sofy M.R., Fakhrelden S.M., Darwish O., Mehany A.B.M., Sofy A.R., Bakry S. Biodegradable Materials from Natural Origin for Tissue Engineering and Stem Cells Technologies // *Handbook of Biodegradable Materials/* Ed. G.A.M. Ali, A.S.H. Makhlof. – Cham: Springer International Publishing, 2023. – P. 1133-1172.

23. Paxton N.P., Allenby M.P., Lewis P.M., Woodruff M.A. Biomedical applications of polyethylene // *European Polymer Journal*. – 2019. – Vol. 118. – P. 412-428.

24. Roina Y., Auber F., Hocquet D., Herlem G. ePTFE functionalization for medical applications // *Materials Today Chemistry*. – 2021. – Vol. 20. – P. 100412.
25. Ángel Serrano-Aroca, Sanjukta Deb *Acrylic-Based Materials for Biomedical and Bioengineering Applications // Acrylate Polymers for Advanced Applications/ Ed. Ángel Serrano-Aroca, Sanjukta Deb. – Rijeka: IntechOpen, 2020. – P. 49-69*
26. Geevarghese R., Sajjadi S.S., Hudecki A., Sajjadi S., Jalal N.R., Madrakian T., Ahmadi M., Włodarczyk-Biegun M.K., Ghavami S., Likus W., Siemianowicz K., Łos M.J. Biodegradable and Non-Biodegradable Biomaterials and Their Effect on Cell Differentiation // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – No. 24. – P. 16185.
27. Ozawa T., Mickle D.A.G., Weisel R.D., Koyama N., Wong H., Ozawa S., Li R.-K. Histologic changes of nonbiodegradable and biodegradable biomaterials used to repair right ventricular heart defects in rats // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. – 2002. – Vol. 124. – No. 6. – P. 1157-1164.
28. Simmons A., Hyvarinen J., Odell R.A., Martin D.J., Gunatillake P.A., Noble K.R., Poole-Warren L.A. Long-term in vivo biostability of poly(dimethylsiloxane)/poly(hexamethylene oxide) mixed macrodiol-based polyurethane elastomers // *Focus on Biomaterials Science in Australia*. – 2004. – Vol. 25. – No. 20. – P. 4887-4900.
29. Veleirinho B., Berti F.V., Dias P.F., Maraschin M., Ribeiro-do-Valle R.M., Lopes-da-Silva J.A. Manipulation of chemical composition and architecture of non-biodegradable poly(ethylene terephthalate)/chitosan fibrous scaffolds and their effects on L929 cell behavior // *Materials Science and Engineering: P*. – 2013. – Vol. 33. – No. 1. – P. 37-46.
30. Hudecki A., Kiryczyński G., Łos M.J. Chapter 7 - Biomaterials, Definition, Overview // *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine/ Ed. M.J. Łos, A. Hudecki, E. Wiecheć. – Academic Press, 2019. – P. 85-98.*
31. Schneider K.H., Goldberg B.J., Hasturk O., Mu X., Dötzlhofer M., Eder G., Theodossiou S., Pichelkastner L., Riess P., Rohringer S., Kiss H., Teuschl-Woller A.H., Fitzpatrick V., Enayati M., Podesser B.K., Bergmeister H., Kaplan D.L. Silk fibroin, gelatin, and human placenta extracellular matrix-based composite hydrogels for 3D bioprinting and soft tissue engineering // *Biomaterials Research*. – 2023. – Vol. 27. – No. 1. – P. 117.
32. Jin M., Shi J., Zhu W., Yao H., Wang D.-A. Polysaccharide-Based Biomaterials in Tissue Engineering: A Review // *Tissue Engineering Part B: Reviews*. – 2021. – Vol. 27. – No. 6. – P. 604-626.
33. Guo B., Ma P.X. Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review // *Science China Chemistry*. – 2014. – Vol. 57. – No. 4. – P. 490-500.

34. Manavitehrani I., Fathi A., Badr H., Daly S., Negahi Shirazi A., Dehghani F. Biomedical Applications of Biodegradable Polyesters // *Polymers*. – 2016. – Vol. 8. – No. 1. – P. 20.
35. MacQueen L.A., Alver P.G., Chantre P.O., Ahn S., Cera L., Gonzalez G.M., O'Connor B.B., Drennan D.J., Peters M.M., Motta S.E., Zimmerman J.F., Parker K.K. Muscle tissue engineering in fibrous gelatin: implications for meat analogs // *npj Science of Food*. – 2019. – Vol. 3. – No. 1. – P. 20.
36. Belsky K., Smiell J. Navigating the Regulatory Pathways and Requirements for Tissue-Engineered Products in the Treatment of Burns in the United States // *Journal of Burn Care & Research*. – 2021. – Vol. 42. – No. 4. – P. 774-784.
37. Webber M.J., Khan O.F., Sydlik S.A., Tang B.P., Langer R. A Perspective on the Clinical Translation of Scaffolds for Tissue Engineering // *Annals of Biomedical Engineering*. – 2015. – Vol. 43. – No. 3. – P. 641-656.
38. Gillman P.E., Jayasuriya A.P. FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration // *Materials Science and Engineering: P*. – 2021. – Vol. 130. – P. 112466.
39. Kim Y., Zharkinbekov Z., Raziyeva K., Tabyldiyeva L., Berikova K., Zhumagul D., Temirkhanova K., Saparov A. Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Regeneration // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15. – No. 3. – P. 807.
40. Shahverdi M., Seifi S., Akbari A., Mohammadi K., Shamloo A., Movahhedy M.R. Melt electrowriting of PLA, PCL, and composite PLA/PCL scaffolds for tissue engineering application // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12. – No. 1. – P. 19935.
41. Younes I., Rinaudo M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications // *Marine Drugs*. – 2015. – Vol. 13. – No. 3. – P. 1133-1174.
42. Sudhakar Y. N., Selvakumar M., Bhat D. K. Biopolymer electrolytes: fundamentals and applications in energy storage. – Elsevier, 2018.
43. Kertmen A., Ehrlich H. Patentology of chitinous biomaterials. Part I: Chitin // *Carbohydrate Polymers*. – 2022. – Vol. 282. – P. 119102.
44. Kertmen A., Dziedzic I., Ehrlich H. Patentology of chitinous biomaterials. Part II: chitosan // *Carbohydrate Polymers*. – 2023. – Vol. 301. – P. 120224.
45. Maliki S., Sharma G., Kumar A., Moral-Zamorano M., Moradi O., Baselga J., Stadler F.J., García-Peñas A. Chitosan as a Tool for Sustainable Development: A Mini Review // *Polymers*. – 2022. – Vol. 14. – No. 7. – P. 1475.
46. Солдатов П.Ю. Разработка технологии получения хитозана из панцирьсодержащего сырья // *Вестник Нижневартковского государственного университета*. – 2015. – №. 1. – P. 48-56.

47. Li Q., Dunn E.T., Grandmaison E.W., Goosen M.F.A. Applications and Properties of Chitosan // *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. – 1992. – Vol. 7. – No. 4. – P. 370-397.
48. Yuan Y., Chesnutt B.M., Haggard W.O., Bumgardner J.D. Deacetylation of Chitosan: Material Characterization and in vitro Evaluation via Albumin Adsorption and Pre-Osteoblastic Cell Cultures // *Materials*. – 2011. – Vol. 4. – No. 8. – P. 1399-1416.
49. Zhao X., Tang J., Liu Y., Hu B., Chen Q., Liu Y. Reaction kinetics of chitosan nanogels crosslinked by genipin // *Journal of Chromatography A*. – 2023. – Vol. 1710. – P. 464427.
50. Wijesena R.N., Tissera N., Kannangara Y.Y., Lin Y., Amaratunga G.A.J., de Silva K.M.N. A method for top down preparation of chitosan nanoparticles and nanofibers // *Carbohydrate Polymers*. – 2015. – Vol. 117. – P. 731-738.
51. Kawamura Y., Yoshida H., Asai S., Kurahashi I., Tanibe H. Effects of Chitosan Concentration and Precipitation Bath Concentration on the Material Properties of Porous Crosslinked Chitosan Beads // *Separation Science and Technology*. – 1997. – Vol. 32. – No. 12. – P. 1959-1974.
52. Takara E.A., Marchese J., Ochoa N.A. NaOH treatment of chitosan films: Impact on macromolecular structure and film properties // *Carbohydrate Polymers*. – 2015. – Vol. 132. – P. 25-30.
53. Dong Y., Ruan Y., Wang H., Zhao Y., Bi D. Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2004. – Vol. 93. – No. 4. – P. 1553-1558.
54. Makarios-Laham I., Lee T.-P. Biodegradability of chitin- and chitosan-containing films in soil environment // *Journal of environmental polymer degradation*. – 1995. – Vol. 3. – No. 1. – P. 31-36.
55. Vikhoreva G.A., Kil'deeva N.R., Ustinov M.Yu., Nochevkina Yu.N. Fabrication and Study of the Degradability of Chitosan Films // *Fibre Chemistry*. – 2002. – Vol. 34. – No. 6. – P. 407-411.
56. Kaya B., Zorba N.N., Caner P. Development of novel biodegradable film based on chitosan with borax (sodium tetraborate) and boron nitride and their biological activity // *International Journal of Food Science & Technology*. – 2023. – Vol. 58. – No. 2. – P. 890-897.
57. Rao S.B., Sharma P.P. Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1997. – Vol. 34. – No. 1. – P. 21-28.
58. Baldrick P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. – 2010. – Vol. 56. – No. 3. – P. 290-299.

59. Chien R.-P., Yen M.-T., Mau J.-L. Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – Vol. 138. – P. 259-264.
60. Malette W.G., Quigley H.J., Gaines R.D., Johnson N.D., Rainer W.G. Chitosan: A New Hemostatic // *The Annals of Thoracic Surgery*. – 1983. – Vol. 36. – No. 1. – P. 55-58.
61. Hu Z., Zhang D.-Y., Lu S.-T., Li P.-W., Li S.-D. Chitosan-Based Composite Materials for Prospective Hemostatic Applications // *Marine Drugs*. – 2018. – Vol. 16. – No. 8. – P. 273.
62. Fan P., Zeng Y., Zaldivar-Silva D., Agüero L., Wang S. Chitosan-Based Hemostatic Hydrogels: The Concept, Mechanism, Application, and Prospects // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – No. 3. – P. 1473.
63. Apryatina K.V., Koryagin A.S., Smirnova O.N., Smirnova L.A. Hemostatic Compositions Based on Chitosan Complexes with Calcium Ions // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2021. – Vol. 54. – No. 12. – P. 1269-1273.
64. Mourya V.K., Inamdar N.N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore // *Reactive and Functional Polymers*. – 2008. – Vol. 68. – No. 6. – P. 1013-1051.
65. Bandara S., Du H., Carson L., Bradford D., Kommalapati R. Agricultural and Biomedical Applications of Chitosan-Based Nanomaterials // *Nanomaterials*. – 2020. – Vol. 10. – No. 10. – P. 1903.
66. Román-Doval R., Torres-Arellanes S.P., Tenorio-Barajas A.Y., Gómez-Sánchez A., Valencia-Lazcano A.A. Chitosan: Properties and Its Application in Agriculture in Context of Molecular Weight // *Polymers*. – 2023. – Vol. 15. – No. 13. – P. 2867.
67. Saheed I.O., Oh W.D., Suah F.B.M. Chitosan modifications for adsorption of pollutants – A review // *Journal of Hazardous Materials*. – 2021. – Vol. 408. – P. 124889.
68. Liu X., Zhao X., Liu Y., Zhang T. Review on preparation and adsorption properties of chitosan and chitosan composites // *Polymer Bulletin*. – 2022. – Vol. 79. – No. 4. – P. 2633-2665.
69. Kyzas G.Z., Bikiaris D.N. Recent Modifications of Chitosan for Adsorption Applications: A Critical and Systematic Review // *Marine Drugs*. – 2015. – Vol. 13. – No. 1. – P. 312-337.
70. Allouche F.-N., Yassaa N., Lounici H. Sorption of Methyl Orange from Aqueous Solution on Chitosan Biomass // *World Multidisciplinary Earth Sciences Symposium, WMESS 2015*. – 2015. – Vol. 15. – P. 596-601.

71. Guzmán E., Ortega F., Rubio R.G. Chitosan: A Promising Multifunctional Cosmetic Ingredient for Skin and Hair Care // *Cosmetics*. – 2022. – Vol. 9. – No. 5. – P. 99.
72. Manigandan V., Karthik R., Ramachandran S., Rajagopal S. Chapter 15 - Chitosan Applications in Food Industry // *Biopolymers for Food Design/ Ed. A.M. Grumezescu, A.M. Holban*. – Academic Press, 2018. – P. 469-491.
73. Harkin P., Mehlmer N., Woortman D.V., Brück T.B., Brück W.M. Nutritional and Additive Uses of Chitin and Chitosan in the Food Industry // *Sustainable Agriculture Reviews 36: Chitin and Chitosan: Applications in Food, Agriculture, Pharmacy, Medicine and Wastewater Treatment/ Ed. G. Crini, E. Lichtfouse*. – Cham: Springer International Publishing, 2019. – P. 1-43.
74. Tang W., Wang J., Hou H., Li Y., Wang J., Fu J., Lu L., Gao D., Liu Z., Zhao F., Gao X., Ling P., Wang F., Sun F., Tan H. Review: Application of chitosan and its derivatives in medical materials // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2023. – Vol. 240. – P. 124398.
75. Sukul M., Sahariah P., Lauzon H.L., Borges J., Másson M., Mano J.F., Haugen H.J., Reseland J.E. In vitro biological response of human osteoblasts in 3D chitosan sponges with controlled degree of deacetylation and molecular weight // *Carbohydrate Polymers*. – 2021. – Vol. 254. – P. 117434.
76. Archana D., Dutta J., Dutta P.K. Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: Characterization, in vitro and in vivo studies // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2013. – Vol. 57. – P. 193-203.
77. Abd-Allah H., Nasr M., Ahmed-Farid O.A.H., El-Marasy S.A., Bakeer R.M., Ahmed R.F. Biological and Pharmacological Characterization of Ascorbic Acid and Nicotinamide Chitosan Nanoparticles against Insulin-Resistance-Induced Cognitive Defects: A Comparative Study // *ACS Omega*. – 2021. – Vol. 6. – No. 5. – P. 3587-3601.
78. Zhao X., Liu Y., Jia P., Cheng H., Wang P., Chen S., Huang H., Han Z., Han Z.-P., Marycz K., Chen X., Li Z. Chitosan hydrogel-loaded MSC-derived extracellular vesicles promote skin rejuvenation by ameliorating the senescence of dermal fibroblasts // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2021. – Vol. 12. – No. 1. – P. 196.
79. Li X., Yang Y., Yang F., Wang F., Li H., Tian H., Wang G. Chitosan hydrogel loaded with recombinant protein containing epitope C from HSP90 of *Candida albicans* induces protective immune responses against systemic candidiasis // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – Vol. 173. – P. 327-340.
80. Mizuno K., Yamamura K., Yano K., Osada T., Saeki S., Takimoto N., Sakurai T., Nimura Y. Effect of chitosan film containing basic fibroblast growth factor on

wound healing in genetically diabetic mice // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2003. – Vol. 64A. – No. 1. – P. 177-181.

81. Thakhiew W., Champahom M., Devahastin S., Soponronnarit S. Improvement of mechanical properties of chitosan-based films via physical treatment of film-forming solution // *Journal of Food Engineering*. – 2015. – Vol. 158. – P. 66-72.

82. Albanna M.Z., Bou-Akl T.H., Blowytsky O., Walters H.L., Matthew H.W.T. Chitosan fibers with improved biological and mechanical properties for tissue engineering applications // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. – 2013. – Vol. 20. – P. 217-226.

83. Shi P., Zhu Y., Ran X., Wang M., Su Y., Cheng T. Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine¹ ¹This work was supported by “973” programs on severe trauma (NO. 1999054205 and NO. 2005CB522605) from the Ministry of Science and Technology of China. // *Journal of Surgical Research*. – 2006. – Vol. 133. – No. 2. – P. 185-192.

84. Laurencin T.P., Jiang T., Kumbar G.S., Nair S.L. Biologically Active Chitosan Systems for Tissue Engineering and Regenerative Medicine // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2008. – Vol. 8. – No. 4. – P. 354-364.

85. Venkatesan J., Kim S.-K. Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering—An Overview // *Marine Drugs*. – 2010. – Vol. 8. – No. 8. – P. 2252-2266.

86. Yang L., Zhao X., Zhang J., Ma S., Jiang L., Wei Q., Cai M., Zhou F. Synthesis of charged chitosan nanoparticles as functional biolubricant // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2021. – Vol. 206. – P. 111973.

87. Wang H., Qian J., Ding F. Emerging Chitosan-Based Films for Food Packaging Applications // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2018. – Vol. 66. – No. 2. – P. 395-413.

88. Flórez M., Guerra-Rodríguez E., Cazón P., Vázquez M. Chitosan for food packaging: Recent advances in active and intelligent films // *Food Hydrocolloids*. – 2022. – Vol. 124. – P. 107328.

89. Haghghi H., Licciardello F., Fava P., Siesler H.W., Pulvirenti A. Recent advances on chitosan-based films for sustainable food packaging applications // *Food Packaging and Shelf Life*. – 2020. – Vol. 26. – P. 100551.

90. Priyadarshi R., Rhim J.-W. Chitosan-based biodegradable functional films for food packaging applications // *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. – 2020. – Vol. 62. – P. 102346.

91. Zhou X., Liu P., Han Y., Li P., Liu S., Li X., Zhao G., Jiang Y. An antibacterial chitosan-based hydrogel as a potential degradable bio-scaffold for alveolar ridge preservation // *RSC Advances*. – 2022. – Vol. 12. – No. 50. – P. 32219-32229.

92. Li Y., Chi Y.-Q., Yu P.-H., Xie Y., Xia M.-Y., Zhang P.-L., Han X., Peng Q. Drug-free and non-crosslinked chitosan scaffolds with efficient antibacterial activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria // *Carbohydrate Polymers*. – 2020. – Vol. 241. – P. 116386.
93. Song X., Hu Y., Qi H., Yan Z. Electrophoretic Deposition and Corrosion Resistance of TiB₂-Chitosan Coating on 6Cr13 Martensitic Stainless Steel // *Coatings*. – 2022. – Vol. 12. – No. 11. – P. 1662.
94. Li X., Ma X.-Y., Feng Y.-F., Ma Z.-S., Wang J., Ma T.-P., Qi W., Lei W., Wang L. Osseointegration of chitosan coated porous titanium alloy implant by reactive oxygen species-mediated activation of the PI3K/AKT pathway under diabetic conditions // *Biomaterials*. – 2015. – Vol. 36. – P. 44-54.
95. Yang S., Liu X., Zeng X., Xia B., Gu J., Luo S., Mai N., Wei W. Fabrication of nano-copper/carbon nanotubes/chitosan film by one-step electrodeposition and its sensitive determination of nitrite // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2010. – Vol. 145. – No. 2. – P. 762-768.
96. Bumgardner J.D., Wisner R., Elder S.H., Jouett R., Yang Y., Ong J.L. Contact angle, protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to chitosan coatings bonded to titanium // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2003. – Vol. 14. – No. 12. – P. 1401-1409.
97. Cui Z., Beach E.S., Anastas P.T. Modification of chitosan films with environmentally benign reagents for increased water resistance // *Green Chemistry Letters and Reviews*. – 2011. – Vol. 4. – No. 1. – P. 35-40.
98. Chen P., Xie F., Tang F., McNally T. Influence of plasticiser type and nanoclay on the properties of chitosan-based materials // *European Polymer Journal*. – 2021. – Vol. 144. – P. 110225.
99. Choi W.Y., Park H.J., Ahn D.J., Lee J., Lee P.Y. Wettability of Chitosan Coating Solution on 'Fuji' Apple Skin // *Journal of Food Science*. – 2002. – Vol. 67. – No. 7. – P. 2668-2672.
100. Mohd Yusof N., Jai J., Hamzah F. Effect of Coating Materials on the Properties of Chitosan-Starch-Based Edible Coatings // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. – 2019. – Vol. 507. – No. 1. – P. 012011.
101. Madhavan Nampoothiri K., Nair N.R., John R.P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research // *Bioresource Technology*. – 2010. – Vol. 101. – No. 22. – P. 8493-8501.
102. Singhvi M., Gokhale D. Biomass to biodegradable polymer (PLA) // *RSC Advances*. – 2013. – Vol. 3. – No. 33. – P. 13558-13568.

103. Yokohara T., Yamaguchi M. Structure and properties for biomass-based polyester blends of PLA and PBS // *European Polymer Journal*. – 2008. – Vol. 44. – No. 3. – P. 677-685.
104. Yang J., Tan J.-N., Gu Y. Lactic acid as an invaluable bio-based solvent for organic reactions // *Green Chemistry*. – 2012. – Vol. 14. – No. 12. – P. 3304-3317.
105. Södergård A., Stolt M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition // *Progress in Polymer Science*. – 2002. – Vol. 27. – No. 6. – P. 1123-1163.
106. Taib N.-A.A.B., Rahman M.R., Huda D., Kuok K.K., Hamdan S., Bakri M.K.B., Julaihi M.R.M.B., Khan A. A review on poly lactic acid (PLA) as a biodegradable polymer // *Polymer Bulletin*. – 2023. – Vol. 80. – No. 2. – P. 1179-1213.
107. Schindler A., Harper D. Polylactide. II. Viscosity–molecular weight relationships and unperturbed chain dimensions // *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*. – 1979. – Vol. 17. – No. 8. – P. 2593-2599.
108. Bodmeier R., McGinity J.W. Solvent selection in the preparation of poly(dl-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1988. – Vol. 43. – No. 1. – P. 179-186.
109. Vink E.T.H., Rábago K.R., Glassner D.A., Gruber P.R. Applications of life cycle assessment to NatureWorks™ polylactide (PLA) production // *Polymer Degradation and Stability*. – 2003. – Vol. 80. – No. 3. – P. 403-419.
110. Farah S., Anderson D.G., Langer R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications – A comprehensive review // *PLA biodegradable polymers*. – 2016. – Vol. 107. – P. 367-392.
111. Levy Y., Paz A., Yosef R.B., Corn B.W., Vaisman B., Shuhath S., Domb A.J. Biodegradable inflatable balloon for reducing radiation adverse effects in prostate cancer // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2009. – Vol. 91B. – No. 2. – P. 855-867.
112. Auras R., Harte B., Selke S. An Overview of Polylactides as Packaging Materials // *Macromolecular Bioscience*. – 2004. – Vol. 4. – No. 9. – P. 835-864.
113. Plackett D.V., Holm V.K., Johansen P., Ndoni S., Nielsen P.V., Sipilainen-Malm T., Södergård A., Verstichel S. Characterization of l-poly(lactide) and l-poly(lactide)–polycaprolactone co-polymer films for use in cheese-packaging applications // *Packaging Technology and Science*. – 2006. – Vol. 19. – No. 1. – P. 1-24.
114. Ivanov E., Kotsilkova R., Xia H., Chen Y., Donato R.K., Donato K., Godoy A.P., Di Maio R., Silvestre P., Cimmino S., Angelov V. PLA/Graphene/MWCNT

Composites with Improved Electrical and Thermal Properties Suitable for FDM 3D Printing Applications // Applied Sciences. – 2019. – Vol. 9. – No. 6. – P. 1209.

115. Tümer E.H., Erbil H.Y. Extrusion-Based 3D Printing Applications of PLA Composites: A Review // Coatings. – 2021. – Vol. 11. – No. 4. – P. 390.

116. Maharana T., Mohanty B., Negi Y.S. Melt–solid polycondensation of lactic acid and its biodegradability // Progress in Polymer Science. – 2009. – Vol. 34. – No. 1. – P. 99-124.

117. Wiebe J., Nef H.M., Hamm P.W. Current Status of Bioresorbable Scaffolds in the Treatment of Coronary Artery Disease // Journal of the American College of Cardiology. – 2014. – Vol. 64. – No. 23. – P. 2541-2551.

118. Stähelin A.P., Weiler A., Rüfenacht H., Hoffmann R., Geissmann A., Feinstein R. Clinical degradation and biocompatibility of different bioabsorbable interference screws: A report of six cases // Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery. – 1997. – Vol. 13. – No. 2. – P. 238-244.

119. Kellomäki M., Niiranen H., Puumanen K., Ashammakhi N., Waris T., Törmälä P. Bioabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation // Orthopaedic Polymeric Biomaterials: Applications of Biodegradables. – 2000. – Vol. 21. – No. 24. – P. 2495-2505.

120. DeStefano V., Khan S., Tabada A. Applications of PLA in modern medicine // Engineered Regeneration. – 2020. – Vol. 1. – P. 76-87.

121. Wisniewski M., Borgne A.L., Spassky N. Synthesis and properties of (D)- and (L)-lactide stereocopolymers using the system achiral Schiff's base/aluminium methoxide as initiator // Macromolecular Chemistry and Physics. – 1997. – Vol. 198. – No. 4. – P. 1227-1238.

122. Shuklov I.A., Jiao H., Schulze J., Tietz W., Kühlein K., Börner A. Studies on the epimerization of diastereomeric lactides // Tetrahedron Letters. – 2011. – Vol. 52. – No. 9. – P. 1027-1030.

123. Achmad F., Yamane K., Quan S., Kokugan T. Synthesis of polylactic acid by direct polycondensation under vacuum without catalysts, solvents and initiators // Chemical Engineering Journal. – 2009. – Vol. 151. – No. 1. – P. 342-350.

124. Kim K.W., Woo S.I. Synthesis of High-Molecular-Weight Poly(L-lactic acid) by Direct Polycondensation // Macromolecular Chemistry and Physics. – 2002. – Vol. 203. – No. 15. – P. 2245-2250.

125. Desai H., Mehta T., Shah N. Azeotropic dehydrative (solution) polycondensation of lactic acid to polylactic acid (PLA): A in-depth review of an overlooked method for manufacturing PLA // Polymer-Plastics Technology and Materials. – 2023. – Vol. 62. – No. 11. – P. 1394-1402.

126. Woo S.I., Kim B.O., Jun H.S., Chang H.N. Polymerization of aqueous lactic acid to prepare high molecular weight poly(lactic acid) by chain-extending with hexamethylene diisocyanate // *Polymer Bulletin*. – 1995. – Vol. 35. – No. 4. – P. 415-421.
127. Zhong W., Ge J., Gu Z., Li W., Chen X., Zang Y., Yang Y. Study on biodegradable polymer materials based on poly(lactic acid). I. Chain extending of low molecular weight poly(lactic acid) with methylenediphenyl diisocyanate // *Journal of Applied Polymer Science*. – 1999. – Vol. 74. – No. 10. – P. 2546-2551.
128. Jacobsen S., Fritz H.-G., Degée P., Dubois P., Jérôme R. New developments on the ring opening polymerisation of polylactide // *Industrial Crops and Products*. – 2000. – Vol. 11. – No. 2. – P. 265-275.
129. Schwach G., Coudane J., Engel R., Vert M. More about the polymerization of lactides in the presence of stannous octoate // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 1997. – Vol. 35. – No. 16. – P. 3431-3440.
130. Kricheldorf H.R., Kreiser-Saunders I., Stricker A. Polylactones 48. SnOct₂-Initiated Polymerizations of Lactide: A Mechanistic Study // *Macromolecules*. – 2000. – Vol. 33. – No. 3. – P. 702-709.
131. Kowalski A., Duda A., Penczek S. Kinetics and Mechanism of Cyclic Esters Polymerization Initiated with Tin(II) Octoate. 3. Polymerization of 1,1-Dilactide // *Macromolecules*. – 2000. – Vol. 33. – No. 20. – P. 7359-7370.
132. Degée Ph., Dubois Ph., Jacobsen S., Fritz H.-G., Jérôme R. Beneficial effect of triphenylphosphine on the bulk polymerization of L,L-lactide promoted by 2-ethylhexanoic acid tin (II) salt // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 1999. – Vol. 37. – No. 14. – P. 2413-2420.
133. Jalabert M., Frascini P., Prud'homme R.E. Synthesis and characterization of poly(L-lactide)s and poly(D-lactide)s of controlled molecular weight // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 2007. – Vol. 45. – No. 10. – P. 1944-1955.
134. Kolstad J.J. Crystallization kinetics of poly(L-lactide-co-meso-lactide) // *Journal of Applied Polymer Science*. – 1996. – Vol. 62. – No. 7. – P. 1079-1091.
135. Okihara T., Tsuji M., Kawaguchi A., Katayama K.-I., Tsuji H., Hyon S.-H., Ikada Y. Crystal structure of stereocomplex of poly(L-lactide) and poly(D-lactide) // *Journal of Macromolecular Science, Part B*. – 1991. – Vol. 30. – No. 1-2. – P. 119-140.
136. Huang J., Lisowski M.S., Runt J., Hall E.S., Kean R.T., Buehler N., Lin J.S. Crystallization and Microstructure of Poly(l-lactide-co-meso-lactide) Copolymers // *Macromolecules*. – 1998. – Vol. 31. – No. 8. – P. 2593-2599.

137. Feng L., Zhang B., Bian X., Li G., Chen Z., Chen X. Thermal Properties of Polylactides with Different Stereoisomers of Lactides Used as Comonomers // *Macromolecules*. – 2017. – Vol. 50. – No. 16. – P. 6064-6073.
138. Miyata T., Masuko T. Crystallization behaviour of poly(l-lactide) // *Polymer*. – 1998. – Vol. 39. – No. 22. – P. 5515-5521.
139. Bergström J.S., Hayman D. An Overview of Mechanical Properties and Material Modeling of Polylactide (PLA) for Medical Applications // *Annals of Biomedical Engineering*. – 2016. – Vol. 44. – No. 2. – P. 330-340.
140. Sawalha H., Schroën K., Boom R. Mechanical properties and porosity of polylactide for biomedical applications // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2008. – Vol. 107. – No. 1. – P. 82-93.
141. Zheng X., Zhou S., Li X., Weng J. Shape memory properties of poly(d,l-lactide)/hydroxyapatite composites // *Biomaterials*. – 2006. – Vol. 27. – No. 24. – P. 4288-4295.
142. Ferguson S., Wahl D., Gogolewski S. Enhancement of the mechanical properties of polylactides by solid-state extrusion. II. Poly(L-lactide), poly(L/D-lactide), and poly(L/DL-lactide) // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1996. – Vol. 30. – No. 4. – P. 543-551.
143. Ren J., Adachi K. Dielectric Relaxation in Blends of Amorphous Poly(dl-lactic acid) and Semicrystalline Poly(l-lactic acid) // *Macromolecules*. – 2003. – Vol. 36. – No. 14. – P. 5180-5186.
144. Helminen A.O., Korhonen H., Seppälä J.V. Cross-Linked Poly(ϵ -caprolactone/D,L-lactide) Copolymers with Elastic Properties // *Macromolecular Chemistry and Physics*. – 2002. – Vol. 203. – No. 18. – P. 2630-2639.
145. Śmigiel-Gac N., Pamuła E., Krok-Borkowicz M., Smola-Dmochowska A., Dobrzyński P. Synthesis and Properties of Bioresorbable Block Copolymers of l-Lactide, Glycolide, Butyl Succinate and Butyl Citrate // *Polymers*. – 2020. – Vol. 12. – No. 1. – P. 214.
146. Wang X., Pan H., Jia S., Wang Z., Tian H., Han L., Zhang H. In-situ reaction compatibilization modification of poly(butylene succinate-co-terephthalate)/polylactide acid blend films by multifunctional epoxy compound // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2022. – Vol. 213. – P. 934-943.
147. Shibata M., Inoue Y., Miyoshi M. Mechanical properties, morphology, and crystallization behavior of blends of poly(l-lactide) with poly(butylene succinate-co-l-lactate) and poly(butylene succinate) // *Polymer*. – 2006. – Vol. 47. – No. 10. – P. 3557-3564.

148. Su S., Kopitzky R., Tolga S., Kabasci S. Polylactide (PLA) and Its Blends with Poly(butylene succinate) (PBS): A Brief Review // *Polymers*. – 2019. – Vol. 11. – No. 7. – P. 1193.
149. Im D., Gavande V., Lee H., Iwata T., Lee W.-K. Compatibility and hydrolytic behaviors of polylactide isomer/poly(butylene succinate) mixtures by the Langmuir technique // *Polymer Degradation and Stability*. – 2021. – Vol. 186. – P. 109517.
150. Mulchandani N., Masutani K., Kumar S., Yamane H., Sakurai S., Kimura Y., Katiyar V. Toughened PLA-b-PCL-b-PLA triblock copolymer based biomaterials: effect of self-assembled nanostructure and stereocomplexation on the mechanical properties // *Polymer Chemistry*. – 2021. – Vol. 12. – No. 26. – P. 3806-3824.
151. Tokiwa Y., Calabia B.P. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide) // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2006. – Vol. 72. – No. 2. – P. 244-251.
152. Athanasiou K.A., Niederauer G.G., Agrawal P.M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers // *Polymer Scaffolding and Hard Tissue Engineering*. – 1996. – Vol. 17. – No. 2. – P. 93-102.
153. Carvalho J.R., Conde G., Antonioli M.L., Santana P.H., Littiere T.O., Dias P.P., Chinelatto M.A., Canola P.A., Zara F.José., Ferraz G.P. Long-Term Evaluation of Poly(lactic acid) (PLA) Implants in a Horse: An Experimental Pilot Study // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – No. 23. – P. 7224.
154. Ramot Y., Haim-Zada M., Domb A.J., Nyska A. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers // *PLA biodegradable polymers*. – 2016. – Vol. 107. – P. 153-162.
155. Alavi M.S., Memarpour S., Pazhohan-Nezhad H., Salimi Asl A., Moghbeli M., Shadmanfar S., Saburi E. Applications of poly(lactic acid) in bone tissue engineering: A review article // *Artificial Organs*. – 2023. – Vol. 47. – No. 9. – P. 1423-1430.
156. da Silva D., Kaduri M., Poley M., Adir O., Krinsky N., Shainsky-Roitman J., Schroeder A. Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems // *Smart nanomaterials and nanostructures for diagnostic and therapy*. – 2018. – Vol. 340. – P. 9-14.
157. Rudnik E., Briassoulis D. Degradation behaviour of poly(lactic acid) films and fibres in soil under Mediterranean field conditions and laboratory simulations testing // *Industrial Crops and Products*. – 2011. – Vol. 33. – No. 3. – P. 648-658.
158. Palai B., Mohanty S., Nayak S.K. A Comparison on Biodegradation Behaviour of Polylactic Acid (PLA) Based Blown Films by Incorporating Thermoplasticized Starch (TPS) and Poly (Butylene Succinate-co-Adipate) (PBSA) Biopolymer in Soil

// Journal of Polymers and the Environment. – 2021. – Vol. 29. – No. 9. – P. 2772-2788.

159. Xu L., Crawford K., Gorman P.B. Effects of Temperature and pH on the Degradation of Poly(lactic acid) Brushes // *Macromolecules*. – 2011. – Vol. 44. – No. 12. – P. 4777-4782.

160. Cuadri A.A., Martín-Alfonso J.E. Thermal, thermo-oxidative and thermomechanical degradation of PLA: A comparative study based on rheological, chemical and thermal properties // *Polymer Degradation and Stability*. – 2018. – Vol. 150. – P. 37-45.

161. Irfan S.A., Razali R., KuShaari K., Mansor N. Reaction-Multi Diffusion Model for Nutrient Release and Autocatalytic Degradation of PLA-Coated Controlled-Release Fertilizer // *Polymers*. – 2017. – Vol. 9. – No. 3. – P. 111.

162. Rezvani Ghomi E., Khosravi F., Saedi Ardahaei A., Dai Y., Neisiany R.E., Foroughi F., Wu M., Das O., Ramakrishna S. The Life Cycle Assessment for Polylactic Acid (PLA) to Make It a Low-Carbon Material // *Polymers*. – 2021. – Vol. 13. – No. 11. – P. 1854.

163. Siparsky G.L., Voorhees K.J., Miao F. Hydrolysis of Polylactic Acid (PLA) and Polycaprolactone (PCL) in Aqueous Acetonitrile Solutions: Autocatalysis // *Journal of environmental polymer degradation*. – 1998. – Vol. 6. – No. 1. – P. 31-41.

164. Antheunis H., van der Meer J.-P., de Geus M., Heise A., Koning P.E. Autocatalytic Equation Describing the Change in Molecular Weight during Hydrolytic Degradation of Aliphatic Polyesters // *Biomacromolecules*. – 2010. – Vol. 11. – No. 4. – P. 1118-1124.

165. Fukushima K., Giménez E., Cabedo L., Lagarón J.M., Feijoo J.L. Biotic degradation of poly(dl-lactide) based nanocomposites // *Polymer Degradation and Stability*. – 2012. – Vol. 97. – No. 8. – P. 1278-1284.

166. Mohamed R.M., Yusoh K. A Review on the Recent Research of Polycaprolactone (PCL) // *Advanced Materials Research*. – 2016. – Vol. 1134. – P. 249-255.

167. Hubbell D.S., Cooper S.L. The physical properties and morphology of poly- ϵ -caprolactone polymer blends // *Journal of Applied Polymer Science*. – 1977. – Vol. 21. – No. 11. – P. 3035-3061.

168. Boucher D.S. Solubility parameters and solvent affinities for polycaprolactone: A comparison of methods // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2020. – Vol. 137. – No. 30. – P. 48908.

169. Gil-Castell O., Badia J.D., Ribes-Greus A. Tailored electrospun nanofibrous polycaprolactone/gelatin scaffolds into an acid hydrolytic solvent system // *European Polymer Journal*. – Vol. – Vol. 101. – P. 273-281.
170. Altun E., Ahmed J., Onur Aydogdu M., Harker A., Edirisinghe M. The effect of solvent and pressure on polycaprolactone solutions for particle and fibre formation // *European Polymer Journal*. – 2022. – Vol. 173. – P. 111300.
171. Woodruff M.A., Hutmacher D.W. The return of a forgotten polymer– Polycaprolactone in the 21st century // *Progress in Polymer Science*. – 2010. – Vol. 35. – No. 10. – P. 1217-1256.
172. Chavalitpanya K., Phattanarudee S. Poly(Lactic Acid)/Polycaprolactone Blends Compatibilized with Block Copolymer // *10th Eco-Energy and Materials Science and Engineering Symposium*. – 2013. – Vol. 34. – P. 542-548.
173. Koenig M.F., Huang S.J. Biodegradable blends and composites of polycaprolactone and starch derivatives // *Polymer*. – 1995. – Vol. 36. – No. 9. – P. 1877-1882.
174. Woodruff M.A., Hutmacher D.W. The return of a forgotten polymer– Polycaprolactone in the 21st century // *Progress in Polymer Science*. – 2010. – Vol. 35. – No. 10. – P. 1217-1256.
175. Deanin R.D., Zheng-Bai Z. Polycaprolactone as a permanent plasticizer for poly(vinyl chloride) // *Journal of Vinyl Technology*. – 1984. – Vol. 6. – No. 1. – P. 18-21.
176. Abrisham M., Noroozi M., Panahi-Sarmad M., Arjmand M., Goodarzi V., Shakeri Y., Golbaten-Mofrad H., Dehghan P., Seyfi Sahzabi A., Sadri M., Uzun L. The role of polycaprolactone-triol (PCL-T) in biomedical applications: A state-of-the-art review // *European Polymer Journal*. – 2020. – Vol. 131. – P. 109701.
177. Espinoza S.M., Patil H.I., San Martin Martinez E., Casañas Pimentel R., Ige P.P. Poly- ϵ -caprolactone (PCL), a promising polymer for pharmaceutical and biomedical applications: Focus on nanomedicine in cancer // *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. – 2020. – Vol. 69. – No. 2. – P. 85-126.
178. Han J., Chen T.-X., Branford-White P.J., Zhu L.-M. Electrospun shikonin-loaded PCL/PTMC composite fiber mats with potential biomedical applications // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2009. – Vol. 382. – No. 1. – P. 215-221.
179. Malikmammadov E., Tanir T.E., Kiziltay A., Hasirci V., Hasirci N. PCL and PCL-based materials in biomedical applications // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2018. – Vol. 29. – No. 7-9. – P. 863-893.

180. Han J., Chen T.-X., Branford-White P.J., Zhu L.-M. Electrospun shikonin-loaded PCL/PTMC composite fiber mats with potential biomedical applications // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2009. – Vol. 382. – No. 1. – P. 215-221.
181. Jiao Z., Luo B., Xiang S., Ma H., Yu Y., Yang W. 3D printing of HA / PCL composite tissue engineering scaffolds // *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*. – 2019. – Vol. 2. – No. 4. – P. 196-202.
182. Siddiqui N., Asawa S., Birru B., Baadhe R., Rao S. PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications // *Molecular Biotechnology*. – 2018. – Vol. 60. – No. 7. – P. 506-532.
183. Kim Y.B., Kim G.H. PCL/Alginate Composite Scaffolds for Hard Tissue Engineering: Fabrication, Characterization, and Cellular Activities // *ACS Combinatorial Science*. – 2015. – Vol. 17. – No. 2. – P. 87-99.
184. Tiaw K.S., Goh S.W., Hong M., Wang Z., Lan B., Teoh S.H. Laser surface modification of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) membrane for tissue engineering applications // *Biomaterials*. – 2005. – Vol. 26. – No. 7. – P. 763-769.
185. Labet M., Thielemans W. Synthesis of polycaprolactone: a review // *Chemical Society Reviews*. – 2009. – Vol. 38. – No. 12. – P. 3484-3504.
186. Mandal P., Shunmugam R. Polycaprolactone: a biodegradable polymer with its application in the field of self-assembly study // *Journal of Macromolecular Science, Part A*. – 2020. – Vol. 58. – No. 2. – P. 111-129.
187. Kumar A., Gross R.A. *Candida antarctica* Lipase B Catalyzed Polycaprolactone Synthesis: Effects of Organic Media and Temperature // *Biomacromolecules*. – 2000. – Vol. 1. – No. 1. – P. 133-138.
188. Grobelny Z., Golba S., Jurek-Suliga J. Mechanism of ϵ -caprolactone polymerization in the presence of alkali metal salts: investigation of initiation course and determination of polymers structure by MALDI-TOF mass spectrometry // *Polymer Bulletin*. – 2019. – Vol. 76. – No. 7. – P. 3501-3515.
189. Xu Y., Wang L., Chen P., Huang P., Dai H., Jiang W., Zhou Y. Living Cationic Polymerization of ϵ -Caprolactone Catalyzed by a Metal-free Lewis Acid of Trityl Tetrafluoroborate // *Macromolecules*. – 2023. – Vol. 56. – No. 2. – P. 501-509.
190. Arbaoui A., Redshaw P. Metal catalysts for ϵ -caprolactone polymerisation // *Polymer Chemistry*. – 2010. – Vol. 1. – No. 6. – P. 801-826.
191. Stridsberg K.M., Ryner M., Albertsson A.-P. Controlled Ring-Opening Polymerization: Polymers with designed Macromolecular Architecture // *Degradable Aliphatic Polyesters*. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2002. – P. 41-65.
192. Punyodom W., Limwanich W., Meepowpan P., Thapsukhon B. Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone initiated by tin(II) octoate/n-hexanol: DSC

isoconversional kinetics analysis and polymer synthesis // *Designed Monomers and Polymers*. – 2021. – Vol. 24. – No. 1. – P. 89-97.

193. Kaluzynski K., Pretula J., Lewinski P., Kaźmierski S., Penczek S. Synthesis and Properties of Functionalized Poly(ϵ -caprolactone); Chain Polymerization Followed by Polycondensation in One Pot with Initiator and Catalyst in One Molecule. *Synthesis and Molecular Structures // Macromolecules*. – 2022. – Vol. 55. – No. 6. – P. 2210-2221.

194. Jenkins M.J., Harrison K.L. The effect of molecular weight on the crystallization kinetics of polycaprolactone // *Polymers for Advanced Technologies*. – 2006. – Vol. 17. – No. 6. – P. 474-478.

195. Nikiforov A., Panina N., Blinou D., Gurzhiy V., Nashchekina J., Korzhikova-Vlakh E., Eremin A., Stepanova M. Ring-Opening Polymerization of rac-Lactide Catalyzed by Octahedral Nickel Carboxylate Complexes // *Catalysts*. – 2023. – Vol. 13. – No. 2. – P. 304

196. Gadomska-Gajadhur A., Ruśkowski P. Biocompatible Catalysts for Lactide Polymerization–Catalyst Activity, Racemization Effect, and Optimization of the Polymerization Based On Design of Experiments // *Organic Process Research & Development*. – 2020. – Vol. 24. – No. 8. – P. 1435-1442.

197. Sin L.T., Tuen B.S. 2 - Synthesis and Production of Poly(Lactic Acid) // *Poly(lactic Acid) (Second Edition)/ Ed. L.T. Sin, B.S. Tuen*. – William Andrew Publishing, 2019. – P. 53-95.

198. Weidner S.M., Meyer A., Falkenhagen J., Kricheldorf H.R. SnOct₂-catalyzed and alcohol-initiated ROPs of L-lactide – About the influence of initiators on chemical reactions in the melt and the solid state // *European Polymer Journal*. – 2021. – Vol. 153. – P. 110508.

199. Kricheldorf H.R., Weidner S.M., Scheliga F. SnOct₂-Catalyzed and Alcohol-Initiated ROPS of l-Lactide–Control of the Molecular Weight and the Role of Cyclization // *Macromolecular Chemistry and Physics*. – 2022. – Vol. 223. – No. 6. – P. 2100464.

200. Kricheldorf H.R., Weidner S.M. High molar mass cyclic poly(l-lactide) obtained by means of neat tin(ii) 2-ethylhexanoate // *Polymer Chemistry*. – Vol. – VOL. 11. – No. 32. – P. 5249-5260.

201. Hege P.S., Schiller S.M. Non-toxic catalysts for ring-opening polymerizations of biodegradable polymers at room temperature for biohybrid materials // *Green Chemistry*. – 2014. – Vol. 16. – No. 3. – P. 1410-1416.

202. Kricheldorf H.R., Weidner S.M. SnOct₂-Catalyzed Syntheses of Cyclic Poly(l-lactide)s with Catechol as Low-Toxic Co-catalyst // *Journal of Polymers and the Environment*. – 2019. – Vol. 27. – No. 12. – P. 2697-2706.

203. Kricheldorf H.R., Weidner S.M. Polymerization of l-lactide with SnCl₂: A Low Toxic and Eco-friendly Catalyst // *Journal of Polymers and the Environment*. – 2021. – Vol. 29. – No. 8. – P. 2504-2516.
204. Rad'kova N.Yu., Kovylyna T.A., Shavyrin A.S., Cherkasov A.V., Fukin G.K., Lyssenko K.A., Trifonov A.A. Amido rare-earth(iii) and Ca(ii) complexes coordinated by tridentate amidinate ligands: synthesis, structure, and catalytic activity in the ring-opening polymerization of rac-lactide and ε-caprolactone // *New Journal of Chemistry*. – 2020. – Vol. 44. – No. 19. – P. 7811-7822.
205. Morozov A.G., Martemyanova T.V., Dodonov V.A., Kazarina O.V., Fedushkin I.L. Four- and Five-Coordinate Titanium(IV) Complexes Supported by the dpp-bian Ligand in ROP of L-Lactide // *European Journal of Inorganic Chemistry*. – 2019. – Vol. 2019. – No. 39-40. – P. 4198-4204.
206. Cheshmedzhieva D., Angelova I., Ilieva S., Georgiev G.S., Galabov B. Initiation of ring-opening polymerization of lactide: The effect of metal alkoxide catalyst // *Computational and Theoretical Chemistry*. – 2012. – Vol. 995. – P. 8-16.
207. Umare P.S., Tembe G.L., Rao K.V., Satpathy U.S., Trivedi B. Catalytic ring-opening polymerization of l-lactide by titanium biphenoxy-alkoxide initiators // *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. – 2007. – Vol. 268. – No. 1. – P. 235-243.
208. Kim Y., Verkade J.G. Living Polymerization of Lactide Using Titanium Alkoxide Catalysts // *Macromolecular Symposia*. – 2005. – Vol. 224. – No. 1. – P. 105-118.
209. Kim Y., Jnaneshwara G.K., Verkade J.G. Titanium Alkoxides as Initiators for the Controlled Polymerization of Lactide // *Inorganic Chemistry*. – 2003. – Vol. 42. – No. 5. – P. 1437-1447.
210. Kim S., Sarkar D., Kim Y., Park M.H., Yoon M., Kim Y., Kim M. Synthesis of functionalized titanium-carboxylate molecular clusters and their catalytic activity // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. – 2017. – Vol. 53. – P. 171-176.
211. Zhang X., Prior T.J., Chen K., Santoro O., Redshaw P. Ring Opening Polymerization of Lactides and Lactones by Multimetallic Titanium Complexes Derived from the Acids Ph₂C(X)CO₂H (X = OH, NH₂) // *Catalysts*. – 2022. – Vol. 12. – No. 9. – P. 935.
212. Gao Z., Hu D., Gao L., Zhang X., Zhang Z.-T., Liang Q. Preparation of the substituted salicylato of titanocene derivatives by the liquid–liquid interfacial reaction // *Journal of Organometallic Chemistry*. – 2001. – Vol. 629. – No. 1. – P. 47-53.

213. Fuoco T., Pappalardo D. Aluminum Alkyl Complexes Bearing Salicylaldiminato Ligands: Versatile Initiators in the Ring-Opening Polymerization of Cyclic Esters // *Catalysts*. – 2017. – Vol. 7. – No. 2. – P. 64.
214. Wu Y.-Y., Luo W., Wang Y.-H., Pu Y.-Y., Zhang X., You L.-S., Zhu Q.-Y., Dai J. Titanium–oxo–Clusters with Dicarboxylates: Single-Crystal Structure and Photochromic Effect // *Inorganic Chemistry*. – 2012. – Vol. 51. – No. 16. – P. 8982-8988.
215. Sambyal K., Singh R.V. Production of salicylic acid; a potent pharmaceutically active agent and its future prospects // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2021. – Vol. 41. – No. 3. – P. 394-405.
216. Sashiwa H., Kawasaki N., Nakayama A., Muraki E., Yamamoto N., Aiba S. Chemical Modification of Chitosan. 14: Synthesis of Water-Soluble Chitosan Derivatives by Simple Acetylation // *Biomacromolecules*. – 2002. – Vol. 3. – No. 5. – P. 1126-1128.
217. Andreica B.-I., Cheng X., Marin L. Quaternary ammonium salts of chitosan. A critical overview on the synthesis and properties generated by quaternization // *European Polymer Journal*. – 2020. – Vol. 139. – P. 110016.
218. Guo Z., Xing R., Liu S., Zhong Z., Ji X., Wang L., Li P. Antifungal properties of Schiff bases of chitosan, N-substituted chitosan and quaternized chitosan // *Carbohydrate Research*. – 2007. – Vol. 342. – No. 10. – P. 1329-1332.
219. Kim K.W., Thomas R.L., Lee P., Park H.J. Antimicrobial Activity of Native Chitosan, Degraded Chitosan, and O-Carboxymethylated Chitosan // *Journal of Food Protection*. – 2003. – Vol. 66. – No. 8. – P. 1495-1498.
220. Xu T., Xin M., Li M., Huang H., Zhou S., Liu J. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of N,O-quaternary ammonium chitosan // *Carbohydrate Research*. – 2011. – Vol. 346. – No. 15. – P. 2445-2450.
221. Hu L., Meng X., Xing R., Liu S., Chen X., Qin Y., Yu H., Li P. Design, synthesis and antimicrobial activity of 6-N-substituted chitosan derivatives // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2016. – Vol. 26. – No. 18. – P. 4548-4551.
222. Antony R., Arun T., Manickam S.T.D. A review on applications of chitosan-based Schiff bases // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – Vol. 129. – P. 615-633.
223. Raczuk E., Dmochowska B., Samaszko-Fiertek J., Madaj J. Different Schiff Bases–Structure, Importance and Classification // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – No. 3. – P. 787.

224. Kausar A. Scientific potential of chitosan blending with different polymeric materials: A review // *Journal of Plastic Film & Sheeting*. – 2017. – Vol. 33. – No. 4. – P. 384-412.
225. H.P.S A.K., Saurabh P.K., A.S. A., Nurul Fazita M.R., Syakir M.I., Davoudpour Y., Rafatullah M., Abdullah P.K., M. Haafiz M.K., Dungani R. A review on chitosan-cellulose blends and nanocellulose reinforced chitosan biocomposites: Properties and their applications // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – Vol. 150. – P. 216-226.
226. Muhd Julkapli N., Akil H.M., Ahmad Z. Preparation, Properties and Applications of Chitosan-Based Biocomposites/Blend Materials: A Review // *Composite Interfaces*. – 2011. – Vol. 18. – No. 6. – P. 449-507.
227. Seidi F., Khodadadi Yazdi M., Jouyandeh M., Dominic M., Naeim H., Nezhad M.N., Bagheri B., Habibzadeh S., Zarrintaj P., Saeb M.R., Mozafari M. Chitosan-based blends for biomedical applications // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – Vol. 183. – P. 1818-1850.
228. van den Broek L. A. M. et al. Chitosan films and blends for packaging material // *Carbohydrate polymers*. – 2015. – Vol. 116. – P. 237-242.
229. Mujtaba M., Morsi R.E., Kerch G., Elsabee M.Z., Kaya M., Labidi J., Khawar K.M. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – Vol. 121. – P. 889-904.
230. Rajeswari A., Gopi S., Jackcina Stobel Christy E., Jayaraj K., Pius A. Chapter 9 - Current research on the blends of chitosan as new biomaterials // *Handbook of Chitin and Chitosan/ Ed. S. Gopi, S. Thomas, A. Pius*. – Elsevier, 2020. – P. 247-283.
231. Kaur M., Sharma A., Puri V., Aggarwal G., Maman P., Huanbutta K., Nagpal M., Sangnim T. Chitosan-Based Polymer Blends for Drug Delivery Systems // *Polymers*. – 2023. – Vol. 15. – No. 9. – P. 2028.
232. Chen M., Runge T., Wang L., Li R., Feng J., Shu X.-L., Shi Q.-S. Hydrogen bonding impact on chitosan plasticization // *Carbohydrate Polymers*. – 2018. – Vol. 200. – P. 115-121.
233. Neto P.G.T., Giacometti J.A., Job A.E., Ferreira F.P., Fonseca J.L.P., Pereira M.R. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks // *Carbohydrate Polymers*. – 2005. – Vol. 62. – No. 2. – P. 97-103.
234. Mathew S., Brahmakumar M., Abraham T.E. Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch–chitosan blend films // *Biopolymers*. – 2006. – Vol. 82. – No. 2. – P. 176-187.

235. Naveen Kumar H.M.P., Prabhakar M.N., Venkata Prasad P., Madhusudhan Rao K., Ashok Kumar Reddy T.V., Chowdoji Rao K., Subha M.P.S. Compatibility studies of chitosan/PVA blend in 2% aqueous acetic acid solution at 30°C // *Carbohydrate Polymers*. – 2010. – Vol. 82. – No. 2. – P. 251-255.
236. Tuhin M.O., Rahman N., Haque M.E., Khan R.A., Dafader N.P., Islam R., Nurnabi M., Tonny W. Modification of mechanical and thermal property of chitosan–starch blend films // *Radiation Physics and Chemistry*. – 2012. – Vol. 81. – No. 10. – P. 1659-1668.
237. Sarasam A., Madihally S.V. Characterization of chitosan–polycaprolactone blends for tissue engineering applications // *Biomaterials*. – 2005. – Vol. 26. – No. 27. – P. 5500-5508.
238. Mohamad S. N. K. et al. Evaluation on structural properties and performances of graphene oxide incorporated into chitosan/poly-lactic acid composites: Cs/pla versus cs/pla-go // *Polymers*. – 2021. – Vol. 13. – No. 11. – P. 1839.
239. Luo B., Yang J., Zhao J., Hsu P., Li J., Zhou P. Rapid synthesis and characterization of chitosan-g-poly(D,L-lactide) copolymers with hydroxyethyl chitosan as a macroinitiator under microwave irradiation // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2012. – Vol. 125. – No. 2. – P.125-131.
240. Liu L., Wang Y., Shen X., Fang Y. Preparation of chitosan-g-polycaprolactone copolymers through ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone onto phthaloyl-protected chitosan // *Biopolymers*. – 2005. – Vol. 78. – No. 4. – P. 163-170.
241. Luckachan G.E., Pillai P.K.S. Chitosan/oligo L-lactide graft copolymers: Effect of hydrophobic side chains on the physico-chemical properties and biodegradability // *Carbohydrate Polymers*. – 2006. – Vol. 64. – No. 2. – P. 254-266.
242. Suyatma N.E., Copinet A., Coma V., Fricoteaux F. Compatibilization method applied to the chitosan-acid poly(L-lactide) solution // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2010. – Vol. 117. – No. 5. – P. 3083-3091.
243. Demina T.S., Bardakova K.N., Svidchenko E.A., Minaev N.V., Pudovkina G.I., Novikov M.M., Butnaru D.V., Surin N.M., Akopova T.A., Bagratashvili V.N., Zelenetskii A.N., Timashev P.S. Fabrication of microstructured materials based on chitosan and D,L-lactide copolymers using laser-induced microstereolithography // *High Energy Chemistry*. – 2016. – Vol. 50. – No. 5. – P. 389-394.
244. Demina T.S., Akopova T.A., Vladimirov L.V., Zelenetskii A.N., Markvicheva E.A., Grandfils Ch. Polylactide-based microspheres prepared using solid-state copolymerized chitosan and d,l-lactide // *Materials Science and Engineering: P*. – 2016. – Vol. 59. – P. 333-338.
245. Demina T.S., Zaytseva-Zotova D.S., Timashev P.S., Bagratashvili V.N., Bardakova K.N., Sevrin P., Svidchenko E.A., Surin N.M., Markvicheva E.A., Grandfils P., Akopova T.A. Chitosan-g-lactide copolymers for fabrication of 3D

scaffolds for tissue engineering // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. – 2015. – Vol. 87. – No. 1. – P. 012074.

246. Silina N.E., Morozov A.G., Gornostaeva E.E., Smirnova L.A., Zaytsev S.D. Ultrasound-assisted synthesis of block copolymers of chitosan and D,L-lactide: Structure and properties // Polymer Science, Series B. – 2017. – Vol. 59. – No. 5. – P. 551-559.

247. Wan Y., Wu Q., Wang S., Zhang S., Hu Z. Mechanical Properties of Porous Polylactide/Chitosan Blend Membranes // Macromolecular Materials and Engineering. – 2007. – Vol. 292. – No. 5. – P. 598-607.

248. Chen P., Dong L., Cheung M.K. Preparation and characterization of biodegradable poly(l-lactide)/chitosan blends // European Polymer Journal. – 2005. – Vol. 41. – No. 5. – P. 958-966.

249. Xu X., Zhou G., Li X., Zhuang X., Wang W., Cai Z., Li M., Li H. Solution blowing of chitosan/PLA/PEG hydrogel nanofibers for wound dressing // Fibers and Polymers. – 2016. – Vol. 17. – No. 2. – P. 205-211.

250. Peesan M., Supaphol P., Rujiravanit R. Preparation and characterization of hexanoyl chitosan/polylactide blend films // Carbohydrate Polymers. – 2005. – Vol. 60. – No. 3. – P. 343-350.

251. Grande R., Pessan L.A., Carvalho A.J.F. Ternary melt blends of poly(lactic acid)/poly(vinyl alcohol)-chitosan // Special issue derived from International Conference on Bio-based Materials and Composites. – 2015. – Vol. 72. – P. 159-165.

252. Gartner H., Li Y., Almenar E. Improved wettability and adhesion of polylactic acid/chitosan coating for bio-based multilayer film development // Applied Surface Science. – 2015. – Vol. 332. – P. 488-493.

253. Rodríguez I., Fernández-Vega L., Maser-Figueroa A.N., Sang B., González-Pagán P., Tinoco A.D. Exploring Titanium(IV) Complexes as Potential Antimicrobial Compounds // Antibiotics. – 2022. – Vol. 11. – No. 2. – P. 158.

254. Yildiz B.P., Kayan A. Non-Toxic and Environmentally Friendly Titanium Complexes and Their Effects on ϵ -Caprolactone Polymerization // Catalysis Surveys from Asia. – 2020. – Vol. 24. – No. 4. – P. 313-324.

255. Urbanek O. et al. Structure and properties of polycaprolactone/chitosan nonwovens tailored by solvent systems // Biomedical Materials. – 2017. – Vol. 12. – No. 1. – P. 015020.

256. Shi Z., Yang H., Jiao J., Wang F., Lu Y., Deng J. Effects of graft copolymer of chitosan and salicylic acid on reducing rot of postharvest fruit and retarding cell wall degradation in grapefruit during storage // Food Chemistry. – 2019. – Vol. 283. – P. 92-100.

257. Rostami S.D. Advances in theory of equilibrium melting point depression in miscible polymer blends // *European Polymer Journal*. – 2000. – Vol. 36. – No. 10. – P. 2285-2290.
258. Lednev I. et al. Novel Method of Preparation Biocompatible Porous Materials Based on Modified Chitosan with High Mechanical Properties // *Lecture Notes in Networks and Systems*. – 2022. – V. 408. – P. 136-143.
259. Lednev I. et al. Development of biodegradable polymer blends based on chitosan and polylactide and study of their properties // *Materials*. – 2021. – Vol. 14. – No. 17. – P. 4900.
260. Lednev I. R. et al. Biocompatible compositions based on chitosan and copolymer (lactide–titanium oxide) for engineering of tissue substitutes for wound healing // *Polymer Bulletin*. – 2020. – Vol. 77. – P. 5083-5101.
261. Lednev I. R., Apyatina K. V., Smirnova L. A. Chitosan-Based Porous Materials Biocompatible with Fibroblasts // *Key Engineering Materials*. – 2019. – Vol. 816. – P. 214-218.