

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский  
государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (ННГУ)**

*На правах рукописи*



**СИЛИНА НАДЕЖДА ЕВГЕНЬЕВНА**

**СИНТЕЗ БЛОК-СОПОЛИМЕРОВ ХИТОЗАНА И D,L-ЛАКТИДА ПОД  
ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАЗВУКА. КОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И  
ПОЛИ(D,L-ЛАКТИДА). СТРУКТУРА И СВОЙСТВА**

02.00.06 – высокомолекулярные соединения

(химические науки)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:  
доктор химических наук, профессор  
Смирнова Лариса Александровна

Нижний Новгород - 2020

## Оглавление

<b>Введение.....</b>	<b>4</b>
<b>Глава 1. Литературный обзор.....</b>	<b>14</b>
1.1. Хитозан. Получение, строение и свойства.....	14
1.2. Модификация хитозана.....	20
1.2.1. Привитые и блок-сополимеры хитозана.....	20
1.2.2. Привитые сополимеры хитозана с лактидом.....	24
1.2.3. Смесевые композиции на основе хитозана и полилактида.....	29
1.3. Полимерные гибриды на основе хитозана, полилактида, гидроксиапатита.....	34
<b>Глава 2. Экспериментальная часть.....</b>	<b>37</b>
2.1. Используемые вещества и их характеристики.....	37
2.2. Методы исследования.....	39
2.2.1. Определение молекулярной массы и степени деацетилирования хитозана.....	39
2.2.2. Синтез блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, L-лактидом и акриламидом.....	40
2.2.3. Определение молекулярной массы гомополимеров и сополимеров, исследование структуры блок-сополимеров.....	42
2.2.4. Изготовление пленок и исследование их физико-механических свойств.....	44
2.2.5. Исследование структуры хитозана, блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом и смесей гомополимеров.....	44
2.2.6. Исследование бактерицидных свойств, грибостойкости и биодegradации блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом.....	45
2.2.7. Исследование теплофизических свойств композиций.....	46
2.2.8. Приготовление и исследование свойств композитов на основе хитозана, блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, модифицированных гидроксиапатитом .....	47

2.2.9. Приготовление и изучение свойств композиций на основе хитозана и поли(D,L-лактид - титаноксида), полученного с использованием $Ti(OPr^i)_4$ ...	48
<b>Глава 3. Результаты и их обсуждение.....</b>	<b>51</b>
3.1. Синтез блок–сополимеров хитозана с D,L-лактидом методом ультразвуковой деструкции.....	51
3.2. Выделение и идентификация блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом..	59
3.3. Физико-механические свойства блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом.....	68
3. 4. Физико-механические свойства смесей хитозана с поли(D,L-лактидом), полученных в присутствии низкомолекулярных модификаторов, полимерных компатибилизаторов, и хитозана с блок-сополимерами хитозана с D,L-лактидом.....	70
3.5. Изучение свойств блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, смесей гомополимеров при введении компатибилизатора, композитов на основе хитозана, модифицированных гидроксиапатитом.....	74
3.5.1. Исследование структурных свойств композиций.....	74
3.5.2. Исследование теплофизических свойств композиций.....	78
3.5.3. Изучение бактерицидных свойств, грибостойкости и биodeградации блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом.....	84
3.5.4. Исследование свойств композитов на основе хитозана, блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, модифицированных гидроксиапатитом.....	87
3.6. Композиционные материалы на основе хитозана и поли(D,L-лактид - титаноксида).....	91
3.6.1. Синтез сополимеров D,L-лактида с титаноксидом с использованием $Ti(OPr^i)_4$ . Получение и исследование свойств их смесей с хитозаном .....	91
<b>Заключение.....</b>	<b>104</b>
<b>Выводы.....</b>	<b>105</b>
<b>Список сокращений.....</b>	<b>106</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>107</b>

## Введение

**Актуальность темы исследования.** Создание биоразлагаемых и биосовместимых материалов на основе природных полимеров является актуальной задачей современной химии полимеров. Среди биополимеров одно из центральных мест занимает хитозан - продукт частичного деацетилирования природного хитина благодаря целому спектру уникальных свойств, в частности, нетоксичности, гипоаллергенности, противомикробному действию, биосовместимости с тканями человека, способности усиливать регенеративные процессы при заживлении ран, на его основе получают препараты биомедицинского назначения, а также упаковочные материалы.

Наличие функциональных групп, которое обуславливает сорбционные и комплексообразующие свойства хитозана, позволяет разрабатывать сорбенты и флокулянты на его основе. Несмотря на комплекс положительных свойств хитозана, учитывая отсутствие токсичности и способность к биодegradации, остается ряд нерешенных проблем, связанных с низкой прочностью материалов на его основе, поэтому для масштабного использования хитозана необходима его модификация. В этом отношении перспективным представляется комплексное использование свойств хитозана и полилактида.

Поли(D,L-лактид) (ПЛА) – биосовместимый, термопластичный, алифатический полиэфир, который широко используется в медицине. Известно, что материалы на основе со(полимеров) лактида с гликолидом,  $\delta$ -валеролактоном,  $\beta$ -бутиролактоном характеризуются высокой механической прочностью и регулируемой скоростью деградации, однако негативной стороной процесса является образование молочной кислоты в результате гидролиза этого полимера, что может привести к локальным воспалительным реакциям в организме.

Можно полагать, что сочетание уникальных свойств хитозана и ПЛА будет успешным как при получении упаковочных материалов специального назначения, так и 2D и 3D (пленочных и объемных) изделий биомедицинского назначения для раневых покрытий и органических составляющих скаффолдов.

Хитозан, являясь полиоснованием, способен связывать молочную кислоту, предотвращая негативные последствия гидролиза ПЛА, а синтетический полимер будет придавать требуемые прочностные характеристики материалу. Кроме того, использование таких гибридных материалов на основе хитозана и ПЛА с интегрированным в структуру композиций наноразмерным диоксидом титана, является перспективным для получения прозрачных биосовместимых ранозаживляющих покрытий, позволяющих контролировать состояние раны и способных к подавлению патогенных микроорганизмов без использования антибиотиков. Диоксид титана является биосовместимым и обладает бактерицидной активностью при световом воздействии. В связи с этим перспективным решением для совмещения полезных свойств компонентов является синтез сополимеров D,L-лактида с титаноксидом с использованием изопророксида титана  $Ti(OPr^i)_4$  в качестве инициатора полимеризации и (со)мономера одновременно для дальнейшего создания смесевых композиций с хитозаном.

Сочетание свойств хитозана и ПЛА с неорганическими компонентами, в частности, с гидроксиапатитом (ГА) – основным минеральным компонентом костной ткани – является перспективным для создания скаффолдов при остеорегенерации в тканевой инженерии.

**Степень разработанности темы исследования.** В настоящее время разработаны методы синтеза привитых сополимеров хитозана с лактидом с использованием каталитических систем, преимущественно, на основе соединений олова. Однако хитозан связывает и удерживает ионы металлов, что негативно сказывается на свойствах материалов, предназначенных для биомедицины, которые должны быть нетоксичными с высокой степенью чистоты. Возникает проблема очистки продуктов синтеза от токсичных катализаторов. Попытки получить однородные смесевые композиции на основе гомополимеров в большинстве случаев не увенчались успехом, и системы на их основе характеризовались низким уровнем физико-механических свойств.

Необходимо выделить работы, авторами которых успешно разработаны материалы с повышенной прочностью на основе привитых сополимеров хитозана с лактидом, полученных методом твердофазного синтеза без использования растворителей и катализаторов. При всех достоинствах этого метода, он требует энергетических затрат и является сложным в аппаратном отношении. На основании этих работ можно предположить успешное решение проблемы получения сополимеров с хорошими прочностными характеристиками в процессе другого вида механохимического воздействия – ультразвука на растворы смесей гомополимеров в условиях кавитации, сопровождаемой гидравлическими интенсивными ударами.

Таким образом, существует задача по разработке и развитию стратегий новых методов получения сополимеров хитозана с лактидом без использования катализаторов.

**Целью работы** является синтез блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом ультразвуковым (УЗ) воздействием на растворы смесей гомополимеров, получение композитов на основе смесей хитозана с ПЛА и поли(D,L-лактид–титаноксидом), комплексное исследование свойств материалов медико-биологического назначения.

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

1. Обоснование совместимости гомополимеров по результатам расчета значений параметров растворимости Гильдебранда хитозана ( $\delta_1$ ) и ПЛА ( $\delta_2$ ); получение однородных растворов хитозана и ПЛА с различными соотношениями компонентов в смешанном растворителе и при введении низкомолекулярных соединений – модификаторов.

2. Синтез блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом методом УЗ воздействия на растворы смесей гомополимеров, исследование строения цепей блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом.

3. Получение смесевых композиций хитозана с ПЛА с использованием компатибилизаторов – блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом.

4. Синтез сополимеров D,L-лактида с титаноксидом с использованием изопропоксида титана и получение их смесей с хитозаном.

5. Исследование свойств композитов на основе блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом и смесей хитозана с ПЛА, изучение биосовместимости композиционных материалов на основе хитозана и поли(D,L-лактид–титаноксида).

### **Научная новизна.**

Теоретически обоснована совместимость гомополимеров хитозана и ПЛА и выявлены два принципиальных подхода для получения однородных смесей хитозана и ПЛА через их растворы:

- использование низкомолекулярных соединений в смешанном растворителе, способных блокировать функциональные группы одного из гомополимеров в минимальной и достаточной концентрации для изменения характера интерполимерного взаимодействия между хитозаном и ПЛА;
- использование блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом в качестве эффективных компатибилизаторов, обеспечивающих формирование однородных смесей хитозана с ПЛА.

Впервые синтезированы блок-сополимеры хитозана с D,L-лактидом методом УЗ воздействия на растворы смесей гомополимеров, доказано полиблочное строение блок-сополимеров.

Разработаны композиции на основе смесей хитозана и поли(D,L-лактид–титаноксида) с высокими прочностными характеристиками. Материалы являются биоразлагаемыми и биосовместимыми, что создает перспективу их использования в тканевой инженерии.

Получены материалы с высокой термической стойкостью на основе хитозана, модифицированного ГА.

### **Практическая значимость.**

Разработан метод и получены однородные по структуре биосовместимые и биоразлагаемые композиционные материалы на основе смесей хитозана с ПЛА и блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом с высокими прочностными

свойствами (Патент RU 2540468). Блок-сополимеры хитозана с D,L-лактидом и смесевые композиции хитозана с ПЛА перспективны в качестве материалов биомедицинского назначения для закрытия раневых поверхностей, в качестве органических составляющих скаффолдов.

**Объекты исследования и методы исследования.** В работе использовали хитозан, полученный из панцирей краба (ЗАО «Биопрогресс», Москва, Россия) с молекулярной массой ( $M_M$ ) =  $1.2 \times 10^5$  и степенью деацетилирования (СД) = 0.82, растворяли в водных растворах уксусной и молочных кислот. ПЛА с  $M_n = 9.0 \times 10^4$ ,  $M_w = 13.2 \times 10^4$  и поли(L-лактид) с  $M_n = 7.9 \times 10^4$ ,  $M_w = 15.5 \times 10^4$  растворяли в тетрагидрофуране (ТГФ). Образцы ПЛА и поли(L-лактида) предоставлены к.х.н. Морозовым А.Г. (Лаборатория органических производных непереходных металлов ИМХ им. Г.А. Разуваева РАН). Поли(D,L-лактид-титаноксид) получали полимеризацией D,L-лактида «Sigma-Aldrich» с раскрытием цикла с использованием изопророксида титана «ACROS Organics» с содержанием основного вещества 98 % в качестве катализатора без дополнительной очистки исходных веществ. Поли(D,L-лактид–титаноксид) с  $M_n = 18.9 \times 10^3$  и  $M_w = 34.0 \times 10^3$ , растворяли в ТГФ. ГА –  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  с размером частиц 50-100 нм предоставлен кафедрой химии твердого тела ННГУ им. Н.И.Лобачевского (д.х.н., проф. Князевым А.В. и к.х.н. Булановым Е.Н.). Акриламид (АА) с содержанием основного вещества 99 %, производство «Sigma-Aldrich». Полиакриламид (ПАА) с  $M_n = 256 \times 10^3$ ,  $M_w = 350 \times 10^3$ . Фермент для разложения хитозана – хитозаназа с активностью 250 ед/г («Lyven», Франция). Однородность растворов в видимой и УФ-областях контролировали спектрофотометрическим методом, а также исследовали светопропускание образцов пленок смесей хитозана и ПЛА на спектрофотометре УФ и видимого диапазонов UV-1650 («Shimadzu»). Вязкость разбавленных растворов полимеров определяли на капиллярном вискозиметре Уббелоде. Блок-сополимеры хитозана с D,L-лактидом, хитозана с L-лактидом и хитозана с АА получали при УЗ воздействии растворов смесей гомополимеров с помощью установки И100-6/4 с ультразвуковым генератором И-10-2.0 и рабочей частотой  $\nu = 22 \pm 10$  % кГц. Сополимеры выделяли осаждением в большом объеме

осадителя. Образование сополимеров доказывали методом ИК-спектроскопии (спектрофотометр «Infracum FT-801») очищенных продуктов синтеза после экстракции (аппарат Сокслета, шейкер). Ферментативное разложение цепей хитозана при расшифровке структуры цепей блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом и хитозана с АА проводили хитозаназой. Элементный анализ образцов блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом и хитозана с АА проводили с использованием элементного анализатора «Elementar Vario EL cube». Молекулярно-массовые характеристики ПЛА определяли методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ) в ТГФ (жидкостной хроматограф Prominence LC-20VP «Shimadzu»). ММ блок-сополимеров хитозана с АА, ММ исходного ПАА и его блоков в блок-сополимере определяли методом ГПХ (высокоэффективный жидкостной хроматограф LC-20AD Prominence «Shimadzu»). ММ блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом определяли методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) (временнóй тандемный масс-спектрометр AXIMA Performance «Shimadzu»). Азотный лазер (337 нм). Спектры получены в линейном режиме положительных ионов. Отдельно готовили раствор матрицы (2,5-дигидрокси-бензойная кислота с концентрацией 18 мг/мл в смеси H<sub>2</sub>O: C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH = 11: 1 по объему), соли (трифторацетат натрия с концентрацией 2.5 мг/мл в тетрагидрофуране и полимера (с концентрацией 1.8 мг/мл в смеси H<sub>2</sub>O: CF<sub>3</sub>COOH = 3: 1 по объему). Полученные растворы смешивали в объемном соотношении матрица: полимер: соль = 100: 10: 1. Перед анализом 2 мкл раствора наносили на мишень, сушили на воздухе при комнатной температуре. Топографию поверхности пленок анализировали методом атомно-силовой микроскопии на приборе «Solver-P4». Рентгенофазовый анализ образцов хитозана, блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом и смесей хитозана с ПЛА, а также образцов ГА и композиций на основе хитозана с ГА выполняли на рентгеновском дифрактометре «Bruker D8 Discover» и на дифрактометре XRD-6000 «Shimadzu», соответственно. Физико-механические характеристики образцов в виде пленок определяли на универсальной разрывной машине «ZWICK/ROELLZ005»,

Германия. Грибостойкость блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом исследовали, используя гостированные штаммы микромицетов *Aspergillus Oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium chrysogenum* по стандартным методикам. Температурные переходы в процессе нагревания образцов хитозана, ПЛА, блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, смесевых композиций хитозана с ПЛА и композитов хитозана с ГА изучали с использованием дифференциального сканирующего калориметра DSC 204 F1 Phoenix (NETZSCH Gerätebau, Германия) и термоанализатора «Shimadzu» DTG-60H, соответственно. Термогравиметрический (ТГ) анализ образцов хитозана, ПЛА, блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом и смесей гомополимеров проводили с использованием термомикровесов TG 209 F1 Iris (NETZSCH Gerätebau, Германия). Биодegradацию *in vivo* блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом и смесей хитозана с поли(D,L-лактид–титаноксидом) проводили на экспериментальных животных. По показателям крови экспериментальных животных и содержанию конечных продуктов перекисного окисления липидов, определяемых методом И.А. Волчегорского, исследовали биологическую активность и влияние введения пленочных материалов на основе смесей хитозана с поли(D,L-лактид-титаноксидом). Бактерицидные свойства блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом исследовали по отношению к культурам бактерий *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, пленки на основе смеси хитозана с поли(D,L-лактид–титаноксидом) - *Staphylococcus aureus* по стандартным методикам. Источником УФ-излучения служила бактерицидная лампа БУВ-30-П с длиной волны 254 нм.

**На защиту выносятся следующие положения:**

- Теоретическое обоснование совместимости гомополимеров хитозана и ПЛА и получения однородных композиционных материалов с улучшенными прочностными характеристиками на основе смесей хитозана и ПЛА через раствор с использованием модификаторов, так и при введении компатибилизаторов - блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом.

- Синтез блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом методом УЗ воздействия на растворы смесей гомополимеров, доказательство строения блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом.

- Результаты комплексного исследования свойств композиций на основе полученных блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, смесей хитозана с ПЛА, смесей хитозана с поли(D,L-лактид–титаноксидом), материалов на основе хитозана, модифицированных ГА.

**Обоснованность и достоверность** полученных результатов обеспечивались их воспроизводимостью и комплексным подходом к решению поставленных задач с использованием современных экспериментальных методов исследования.

**Апробация работы.** Результаты исследований докладывались и обсуждались на конференциях различного уровня: 10-th International Conference of the European Chitin Society (Saint-Petersburg, 2011), IV Съезде биофизиков России. Симпозиум III «Физика - медицине и экологии» (Нижний Новгород, 2012), XI международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Мурманск, 2012), XIV International Conference on Thermal Analysis and Calorimetry in Russia (Saint-Petersburg, 2013), Шестой Всероссийской Каргинской Конференции «Полимеры - 2014» (Москва, 2014), XVIII конференции молодых учёных-химиков Нижегородской области (Нижний Новгород, 2015), XX International Conference on Chemical Thermodynamics in Russia (Nizhni Novgorod, 2015), 11th и 12th International Saint-Petersburg Conference of Young Scientists «Modern problems of polymer science» (Saint-Petersburg, 2015, 2016), 13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry (Belgrade, Serbia, 2016), XV International Conference on Thermal Analysis and Calorimetry in Russia (RTAC-2016) (Saint-Petersburg, 2016) и 2nd International Conference on Nanotechnology and Nanomaterials in Energy (Lyon, France, 2017).

Материалы диссертационных исследований были представлены на научных конкурсах, по результатам которых автору дважды присуждалась именная стипендия академика Г.А. Разуваева (2013/2014, 2014/2015 уч.г.).

**Работа выполнена при поддержке** грантов ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы», при частичной поддержке гранта (соглашение от 27.08.2013г. № 02.В.49.21.0003 между МОН РФ и ННГУ) и финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (код проекта 1537), (ГК № 4.3760.2017/ПЧ) и РФФИ в рамках научного проекта № 16-33-60172 мол\_а\_дк.

**Публикации.** По материалам диссертационного исследования опубликовано 17 научных работ, в том числе 4 статьи в научных журналах, индексируемых международными реферативно-библиографическими базами научного цитирования *Web of science* и *Scopus*, 1 патент Российской Федерации на изобретение и 12 тезисов докладов.

**Личный вклад автора.** Диссертант принимал непосредственное участие во всех этапах выполнения диссертационной работы, включая постановку целей и задач исследования, планирование и выполнение экспериментов, анализ и интерпретацию полученных данных, оформление и подготовку по результатам исследований публикаций в виде патента, статей и тезисов докладов на конференциях различного уровня.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы из 268 наименований. Работа изложена на 136 страницах машинописного текста, включает 37 рисунков и 18 таблиц.

**Соответствие диссертации паспорту специальности.** Диссертационная работа по своей актуальности, целям, решаемым задачам и полученным результатам соответствует пунктам 4, 6, 7 и 9 паспорта специальности 02.00.06 – высокомолекулярные соединения.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность д.х.н., проф. Смирновой Н.Н., д.х.н. проф. Маркину А.В. за проведение анализов (со)полимеров методами дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и термогравиметрии, к.х.н. Морозову А.Г. за синтез образцов ПЛА (ИМХ им. Г.А. Разуваева РАН), к.ф.м.н. Юнину П.А. (ИФМ РАН) за помощь при изучении рентгеноструктурных

свойств (со)полимеров, к.х.н. Батенькину М.А. за помощь в изучении топографии поверхности пленок методом атомно-силовой микроскопии, Горностаевой Е.Е. за помощь в определении молекулярно-массовых характеристик со(полимеров) методом ГПХ, д.х.н. Гришину И.Д. и Григорьевой А.О. за проведение исследований методом MALDI-TOF, д.б.н., проф. Корягину А.С. (ИББМ ННГУ им. Н.И. Лобачевского) за помощь при изучении биосовместимости композитов *in vivo*, с.н.с. Смирновой О.Н. (ОБИ ННГУ) за помощь при изучении грибостойкости и бактерицидных свойств материалов.

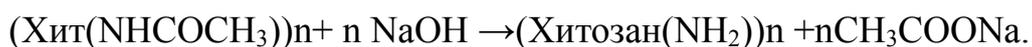
## Глава 1. Литературный обзор

### 1.1 Хитозан. Получение, строение и свойства

Полисахариды – это высокомолекулярные соединения, макромолекулы которых состоят из элементарных звеньев моносахаридов, соединенных между собой гликозидными связями. Этот класс биополимеров широко распространен в природе и является одним из важных компонентов морских животных и растений. [1]. Хитин и его производное хитозан являются линейными полисахаридами. Хитин открыли Н.Врасонот, А. Одьер в 1811 году, хитозан - С. Rouget в 1859 году [2]. Исследованиями хитина и хитозана занимаются по всему миру, значительное количество работ принадлежит ученым из стран Азии [3, 4]. Хитин близок к целлюлозе по химической структуре и занимает 2 место после нее по распространенности в природе [5]. Воспроизводство хитина в мировом океане в среднем оценивается более чем в 2 млрд. тонн/год. Источником хитинсодержащего сырья в России является краб-стригун, камчатский краб, антарктический криль и др. [2].

Хитозан, который получают из природного хитина, является линейным полисахаридом, построенным из повторяющихся фрагментов (1→4)-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкана (N-ацетил-D-глюкозамина) и (1→4)-2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкана (D-глюкозамина). Хитозан содержит, в основном, менее 40 % остатков N-ацетил-D-глюкозамина (рисунок 1) [3].

Для удаления ацетильной группы хитина проводят его обработку концентрированным раствором NaOH (водный / спиртовой). Реакция получения хитозана:



Скорость процесса увеличивается с повышением температуры, но это приводит к получению продукта с низкой ММ за счет гидролитического распада цепи хитина [2].

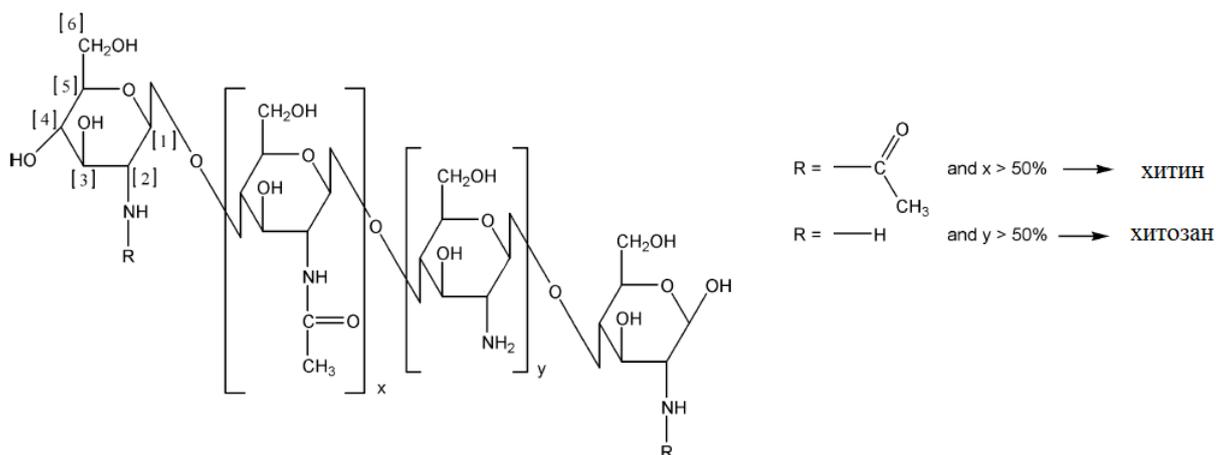


Рисунок 1. Схематическое представление макромолекул хитина и хитозана

[3]

Существует альтернативный более экономичный и экологический способ получения хитозана. Хитин смешивают с порошком NaOH (весовое соотношение 1: 5) и при 180°C с помощью экструзии получают высокодеацетилованный и растворимый хитозан, при этом требуется в 2 раза меньше гидроксида натрия, необходимого для проведения реакции в водной среде. При увеличении температуры с 25 до 200°C СД можно доводить в растворе до 98 % [5].

Хитин и хитозан являются аморфно-кристаллическими полимерами, а степень их кристалличности зависит от СД. Кристалличность максимальна для хитина (СД = 0 %) или полностью деацетилованного хитозана (СД = 100 %) и уменьшается для промежуточных значений СД [6]. Авторы работы [7] сделали вывод о том, что хитин и хитозан являются полужесткими полимерами, характеризующиеся персистентной длиной, которая зависит от СД молекулы полисахарида.

Впервые структуру хитозана исследовали в 1936 году [8], авторами были записаны рентгенограммы хитозановых волокон, полученных деацетилизацией образцов хитина. В работе [9] были получены две другие полиморфные модификации хитозана. Хитозан растворяли в муравьиной кислоте и готовили пленки. [9]. Авторы работы [10] провели рентгеноструктурные исследования пленок хитозана (СД = 99 %). Пленки получали из растворов хитозана в CH<sub>3</sub>COOH, нейтрализовали NaOH, вытягивали в воде при 95°C и отжигали при 200°C. Авторы показали, что конформация цепи хитозана схожа с хитином, а

именно структура цепи хитозана представляет собой двойную спираль, с повторяющейся через 10.39 Å единицей [10]. В таблице 1 представлены параметры элементарных ячеек изученных полиморфных модификаций хитозана.

Таблица 1. Полиморфные модификации хитозана

Образец	Пространственная группа симметрии	Параметры элементарной ячейки			Ссылка
		a, Å	b, Å	c, Å	
1	ромбическая	8.9	10.25	17.0	[8]
2	ромбическая	7.76	10.91	10.30	[9]
3	ромбическая	4.4	10.0	10.3	[9]
4	ромбическая	8.24	16.48	10.39	[10]

На рисунке 2 представлена молекулярная структура хитозана. Углы,  $\psi$  и  $\phi$ , определяют конформацию цепи и угол  $\chi$  определяет ориентацию гидроксильной группы у  $C_6$ . Внутримолекулярные водородные связи между атомом водорода гидроксильной группы при  $O_3$  и  $O_5$  и межмолекулярные водородные связи между атомом азота аминогруппы  $N_2$  и атомом водорода гидроксильной группы при  $O_6$  показаны пунктирными линиями [11].

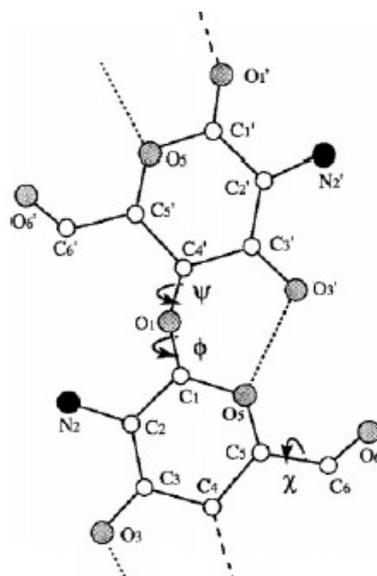


Рисунок 2. Химическая структура сегмента хитозана [11]

Локальная жесткость связана с конформацией молекулы, в особенности с формированием сети внутримолекулярных водородных связей, как показано на рисунке 3.

ММ хитозана влияет на вязкость получаемых из него растворов, эту характеристику полимера следует брать в расчет при формировании материалов на его основе. Не менее важна и СД, которая описывает степень преобразования N-ацетил-D-глюкозамина в D-глюкозамин.

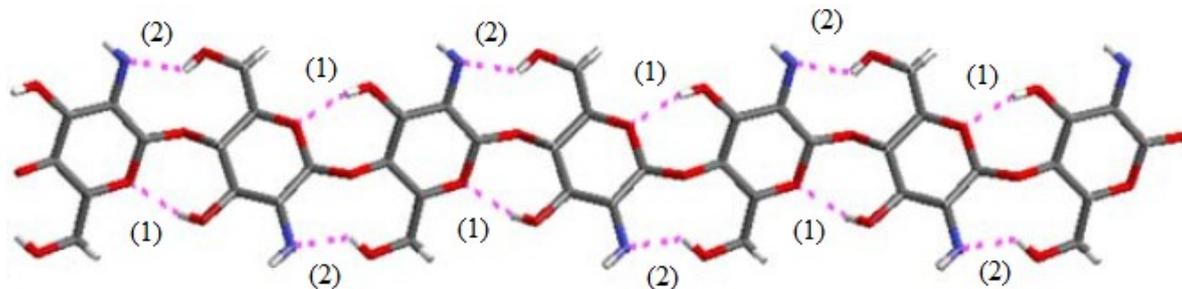


Рисунок 3. Молекулярное моделирование цепи хитозана с двумя водородными связями (1) между атомом водорода гидроксильной группы при O<sub>3</sub> и O<sub>5</sub>, и (2) между атомом азота аминогруппы N<sub>2</sub> и атомом водорода гидроксильной группы при O<sub>6</sub> [7]

СД выражается в процентном отношении количества глюкозаминных звеньев к общему числу мономерных звеньев в молекуле хитозана. Значения СД влияют на растворимость хитозана в водно-кислых средах, набухание в воде, способность к биодegradации, биологическую активность и физико-химические свойства [12, 13].

Хитозан обладает рядом уникальных биологических свойств [12]:

- природный биоразлагаемый полимер, безопасный
- биосовместимый, нетоксичный
- ускоряет образование костей
- фунгистатическое действие
- противоопухолевый эффект
- понижает уровень холестерина
- депрессант центральной нервной системы
- иммуновспомогательное средство
- спермицидное действие
- регенеративный эффект на соединительную ткань десен

Хитозан является полифункциональным биополимером, его цепи содержат реакционно - способные группы  $-NH_2$ ,  $-OH$ ,  $-NHCOCH_3$ . Хитозан растворим в водных кислых средах. Протонирование  $NH_2$ -группы в положении C<sub>2</sub> повторяющегося звена D-глюкозамина приводит к тому, что полисахарид

превращается в полиэлектролит в кислой среде. Хитозан является единственным псевдонатуральным катионным полимером [7]. Хитозан, являясь поликатионом, способен формировать полиэлектролитные комплексы с анионными полиэлектролитами (альгинатом, декстрансульфатом и т.д.) [14, 15]. Кроме того, известно, что хитозан образует полимолекулярные комплексы с белковыми макромолекулами, в частности, с инсулином и белками молочной сыворотки [16-18] и дезоксирибонуклеиновой кислотой [19, 20].

Наряду с биосовместимостью, одной из наиболее значимых свойств для использования хитозана в биомедицинских приложениях является его способность к биологическому разложению, основные аспекты которого, рассмотрены в статье [21]. Скорость биодegradации хитозан будет зависеть от его кристалличности, на которую влияет распределение ацетильных остатков вдоль цепи [6]. Поскольку при снижении кристалличности полимера скорость биодegradации увеличивается, то хитозан с низкой СД~60 % (его кристалличность уменьшается со снижением СД) будет быстрее деградировать в олигосахариды, также как и хитозан с более низкой ММ.

#### *Деградация хитозана in vitro и in vivo*

Хитозан разрушается у позвоночных в основном ферментом лизоцимом и бактериальными ферментами в толстой кишке [22]. В работе [23] было установлено, что фермент лизоцим эффективно деструктурирует хитозан после 4 ч инкубации *in vitro* при pH = 5.5 (0.1 М фосфатного буфера, 0.2 М NaCl, 37°C), вязкость хитозана (СД = 50%) уменьшилась на 66 %. В работе [24] найден круг протеаз, способных деградировать пленки хитозана в различной степени. Под действием лейцин-амино-пептидазы пленки хитозана разлагались на 38 % в течение 30 дней. Выявлено, что расщепление хитозана в слепой и толстой кишке крыс вызвано бактериальными ферментами и связано с СД и ММ. Пленки хитозана также разрушались под действием ферментов поджелудочной железы свиней. Что касается, деградации хитозана *in vivo*, в литературе сведения ограничены. В одном из немногих исследований [25] сообщалось, что олигосахариды хитозана активируют активность лизоцима в крови кроликов при

введении внутривенно в концентрациях 7.1 – 8.6 мг/кг. Хитозан также вводили подкожно в качестве имплантата. В работе [24] композиты двух видов: хитозан (ММ = 400 кДа) и модифицированный хитозан в виде плоских дисков сохранялись без разложения в ротовой полости свиней в течение 6 часов. Расщепление хитозана происходило преимущественно в кишечнике. Процесс деградации после перорального введения более эффективно наблюдается у кур и цыплят-бройлеров (67-98 %), чем у кроликов (39-83 %). Установлена зависимость скорости разложения хитозана *in vivo* от его СД и ММ, однако механизм деградации до конца не изучен.

Резюмируя все вышесказанное, биополимер хитозан обладает комплексом уникальных свойств: способностью к биологическому разложению [24, 26], антибактериальной активностью против широкого спектра бактерий [27, 28], антимикробной активностью [29-32], низкой токсичностью [24, 33], ранозаживляющим и кровоостанавливающим свойствами [29, 34-39], высокой реакционной и сорбционной способностью [40], что делает этот полимер одним из самых интересных и перспективных видов сырья для различных областей применения. Хитозан и его производные используются в сельском хозяйстве [41, 42], нашли широкое применение в качестве флокулянтов [43, 44] и сорбентов для очистки воды [45-48], в косметической [49], бумажной [50], пищевой промышленности [50, 51], фармации, как носитель лекарственных средств [52-56], медицине [57-60] и стоматологии [61].

Однако, хитозан, ввиду ограниченной растворимости, хрупкости все чаще подвергается химической и механической модификации для создания гибридных материалов с новыми свойствами, что расширяет спектр его применений, особенно в биомедицинской области [6, 53, 58]. Исследования показывают перспективность хитозана и его производных для костной и мягкой тканевой инженерии, для терапии остеоартроза [53, 62-67], композитные гидрогели имеют потенциал для восстановления хряща [68]. Хитозан способствует прикреплению клеток и образованию естественного внутриклеточного матрикса, улучшая регенерацию костной ткани [64, 69-71].

## 1.2. Модификация хитозана

### 1.2.1. Привитые и блок-сополимеры хитозана

Получение производных хитина и хитозана является важной задачей. Учитывая все биологические свойства хитозана [12, 72], актуальным является расширение спектра его производных, а также получения материалов с новыми свойствами на его основе. Значительное количество производных синтезировано как за счет реакций по гидроксильным группам аналогично целлюлозе [73], так и благодаря наличию аминогруппы [74]. Основные пути модификации хитозана описаны в работе [75].

Прививка к основной цепи полимера боковых ветвей является одним из основных методов модификации. Диапазон получаемых производных может быть достаточно широким, благодаря множеству комбинаций звеньев мономеров, входящих в привитые цепи. Метод привитой сополимеризации дает возможность объединить биологические свойства хитозана с преимуществами синтетических полимеров и получить новые материалы на его основе [12, 72]. Реакции синтеза привитых сополимеров осуществляются тремя основными способами: «grafting from» и «grafting onto», метод макромономера («grafting-through») [76].

Метод «grafting from» основан на полимеризации мономеров с участием функциональных групп основной цепи. Полимерный компонент используют в качестве инициатора, который возбуждает свободнорадикальную, ионную, координационно-ионную полимеризацию мономера, полимеризацию с раскрытием цикла мономера, который добавляют в реакционную смесь. Исходный полимер – это основная цепь привитого сополимера, привитые цепи которого будут образовывать полимеризующийся мономер [76].

Второй тип реакций «grafting onto» реализуется при обрыве «живых» цепей на «готовом» полимере через взаимодействие полимеров (олигомеров) путем конденсации функциональных групп, так и в случае рекомбинации макрорадикалов, образовавшихся в результате механохимического (вальцевание,

действие ультразвука, экструзия), ферментативного, радиационно-химического воздействия на смесь полимеров [76].

Третьим методом синтеза привитых сополимеров является макрономерный метод «grafting through». Макромомеры представляют собой олигомерные или полимерные цепи, несущие полимеризуемую концевую группу. Привитые сополимеры образуются за счет сополимеризации предварительно полученных макрономеров с другим мономером [76].

Большое количество статей посвящено привитой сополимеризации хитозана с виниловыми мономерами. Наиболее часто используемыми инициаторами привитой полимеризации виниловых мономеров на хитозан являются ионы церия ( $\text{Ce}^{4+}$ ) [77-86], реагент Фентона ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ ) [87-89], 2,2'-азо-бис-изобутиронитрил (ДАК) и т.д. [90, 91]. Другим типом водорастворимого радикального инициатора является персульфат калия (аммония). В таблице 2 перечислены наиболее часто используемые мономеры и иницирующие системы в синтезе привитых сополимеров хитозана.

Привитые сополимеры на основе полисахаридов можно получить, используя микроволновое [98-100] и  $\gamma$ -излучение [101-103], а также полимеризацией путем обратимого присоединения и фрагментации (RAFT) и полимеризации с переносом атома (ATRP). Привитые сополимеры хитозана синтезированы, используя метод «grafting from» в работах [104-114] и «grafting onto» [115-120], соответственно.

Привитая полимеризация виниловых мономеров на полисахариды позволяет получать гибридные сополимеры, которые находят свое применение в основном как биоматериалы, разделительные мембраны, гидрогели. Кроме привитых сополимеров в литературе также упоминаются и блок-сополимеры хитозана, получаемые различными способами, однако количество статей заметно меньше, чем предыдущих.

**Таблица 2.** Наиболее распространенные системы при получении привитых сополимеров с хитозаном

Мономеры	Иницилирующие системы	Ссылки
Акрилонитрил	$\text{Ce}^{4+}$	[77-80]
	персульфат калия (аммония)	[94, 95]
	микроволновое излучение	[99]
2-гидроксиэтилметакрилат	$\text{Ce}^{4+}$	[81]
	ДАК	[91]
N-изопропилакриламид	$\text{Ce}^{4+}$	[82]
Винилацетат	$\text{Ce}^{4+}$	[83, 84]
Акриловая кислота	$\text{Ce}^{4+}$	[85]
Метакриловая кислота	$\text{Ce}^{4+}$	[86]
Метилметакрилат	реагент Фентона ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ )	[87,89]
	персульфат калия (аммония)	[93, 50]
	микроволновое излучение	[100]
Метилакрилат	ДАК	[90, 91]
2-гидроксипропилметакрилат	ДАК	[91]
Стирол	ДАК	[91]
	$\gamma$ -излучение	[101, 102]
Акриламид	персульфат калия (аммония)	[92]
Бутилакрилат	персульфат калия	[96]
	$\gamma$ -излучение	[103]
N-винилпирролидон	персульфат аммония	[97]

Блок-сополимеры представляют собой макромолекулы, содержащие химически различные, связанные по концам блоки. Блок-сополимеры могут быть двухблочными (АВ), трехблочными (АВА) и полиблочными (АВ)<sub>n</sub>. В основе реакций синтеза блок-сополимеров лежат два главных принципа: взаимодействие макромолекулярного инициатора с мономером, взаимодействие двух или более полимеров или макрорадикалов друг с другом. Основными методами синтеза

блок-сополимеров являются полимеризация по механизму «живущих» цепей и ступенчатая полимеризация (поликонденсация) [121].

Ранее упоминалось о получении гибридных сополимеров хитозана, полученных методом твердофазного синтеза в условиях сдвиговых деформаций. Авторами [122-126] успешно разработаны материалы с повышенной прочностью на основе сополимеров хитозана. На основании этих работ можно предположить успешное решение проблемы получения сополимеров с хорошими прочностными характеристиками в процессе другого вида механохимического воздействия – ультразвука. Механохимические превращения, в частности, воздействие ультразвука являются возможным методом синтеза блок-сополимеров.

Развитие химических реакций в УЗ поле тесно связано с возникновением явления кавитации. Основными особенностями кавитации являются возникновение в жидкости и последующее «захлопывание» паро-газовых полостей, сопровождающееся значительными гидродинамическими ударами [127-129]. Механическое воздействие на системы из нескольких полимеров или полимера и мономеров позволяет осуществить синтез новых гибридных полимеров в результате взаимодействия макрорадикалов различного строения друг с другом или с мономерами [128, 129].

Показано, что вязкость растворов синтетических полимеров (поли- $\epsilon$ -капролактона и поливинилацетата [130], полиакрилонитрила [131]) под действием УЗ колебаний уменьшается, что связано с разрушением основных цепей макромолекул. Как упоминалось выше, что хитозан является жесткоцепным полимером. Жесткость основной цепи хитозана возрастает с увеличением степени ацетилирования [132-134]. Было подтверждено, что вязкость его растворов снижается под действием ультразвука, так как происходит деградация цепей [91, 135]. В работе [136] также было продемонстрировано, что обработка хитозана и крахмала ультразвуком с  $\nu = 360$  кГц в водном растворе является эффективной процедурой для снижения молекулярной массы полисахаридов. Авторы работы [135] установили, что под УЗ воздействием происходит снижение вязкости 3% раствора хитозана в 6 раз в течение 15–20 минут. Показано эффективное

использование УЗ воздействия с точки зрения синтеза блок-сополимеров хитозана и проведен синтез гибридных сополимеров хитозана с диметиламиноэтилметакрилатом. Описан синтез блок - сополимеров хитозана с метилакрилатом, 2-этилгексилакрилатом и стиролом [91].

Таким образом, поиск новых методов получения биоразлагаемых и биосовместимых гибридных сополимеров на основе полисахаридов, а, в частности, сополимеров хитозана с лактидом, по-прежнему остается актуальным, и эта задача может быть успешно решена методом УЗ воздействия.

### 1.2.2. Привитые сополимеры хитозана с лактидом

В этом разделе будут рассмотрены методы получения привитых сополимеров хитозана с лактидом. Способы синтеза влияют на структуру и свойства получаемых сополимеров. Комплекс свойств (способность к биодegradации, физико-механические и теплофизические характеристики и т. д.) определяет сферу использования полученных материалов.

В работах [137-138] методом поликонденсации и привитой полимеризации без катализатора при  $T = 80-90^{\circ}\text{C}$  были получены привитые сополимеры хитозана с лактидом. Привитые сополимеры хитозана с L-молочной кислотой являются цитосовместимыми и перспективны для тканевой инженерии [138].

Авторами работы [139] были получены водорастворимые привитые сополимеры взаимодействием D,L-лактида с хитозаном в диметилсульфоксиде в присутствии триэтиламина, способные образовывать полимерные мицеллы, для использования в качестве носителя гидрофобных лекарств и их контролируемого высвобождения.

Амфифильный гибридный сополимер хитозан-прив-(L-лактид) получен [140] при перемешивании ранее приготовленного раствора прекурсора ПЛА (PLLA-NCO), дилаурата дибутилолова (II) (0.2 мол. % PLLA-NCO) и хитозана в диметилформамиде в атмосфере азота при  $T = 80^{\circ}\text{C}$  (рисунок 4). Прекурсор ПЛА (PLLA-NCO) синтезировали по реакции ПЛА с 4,4'-метиленбис(фенилизоцианатом) (МФИ) при добавлении диметилформамида

в атмосфере азота при  $T = 60^{\circ}\text{C}$  при интенсивном перемешивании в течение 2 часов. Максимальный процент прививки составил 80.9 % при соотношении по массе хитозан: ПЛА = 1: 30 в сополимере. Авторы подчеркивают, что этот способ удобен для объединения биологических функций хитозана с хорошими механическими свойствами синтетических биоразлагаемых полимеров.

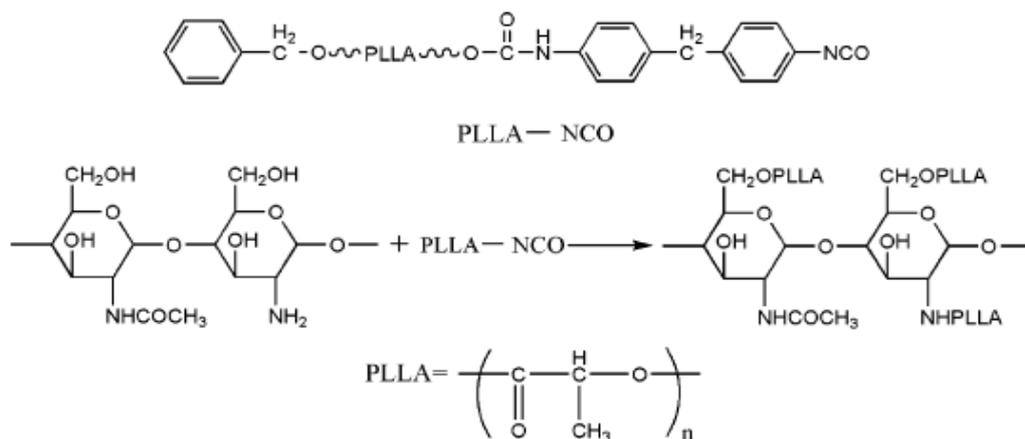


Рисунок 4. Синтез гибридных амфифильных привитых сополимеров хитозана с лактидом с помощью стратегии «grafting onto»

В исследовании [141] привитую полимеризацию L-лактида на хитозан проводили полимеризацией с раскрытием цикла при  $T = 90^{\circ}\text{C}$  в диметилсульфоксиде, в атмосфере азота, катализатор -  $\text{Ti}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_4$ . Все привитые сополимеры в отличие от хитозана в водной среде образуют гидрогели. Содержание L-лактида в сополимерах влияет на их биodeградацию. Полученные материалы перспективны для получения перевязочных материалов и доставки лекарств.

В работе [142] привитые сополимеры хитозан-прив-лактид синтезировали путем полимеризации с раскрытием цикла лактида на фталоил-защищенный хитозан самокатализом. В данном случае катализатор не является токсичным в отличие, например, от токсичного и трудноудаляемого 2-этилгексаноата олова (II). Синтезируемые сополимеры могут найти применение в области биомедицины. Представленный в работе механизм может стать удобным методом для подготовки новых биогибридов на основе хитозана, свободных от токсичных катализаторов.

В работе [143] ряд привитых сополимеров хитозана с лактидом с различной длиной цепи ПЛА синтезировали реакцией между аминогруппой хитозана и карбоксильной группой ПЛА с участием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида в соляной кислоте. Авторы показали, что длину привитых цепей можно легко контролировать путем добавления ПЛА с различной молекулярной массой. При уменьшении ММ ПЛА степень замещения ПЛА увеличивалась, тем самым реакция прививки проходила эффективней. Полученные привитые сополимеры с низкой степенью замещения перспективны для использования в тканевой инженерии.

В работе [144] прививка лактида на хитозан была успешно выполнена двумя различными способами: методом полимеризации с раскрытием цикла (А) и «grafting from» (В) (рисунок 5).

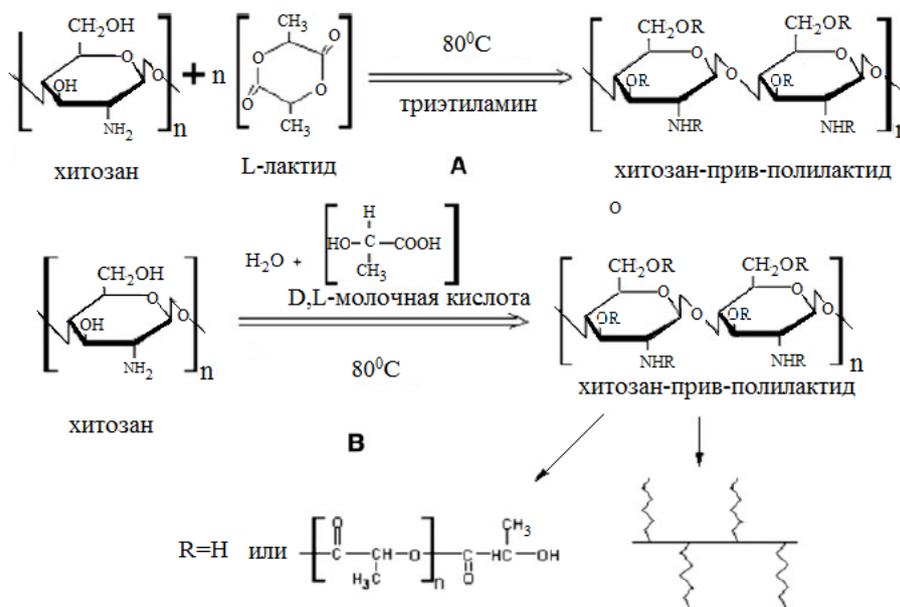


Рисунок 5. Схема получения привитых сополимеров хитозана с L-лактидом и D,L-молочной кислотой методами полимеризации с раскрытием цикла (А) и «grafting from» (В)

Полученный гибридный сополимер, к сожалению, не растворяется ни в органических растворителях, ни в разбавленной кислоте, поэтому непригоден в качестве компатибилизатора для совмещения растворов смесей хитозана с ПЛА.

Авторами работы [145] синтезированы сополимеры хитозана и гидроксиэтилхитозана с D,L-лактидом при микроволновом облучении (мощность микроволн 10 Вт) и  $T = 130^{\circ}\text{C}$  в присутствии 2-этилгексаноата олова (II) ( $c = 0.05$  мол. %) относительно D,L-лактида. Показано, что скорость полимеризации в данном случае выше по сравнению с обычной термической полимеризацией ( $T = 130^{\circ}\text{C}$ , 24 часа). При увеличении значения  $n$  (D,L-лактид):  $n$  (амино гликозидная единица) с 20: 1 до 40: 1 для привитых сополимеров гидроксиэтилхитозана с D,L-лактидом процент прививки находился в пределах 236.25 – 317.50 %, степень полимеризации боковых цепей поли(D,L-лактида) варьировалась в пределах 13.25 – 24.17. Эти значения были намного выше, чем у привитых сополимеров хитозана с D,L-лактидом, процент прививки которых составил 165.83 – 208.52 %, а средняя степень полимеризации боковых цепей поли (D,L-лактида) — 5.16 – 8.32. Авторы предполагают, что реакционная активность хитозана улучшилась после гидроксиэтилирования за счет возможного ослабления внутри- и межмолекулярных водородных связей полисахарида.

Амфифильные производные хитозана, содержащие боковые цепи ПЛА, были успешно синтезированы *in situ* посредством поликонденсации с раскрытием цикла с 2-этилгексаноатом олова (II) качестве катализатора, при  $T = 120^{\circ}\text{C}$  [146]. Показано, что при соотношении молочная кислота: хитозан по массе равном 30: 1 и изменении содержания 2-этилгексаноата олова (II) от 0.10 до 0.30 мас. %, процент прививки увеличился с 131.72 до 313.42 %, соответственно.

Анализируя совокупность литературных данных, необходимо отметить, что в основном, синтез привитых сополимеров хитозана с лактидом проводят при высоких температурах с использованием инициаторов, большинство из которых токсичны, особенно на основе соединений олова. Хитозан способен связывать и удерживать ионы металлов, что создает проблемы при очистке продуктов синтеза. Несмотря на достигнутые успехи в получении материалов на основе хитозана и ПЛА, практически неизвестны работы по синтезу их блок-сополимеров.

В последние десятилетие усилился интерес к получению сополимеров хитозана с лактидом, получаемых методом твердофазного синтеза, в литературе встречается достаточное количество работ, в которых отмечается не только простота метода и эффективность получения таких сополимеров, но и отсутствие необходимости использования растворителей [122-126].

Авторами работы [122] получены привитые сополимеры хитозана с олиго(L-, D,L-лактидами) методом твердофазного синтеза. В зависимости от условий проведения процесса и характеристик исходных компонентов степень прививки составила 4-44 мас. %. Принципиально важным является зависимость прочностных характеристик привитых сополимеров от стереоизомерии ПЛА. Прививка на хитозан олиго(L-лактида) приводит к незначительному снижению прочности при разрыве, в то время как прививка олиго(D,L-лактида) повышает ее на 40 %. Сополимеры использовали для формования как 2D, так и 3D материалов для тканевой инженерии в виде сферических микрочастиц и макропористых гидрогелей.

В исследовании [123] твердофазный метод сополимеризации использовали для прививки до 160 мас. % D,L-лактида на цепи хитозана (рисунок 6). Показано, что прививка протекала в результате ацетилирования аминогруппы хитозана, степень замещения до 0.41.

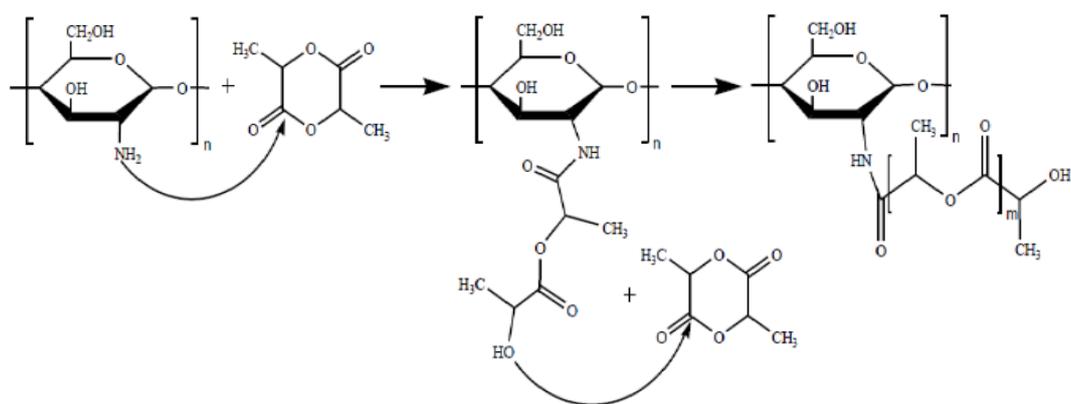


Рисунок 6. Схема привитой полимеризации D,L-лактида на хитозан

Прививка гидрофобных боковых цепей D,L-лактида при степени полимеризации достигающей 10 приводила к получению сополимеров хитозана с

D,L-лактидом с амфифильными свойствами. Амфифильные сополимеры были использованы для создания микросфер в тканевой инженерии.

Как отмечалось ранее, авторы работы [122] выявили, что прививка D,L-лактида на хитозан в условиях сдвиговых деформаций (метод твердофазного синтеза) приводит к увеличению прочности пленочных образцов. Принимая это во внимание, актуальная задача по получению биоразлагаемых и биосовместимых гибридных сополимеров хитозана с лактидом с высокими физико-механическими свойствами может быть успешно решена, используя метод УЗ воздействия.

### **1.2.3. Смесевые композиции на основе хитозана и полилактида**

Авторы предыдущих исследований отметили, что привитые сополимеры хитозана с лактидом перспективны для использования в тканевой инженерии благодаря комбинации их полезных свойств, что может быть также реализовано путем приготовления смесевых композиций на основе хитозана и ПЛА.

В литературе встречается достаточное количество работ по получению смесевых композиций на основе хитозана и ПЛА [147-155]. Особое внимание необходимо уделить тем работам, в которых удалось получить смеси, обладающие хорошими физико-механическими свойствами [147, 149, 155].

Смеси полимеров обычно получают либо смешением расплавов, либо растворов гомополимеров. К сожалению, хитозан - неплавкий полимер, при  $T > 230^{\circ}\text{C}$  наблюдается его деструкция, к тому же хитозан и ПЛА существенно отличаются по температуре стеклования ( $T_g$ ). Поэтому 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 соответствующего растворителя.

В работе [147] композиционные материалы ПЛА: хитозан с весовыми соотношениями от 10: 1 до 10: 4 получали путем смешения гомополимеров. Показано, что скорость деградации композитов были ниже, чем у чистого ПЛА. С увеличением массовой доли хитозана в композите скорость его разложения

снижалась. Это связано с тем, что хитозан, являясь полиоснованием, способен нейтрализовать кислотные продукты деградации ПЛА. Композиты потенциально могут использоваться в тканевой инженерии в виде скаффолдов.

В работах [148, 149] на основе смесей хитозана и ПЛА / поли(L-лактида) были изготовлены пористые мембраны. Авторы работы [148], показали, что для эффективного смешивания двух гомополимеров необходимо использовать смешанные растворители с учетом растворимости органических растворителей в воде. Отмечено, что для получения мембран важна последовательность введения растворов. Необходимо вводить растворы ПЛА или поли(L-лактида) в растворы хитозана, а не наоборот. Показано, что по мере увеличения доли хитозана как прочность на растяжение, так и модуль Юнга пористых мембран уменьшаются, а их удлинение при растяжении увеличивается.

В работе [150] получали биоразлагаемые материалы 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. Смеси осаждали ацетоном после перемешивания. Авторы выявили образование межмолекулярных водородных связей между двумя компонентами в смесях, которые образуются, в основном между карбонильными группами поли(L-лактида) и аминогруппами хитозана (рисунок 7).

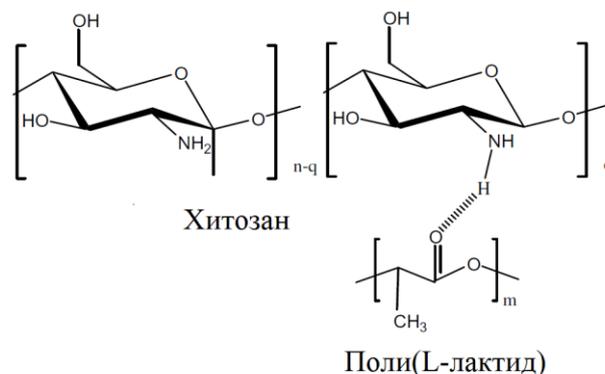


Рисунок 7. Схема образования интермолекулярных водородных связей между поли(L-лактидом) и хитозаном в смеси

Авторами изучено влияние межмолекулярного взаимодействия на кристаллизационную структуру смесей поли(L-лактид): хитозан. Данных о физико-механических свойствах композитов авторами не было представлено.

Авторы работ [151-152] предприняли попытки разработки композитов на основе смеси хитозана с ПЛА для использования последних в качестве упаковочных материалов. Авторы работы [151] получили смесевые композиции из эмульсий водного раствора хитозана с ПЛА, растворенного в хлороформе с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ) в качестве компатибилизатора. Выявлено, что ПЭГ (16.6 мас. %) улучшает механические свойства пленок хитозана и ПЛА, увеличивая гибкость материалов (величины разрушающего напряжения  $\sigma$  и деформации  $\epsilon$  пленок в статье не были представлены). Авторами отмечено, что, несмотря на другие характеристики, низкий уровень прочностных свойств таких гетерогенных пленок ограничивает их применение в качестве упаковочных материалов.

Авторы исследования [152] показали, что все смеси хитозана и ПЛА с увеличением содержания последнего показывают уменьшение значения модуля Юнга, прочности на растяжение  $\sigma$  и удлинения при разрыве  $\epsilon$ . Исходя из полученных результатов, авторы предположили, что уменьшение значения модуля упругости при растяжении с увеличением доли ПЛА может быть результатом разделения фаз системы при смешивании, а также, что смеси хитозан: ПЛА несовместимы. Анализ теплофизических свойств смесей хитозана с ПЛА также показал, что в смеси происходит фазовое разделение, что свидетельствует об их несовместимости.

Авторы работы [153] разработали способ получения смесевых композиций на основе хитозана и ПЛА через совмещение их эмульсий. Поливиниловый спирт (ПВС) использовали в качестве компатибилизатора для стабилизации эмульсии. Водный раствор хитозана в 1 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и ПВС в воде смешивали с раствором ПЛА в хлороформе в условиях высоких сдвиговых напряжений (22 000 об /мин) в течение 60 с. Для бинарных смесей ПВС: ПЛА и хитозан: ПЛА испытания на растяжение были невозможны, так как смеси после приготовления распадались.

Прочность на разрыв для хитозана, ПВС и ПЛА составляют ~ 28, ~ 17 и 18 МПа, соответственно. Для тройных смесей хитозан: ПВС: ПЛА = 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 важность ПВС, не только в качестве стабилизатора эмульсии, но и в качестве компатибилизатора смеси хитозана с ПЛА.

Авторы статьи [154] получили смеси хитозан: ПЛА с весовыми соотношениями 50: 50 при смешении гомополимеров в двухшнековом экструдере с температурным профилем 175-180°C и скоростью вращения шнека 100 об/ мин. Экструдированные нити измельчали и подвергали литьевому формованию для производства стержней. Показано, что добавление хитозана приводило к снижению как величины прочности на растяжение, так и удлинения в 1.5 и 3.1 раза, соответственно.

Авторы работы [155] предложили подход, в котором совместимость между двумя несовместимыми полимерами может быть осуществлена посредством химических реакций между функциональными группами хитозана (-ОН и -NH<sub>2</sub>) и ПЛА (-ОН и -COOH) с образованием компатибилизатора *in situ*. В процессе смешивания в систему добавляли МФИ. Схема возможных химических реакций между диизоцианатом и ПЛА, а также реакции совмещения с хитозаном представлены на рисунках 8 и 9, соответственно.

В работе 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 МФИ отражается на физико-механических свойствах композиций хитозана с ПЛА.



Анализируя представленные работы, можно сделать ряд выводов:

1) получить однородные смеси на основе гомополимеров проблематично

2) разработаны методы получения смеси хитозан: ПЛА с использованием компатибилизаторов

Однако вопрос о несовместимости хитозана и ПЛА остается открытым. Чтобы говорить о несовместимости полимеров, необходимо рассчитать и сравнить их параметры растворимости, далее можно судить о возможности получения совместимых смесей, однако, дополнительно необходимо решить проблему ограничения интерполимерного взаимодействия между гомополимерами.

### **1.3. Полимерные гибриды на основе хитозана, полилактида, гидроксиапатита**

Пленочные материалы на основе хитозана и ПЛА, как уже было сказано, могут использоваться для получения упаковочных, ранозаживляющих, а также других видов материалов медико-биологического назначения.

При разработке композитов для применения в качестве скаффолдов в тканевой инженерии, в частности, для остеосинтеза и регенерации поврежденных костных тканей можно выделить три основные группы материалов: природные полимеры, синтетические полимеры и керамика [156, 157]. К сожалению, ни один из материалов в отдельности не обладает достаточным комплексом свойств для получения полноценного имплантата. Поэтому в настоящее время данную проблему пытаются решить производством комбинированных материалов, создавая скаффолды на основе синтетических и природных биорезорбируемых материалов с добавлением биоактивных веществ [157, 158].

В качестве синтетических органических компонентов для получения скаффолдов используют биорезорбируемые полимеры [159, 160], в частности, ПЛА и его сополимеры [161, 162-168], обладающие высокой биосовместимостью и биодegradацией *in vivo*, а материалы на его основе характеризуются высокой

механической прочностью и регулируемой скоростью деградации [169], а также биополимеры, такие как коллаген [170-179], каррагинан [180], производные целлюлозы [181,182].

Среди биополимеров перспективным для использования в качестве компонентов матриц для тканевой инженерии является полисахарид хитозан [71, 183-201], поскольку он биосовместимый, гипоаллергенный, обладает противомикробными свойствами в отношении некоторых бактерий и грибов, растворим в водных растворах при  $\text{pH} < 5.5$  [12, 32, 202, 203]. Недостатком хитозана является невысокая механическая прочность.

В качестве неорганических компонентов для получения скаффолдов используют трикальций фосфат, биоактивные стекла различного состава и, преимущественно, ГА, благодаря высокой степени биосовместимости [204-206]. Однако ГА не может обеспечить всех требуемых характеристик материала ввиду отсутствия пористой структуры, низкой скорости биодеградации и хрупкости.

Поэтому его использование ограничивается только в качестве биоактивной добавки для увеличения остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойств скаффолдов для остеорегенерации [156, 158, 204-206].

В настоящее время можно выделить несколько направлений исследований, а именно работы по получению скаффолдов на основе хитозана и (со)полимеров лактида [159, 186, 207-215], (со)полимеров лактида и ГА [164-167, 206, 216-219], хитозана и ГА [189-192, 197, 199-201], а также комбинированных материалов на основе хитозана с (со)полимерами лактида, ГА / фосфатами кальция [220, 221].

Разработаны основы технологии получения гибридных композитов, предназначенных для применения в качестве пористых матриц для регенерации поврежденных костных тканей. Однако, поиск и разработка новых материалов для производства скаффолдов для тканевой инженерии и остеозамещения продолжают оставаться актуальной задачей. Можно предположить, что для производства и оптимизации необходимых характеристик скаффолдов перспективно использование комбинации свойств, присущих хитозану, ПЛА и ГА. Получение пористых композитов на основе ГА, хитозана и

сополимеров хитозана с лактидом для достижения необходимого комплекса свойств (физико-механических, остеоиндуктивных биосовместимости), обеспечивающего регенерацию ткани при лечении костных дефектов является актуальной задачей.

## Глава 2. Экспериментальная часть

### 2.1. Используемые вещества и их характеристики

В работе использовали хитозан (ЗАО «Биопрогресс», Россия) с  $MM = 1.2 \times 10^5$  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 марки «хч» ГОСТ 61-75 ( $99.5\%$ , плотность  $1.049 \text{ г/см}^3$ ), молочную кислоту «х.ч.» (ООО «Азур», содержание основного вещества  $80\%$ ).

Хлорид натрия – NaCl -марки «ч.д.а.» ГОСТ 4233-77 (содержание основного вещества –  $99.9\%$ ).

Гуанидин солянокислый  $(\text{NH}_2)_2\text{C}=\text{NH}\cdot\text{HCl}$ , моноэтаноламин  $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$  - марки «х.ч.» (содержание основного вещества –  $99\%$ ).

В качестве катализатора полимеризации с раскрытием цикла D,L-лактида использовали комплекс магния с аценафтендииминным лигандом  $(\text{dpp-bian})\text{Mg}(\text{TГФ})_3$  (**1**), который демонстрирует высокую активность в полимеризации лактидов с образованием полимера высокой ММ и узким ММР (рисунок 10) [222, 223].

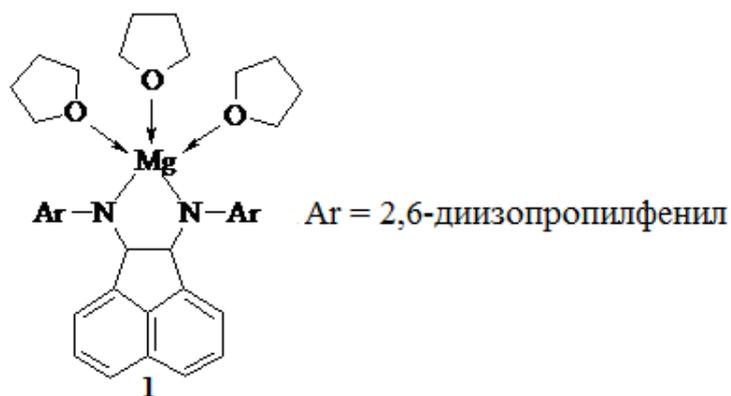


Рисунок 10. Комплекс магния с аценафтендииминным лигандом  $(\text{dpp-bian})\text{Mg}(\text{TГФ})_3$  (**1**)

Его использование при полимеризации лактида более предпочтительно по сравнению с широко применяемыми катализаторами на основе олова [224-226],

проявляющие токсические свойства. Установлено [223], что ПЛА, полученный на комплексе **1**, не обнаруживает цитотоксичности в экспериментах с культурами дермальных фибробластов человека. Полимеризацию D,L-лактида проводили в растворе ТГФ при температуре 70°C в течение 24 ч согласно методике [223]: для реакции было взято 14.4 г (100 ммоль) D,L-лактида и 211.8 мг (0.2857 ммоль) комплекса **1**. Выход полимера ( $M_n = 9.0 \times 10^4$ ,  $M_w = 13.2 \times 10^4$ ) составил 92 %. Поли(L-лактид) с  $M_n = 7.9 \times 10^4$ ,  $M_w = 15.5 \times 10^4$  был синтезирован аналогично. Образцы ПЛА и поли(L-лактида) предоставлены к.х.н. Морозовым А.Г. (Лаборатория органических производных непереходных металлов ИМХ им. Г.А. Разуваева РАН). Для приготовления растворов ПЛА использовали ТГФ.

Сополимер поли(D,L-лактид - титаноксид) получали полимеризацией D,L-лактида «Sigma-Aldrich» с раскрытием цикла с использованием изопророксида титана «ACROS Organics» с содержанием основного вещества 98 % в качестве катализатора без дополнительной очистки исходных веществ. Поли(D,L-лактид - титаноксид) с  $M_n = 18.9 \times 10^3$  и  $M_w = 34.0 \times 10^3$ , растворяли в ТГФ. В колбу вносили D,L-лактид и необходимое количество изопророксида титана, систему перемешивали до полного растворения кристаллов D,L-лактида. Процедуру проводили в боксе с сухим аргоном. Исходное мольное соотношение реагентов [D,L-лактид]: [Ti(OPr<sup>i</sup>)<sub>4</sub>] варьировали от 1: 1 до 3: 1. Синтез проводили при температуре 130°C в течение 12 часов в атмосфере аргона. После окончания синтеза продукт выделяли этиловым спиртом и сушили под вакуумом до постоянной массы. После выделения сополимера дополнительно было проведено экстрагирование на аппарате Сокслета возможно непрореагировавшего D,L-лактида из продукта синтеза этанолом в течение 36 ч. ММ ПЛА, исследованная методом ГПХ составляла  $34 \times 10^3$ ,  $M_w/M_n = 1.8$ , выход полимера составил 48 %. Содержание звеньев поли(титаноксида) в сополимерах, полученных при различных соотношениях компонентов варьировалось от 15 до 35 мас. %.

Растворители ТГФ, этанол, изопропанол, очищали по общепринятым методикам [227].

АА, содержание основного компонента 99 %, производство «Sigma-Aldrich». ПАА с  $M_n = 256 \times 10^3$ ,  $M_w = 350 \times 10^3$  был получен полимеризацией АА в водной среде, инициатор радикальной полимеризации - персульфат аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ .

Фермент для разложения хитозана – хитозаназа с активностью 250 ед/г производство «Lyven», Франция.

Суспензия ГА -  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  с размером частиц 50-100 нм предоставлена лабораторией Химии твердого тела (д.х.н., проф. Князевым А.В., к.х.н. Булановым Е.Н.) способ получения суспензии ГА подробно описан в патенте [228]. Во всех экспериментах использовали суспензию ГА с содержанием его 5-7 мас. % в дистиллированной воде.

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1. Определение молекулярной массы и степени деацетилирования хитозана

ММ хитозана определяли вискозиметрическим методом на вискозиметре Уббелюде при температуре 21°C. Навеску хитозана 0.1 г растворяли в 30 мл раствора  $\text{CH}_3\text{COOH}$  с концентрацией 0.33 моль/л в дистиллированной воде. Перед проведением измерений в раствор хитозана небольшими порциями добавляли хлорид натрия (концентрация соли в растворе составляла 0.3 моль/л) для подавления полиэлектролитного эффекта. Расчет средневязкостной ММ проводили по уравнению Марка-Куна-Хаувинка  $[\eta] = 3.41 \times 10^{-5} M^{1.02}$  [229].

СД 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 0.1н растворе  $\text{HCl}$ , заранее приготовленного из фиксанала. Раствор титровали 0.1н  $\text{NaOH}$  при постоянном перемешивании. На основании полученных результатов строили график зависимости рН раствора от объема титранта ( $\text{NaOH}$ ).

Кривая потенциометрического титрования раствора хитозана имеет два перегиба, первый перегиб кривой соответствует  $V_1(\text{NaOH})$ , пошедшему на титрование избыточного количества  $\text{HCl}$ , несвязанной с аминогруппами хитозана,

а второй -  $V_2(\text{NaOH})$  – на титрование  $\text{HCl}$ , связанной с аминогруппами хитозана. Для расчета СД образца хитозана использовали следующие формулы:

$$\text{СД} = \frac{V_{\text{прак}}}{V_{\text{теор}}} \times 100 \%,$$

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

$$V_{\text{теор}} = \frac{m}{\text{ММ}},$$

где  $\Delta V = V_2(\text{NaOH}) - V_1(\text{NaOH})$ , мл, соответствует нейтрализации аминогрупп хитозана,  $C$  – концентрация  $\text{NaOH}$ , моль/л,  $m$  – навеска хитозана, г;  $\text{ММ}$  звена глюкозамина = 161 г/моль. Данные обрабатывали статистически с применением критерия достоверности. В расчетах учитывали содержание влаги в хитозане.

### **2.2.2. Синтез блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, L-лактидом и акриламидом**

Блок-сополимеры хитозана с D,L-лактидом и хитозана с L-лактидом получали при УЗ обработке растворов смесей гомополимеров в течение 30 мин при  $T = 21^\circ\text{C}$  на установке И100-6/4 с УЗ генератором И-10-2.0 с мощностью 2000 Вт и рабочей частотой  $22 \pm 10 \%$  кГц.

Для приготовления растворов хитозана и ПЛА и поли(L-лактида) в различных соотношениях к 3 мас. % раствору хитозана в водном растворе уксусной кислоты (1.2 мас. %) при непрерывном перемешивании добавляли расчетное количество раствора ПЛА / поли(L-лактида) в ТГФ (1.5 мас. %). Приготовление растворов хитозана и ПАА проводили аналогично, используя расчетное количество раствора ПАА в воде (1.5 мас. %).

Однородность растворов контролировали спектрофотометрическим методом [230]. Спектры в видимой и УФ-областях регистрировали с помощью спектрофотометра UV-1650 («Shimadzu»).

Стоит отметить, что синтез блок-сополимеров хитозана с L-лактидом был интересен с точки зрения оценки влияния стереоизомерии ПЛА на физико-

механические свойства блок-сополимеров. Все дальнейшие эксперименты проводились только для блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом.

Наблюдался материальный баланс между массой осадка, выделенного после синтеза, и суммарной массой сополимера и гомополимера ПЛА. В дополнении к этому, экстрагирование возможно непрореагировавшего ПЛА из образцов после окончания синтеза проводили на аппарате Сокслета ТГФ в течение 36 ч, а хитозана – водным раствором уксусной кислоты на шейкере в течение того же времени. Время было установлено по глухому опыту экстракции ПЛА (хитозана) из смеси соответствующих гомополимеров. Хитозан и ПЛА по отдельности растворяли в 1.2 % уксусной кислоте и ТГФ, соответственно, смешивали их растворы, пробы осаждали изопропанолом и центрифугировали для отделения осадка. Образцы сушили вакуумированием до постоянной массы.

Блок-сополимеры хитозана с АА получали аналогично блок-сополимерам хитозана с D,L-лактидом. Для отделения возможно непрореагировавшего ПАА аликвотную часть раствора после синтеза по каплям при непрерывном перемешивании добавляли в дистиллированную воду, так как она является растворителем последнего. Осадок сополимера отделяли, раствор концентрировали под вакуумом и обрабатывали изопропанолом. Дополнительно экстрагирование ПАА из образцов после окончания синтеза проводили на аппарате Сокслета дистиллированной водой в течение 36 ч, а хитозана – водным раствором уксусной кислоты на шейкере в течение того же времени.

Образование сополимеров доказывали методом инфракрасной спектроскопии с помощью спектрофотометра «Infracum FT-801».

Состав блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом и хитозана с АА определяли методом элементного анализа с помощью элементного анализатора «Elementar Vario EL cube». Строили калибровочный график зависимости массовой доли углерода (азота) от соотношений гомополимеров в смеси и, используя его, находили состав сополимера.

### 2.2.3. Определение молекулярной массы гомополимеров и сополимеров, исследование структуры блок-сополимеров

Важной характеристикой сополимера является его структура, в случае блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом ММ блок-сополимера определить не представляется возможным, поскольку блок-сополимеры хитозана с D,L-лактидом не растворяются ни в ТГФ, ни в буферных средах, однако открывается возможность определения ММ блоков ПЛА в блок-сополимере, поскольку блоки полисахарида можно разрушить ферментативным гидролизом. Образцы блок-сополимера обрабатывали ферментом хитозаназой, разрушающим блоки хитозана до олигомера, растворимого в воде. В раствор блок-сополимеров вводили 1 мас. % фермента при температуре 38°C и оставляли на 6 часов для полного расщепления блоков полисахарида. Для разложения фермента раствор прогревали при температуре 55°C в течение 3 часов. Оставшийся после деградации блоков хитозана ПЛА выпадал в осадок, который очищали переосаждением и изучали его молекулярно-массовые характеристики.

Молекулярно-массовые характеристики ПЛА определяли методом ГПХ в ТГФ при 40°C со скоростью потока элюента 0.7 мл/мин на жидкостном хроматографе Shimadzu Prominence LC-20VP с колонками Tosoh Bioscience, наполненными полистиролдивинилбензольным гелем с размером пор  $1 \times 10^5$  и  $1 \times 10^4$  Å. В качестве детектора использовали дифференциальный рефрактометр. Хроматограммы обрабатывали с помощью программного обеспечения LCsolution. Для калибровки применяли узкодисперсные стандарты ПС.

Для оценки структуры блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом на качественном уровне были получены блок-сополимеры хитозана с АА при УЗ обработке растворов смесей гомополимеров в условиях, аналогичных синтезу блок-сополимеров с D,L-лактидом.

Блок-сополимеры хитозана с АА растворимы в буферных средах, что дает возможность определить как ММ блоков, входящих в его состав, так и ММ блок-сополимера. Таким образом, предположительное строение цепей блок-

сополимеры хитозана с D,L-лактидом проводили по результатам анализа строения цепей блок-сополимеров хитозана с АА.

ММ блок-сополимеров хитозана с АА, ММ исходного ПАА и его блоков в блок-сополимере определяли методом ГПХ на высокоэффективном жидкостном хроматографе LC-20AD Prominence «Shimadzu» с колонкой: TSKGEL G3000 SW XL с размером частиц 5  $\mu\text{m}$ , заполненной гелем на основе силикагеля, модифицированного гидрофильными активными группами. В качестве элюента использовали 0.5 н уксусную кислоту при скорости потока 0.8 мл/мин, температура 30°C, детектор ELSD (низкотемпературный испарительный детектор светорассеяния). Калибровку проводили, используя узкодисперсные образцы декстрана в диапазоне ММ от 1000 до 410000 Да (Fluca). Для выделения блоков ПАА и определения их ММ использовали, как и в случае с блок-сополимерами хитозана с D,L-лактидом, ферментативное разрушение фрагментов цепей полисахарида. Предварительно было показано, что ни ПЛА, ни ПАА не разрушаются при воздействии фермента хитозаназы.

ММ блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом определяли методом MALDI-TOF (времяпролётный тандемный масс-спектрометр AXIMA Performance (Shimadzu). Азотный лазер 337 нм. Спектры получены в линейном режиме положительных ионов. Для этого исследования было проведено фракционирование полученных блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом методом дробного осаждения из раствора. Готовили отдельно раствор матрицы (2,5-дигидрокси-бензойная кислота 18 мг/мл в смеси  $\text{H}_2\text{O}$ :  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  = 11: 1 по объему), соли (трифторацетат натрия 2.5 мг/мл в ТГФ) и полимера (1.8 мг/мл в смеси  $\text{H}_2\text{O}$ :  $\text{CF}_3\text{COOH}$  = 3: 1 по объему). Полученные растворы смешивали в объемном соотношении матрица: полимер: соль = 100: 10: 1. Перед анализом 2 мкл раствора наносили на мишень, сушили на воздухе при комнатной температуре.

#### **2.2.4. Изготовление пленок и исследование их физико-механических свойств**

Пленки хитозана получали методом полива на стеклянную подложку из водноуксуснокислых растворов (3 мас. % хитозана в 1.2 % уксусной кислоте). Пленки полимеров получали методом полива на стеклянную подложку из однородных растворов блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом и хитозана с хитозана с L-лактидом и однородных растворов смесевых композиций на основе хитозана и ПЛА в смешанном растворителе 1.2 мас. %  $\text{CH}_3\text{COOH}$  – ТГФ в соотношении, которое применяли при синтезе. Смесевые композиции на основе хитозана и ПЛА при их различных соотношениях были получены без и с использованием компатибилизатора. В качестве компатибилизаторов были использованы блок-сополимеры хитозана с D,L-лактидом, с массовой долей последнего 0.1 и 0.2. Все пленки получали в условиях равномерного испарения растворителя до постоянной массы при комнатной температуре. Для удаления уксусной кислоты пленки обрабатывали спиртовым раствором NaOH, а затем дистиллированной водой до нейтрального значения pH среды. Затем пленки подвергали вакуумированию в течении 4 – 6 часов при  $T = 30^\circ\text{C}$  в вакуумном шкафу.

Физико-механические характеристики образцов в виде пленок определяли на универсальной разрывной машине «ZWICK/ROELLZ005» (Германия) при постоянной скорости растяжения 50 мм/мин с автоматической регистрацией деформации  $\epsilon$  и разрушающего напряжения  $\sigma$ .

#### **2.2.5. Исследование структуры хитозана, блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом и смесей гомополимеров**

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  $10-60^\circ$  по углу дифракции  $2\theta$  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.

Топографию поверхности пленок блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, исходного полисахарида и ПЛА анализировали методом атомно-силовой микроскопии на сканирующем зондовом микроскопе «Solver-P4» (Зеленоград). Сканирование проводили в полуконтактном режиме. Эксперименты выполнены в ИМХ РАН старшим научным сотрудником к.х.н. Батенькиным М.А.

#### **2.2.6. Исследование бактерицидных свойств, грибостойкости и биodeградации блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом**

Бактерицидные свойства блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом исследовали по отношению к культурам ряда бактерий, которые могут инфицировать раневую поверхность: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

Грибостойкость блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом исследовали с использованием гостированных штаммов микромицетов: *Aspergillus Oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium chrysogenum*. Используемый метод дает возможность оценить природную грибостойкость материалов, то есть возможность их использования микромицетами в качестве источников питания. Эксперимент проводили следующим образом: полимерную композицию помещали в чашки Петри, инокулировали суспензией спор грибов ( $1 \times 10^6$  в мл) и термостатировали в течение 28 суток при  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  и влажности  $> 95\%$ . Грибостойкость оценивали в баллах (по шестибальной шкале) на основе визуальной оценки интенсивности роста грибов на испытуемых образцах. Бактерицидные свойства и грибостойкость композиций на основе хитозана и ПЛА были изучены в отделе биологических исследований НИИ химии ННГУ. Исследование грибостойкости полученных сополимеров проводили по государственному стандарту [231].

Биодеградацию *in vivo* блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом,  $\omega(\text{ПЛА}) = 26$  мас. % исследовали на предварительно наркотизированных лабораторных животных – нелинейных белых крысах массой ~ 200-220 г.

Все процедуры 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).

Из блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом,  $\omega(\text{ПЛА}) = 26$  мас. % были изготовлены пластины длиной 2 см и шириной 0.5 см. Лабораторным животным были сделаны разрезы в бедренной части и под кожу введены и зашиты пластины. Длительность опыта составляла 2 месяца. Все опыты выполнены под руководством и при непосредственном участии д.б.н., профессора А.С. Корягина на кафедре биохимии и физиологии института биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского.

### **2.2.7. Исследование теплофизических свойств композиций**

Теплофизические свойства образцов хитозана, блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, смесевых композиций хитозана с ПЛА 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. Проверку надежности работы калориметра осуществляли посредством стандартных калибровочных экспериментов по определению термодинамических характеристик плавления индия, олова, висмута, цинка, ртути, нитрата калия, хлорида цезия и бифенила. Было установлено, что аппаратура и методика ДСК-измерений позволяют определять температуры фазовых превращений с

погрешностью  $\pm 0.5^\circ\text{C}$ . Методика определения вышеуказанных характеристик подробно описана в работах [232, 233] и NETZSCH *Proteus* Software.

ТГ-анализ образцов хитозана, ПЛА и блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом и смесевых композиций хитозана с ПЛА проводили в области температур  $30\text{--}330^\circ\text{C}$  с использованием термомикровесов TG 209 *FI Iris* (NETZSCH Gerätebau, Германия). Измерения образцов проводились в атмосфере аргона со скоростью нагревания  $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ . В соответствии с NETZSCH *Proteus* Software, используемая аппаратура и методика ТГ-измерений позволяет зафиксировать изменение массы образцов до  $\pm 0.1$  мкг. Методика проведения ТГ-анализа стандартная, согласно Netzsch Software *Proteus*. За температуру начала разложения принимали температуру, соответствующую потере массы 2 %.

#### **2.2.8. Приготовление и исследование свойств композитов на основе хитозана, блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, модифицированных гидроксиапатитом**

Хитозан и блок-сополимеры хитозана с D,L-лактидом модифицировали с помощью гидроксиапатита. К раствору хитозана (3 мас. % в 1.2 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) добавляли при непрерывном перемешивании суспензию ГА в дистиллированной воде, содержание которого ( $\omega$ ) варьировали от 5 до 40 мас. %.

К растворам блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом,  $\omega$  (ПЛА) = 0.1 и 0.2 добавляли при тщательном перемешивании суспензию ГА в дистиллированной воде, содержание  $\omega(\text{ГА}) = 0.5$  мас. % по отношению к хитозану. Физико-механические свойства образцов в виде пленок определяли методом, описанным в разделе 2.2.4. настоящей работы.

Рентгеновские дифрактограммы соединений были записаны на дифрактометре XRD-6000 «Shimadzu» (излучение  $\text{CuK}_\alpha$ , геометрия  $\theta$ - $2\theta$ ) в диапазоне  $2\theta$  от 10 до 60 градусов с шагом сканирования 0.02 градуса.

Поведение отдельных соединений и композитов в широком диапазоне температур исследовали с помощью термоанализатора Shimadzu DTG-60H (скорость нагрева  $10^\circ\text{C}/\text{мин}$ , в атмосфере азота, алундовый тигель).

### 2.2.9. Приготовление и изучение свойств композиций на основе хитозана и поли(D,L-лактид - титаноксида), полученного с использованием $Ti(OPr^i)_4$

Хитозан ( $MM = 1.2 \times 10^5$  и  $CD = 82 \%$ ) растворяли в водном растворе молочной кислоты (1.5 мас. %), содержание полисахарида составляло 3 мас. %. После полного растворения хитозана в растворы добавляли рассчитанное количество поли(D,L-лактид - титаноксида), растворенного в ТГФ, – от 10 до 50 мас. % по отношению к массе хитозана и перемешивали систему в течение нескольких часов до образования однородного раствора. Образцы поли(D,L-лактид – титаноксида) были синтезированы с использованием  $Ti(OPr^i)_4$  в качестве катализатора полимеризации с раскрытием цикла D,L-лактида и со(мономера) одновременно. Исходное мольное соотношение реагентов [D,L-лактид]:  $[Ti(OPr^i)_4]$  варьировали от 1: 1 до 3: 1. Содержание звеньев поли(титаноксида) в сополимерах варьировалось от 15 до 35 мас. %. Пленки получали аналогичным методом, описанным в разделе 2.2.4. настоящей работы. Для удаления молочной кислоты пленки обрабатывали спиртовым раствором NaOH, а затем дистиллированной водой до нейтрального значения pH среды. Соотношение компонентов в высушенных образцах изменялось в пределах: хитозана – от 91 мас. % до 66.7 мас. %; ПЛА – от 9 мас. % до 33.3 мас. %.

Светопропускание пленок на основе смесей хитозана и поли(D,L-лактид - титаноксида) различного состава исследовано на спектрофотометре УФ- и видимого диапазонов UV-1650 (Shimadzu). Физико-механические характеристики образцов проводили методом, описанным в разделе 2.2.4. настоящей работы.

Исследование биологической активности пленочных материалов на основе смесей хитозана и поли(D,L-лактид - титаноксида) проведено на белых нелинейных крысах-самках трехмесячного возраста массой 150-200 г. Полученные образцы были имплантированы экспериментальным животным в межлопаточную область спины. Работы проводились на наркотизированных животных в соответствии с требованиями, описанными в разделе 2.2.6. настоящей работы.

Экспериментальные животные были разделены на 3 группы по 7 особей в каждой: группа 1 – интактные животные (относительная норма); 2 группа – контроль (животным был осуществлен надрез без введения пленки); группа 3 – опытные животные. Предварительно наркотизированным крысам 2 и 3 групп делали разрез кожи в межлопаточной области. Животным 3 группы таким образом были имплантированы под кожу образцы пленок состава 66.7 мас. % хитозан + 33.3 мас. % поли(D,L-лактид - титаноксид) ([D,L-лактид]: [Ti(OPr<sup>i</sup>)<sub>4</sub>] = 3: 1, содержание звеньев поли(титаноксида) в сополимере составляло 30 мас. %). После этого разрез зашивали. Животным контрольной группы рану зашивали, не вводя пленку.

Для оценки влияния имплантированной пленки на функциональное состояние животных, возможное развитие у них воспалительных процессов и аллергической реакции через 7 и 21 сутки после введения пленки у крыс забирали кровь для анализа. 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. Биосовместимость оценивали по отсутствию или наличию фиброзной капсулы вокруг образца пленки. Биорезорбируемость оценивалась по уменьшению массы введенного образца спустя 1 и 3 недели после введения.

В плазме крови определяли содержание одного из конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – первичных, вторичных диеновых конъюгатов и оснований Шиффа методом И.А. Волчегорского [234].

Результаты исследований статистически обрабатывали с использованием 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.

Антибактериальное действие состава 66.7 мас. % хитозан + 33.3 мас. % поли(D,L-лактид - титаноксид) ([D,L-лактид]: [Ti(OPr<sup>i</sup>)<sub>4</sub>] = 3: 1, содержание звеньев поли(титаноксида) в сополимере составляло 30 мас. %) было изучено при развитии штаммов микроорганизмов *Staphylococcus aureus*. О наличии бактерицидной активности судили по зоне ингибирования роста тест-культур бактерий, которая образуется вокруг исследуемых образцов. Испытания пленочных образцов частично проводились при действии УФ-света. Источником УФ-излучения служила бактерицидная лампа БУВ-30-П с длиной волны 254 нм.

### Глава 3. Результаты и их обсуждение

#### 3.1. Синтез блок–сополимеров хитозана с D,L-лактидом методом ультразвуковой деструкции

Синтез блок-сополимеров с помощью воздействия УЗ на растворы смесей гомополимеров является простым и эффективным в экспериментальном отношении [121, 131, 235-237]. Этот метод позволяет получать однородные композиционные материалы, содержащие в макромолекулах фрагменты несовместимых или трудносовместимых полимеров. Полученные при таком способе синтеза блок-сополимеры могут быть двухблочными, трехблочными или мультиблочными.

Анализ литературных данных различных авторов, исследовавших возможность получения однородных смесей хитозана с ПЛА через раствор, показал, что в большинстве случаев попытки получить смесь гомополимеров не увенчались успехом из-за выпадения осадка. В ряде работ авторы пришли к выводу о несовместимости хитозана и ПЛА. С моей точки зрения, существует несколько факторов, которые влияют на трудность получения однородной смеси. Одна из причин - полимеры могут быть несовместимыми, другая - неправильно подобранные растворители. И еще одним возможным фактором является интерполимерное взаимодействие между макромолекулами хитозана и ПЛА в растворе за счет их функциональных групп. Учитывая результаты авторов [151-153,155], которые пришли к выводу о несовместимости хитозана с ПЛА, необходимо было подтвердить или опровергнуть это положение.

Известно, что одним из критериев, позволяющих предсказать совместимость полимеров, является использование значения параметра растворимости Гильдебранда ( $\delta$ ). Как правило, считается, что компоненты совместимы, если  $\delta_1 - \delta_2 < 1.5$ , где  $\delta_1$  и  $\delta_2$  –параметры растворимости полимеров 1 и 2 соответственно [238].

Был выполнен расчет параметров растворимости хитозана и ПЛА по Аскадскому:

$$\delta^2 = \frac{E^*}{N_A \sum_{i=0}^i \Delta V_i},$$

где  $N_A$  – постоянная Авогадро,  $\Delta V_i$  – инкремент ван-дер-ваальсового объема атомов  $i$ -ого вида,  $E^*$  – энергия когезии. Значение  $E^*$  – величина аддитивная  $E^* = \sum_{i=0}^i \Delta E_i$ , где  $\Delta E_i$  – вклад каждого атома и типа межмолекулярного взаимодействия в  $E^*$  [238-240].

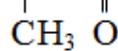
Параметр растворимости ПЛА рассчитывали в соответствии с формулой

$$\delta^2 = \frac{\sum_{i=1}^n \Delta E_i^*}{N_A \cdot \sum \Delta V_i},$$

используя табличные значения  $\Delta E^*$  для различных атомов и

молекулярные объемы различных атомных группировок по Аскадскому [239].

Для полимерной цепи  $-\text{CH}-\text{C}-\text{O}-$  имеем:



$$\Delta E = 3 \Delta E_C^* + 4 \Delta E_H^* + 2 \Delta E_O^* = 3 \times 550.7 + 4 \times 47.7 + 2 \times 142.6 = 2128.1 \text{ кал/моль},$$

$$\Delta V = \Delta V_{C,10} + \Delta V_{C,27} + \Delta V_{C,35} + \Delta V_{O,57} + 4 \Delta V_{H,54} + \Delta V_{O,55} = 48.7 \text{ \AA}^3.$$

Так как  $N_A = 6.06 \times 10^{23}$ , то

$$\delta_{\text{ПЛА}} = [2128.1 / (6.06 \times 10^{23} \times 48.7 \times 10^{-24})]^{0.5} = 8.5 \text{ (кал/см}^3)^{0.5}.$$

Хитозан состоит из двух видов звеньев N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина, то его можно представить в виде сополимера. СД описывает степень преобразования N-ацетил-D-глюкозамина в D-глюкозамин. СД выражается в процентном отношении количества глюкозаминных звеньев к общему числу мономерных звеньев в молекуле полисахарида.

Параметр растворимости хитозан рассчитывали по формуле:

$$\delta_{1,2}^2 = \frac{\alpha_1 (\sum_i \Delta E_i^*)_1 + (1 - \alpha_1) (\sum_i \Delta E_i^*)_2}{N_A [\alpha_1 (\sum_i \Delta V_i^*)_1 + (1 - \alpha_1) (\sum_i \Delta V_i^*)_2]},$$

где

$\alpha_1$  - СД хитозана,  $(\sum_i \Delta E_i^*)_1$  и  $(\sum_i \Delta E_i^*)_2$  – эффективные энергии компонентов 1 (D-глюкозамин) и 2 (N-ацетил-D-глюкозамин) в сополимере;  $(\sum_i \Delta V_i^*)_1$  и  $(\sum_i \Delta V_i^*)_2$  - ван-дер-ваальсовы объемы компонентов.

$$\Delta E_1 = 6\Delta E_C^* + 11\Delta E_H^* + 4\Delta E_O^* + E_N^* = 6 \times 550.7 + 11 \times 47.7 + 4 \times 142.6 + 1 \times 1205 = 5604.3 \text{ кал/ моль (звено D-глюкозамина).}$$

$$\Delta E_2 = 8\Delta E_C^* + 13\Delta E_H^* + 6\Delta E_O^* + E_N^* = 8 \times 550.7 + 13 \times 47.7 + 6 \times 142.6 + 1 \times 1205 = 7086.3 \text{ кал/ моль (звено N-ацетил-D-глюкозамина).}$$

Рассчитываем  $\Delta V_1$  (звено D-глюкозамина) и  $\Delta V_2$  (звено N-ацетил-D-глюкозамина). Инкремент объема атома С, обрамленного двумя атомами О, одним атомом Н и одним атомом С, нет в приложении [239], но его можно рассчитать из разности значений уже известных мольных объемов атомных группировок:

$$\Delta V = \Delta V_{C,24} + \Delta V_{C,1} = 8.6 - 5.0 = 3.6 \text{ \AA}^3.$$

Таким образом, при замене одного атома С на атом О, используя инкремент объема атома С, обрамленного двумя атомами С, одним атомом Н и одним атомом О ( $\Delta V_{C,27}$ ), получаем  $\Delta V_{C,27+3,6} = \Delta V_{C,27} + 3.6 \text{ \AA}^3 = 12.2 + 3.6 = 15.8 \text{ \AA}^3$ .

Для определения инкремента объема атома С, обрамленного двумя атомами С, одним атомом Н и одним атомом N, которого также нет в приложении [239], необходимо сначала рассчитать:  $\Delta V = \Delta V_{C,4} + \Delta V_{C,1} = 9 - 5.0 = 4.0 \text{ \AA}^3$ , который получается при замене одного атома Н на атом С.

Таким образом, используя инкремент объема атома С, обрамленного двумя атомами Н, одним атомом N и одним атомом С ( $\Delta V_{C,37}$ ), в итоге получаем  $\Delta V_{C,37-4.0} = \Delta V_{C,37} - 4 \text{ \AA}^3 = 14.7 - 4.0 = 10.7 \text{ \AA}^3$ . Аналогично рассчитывали инкременты объема атомов О, N, значения которых также не были приведены в приложении [239].

$$\begin{aligned} \Delta V_1 = & \Delta V_{C,27+3.6} + \Delta V_{C,37-4.0} + 3\Delta V_{C,27} + \Delta V_{C,28} + 2 \Delta V_{O,57} + 2 \Delta V_{O,60} + \Delta V_{N,70} + \\ & + 2 \Delta V_{H,52} + 7 \Delta V_{H,54} + 2 \Delta V_{H,56} = 15.8 + 10.7 + 3 \times 12.2 + 16.2 + 2 \times 3.4 + 2 \times 5.6 + 9.1 + \\ & + 2 \times 4.7 + 7 \times 2.0 + 2 \times 3.5 = 136.8 \text{ \AA}^3 = 136.8 \times 10^{-24} \text{ см}^3. \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \Delta V_2 = & \Delta V_{C,27+3.6} + \Delta V_{C,37-4.0} + 3\Delta V_{C,27} + \Delta V_{C,28} + \Delta V_{C,35} + \Delta V_{C,10} + 2 \Delta V_{O,60} + \\ & + 2\Delta V_{O,57} + \Delta V_{O,60-2.5} + \Delta V_{O,55} + \Delta V_{N,68+7.6} + \Delta V_{H,56} + 2 \Delta V_{H,52} + 10 \Delta V_{H,54} = 15.8 + \end{aligned}$$

$$+10.7 + 3 \times 12.2 + 16.2 + 15.9 + 17.2 + 2 \times 5.6 + 2 \times 3.4 + 3.1 + 5.85 + 8.5 + 3.5 + 2 \times 4.7 + 10 \times 2.0 = 180.75 \text{ \AA}^3 = 180.75 \times 10^{-24} \text{ см}^3.$$

Так как  $N_A = 6.06 \times 10^{23}$ , то

$$\delta_{\text{хитозан}} = [0.82 \times 5604.3 + (1 - 0.82) \times 7086.3 / (6.06 \times 10^{23} \times ((0.82 \times 136.8 + (1 - 0.82) \times 180.75 \times 10^{-24})))]^{0.5} = 9.1 \text{ (кал/см}^3)^{0.5}.$$

Итак, для хитозана значение параметра растворимости составило  $9.1 \text{ [(кал/см}^3)^{1/2}]$ , для ПЛА:  $\delta = 8.5 \text{ [(кал/см}^3)^{1/2}]$ , т.е.  $\delta_{\text{хитозан}} - \delta_{\text{ПЛА}} = 0.6 \ll 1.5$ , близкие параметры растворимости обоих полимеров указывают на их совместимость [241].

Отсюда можно сделать заключение, что проблема получения однородной смеси кроется не в несовместимости гомополимеров, а может быть связана с двумя причинами: сложностью подбора общего растворителя и интерполимерным взаимодействием между макромолекулами хитозана и ПЛА. В пользу последнего свидетельствуют данные работ [14-17] по интерполимерному взаимодействию хитозана с белковыми макромолекулами, в частности с инсулином [14, 15], белками молочной сыворотки [16, 17].

В первую очередь, необходимо было подобрать смешанный растворитель, обеспечивающий совмещение гомополимеров для приготовления однородной системы. Хитозан растворим в водных растворах разбавленных кислот (нерастворитель для ПЛА), а ПЛА - в ТГФ (нерастворитель для хитозана). В связи с этим, исследовано влияние ТГФ на устойчивость растворов хитозана (3 мас. % в 1.2 мас. %  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) и 1.2 мас. %  $\text{CH}_3\text{COOH}$  на устойчивость растворов ПЛА в ТГФ.

О качестве растворителя можно судить на основании данных по проценту их светопропускания (оптической плотности) [230]. Методом УФ-спектроскопии было показано, что при добавлении ТГФ вплоть до 30 об. % в уксуснокислый раствор хитозана процент светопропускания смеси остается постоянным. Аналогично исследовали влияние 1.2 мас. % водного раствора уксусной кислоты на устойчивость раствора ПЛА в ТГФ. Показано, что при его добавлении вплоть

до 10 об. % к раствору ПЛА в ТГФ процент светопропускания смеси остается постоянным.

На основании исследований влияния различных концентраций ПЛА в ТГФ на растворы хитозана были установлены оптимальные, с точки зрения получения однородных смесей, соотношения полимеров и растворителей. Для приготовления однородных растворов смесей гомополимеров использовали 1.5 мас. % раствор ПЛА в ТГФ, который при непрерывном перемешивании вводили в раствор 3 мас. % хитозана в 1.2 мас. %  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Однако даже при этих оптимальных условиях система оставалась оптически прозрачной лишь до соотношения хитозан: ПЛА = 90: 10 по массе. При дальнейшем увеличении массовой доли ПЛА наблюдали помутнение раствора и выпадение осадка. Последнее обусловлено, по видимому, образованием интерполимерного комплекса между хитозаном и ПЛА.

Образование комплекса хитозан-ПЛА подтверждено методом ИК-спектроскопии. Для этого к раствору хитозана добавляли раствор ПЛА, полученный раствор центрифугировали, осадок отфильтровывали и сушили до постоянной массы. Были записаны ИК-спектры осадка и фильтрата (рисунок 11) [241].

В ИК-спектре фильтрата наблюдаются полосы поглощения, характерные для функциональных групп хитозана ( $1651, 1591 \text{ см}^{-1}$  – амид I и деформационные колебания свободных аминогрупп, соответственно), полоса поглощения карбонильной группы ПЛА отсутствует). В ИК-спектре осадка присутствуют как полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям карбонильной группы ПЛА ( $1754 \text{ см}^{-1}$ ), так и характерные для функциональных групп хитозана ( $1651, 1566 \text{ см}^{-1}$  – амид I и деформационные колебания свободных аминогрупп, соответственно). Стоит отметить, что в спектре (рисунок 11, кривая 2) наблюдается смещение полосы, относящейся к аминогруппе хитозана с  $1591$  до  $1566 \text{ см}^{-1}$ , что может быть обусловлено образованием интерполимерного комплекса между гомополимерами за счет их функциональных групп. Таким образом, получение однородных растворов хитозана с ПЛА в смешанном

растворителе возможно лишь до соотношения гомополимеров 90 мас. % хитозан и 10 мас. % ПЛА [241].

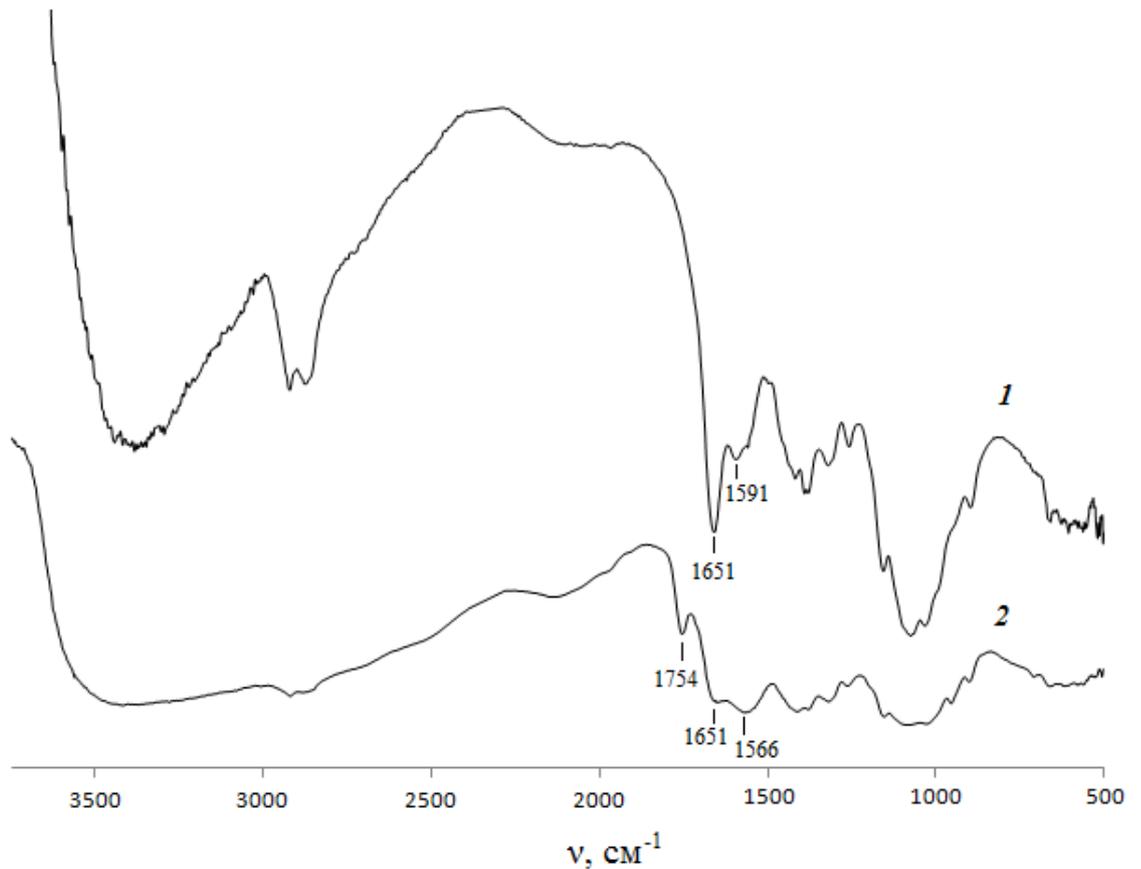


Рисунок 11. ИК-спектры фильтрата (**1**) и высушенного образца комплекса хитозан – ПЛА, выпавшего в осадок (**2**)

С целью предотвращения интерполимерного взаимодействия и получения растворов хитозана и ПЛА с высоким содержанием последнего в раствор ПЛА в ТГФ вводили низкомолекулярные соединения - модификаторы, содержащие аминогруппы – гуанидин солянокислый  $(\text{NH}_2)_2\text{C}=\text{NH}\cdot\text{HCl}$  или моноэтаноламин  $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ , способные блокировать карбонильные группы ПЛА. Количество модификаторов варьировали в широком интервале – от эквимольного соотношения модификатора и звеньев ПЛА до соотношения 1: 100. Установлено, что минимальное количество модификатора, которое требуется вводить по отношению к рассчитанному количеству звеньев ПЛА для обеспечения однородности системы, составляет 1: 50, т.е. достаточно блокировать каждое пятидесятое звено макромолекулы ПЛА. Добавление модификаторов в раствор

ПЛА обеспечило получение раствора хитозана с содержанием ПЛА до 50 мас. %. Однородность системы контролировали спектрофотометрическим методом. Полученные растворы хитозана и ПЛА подвергали УЗ воздействию [242].

Предварительно было установлено оптимальное время УЗ воздействия на водноуксуснокислые растворы 3 мас. % хитозана, при котором достигается предельная деструкция цепей полисахарида. Во всех случаях деструкция хитозана существенно зависела от содержания  $\text{CH}_3\text{COOH}$  в растворе, которая варьировалась от 1 до 4 мас. %. Так для 3 мас. % хитозана в 1.2 мас. %  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ММ снижается с  $1.2 \times 10^5$  до  $2.1 \times 10^3$ , достигая постоянного значения за 30 мин при  $\nu = 21.5$  кГц и  $T = 21^\circ\text{C}$ .

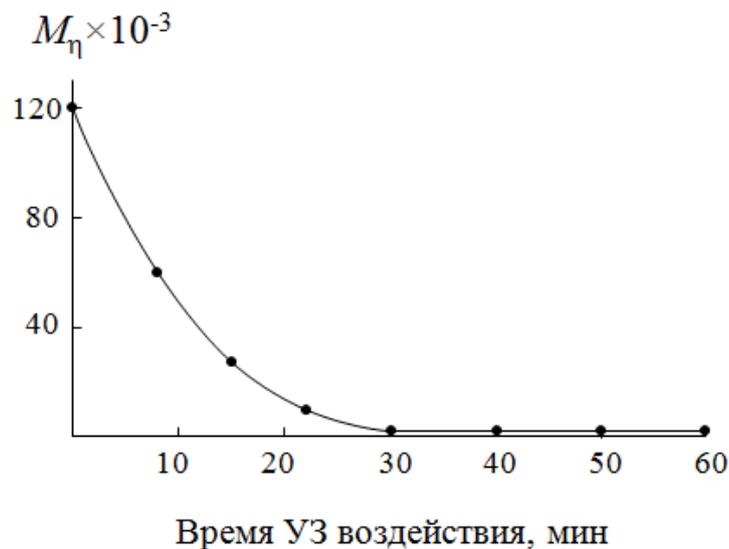


Рисунок 12. Изменение ММ хитозана в процессе УЗ воздействия на его раствор (3 мас. % в 1.2 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ),  $\nu = 21.5$  кГц,  $T = 21^\circ\text{C}$

Существенно, что при этом не происходит изменение структуры звеньев хитозана, о чем свидетельствует полная идентичность спектров полимера до и после УЗ воздействия (рисунок 13). Варьирование продолжительности УЗ воздействия позволяет регулировать длину блоков полисахарида в процессе получения блок-сополимеров[242].

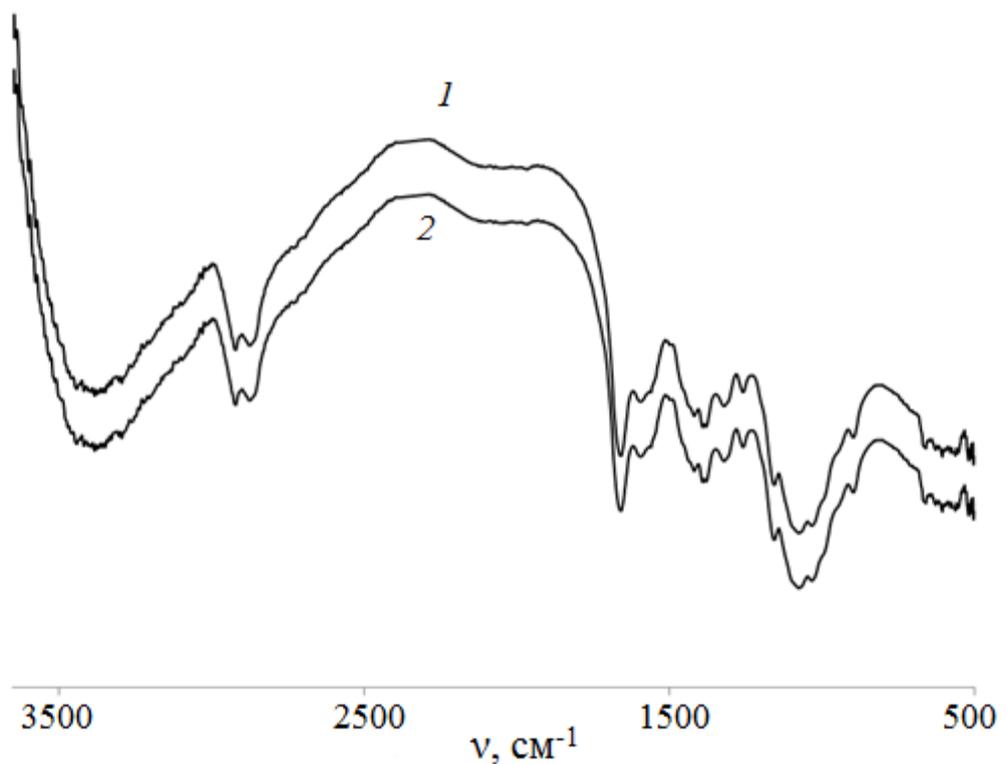


Рисунок 13. ИК-спектры хитозана до (1) и после (2) УЗ воздействия.

В этих условиях (30 мин,  $\nu = 21.5$  кГц,  $T = 21^\circ\text{C}$ ) было проведено УЗ воздействие на растворы смесей гомополимеров хитозана с ПЛА и хитозана с поли(L-лактидом). На основании известных общих положений о влиянии УЗ воздействия на растворы смесей гомополимеров [121, 235-237] можно предположить, что продукты синтеза представляют собой блок-сополимеры хитозана с лактидом. Хотя нельзя исключать и присутствие незначительного содержания гомополимеров.

Синтез сополимеров хитозана с L-лактидом был интересен с точки зрения оценки влияния стереоизомерии лактида на физико-механические свойства сополимеров. Выявлено, что физико-механические свойства блок-сополимеров хитозана с L-лактидом незначительно выше по сравнению с исходным хитозаном, поэтому все дальнейшие эксперименты проводились только для блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом [242, 243].

Результаты исследований, представленные в данном разделе, опубликованы в работах [241-243].

### 3.2. Выделение и идентификация блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом

При деструкции цепей соответствующих гомополимеров в растворе под воздействием ультразвука нельзя исключать образование гомополимеров в результате рекомбинации фрагментов этих цепей.

После проведения УЗ воздействия на растворы смеси гомополимеров был выделен продукт синтеза. Навеску высушенного образца помещали в аппарат Сокслета и возможно непрореагировавший ПЛА экстрагировали ТГФ в течение 36 ч. Экстракцию хитозана проводили 1.2 % уксусной кислотой в течение того же времени при температуре 40°C на шейкере. Потеря массы в первом случае составила 4.3 %, непрореагировавшего хитозана после экстракции не обнаружено. Выявлено, что при увеличении содержания ПЛА в исходной смеси с 10 до 50 мас. % выход блок-сополимера снижается с 95.7 до 92.6% (таблица 3). Количество непрореагировавшего ПЛА можно объяснить использованием полидисперсного образца, низкомолекулярные фракции которого не разрушались под действием УЗ.

Содержание звеньев ПЛА в блок-сополимерах определено методом CNH-анализа (таблица 3) [242].

Таблица 3. Содержание ПЛА в исходных смесях и полученных блок-сополимерах, мас. %, выход блок-сополимера, %

$\omega(\text{ПЛА})$ в исходной смеси, мас. %	Содержание непрореагировавшего гомополимера (ПЛА), %	Выход блок-сополимера, %	$\omega(\text{ПЛА})$ в блок-сополимере, мас. %
10	4.3	95.7	6
20	4.8	95.2	16
30	5.4	94.6	26
50	7.4	92.6	46

Подтверждением получения блок-сополимеров являются результаты ИК-спектроскопии. В очищенном от возможно непрореагировавших гомополимеров

образце (рисунок 14, кривая 3) наблюдаются полосы поглощения, характерные для функциональных групп хитозана ( $1651$ ,  $1591$   $\text{см}^{-1}$  – амид I и деформационные колебания свободных аминогрупп, соответственно) и характерная полоса поглощения, соответствующая валентным колебаниям карбонильной группы ПЛА ( $1758$   $\text{см}^{-1}$ ).

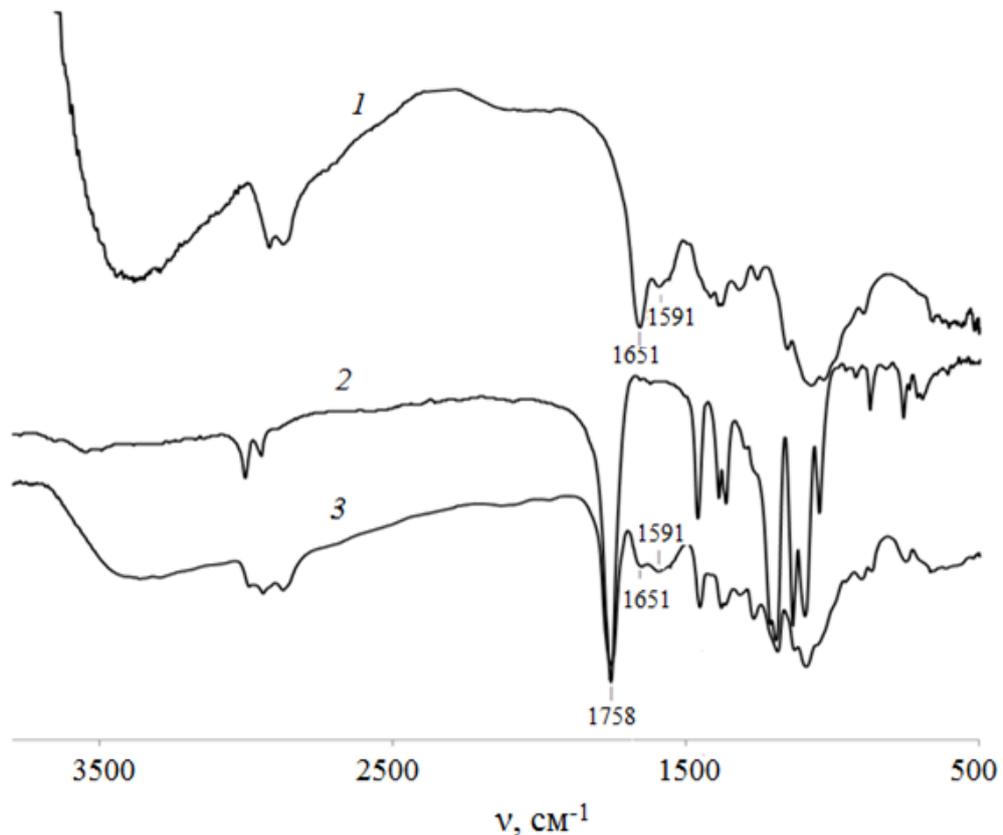


Рисунок 14. ИК-спектры образцов пленок хитозана (**1**), ПЛА (**2**) и блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом (**3**); массовая доля ПЛА в блок-сополимере 16 мас. %

При всей простоте синтеза блок-сополимеров методом УЗ воздействия на растворы смесей гомополимеров существует проблема определения строения их цепей. Последнее требует нахождения его ММ, ММ блоков и состава блок-сополимеров. ММ блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом определить методом ГПХ не удастся ввиду его нерастворимости ни в органическом растворителе, используемого в качестве элюента (ТГФ), ни в водных буферных растворах. В данном случае, возможно определить только ММ блоков ПЛА, входящих в блок-

сополимер, применив метод ферментативного разложения блоков хитозана в блок-сополимере до олигомера, растворимого в воде. Предварительно было показано, что ПЛА не разрушается при воздействии фермента хитозаназы [242].

Блок-сополимеры обрабатывали ферментом хитозаназой. После разложения блоков хитозана цепи последовательностей, состоящие из ПЛА, выпадали в осадок. Осадок очищали переосаждением из ТГФ, сушили под вакуумом до постоянной массы. Методом ИК-спектроскопии осадок был идентифицирован как ПЛА (рисунок 15).

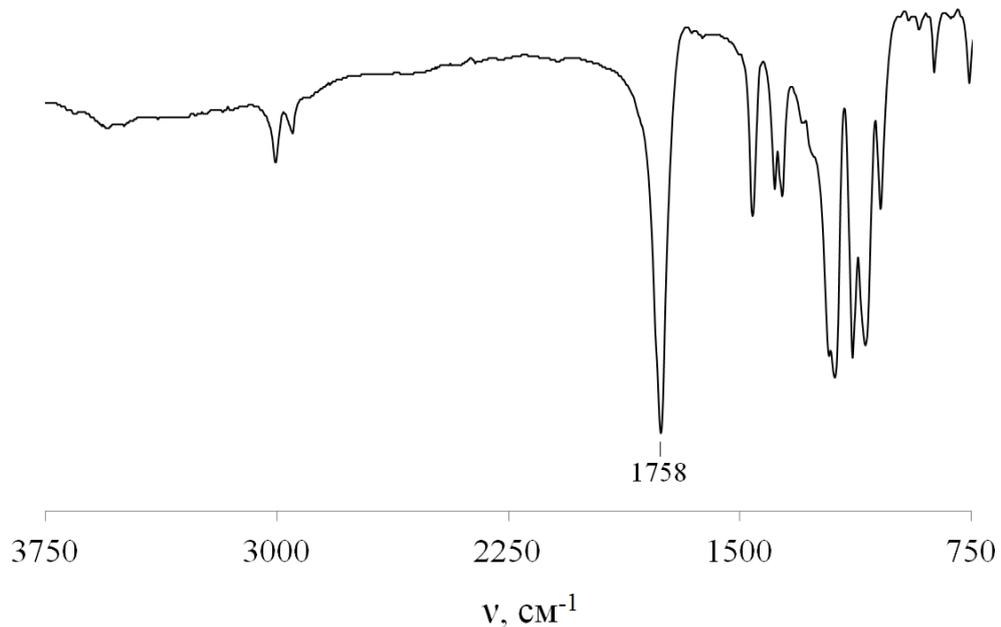


Рисунок 15. ИК-спектр осадка, полученного после ферментативного разложения блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, и идентифицированного как ПЛА

В ИК-спектре образца (рисунок 15) присутствует характерный пик, соответствующий частоте поглощения карбонильной группы ПЛА ( $1758 \text{ cm}^{-1}$ ). ММ ПЛА, выделенного после обработки блок-сополимеров ферментом хитозаназой, определяли методом ГПХ (таблица 4). Было рассчитано среднее число звеньев лактида в блоках.

Таблица 4. Молекулярно-массовые характеристики блоков ПЛА

Массовая доля ПЛА в блок-сополимере, мас. %	ММ фрагментов ПЛА		
	$M_n \times 10^{-3}$	$M_w \times 10^{-3}$	$M_w/M_n$
6	6.9	9.9	1.4
16	10.5	22.5	2.1
46	0.96	2.9	3.0

В блок-сополимере хитозана с D,L-лактидом,  $\omega$  (ПЛА) = 6 мас. % блоки (последовательности) лактида достаточно однородны по ММ ( $M_w/M_n = 1.4$ ) и содержат ~ 137–138 звеньев. С увеличением доли ПЛА с 16 до 46 мас. % в блок-сополимере однородность блоков лактида снижается с  $M_w/M_n = 2.1$  до 3.0, а блоки (последовательности) лактида содержат ~ 312-313 и ~ 40 звеньев, соответственно.

Были предприняты попытки определения ММ блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом методом MALDI-TOF. Однако высокая ММ и полидисперсность образцов блок-сополимеров не позволила решить эту задачу.

Для установления на качественном уровне строения цепей блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом в аналогичных условиях был синтезирован блок-сополимер хитозана с АА. В этом случае методом ГПХ возможно определить как ММ блок-сополимера хитозана с АА, растворимого в водных средах, так и ММ блоков, входящих его состав. Выход блок-сополимера, содержащего 20 мас.% звеньев ПАА, в данном случае составил 100%.

Подтверждением получения блок-сополимеров являются результаты ИК-спектроскопии. В ИК-спектре хитозана (рисунок 16, кривая 1) наблюдаются следующие полосы поглощения, характерные для его функциональных групп: (1651, 1591  $\text{см}^{-1}$  – амид I и деформационные колебания свободных аминогрупп, соответственно), полосы, характерные для сахаридов при 1155  $\text{см}^{-1}$ , 1074 и 1032  $\text{см}^{-1}$  (группа C-O-C). В образце блок-сополимера хитозана с АА, очищенном от возможно присутствующих гомополимеров, (рисунок 16, кривая 3) наблюдаются полосы поглощения, характерные как для функциональных групп хитозана, так и полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям

$>C=O$  амидной группы ПАА ( $1681\text{ см}^{-1}$ ) и деформационным колебаний метиленовой группы  $CH_2$  ПАА ( $1455\text{ см}^{-1}$ ).

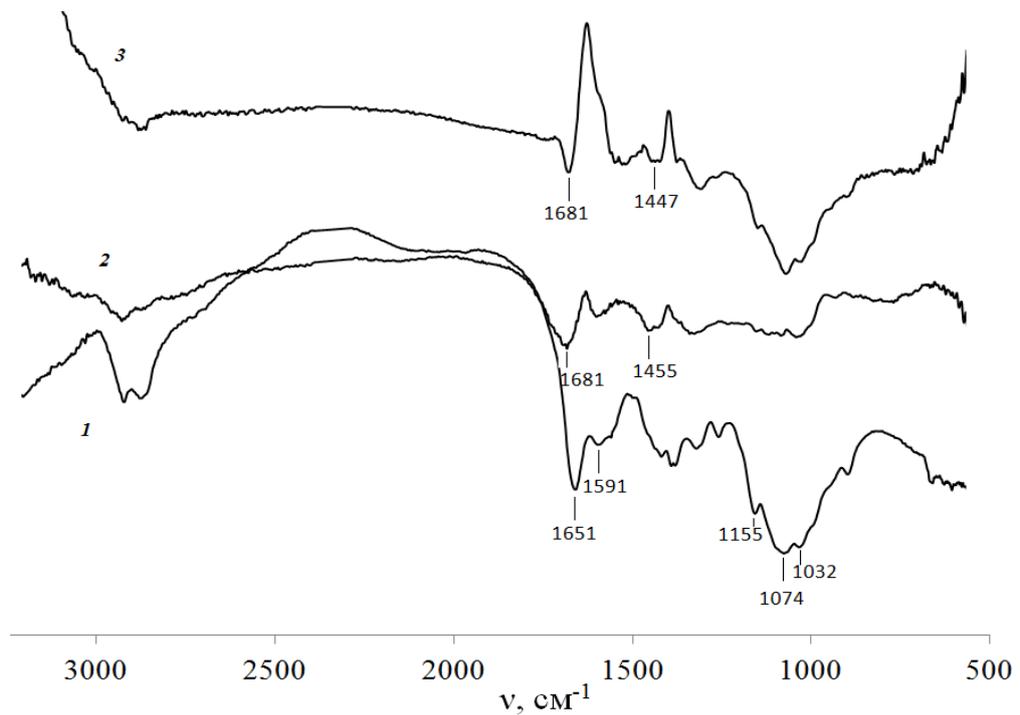


Рисунок 16. ИК-спектры хитозана (1), ПАА (2) и блок-сополимера хитозана с АА, массовая доля ПАА в блок-сополимере 20 мас. % (3)

Для выделения блоков ПАА и определения их ММ использовали, как и в случае с блок-сополимерами хитозана с D,L-лактидом, ферментативное разрушение фрагментов цепей полисахарида. Предварительно было показано, что ПАА не разрушается при воздействии фермента хитозаназы. Результаты определения ММ блок-сополимеров и блоков в нем методом ГПХ представлены в таблице 5.

Таблица 5. Молекулярно-массовые характеристики исходного ПАА, блок-сополимеров хитозана с АА, блоков ПАА в блок-сополимере

Образец	$M_n \times 10^{-3}$	$M_w \times 10^{-3}$	$M_w/M_n$
ПАА	256	350	1.40
ПАА после деструкции хитозаназой	247	327	1.30
Блок-сополимер хитозана с АА	220	269	1.20
Блоки ПАА в блок-сополимере после деструкции хитозаназой	0.30	0.38	1.25

Из приведенных в таблице 5 данных видно, что блок-сополимер хитозана с АА имеет полиблочное строение, в котором блоки (последовательности) АА характеризуются высокой однородностью по ММ ( $M_w/M_n = 1.25$ ) и содержат ~ 5–6 звеньев.

Учитывая, что блок-сополимер хитозана с АА, содержит 20 мас. % ПАА, среднее значение суммарной ММ блоков ПАА составляет  $\sim 5.4 \times 10^4$ , а, соответственно, хитозана  $\sim 2.2 \times 10^5$ . Среднее значение числа блоков ПАА в цепи блок-сополимера равно отношению среднего значения суммарной ММ блоков ПАА к ММ блоков ПАА после деструкции хитозановой части ферментом и составляет  $\sim 141$ . Количество блоков хитозана равно количеству блоков ПАА в блок-сополимере. Исходя из этого, было рассчитано среднее значение ММ блоков хитозана в цепи блок-сополимера, которое составило  $\sim 1520$ , что соответствует количеству звеньев глюкозамина в блоках  $\sim 9$  единиц (рисунок 17) [242].

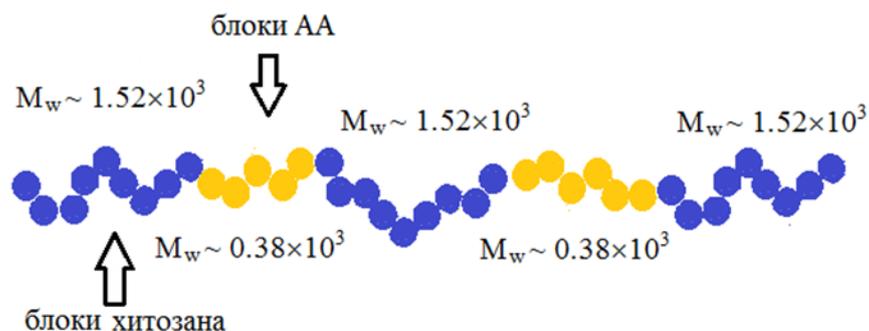


Рисунок 17. Схема строения цепи блок-сополимеров хитозана с АА, полученного методом УЗ воздействия на раствор смеси гомополимеров хитозана и ПАА. Содержание ПАА в блок-сополимере составляло 20 мас. %

Длина блоков ПЛА, которую определили после ферментативного разложения хитозановой части блок-сополимера, колеблется в пределах от  $2.9 \times 10^3$  до  $22.5 \times 10^3$  в зависимости от соотношения компонентов в реакционной смеси (таблица 4). Меньшие размеры блоков ПАА в блок-сополимере по сравнению с ПЛА обусловлены, по - видимому, большей жесткостью цепи карбоцепных полимеров (параметр статистической жесткости цепи  $\sigma$  составляет 1.8–2.6 в отличие от гетероцепных, к числу которых относятся полиэферы ( $\sigma = 1.3–1.8$ ) [244]).

Как уже отмечалось выше, ММ блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом методом ГПХ определить не представлялось возможным из-за их нерастворимости в индивидуальных растворителях. Однако удалось подтвердить структуру блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом по результатам анализа его фракций методом MALDI-TOF. Для этого проведено фракционирование полученных блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом методом дробного осаждения из раствора в смешанном растворителе. Для анализа выбрана фракция блок-сополимера с наиболее узким молекулярно-массовым распределением. ММ образца блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом,  $\omega$  (ПЛА) = 16 мас. % составила:  $M_w = 45.8 \times 10^3$ ,  $M_n = 43.9 \times 10^3$ ,  $M_w/M_n = 1.04$  (рисунок 18).

Длина блоков ПЛА, которую определили после ферментативного разложения блок-сополимера, составила  $2.5 \times 10^3$  ( $M_w/M_n = 3.0$ ). Учитывая, что фракция блок-сополимера содержит 16 мас. % ПЛА, среднее значение суммарной ММ блоков ПЛА в ней составляет  $\sim 7.3 \times 10^3$ , а, соответственно, хитозана  $\sim 38.5 \times 10^3$ . Среднее значение числа блоков ПЛА в цепи блок-сополимера равно отношению среднего значения суммарной ММ блоков ПЛА к ММ блоков ПЛА после деструкции хитозановой части ферментом и составляет  $\sim 3$ . Количество блоков хитозана равно количеству блоков ПЛА в блок-сополимере.

Блок-сополимер хитозана с D,L-лактидом,  $\omega$ (ПЛА) = 16 мас. %, имеет полиблочное строение, в котором блоки лактида содержат  $\sim 35$  звеньев. Среднее

значение ММ блоков хитозана в цепи блок-сополимера составило  $\sim 13260$ , что соответствует количеству его звеньев в блоках  $\sim 78$  единиц.

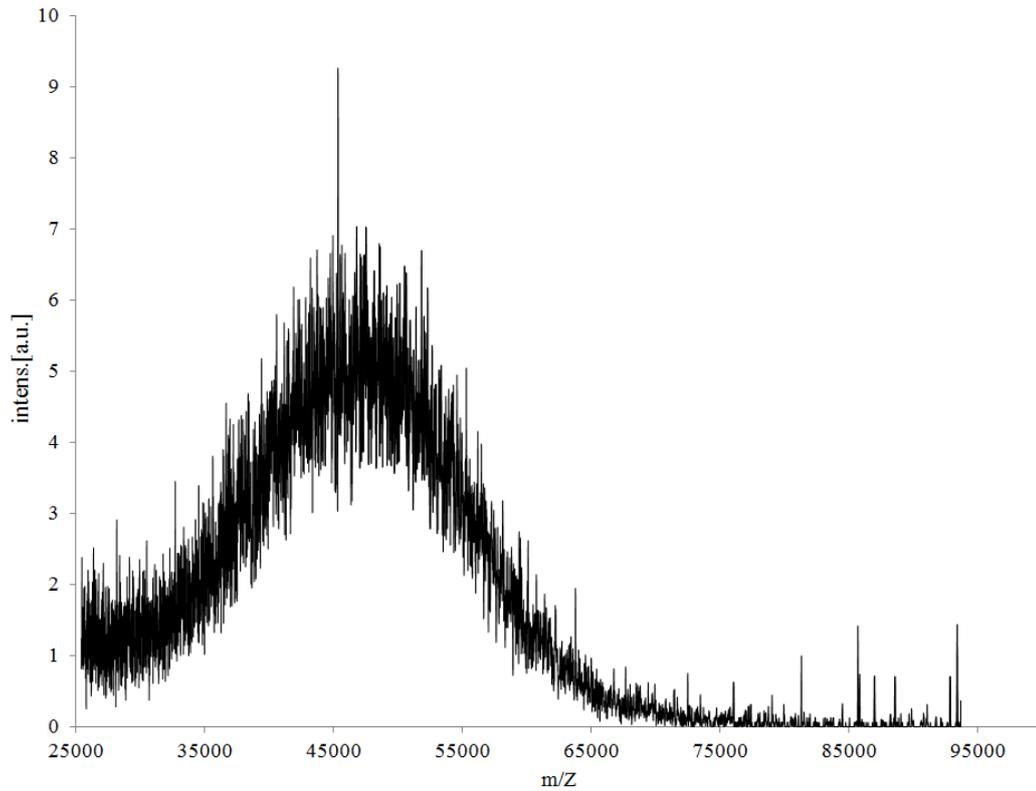


Рисунок 18. MALDI-TOF - спектр фракции блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом. Массовая доля ПЛА в блок-сополимере составляет 16 мас. %

ММ других фракций установить не удалось из-за высокой ММ блок-сополимера и широкого молекулярно-массового распределения. Таким образом, схему синтеза и структуру блок-сополимера можно представить в следующем виде (рисунок 19).

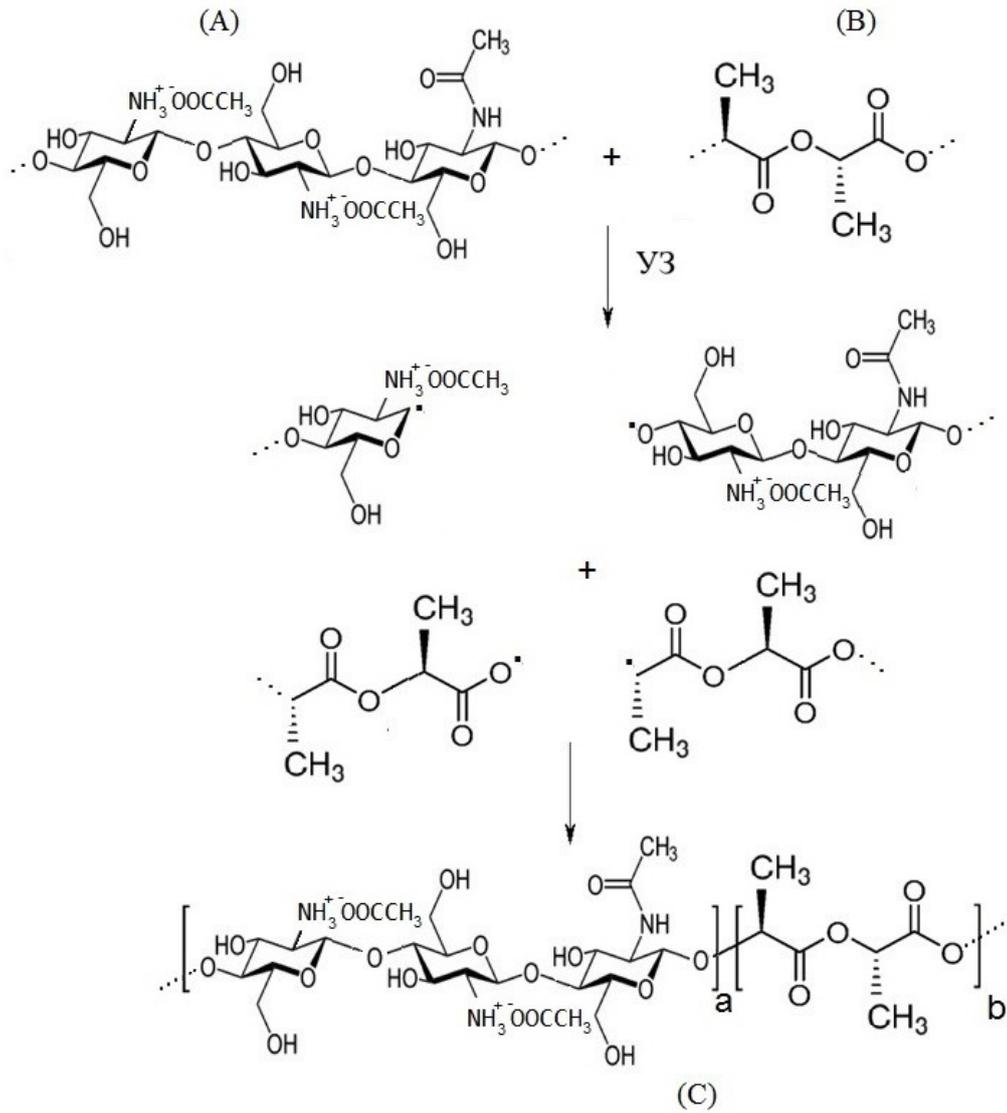


Рисунок 19. Схема синтеза блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом (C) методом УЗ воздействия на раствор смеси гомополимеров хитозана и ПЛА, где а и б - число звеньев в блоках хитозана (A) и ПЛА (B), соответственно

Результаты исследований, представленные в данном разделе, опубликованы в работе [242].

### 3.3. Физико-механические свойства блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом

Введение звеньев ПЛА в структуру цепей хитозана приводит к существенному изменению физико-механических свойств блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом по сравнению с исходным полисахаридом (таблица 6) [242].

Таблица 6. Разрушающее напряжение и предельная деформация пленок блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом

Массовая доля ПЛА в блок-сополимере, мас. %	Мольное соотношение модификатор: звенья ПЛА	$\sigma$ , МПа	$\varepsilon$ , %
0	–	$24.0 \pm 1.0$	$1.9 \pm 0.2$
6	Гуанидин солянокислый 1:1	$51.2 \pm 1.7$	$12.5 \pm 0.5$
16		$48.4 \pm 1.8$	$14.2 \pm 0.4$
6	Гуанидин солянокислый 1:50	$51.3 \pm 0.9$	$10.7 \pm 0.4$
16		$47.3 \pm 1.6$	$20.6 \pm 0.9$
26		$40.3 \pm 1.4$	$14.8 \pm 0.4$
6	Моноэтаноламин 1:50	$44.9 \pm 1.5$	$8.3 \pm 0.2$
16		$52.5 \pm 1.1$	$10.2 \pm 0.4$
26		$50.0 \pm 1.5$	$6.0 \pm 0.2$
46		$43.8 \pm 1.2$	$4.7 \pm 0.1$

Величины разрушающего напряжения и предельной деформации пленок блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом в отдельных случаях достигают 52.5 МПа и  $\varepsilon \sim 20.6$  %, соответственно. Наблюдаемые отклонения прочностных характеристик для различных составов блок-сополимеров, по-видимому, обусловлены различием в длине блоков ПЛА, формирующихся в процессе синтеза при различных соотношениях хитозана и ПЛА. Для блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом при содержании последнего 16 мас. % и максимальной длине блоков ( $MM = 22.5 \times 10^3$ ) достигаются оптимальные физико-механические показатели – величина разрушающего напряжения составляет  $\sigma = 47$  МПа при предельной деформации  $\varepsilon = 20$  %.

Таким образом, длина блоков ПЛА существенно влияет на физико-механические свойства блок-сополимеров – чем длиннее последовательности звеньев ПЛА в цепях блок-сополимеров, тем ярче проявляются их пластические свойства [242].

Наряду с этим для сравнения синтезированы блок-сополимеры хитозана с L-лактидом. Введение звеньев L-лактида в структуру цепей хитозана приводит к незначительному увеличению величины разрушающего напряжения  $\sigma$  по сравнению с исходным хитозаном, величина предельной деформации  $\epsilon$  не превышает 3.5 %.

Следует отметить общность в проявлении физико-механических характеристиках сополимеров хитозана с D,L-лактидом и хитозана с L-лактидом, полученных в данной работе и полученных методом твердофазного синтеза [142]. В обеих работах высокие показатели  $\sigma$  и  $\epsilon$  наблюдаются только для сополимеров хитозана с D,L-лактидом.

Результаты исследований, представленные в данном разделе, опубликованы в работах [242, 243].

### 3.4. Физико-механические свойства смесей хитозана с поли(D,L-лактидом), полученных в присутствии низкомолекулярных модификаторов, полимерных компатибилизаторов, и хитозана с блок-сополимерами хитозана с D,L-лактидом

Наряду с изучением физико-механических свойств блок-сополимеров хитозана с ПЛА были исследованы свойства пленок на основе исходных смесей хитозана с ПЛА и смесей хитозана с блок-сополимерами хитозана с D,L-лактидом.

Были получены однородные растворы смесей гомополимеров, содержащие до 50 мас. % ПЛА в присутствии низкомолекулярных модификаторов. Мольное соотношение модификатор (гуанидин солянокислый): звенья ПЛА составляло 1: 50. Из полученных растворов отлиты прозрачные пленки и исследованы их физико-механические свойства (таблица 7). Для композиций хитозан: ПЛА равных от 92: 8 до 50: 50 по массе прослеживалась положительная динамика улучшения физико-механических свойств (величины  $\sigma$  и  $\epsilon$  возрастают до 40.3 МПа и 3.0 %, соответственно, по сравнению с исходным хитозаном).

Таблица 7. Физико-механические свойства композиций на основе хитозана и ПЛА, полученных с использованием низкомолекулярного модификатора (гуанидина солянокислого)

Массовая доля ПЛА в смеси, мас. %	$\sigma$ , МПа	$\epsilon$ , %
0	24.0 ± 1.0	1.9 ± 0.2
8	25.2 ± 1.2	3.3 ± 0.2
10	29.0 ± 1.2	5.2 ± 0.3
20	21.8 ± 0.9	4.6 ± 0.3
50	40.3 ± 1.3	3.0 ± 0.2

С точки зрения снижения энергозатрат для производства материалов с требуемыми характеристиками было целесообразно вернуться к получению смесевых композиций, используя идею введения компатибилизаторов. В данном случае в качестве компатибилизаторов могут выступать полученные блок-

сополимеры хитозана с D,L-лактидом, благодаря сродству как к хитозану, так и ПЛА, тем самым будут предотвращать образование интерполимерного комплекса между гомополимерами и гомогенизировать систему.

Далее работа была разделена на два этапа. На первом этапе провели оценку влияния блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом на физико-механические показатели хитозана, на втором - оценку эффективности блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом в качестве компатибилизаторов для получения смесевых композиций хитозана с ПЛА с высоким содержанием последнего без использования УЗ воздействия.

Были приготовлены композиции на основе хитозана и блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом. Для этого в растворы хитозана при непрерывном перемешивании добавляли от 10 до 50 мас. % блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом с массовой долей ПЛА в нем 0.1, отливали пленки, представляющие собой прозрачные материалы, и исследовали их физико-механические свойства (таблица 8). Аналогично готовили композиции хитозана с блок-сополимером хитозана с D,L-лактидом с массовой долей ПЛА в нем 0.2 (таблица 8) [241]. Блок-сополимеры с массовой долей ПЛА равной 0.1 и 0.2 были выбраны в качестве компатибилизаторов, так как их пленки имели максимальный уровень физико-механических свойств.

Таблица 8. Разрушающее напряжение и предельная деформация пленок композиций хитозана с блок-сополимерами хитозана с D,L-лактидом

Состав композиции	Массовая доля звеньев лактида в блок-сополимере			
	$\omega(\text{ПЛА}) = 0.1$		$\omega(\text{ПЛА}) = 0.2$	
хитозан: блок-сополимер хитозанас D,L-лактидом, (г/г)	$\sigma$ , МПа	$\epsilon$ , %	$\sigma$ , МПа	$\epsilon$ , %
100: 0	$24.0 \pm 1.0$	$1.9 \pm 0.2$	$24.0 \pm 1.0$	$1.9 \pm 0.2$
90: 10	$30.2 \pm 0.4$	$2.0 \pm 0.1$	$42.4 \pm 1.1$	$4.2 \pm 0.5$
70: 30	$32.4 \pm 1.2$	$3.8 \pm 0.1$	$48.9 \pm 1.7$	$7.5 \pm 0.7$
50: 50	$37.0 \pm 0.8$	$6.5 \pm 0.2$	$49.8 \pm 1.9$	$9.8 \pm 0.6$

Из данных таблицы 8 видно, что введение блок-сополимеров в хитозан приводит к повышению как величины разрушающего напряжения  $\sigma$ , так и, что существенно, предельной деформации  $\varepsilon$ . Наилучшие физико-механические показатели были достигнуты при использовании блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом с массовой долей последнего 0.2 ( $\sigma = 49.8$  МПа и  $\varepsilon = 9.8$  %).

Таким образом, используя блок-сополимеры хитозана с D,L-лактидом и варьируя состав полимерной композиции, можно достичь прочностных характеристик  $\sigma$  до 50 МПа при величине деформации  $\varepsilon$  до 10 %.

Для получения композиций с высоким содержанием ПЛА был использован компатибилизатор. Этот метод широко используется для получения смесей синтетических полимеров. В последние годы его успешно применяют для создания гомогенных систем двух и более полимеров, один из которых является природным [155, 245, 246]. Компатибилизаторами или межфазными добавками называются вещества, увеличивающие прочность связи полимер-полимер в межфазном слое. Увеличение прочности связи в межфазном слое приводит к увеличению механической однородности гетерофазной смеси полимеров. Компатибилизаторы не только улучшают диспергирование одного полимера в другом, но и стабилизируют смесь, препятствуя агрегации их макромолекул. Блок-сополимер способен локализоваться в межфазном слое в результате диффузии, его ММ не должна быть слишком большой, так как это может затруднить диффузию и привести к образованию устойчивых мицелл блок-сополимера в матрице обеих фаз [240].

Основываясь на этих данных, в качестве компатибилизатора для улучшения совместимости гомополимеров хитозана и ПЛА был использован блок-сополимер хитозана с D,L-лактидом с массовой долей последнего 0.2. В раствор хитозана вводили раствор компатибилизатора, а затем раствор ПЛА в ТГФ в различных количествах, что обеспечило получение однородного раствора. Использование компатибилизатора предотвращает образование интерполимерного комплекса между гомополимерами и гомогенизирует систему. Исследовали физико-механические свойства пленок, отлитых из полученных растворов (таблица 9).

Таблица 9. Разрушающее напряжение и предельная деформация пленок композиций хитозана с ПЛА, содержащих компатибилизатор

Массовая доля компатибилизатора относительно хитозана, мас. %	Состав композиции хитозана: ПЛА (г/г)	$\sigma$ , МПа	$\varepsilon$ , %
0	100: 0	24.0 ± 1.0	1.9 ± 0.2
0	90: 10	29.0 ± 1.2	5.2 ± 0.3
0	80: 20	21.8 ± 0.9	4.6 ± 0.3
0	50: 50	40.3 ± 1.3	3.0 ± 0.2
1	90: 10	42.0 ± 1.8	2.7 ± 0.2
10	90: 10	39.6 ± 2.0	12.4 ± 0.9
10	80: 20	33.3 ± 1.7	10.7 ± 0.7
10	70: 30	35.6 ± 1.8	10.3 ± 0.7
10	50: 50	34.3 ± 1.2	13.4 ± 0.9

При увеличении содержания ПЛА в композиции от 10 до 50 мас. % величина разрушающего напряжения композиции возрастает в 1.4-1.7 раз и величина предельной деформации при разрыве достигает 13 % по сравнению с исходным полисахаридом. Изменение физико-механических свойств композиций на основе хитозана и ПЛА с использованием компатибилизаторов, по-видимому, связано с изменением их структуры.

Таким образом, удалось получить однородные композиции на основе хитозана и ПЛА с хорошими физико-механическими характеристиками с использованием блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом в качестве компатибилизаторов. Варьируя состав полимерной композиции можно достичь прочностных характеристик пленок до 42 МПа, однако по своим показателям они уступают как блок-сополимерам хитозана с D,L-лактидом, так и их композициям с хитозаном. Совокупность полученных результатов определяет перспективность создания на их основе материалов биомедицинского назначения и биоразлагаемых материалов общего назначения с регулируемым временем разложения. Результаты исследований, представленные в данном разделе, опубликованы в работе [241].

### **3.5. Изучение свойств блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, смесей гомополимеров при введении компатибилизатора, композитов на основе хитозана, модифицированных гидроксиапатитом**

#### **3.5.1. Исследование структурных свойств композиций**

Одной из причин наблюдаемого изменения физико-механических свойств блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом и композиций на основе хитозана и ПЛА с использованием низкомолекулярного модификатора и компатибилизаторов по сравнению с исходным хитозаном является изменение структуры полисахарида [241].

Методом рентгенофазового анализа была исследована структура композиций, а методом атомно-силовой микроскопии исследована топография поверхности пленок. Известно, что хитозан характеризуется наличием значительной доли кристаллических структур [247, 248]. На рисунке 20 приведены рентгеновские дифрактограммы для образцов хитозана (линия А), блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом с массовой долей звеньев последнего 6 мас. % (линия В), смеси хитозана с ПЛА в присутствии компатибилизатора (линия С) и хитозана с компатибилизатором без ПЛА (линия D). Для двух последних образцов в качестве компатибилизатора выступал блок-сополимер хитозана с D,L-лактидом с массовой долей звеньев ПЛА 0.2. Массовая доля блок-сополимера относительно хитозана составляла 10 мас. % [241].

На дифрактограмме образца хитозана (рисунок 20, линия А) видны характерные интенсивные пики в области 10, 20 и 40 градусов. В блок-сополимере хитозана с D,L-лактидом (рисунок 20, линия В) наблюдалось уменьшение интенсивности и уширение пика хитозана вблизи  $2\theta = 20$  градусов, что свидетельствует о возрастании аморфных и понижении доли кристаллических структур, а также ухудшении дальнего порядка. Наряду с этим наблюдаются дополнительные пики  $2\theta$  при 9 и 13 градусах, которые могут быть обусловлены появлением упорядоченных структур за счет взаимодействия хитозана с ПЛА.

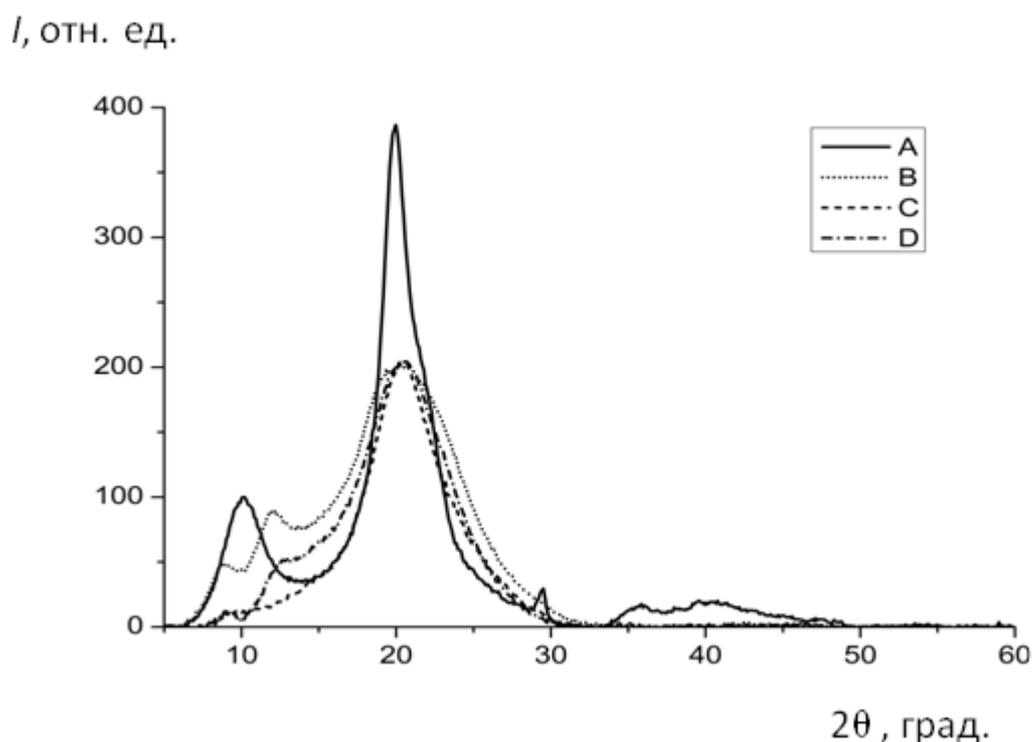


Рисунок 20. Рентгеновские дифрактограммы образцов хитозана (линия А), блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом (линия В), смеси хитозан: ПЛА = 90: 10 по массе в присутствии компатибилизатора (линия С) и хитозана с компатибилизатором без ПЛА (линия D).

Известно, что наибольшие значения физико-механических показателей наблюдаются при оптимальном для каждой системы соотношении кристаллических и аморфных областей [249]. При введении компатибилизатора в хитозан (рисунок 20, линия D) наблюдается снижение кристаллической фазы хитозана. Добавление компатибилизатора в смесевую композицию хитозана с ПЛА (рисунок 20, линия С) приводит к исчезновению пиков при 9 и 13 градусах, что говорит об еще большей аморфизации системы, вследствие уменьшения интерполимерного взаимодействия между макромолекулами хитозана с ПЛА.

На рисунке 21 представлены рентгеновские дифрактограммы образцов блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, с различным содержанием ПЛА. На дифрактограммах всех образцов блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом наблюдалось уменьшение интенсивности и уширение пика хитозана вблизи

$2\theta = 20$  градусов, наиболее ярко это проявлялось у образцов блок-сополимеров с массовой долей ПЛА в блок-сополимере 6 и 16 мас. % (рисунок 21).

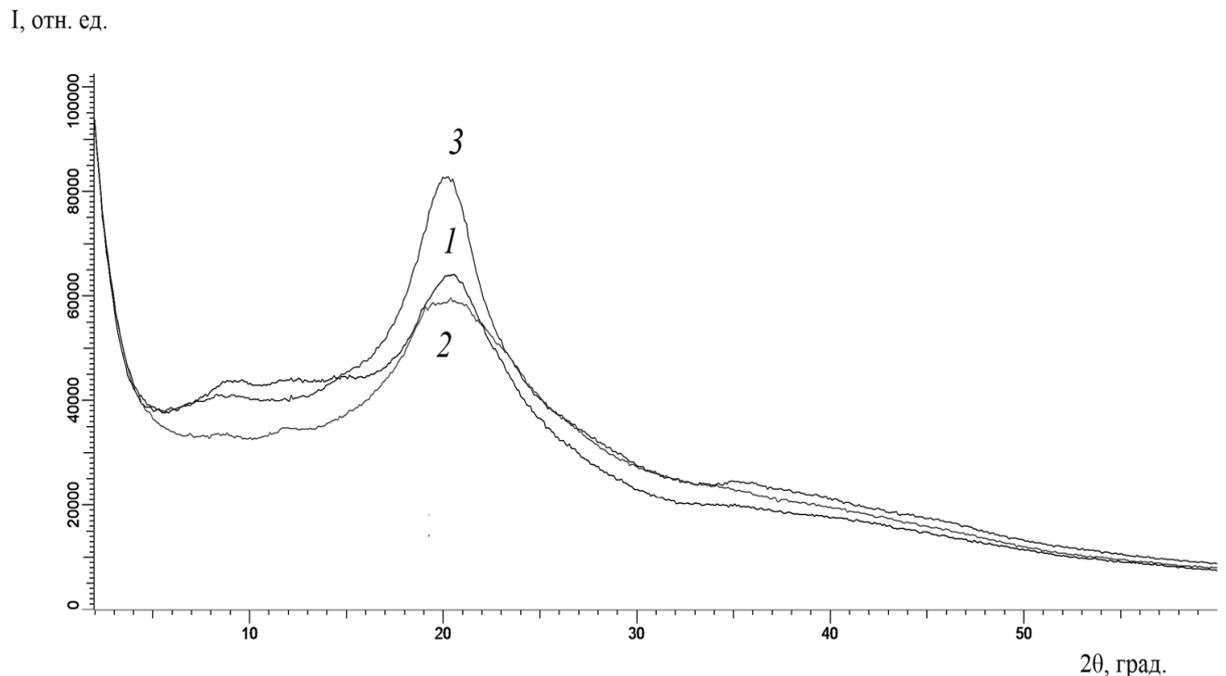


Рисунок 21. Рентгеновские дифрактограммы образцов блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, массовая доля ПЛА в блок-сополимере 6 (1), 16 (2) и 26 (3) мас. %, соответственно

Изменение структуры композиций, содержащих ПЛА, по сравнению с исходным полисахаридом существенно проявляется при анализе топографий поверхностей пленок, которые представлены на рисунках 22-24.

Видно, что структура поверхности исходного хитозана и блок-сополимера существенно различаются. Пленки исходного хитозана характеризуется зернистой структурой с размером зерен  $\sim 0.5$  мкм (рисунок 22) в отличие от пленок ПЛА, обладающего ярко выраженной фибриллярной структурой (рисунок 23).

Чередование звеньев ПЛА и хитозана приводит к тому, что поверхность блок-сополимера характеризуется укрупненной зернистой структурой по сравнению с исходным полисахаридом (рисунок 24). Образование этих зерен может быть связано с упаковкой концевых хитозановых блоков цепей блок-сополимера [242]. Основные результаты исследований, представленные в данном разделе, опубликованы в работах [241, 242].

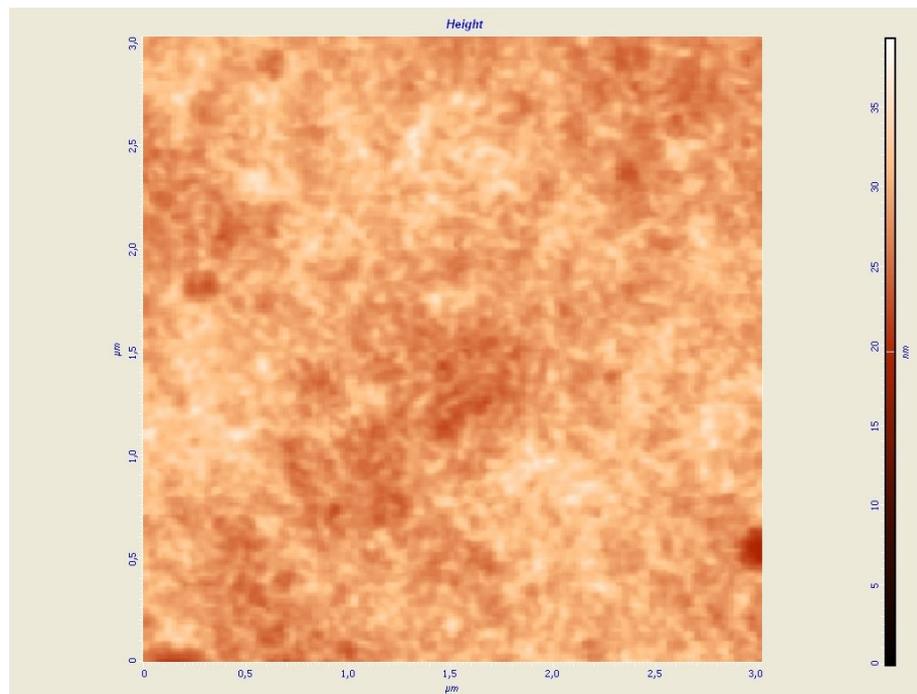


Рисунок 22. Топография поверхности пленок хитозана. Плоскостное изображение (размер  $3 \times 3$  мкм)

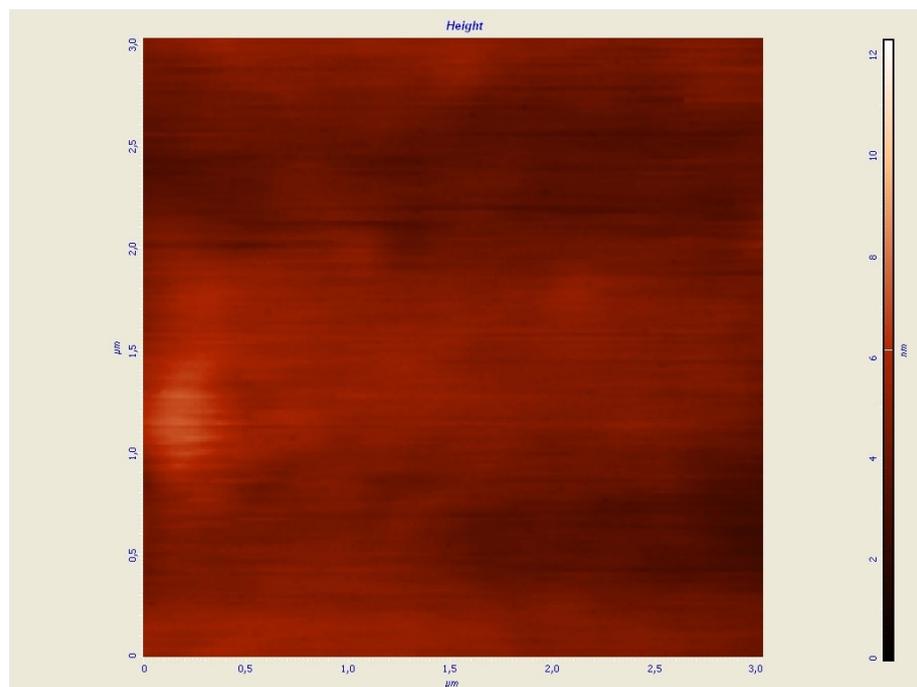


Рисунок 23. Топография поверхности пленок ПЛА. Плоскостное изображение (размер  $3 \times 3$  мкм)

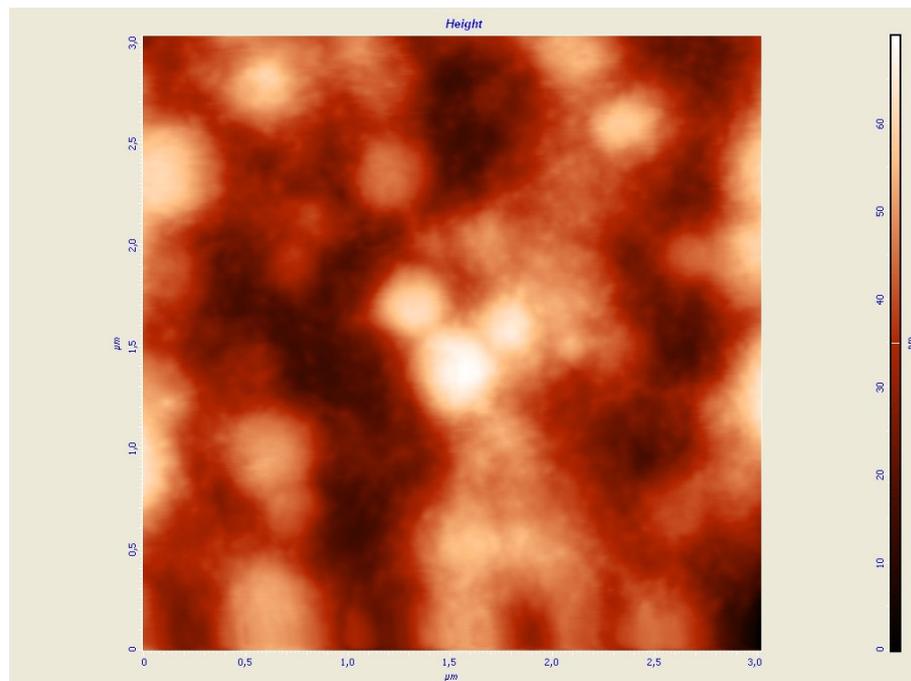


Рисунок 24. Топография поверхности пленок блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом. Массовая доля ПЛА в блок-сополимере 26 мас. %. Плоскостное изображение (размер  $3 \times 3$  мкм)

### 3.5.2. Исследование теплофизических свойств композиций

Для определения температурных границ применения материалов изучены теплофизические характеристики в области  $0-330^{\circ}\text{C}$  исходных полимеров и образцов блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом с массовой долей ПЛА в них равной 6, 16 и 26 мас. %, соответственно, методом ДСК с помощью дифференциального сканирующего калориметра DSC204F1 с высокочувствительным  $\mu$ -сенсором (таблица 10) [250]. В исходном хитозане проявляются несколько релаксационных переходов  $\beta$ -переход ( $T_{\beta} = 47^{\circ}\text{C}$ ) и два температурных интервала расстеклования ( $T_{g1} = 74^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{g2} = 140^{\circ}\text{C}$ ). Это обусловлено сложной молекулярной и надмолекулярной структурой данного полисахарида.  $\beta$ -переход в хитозане связан с колебаниями пиранозных колец вокруг глюкозидной связи [251].

ДСК-кривые изученных образцов блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом представлены на рисунках 25, 26 [250].

Таблица 10. Усредненные температуры физических переходов в хитозане, ПЛА и образцах блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом

*\*Погрешность в определении составляет  $\pm 0.5^\circ\text{C}$*

Образец	$T_{\beta}, ^\circ\text{C}^*$	$\Delta T_1, ^\circ\text{C}^*$	$T_{g1}, ^\circ\text{C}^*$	$\Delta T_2, ^\circ\text{C}^*$	$T_{g2}, ^\circ\text{C}^*$
Хитозан	47	–	74	–	140
Блок-сополимер хитозана с D,L-лактидом, $\omega$ (ПЛА) = 6 мас. %	30	28-56	45	155-201	179
Блок-сополимер хитозана с D,L-лактидом, $\omega$ (ПЛА) = 16 мас. %	30	31-63	48	164-198	182
Блок-сополимер хитозана с D,L-лактидом, $\omega$ (ПЛА) = 26 мас. %	31	17-67	45	129-187	160
ПЛА	–	50-57	53	–	–

$\Delta T$  - интервал стеклования;  $T_g$  - температура стеклования

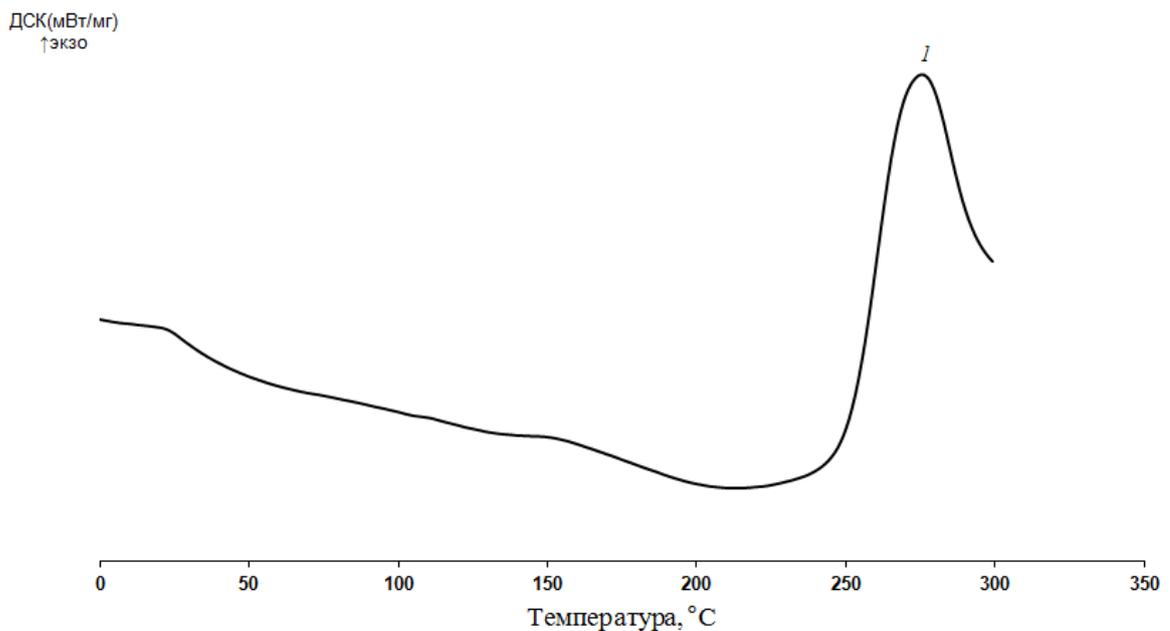


Рисунок 25. ДСК-кривая блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом,  $\omega$ (ПЛА) = 6 мас. % (1)

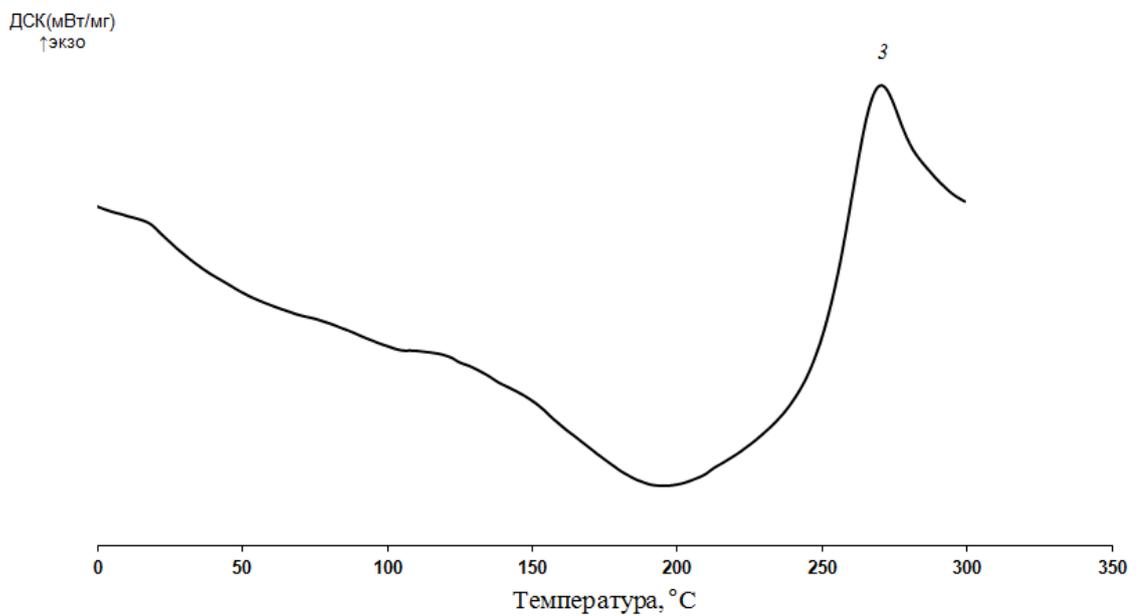
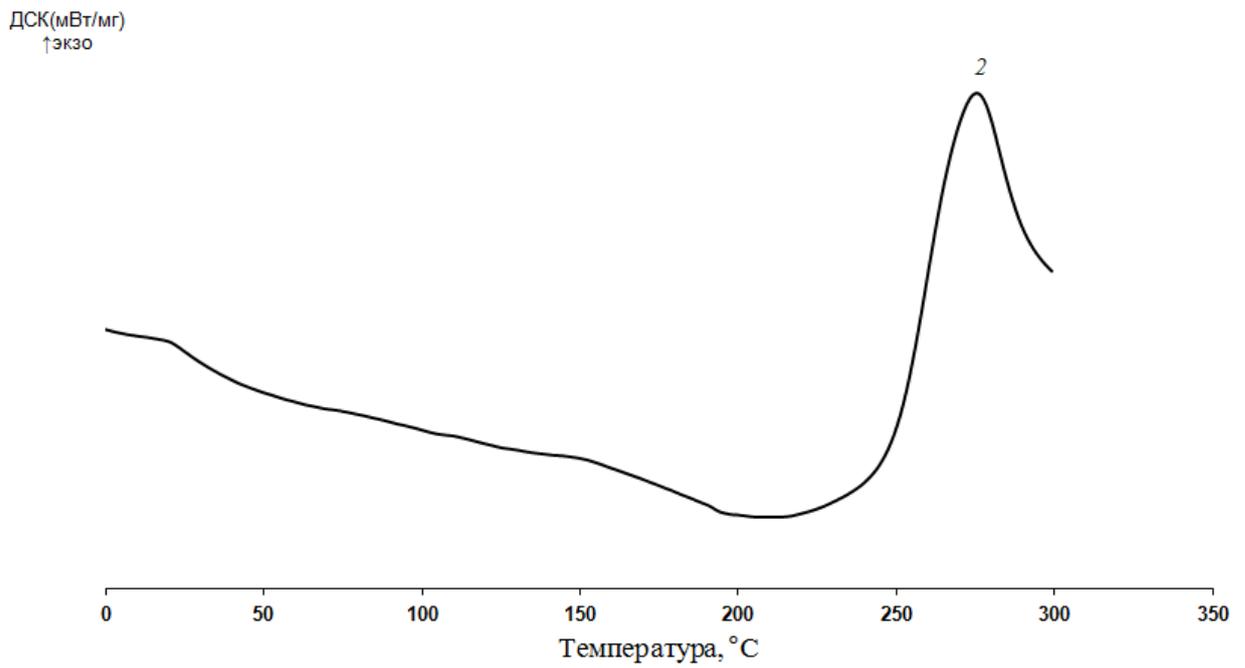


Рисунок 26. ДСК-кривые блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом,  
 $\omega(\text{ПЛА})$ : **2** – 16 мас. %, **3** – 26 мас. %

Введение блоков D,L-лактида немного снижают  $T_{\beta}$  хитозана, что может быть связано с изменением его структуры, и возможно обусловливается пластифицирующим эффектом блоков ПЛА. Расстекловывание идет в более широком  $\Delta T$ : при увеличении содержания D,L-лактида в блок-сополимере с 6 до 26 мас. %, интервал расстекловывания (первый переход) увеличивается с  $\Delta T = 28^{\circ}\text{C}$  до  $\Delta T = 50^{\circ}\text{C}$  [250].

Температура первого перехода незначительно зависят от состава блок-сополимеров. Так, при изменении содержания ПЛА от 6 до 26 мас. % температура превращения практически остается постоянной.

Аналогично исследовано термическое поведение в области  $30\text{--}350^{\circ}\text{C}$  образцов смесевых композиций на основе хитозана и ПЛА с массовой долей последнего 10 и 20 мас. %, полученных в присутствии компатибилизатора - блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом с массовой долей ПЛА равной 0.2 (рисунок 27).

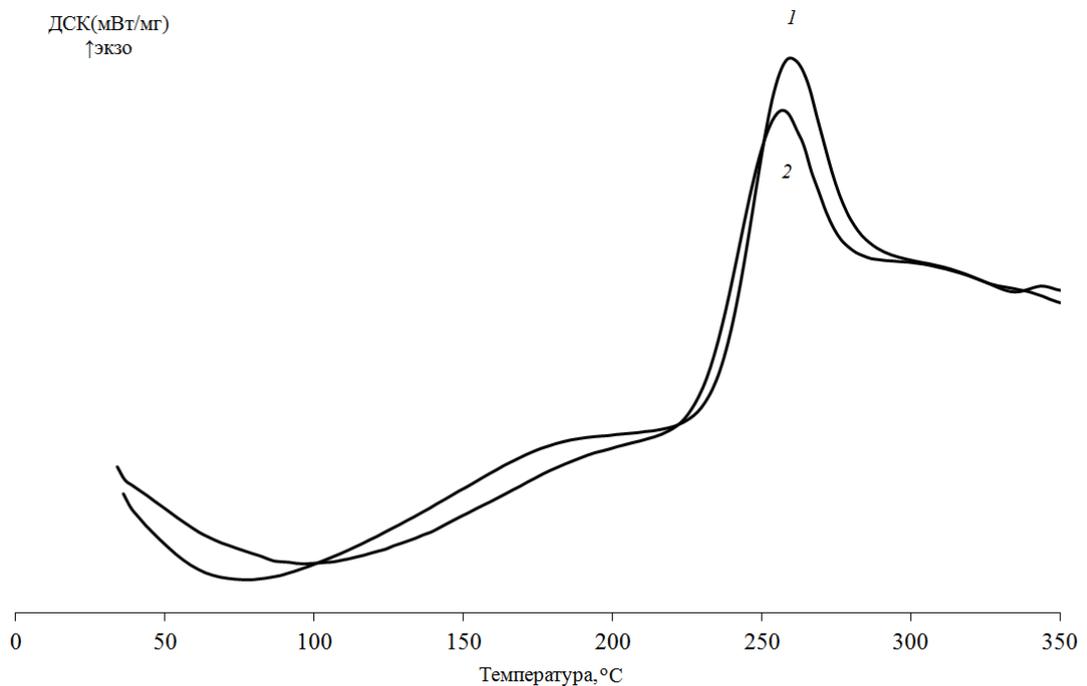


Рисунок 27. ДСК - кривые композиций на основе хитозана и ПЛА, с массовой долей ПЛА 10 (**1**) и 20 мас. % (**2**), соответственно

Методом ТГ- анализа для образцов хитозана было определено, что заметная потеря массы обезвоженного хитозана в среде аргона, связанная с разрушением

образца, наблюдается при  $T = 207^{\circ}\text{C}$ , а достижении  $327^{\circ}\text{C}$  потеря массы составляет 42.69 %. Таким образом, в инертной среде образец хитозана термически устойчив вплоть до  $207^{\circ}\text{C}$  (рисунок 28).

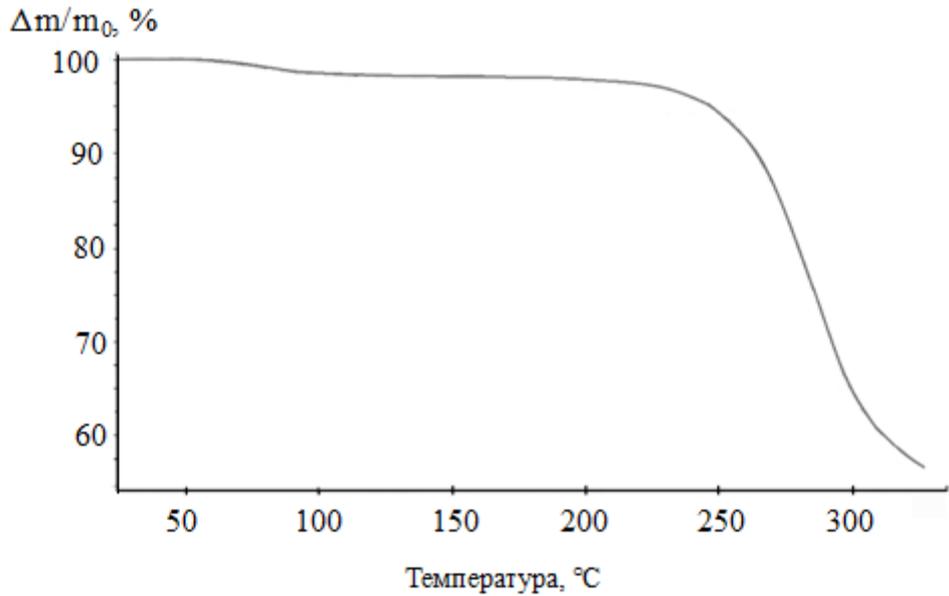


Рисунок 28. ТГ- кривая образца хитозана

Для образца ПЛА было определено, что в инертной среде образец ПЛА термически устойчив вплоть до  $240^{\circ}\text{C}$  (рисунок 29).

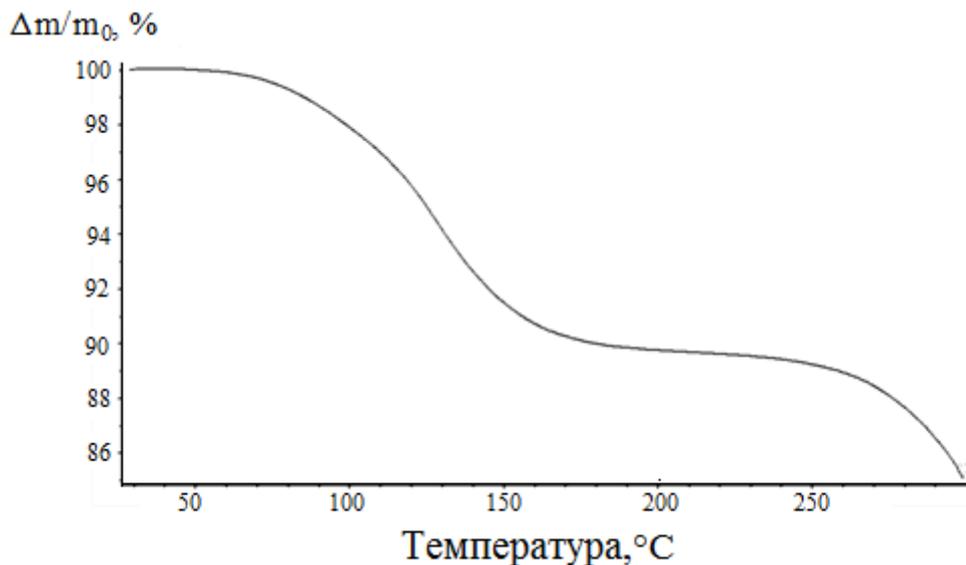


Рисунок 29. ТГ- кривая образца ПЛА

Согласно ТГ-анализу, стабильность блок-сополимеров изменяется с увеличением массовой доли ПЛА. Установлено, что в инертной среде распад

образцов блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, с массовой долей ПЛА в блок-сополимере, равной 6, 16 и 26 мас. % начинается при  $207 \pm 1$ ,  $234 \pm 1$  и  $219 \pm 1^\circ\text{C}$ , соответственно, по сравнению с хитозаном, температура начала распада образцов которого составляет  $207 \pm 1^\circ\text{C}$  (рисунок 30).

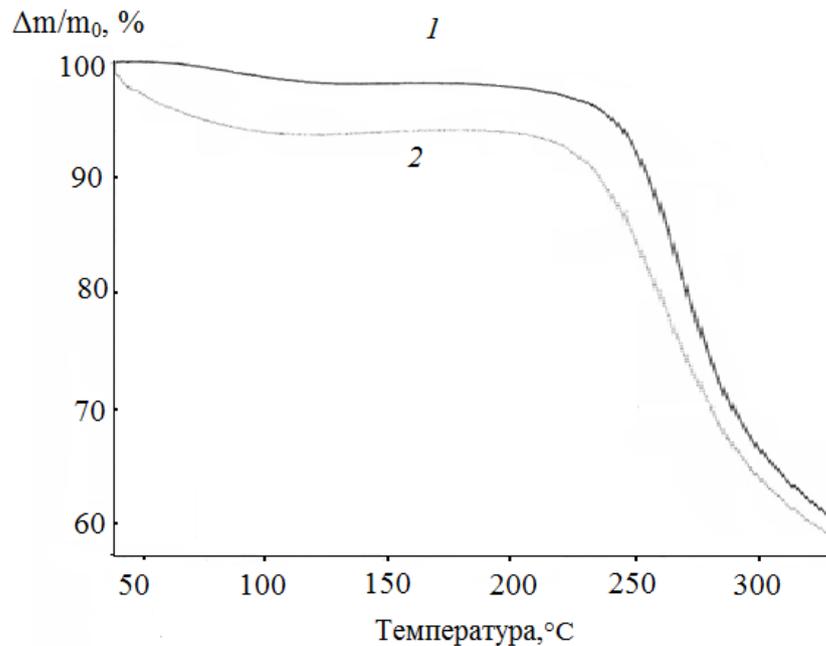


Рисунок 30. ТГ-кривые образцов ПЛА блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, с массовой долей ПЛА равной 6 (1) и 16 % (2)

ТГ - анализ образцов композиций хитозана с ПЛА, полученных в присутствии компатибилизаторов, проводили в области температур 30–330°C. Распад образцов композиций на основе хитозана и ПЛА, с массовой долей последнего 10 и 20 мас. % начинается при  $235 \pm 1$  и  $230 \pm 1^\circ\text{C}$ , соответственно, в отличие от образцов хитозана, для которых температура составляет  $207 \pm 1^\circ\text{C}$  (рисунок 31).

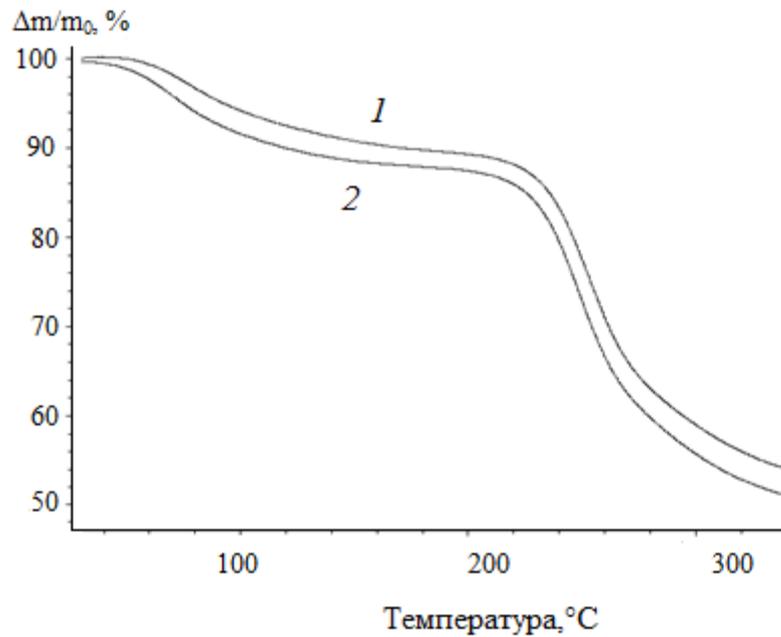


Рисунок 31. ТГ - кривые композиций на основе хитозана и ПЛА, с массовой долей ПЛА 10 (**1**) и 20 мас. % (**2**), соответственно

Проявляется тенденция некоторого повышения температуры разложения композитов при введении звеньев ПЛА, однако при значительном содержании ПЛА температура несколько снижается, но остается выше по сравнению с исходным хитозаном.

Совокупность полученных результатов определяет перспективность создания на основе полученных гибридных композитов, как материалов биомедицинского назначения, так и биоразлагаемых упаковочных материалов, использование которых возможно в достаточно широком интервале температур. Основные результаты исследований, представленные в данном разделе, опубликованы в работе [250].

### **3.5.3. Изучение бактерицидных свойств, грибостойкости и биodeградации блок-сополимеров ХТЗ с D,L-лактидом**

Блок-сополимеры хитозана с D,L-лактидом потенциально могут использоваться в качестве материалов для биомедицины, как базовые композиции при разработке скаффолдов, ранозаживляющих покрытий, а также упаковочных материалов. Необходимо было провести комплексное исследование поведения

образцов как под действием внешних факторов (бактерицидные свойства и грибостойкость), так и под действием внутренних ферментов (биodeградация *in vivo*), что важно с точки зрения их применения.

Были изучены бактерицидные свойства хитозана и блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом по отношению к культурам бактерий, способных вызывать воспалительные процессы: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (таблица 11.)

Таблица 11. Результаты исследований бактерицидных свойств пленок блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом по отношению к культурам бактерий

Массовая доля ПЛА в блок-сополимере, мас. %	Зона ингибирования роста бактерий, R (мм)		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
0	3	4	4
46	3	4	4
50	3	4	4

Известно, что хитозан обладает антибактериальной активностью против широкого спектра бактерий [27, 28], однако в данной работе исследуемые образцы хитозана проявляли только бактериостатический эффект, поскольку радиус зоны ингибирования роста бактерий составлял 3-4 мм, что сохраняется и для блок-сополимеров с содержанием ПЛА 46-50 мас. %.

Была исследована биodeградация *in vivo* образцов блок-сополимера хитозана с D,L-лактидом,  $\omega$  (ПЛА) = 26 мас. % на экспериментальных животных в течение 2 месяцев. Оказалось, что пластины полностью биodeградировали под кожей без признаков воспаления [241].

Изучена грибостойкость образцов пленок блок-сополимеров. В экспериментах были использованы гостированные штаммы микромицетов: *Aspergillus Oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium chrysogenum*. Результаты представлены в таблице 12.

Таблица 12. Результаты исследований грибостойкости пленок блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом по отношению к гостированным штаммам микромицетов

Массовая доля ПЛА в блок-сополимере, мас. %	Вид микромицета / Интенсивность развития плесневых грибов, балл		
	<i>Aspergillus Oryzae</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
6	3	3	1-2
16	4-5	5	3
26	4	5	4

Наименьшая скорость биоразложения наблюдается для блок-сополимера, содержащего 6 мас. % ПЛА, для изученных микромицетов.

Наиболее активно биodeградация протекает под действием *A. terreus*, в случае которого, для блок-сополимеров, содержащих 16 и 26 мас. % ПЛА, степень обрастания составила 5 баллов. Таким образом, варьируя состав полимерной композиции, можно управлять временем биodeградации [243].

Совокупность полученных результатов определяет перспективность создания на основе композиций хитозана с ПЛА прозрачных, биосовместимых, биоразлагаемых материалов с регулируемым временем разложения. Следует отметить, что композиции хитозана с ПЛА с требуемыми физико-механическими показателями можно получать как используя УЗ воздействие на смеси гомополимеров в присутствии низкомолекулярных модификаторов, так и с использованием блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом в минимальном количестве в качестве компатибилизаторов. Второй способ является более экологически и экономически выгодным, так как затраты на электроэнергию значительно снижаются.

Результаты исследований, представленные в данном разделе, опубликованы в работах [241, 243].

### **3.5.4. Исследование свойств композитов на основе хитозана, блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, модифицированных гидроксиапатитом**

В настоящее время разрабатывается широкий спектр композиционных материалов на основе ГА и биополимеров, которые обладают близкими к кости механическими свойствами и проявляют высокую биоактивность. Авторами [192, 219, 252] разработаны основы технологии и исследованы свойства гибридных материалов, предназначенных для применения в качестве пористых матриц в медицине для регенерации поврежденных костных тканей.

В этой связи перспективным представляется создание гибридных композитов на основе хитозана и ПЛА с добавлением ГА для разработки и получения 2D и 3D материалов, используемых в качестве органических составляющих скаффолдов для тканевой инженерии. ПЛА будет придавать необходимые физико-механические свойства материалу, хитозан, являясь полиоснованием, будет способен связывать молочную кислоту (продукт гидролиза ПЛА), а гидроксиапатит, в свою очередь, будет использован в качестве дополнительного материала для увеличения остеоиндуктивных свойств. При этом необходимо оценить влияние введения ГА на прочностные характеристики получаемых композитов. Результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13. Разрушающее напряжение и предельная деформация пленок на основе хитозана, модифицированных ГА

Содержание ГА, мас.%	$\sigma$ , МПа	$\varepsilon$ , %
0	$24.0 \pm 1.0$	$1.9 \pm 0.2$
1	$35.7 \pm 2.1$	$2.1 \pm 0.2$
3	$36.6 \pm 1.4$	$2.2 \pm 0.2$
5	$38.5 \pm 1.4$	$2.0 \pm 0.2$
7	$29.8 \pm 1.5$	$2.1 \pm 0.2$
10	$19.5 \pm 1.3$	$2.0 \pm 0.2$
15	$17.2 \pm 1.0$	$1.8 \pm 0.2$
20	$15.4 \pm 0.7$	$1.8 \pm 0.1$
40	$12.1 \pm 0.7$	$1.6 \pm 0.1$

Из таблицы 13 видно, что введение от 1 до 5 мас. % ГА в хитозан, повышает величину разрушающего напряжения пленок в 1.5 раза до 38.5 МПа, в то время как, величина деформации практически не изменяется по сравнению с исходным полисахаридом. При дальнейшем увеличении содержания ГА вплоть до 40 мас. % уровень физико-механических характеристик пленок значительно снижается.

Проведены рентгенографические исследования образцов, которые выявили, что введение ГА снижает кристалличность хитозана и приводит к его аморфизации (рисунок 32). Снижение доли кристаллических структур обуславливает закономерное снижение температуры стеклования образцов в пределах 15-20°C по сравнению с исходным хитозаном (рисунок 32).

При анализе ДСК - кривых образцов, выявлено, что присутствие ГА в пленках приводит к повышению температуры разложения композитов по сравнению с исходным полисахаридом (рисунок 33).

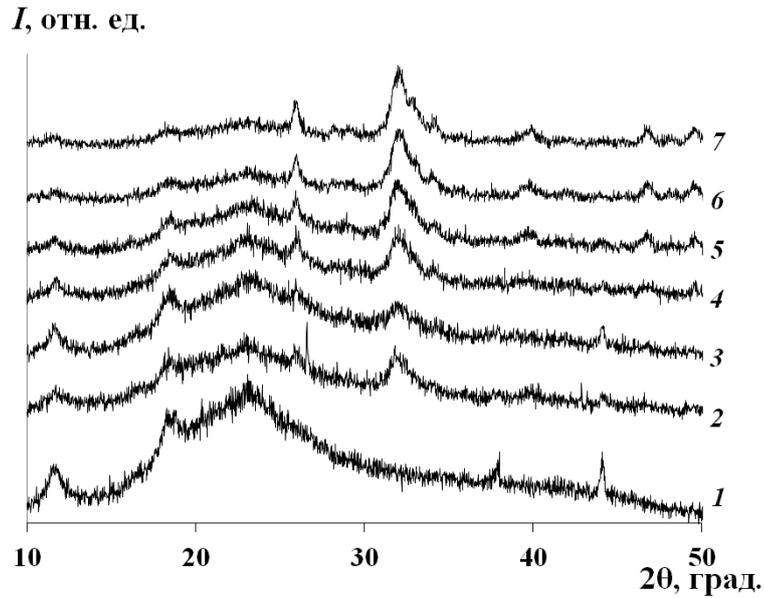


Рисунок 32. Рентгенограммы композитов (№1 - 7) на основе хитозана, с различным содержанием ГА, мас. %: №1 – 0, №2 – 5, №3 – 10, №4 – 15, №5 – 20, №6 – 30, №7 – 40

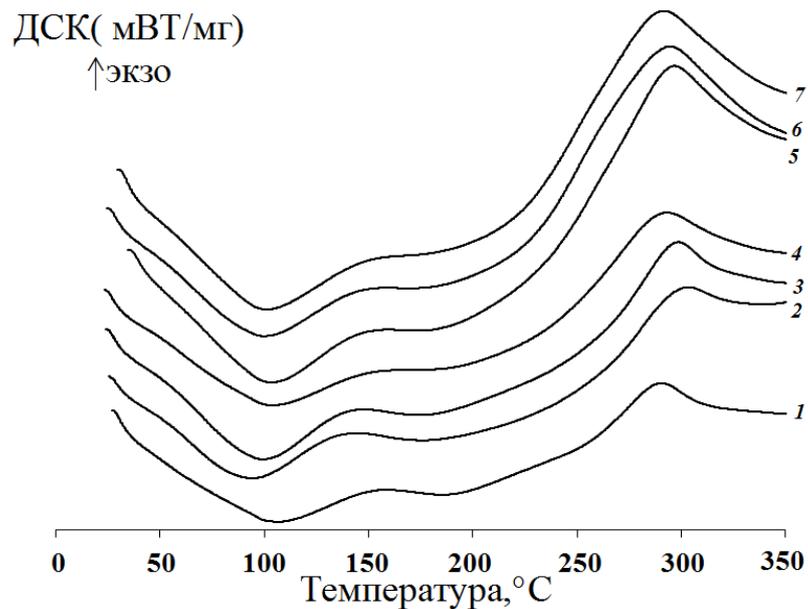


Рисунок 33. ДСК-кривые композитов (№1 - 7) на основе хитозана, с различным содержанием ГА, мас. %: №1 – 0, №2 – 5, №3 – 10, №4 – 15, №5 – 20, №6 – 30, №7 – 40

Исследованы физико-механические свойства пленки композиций на основе блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, наполненных ГА (таблица 14). Массовую долю ГА рассчитывали по отношению к блок-сополимеру хитозана с D,L-лактидом.

Таблица 14. Разрушающее напряжение и предельная деформация пленок на основе блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом, модифицированных ГА

Массовая доля ПЛА, мас. % в блок-сополимере хитозана с D,L-лактидом	Содержание ГА, мас. %	$\sigma$ , МПа	$\epsilon$ , %
6	0	$51.2 \pm 1.7$	$12.5 \pm 0.5$
6	0.5	$47.7 \pm 1.3$	$10.3 \pm 0.5$
16	0	$48.4 \pm 1.8$	$14.2 \pm 0.4$
16	0.5	$37.1 \pm 2.0$	$12.0 \pm 0.6$

Из таблицы 14 видно, что при введении в композицию даже незначительного количества ГА (0.5 мас. %) величины разрушающего напряжения  $\sigma$  и предельной деформации  $\epsilon$  пленок несколько снижаются, однако остаются на достаточно высоком уровне.

Таким образом, можно сделать заключение, что использование ГА при создании гибридных композиционных материалов на основе хитозана является возможным, так как в этом случае полиморфные трансформации гидроксиапатита даже при его высоком содержании в композите не оказывают существенного влияния на свойства композитов в относительно широком температурном диапазоне.

В работе показано, что при добавлении в состав расчетного количества ГА уровень физико-механических характеристик пленок композиций на основе хитозана и ПЛА уменьшается незначительно, поэтому такие композиты могут использоваться при разработке скаффолдов для тканевой инженерии благодаря содержанию синтетических полимерных блоков в составе.

Для использования гибридных материалов при дальнейшей разработке скаффолдов необходимо усовершенствование методики получения пористых структур с размерами пор 150-500 мкм, а также комплексное исследование цитотоксичности образцов и их влияния на пролиферацию человеческих клеток.

### 3.6. Композиционные материалы на основе хитозана и поли(D,L-лактид–титаноксида)

#### 3.6.1. Синтез сополимеров D,L-лактида с титаноксидом с использованием $Ti(OPr^i)_4$ . Получение и исследование свойств их смесей с хитозаном

При повреждении тканей и в процессе их лечения часто возникают осложнения, связанные с инфицированием ран и нагноением различной степени тяжести [253]. Для минимизации этих негативных последствий в большинство коммерчески доступных ранозаживляющих материалов включают антибиотики или антисептики, что негативно сказывается на процессе ранозаживления.

Актуальной задачей является разработка не только прозрачных биосовместимых ранозаживляющих покрытий на основе хитозана и ПЛА, позволяющих контролировать состояние раны, но и способных к подавлению патогенных микроорганизмов без использования антибиотиков. Это может быть достигнуто интегрированием в структуру композиций наноразмерного  $TiO_2$ .

$TiO_2$  является биосовместимым [254] и обладает бактерицидной активностью при световом воздействии [255]. Диоксид титана обладает уникальной способностью генерировать на своей поверхности активные формы кислорода ( $O_2\cdot^-$ ,  $\cdot OH$ ) при световом воздействии за счет одноэлектронного перехода  $Ti^{4+} + e^- \rightleftharpoons Ti^{3+}$  [256-260]. Эти активные формы кислорода могут не только обезвреживать загрязняющие вещества, но и связываться с бактериями и микробами, вызывая их гибель (обладают бактерицидным [259] и вирулицидным действием [260]), а также вызывать полное разложение погибших бактерий. Следует отметить, что все эти процессы протекают вблизи поверхности покрытия и не приводят к образованию вредных для организма биоцидов. В работе [261] показано, что нанокompозит хитозан-поливинилпирролидон -  $TiO_2$  проявляет сильный антибактериальный эффект против четырех видов патогенных бактерий - *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* - и является нетоксичным по отношению к клеткам фибробластов NH3T3 и L929 –

клеткам соединительной ткани. Высокие антибактериальные свойства обусловлены присутствием диоксида титана в композиции.

В связи с этим интересным решением для совмещения полезных свойств хитозана, ПЛА и диоксида титана является синтез сополимеров D,L-лактида с титаноксидом с использованием  $Ti(OPr^i)_4$  в качестве инициатора полимеризации и со(мономера) одновременно для получения композиций с хитозаном. Полученные материалы могут быть перспективны для использования в качестве ранозаживляющих покрытий.

Известно [262-264], что алкоксиды титана инициируют полимеризацию с открытием лактидного кольца. Схема механизма представлена на рисунке 34.

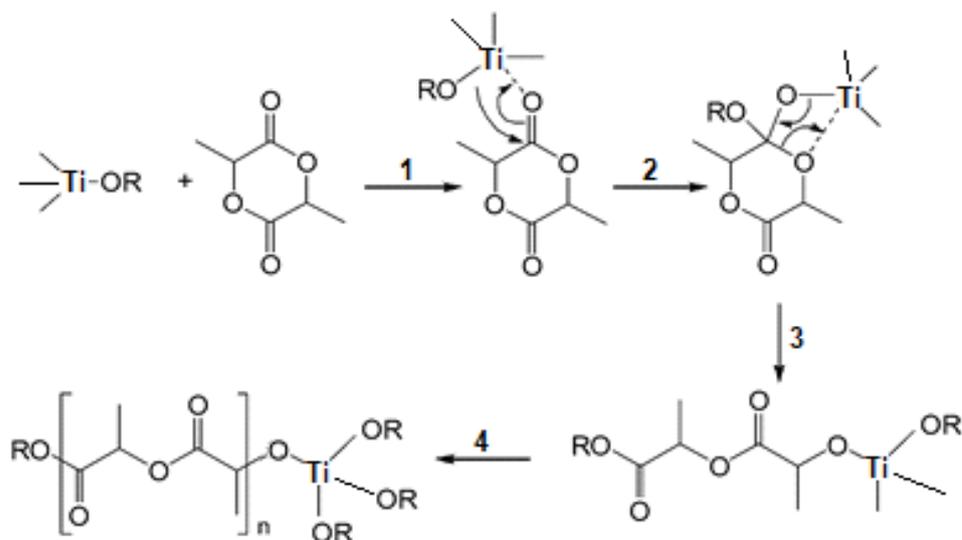


Рисунок 34. Схема координационно-вставочного механизма полимеризации лактида с раскрытием цикла в присутствии алкоксида титана ( $R = -Pr^i$ ) [264]

Одновременно образование полититаноксидных кластеров ( $(\equiv TiO_m)_n$ ) могло протекать в выбранной системе из-за реакции поликонденсации алкоксидов титана (рисунок 35).

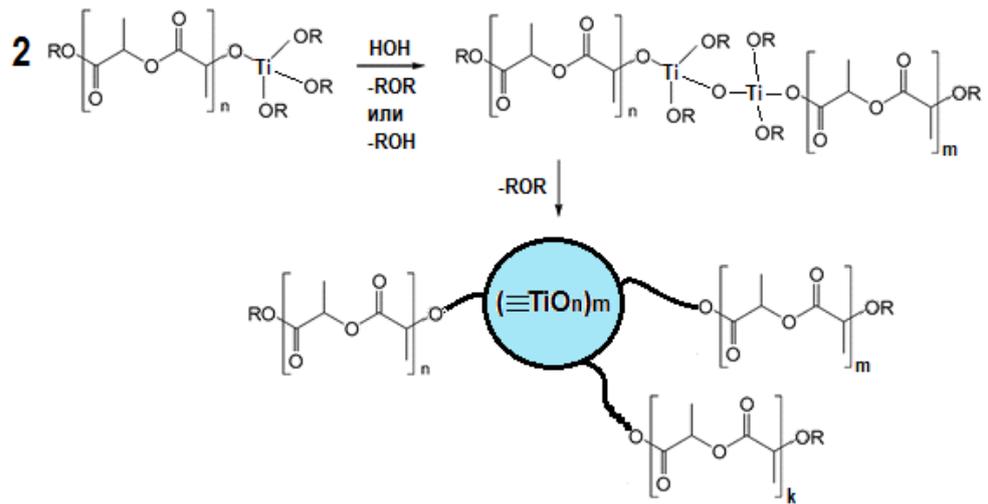


Рисунок 35. Схема образования полититаноксидных кластеров  $((\equiv\text{TiO}_m)_n)$

Для синтеза сополимеров D,L-лактида с титаноксидом использовали изопропоксид титана. Качественный состав продукта реакции подтвержден данными ИК-спектроскопии (рисунок 36, кривая 1) [265].

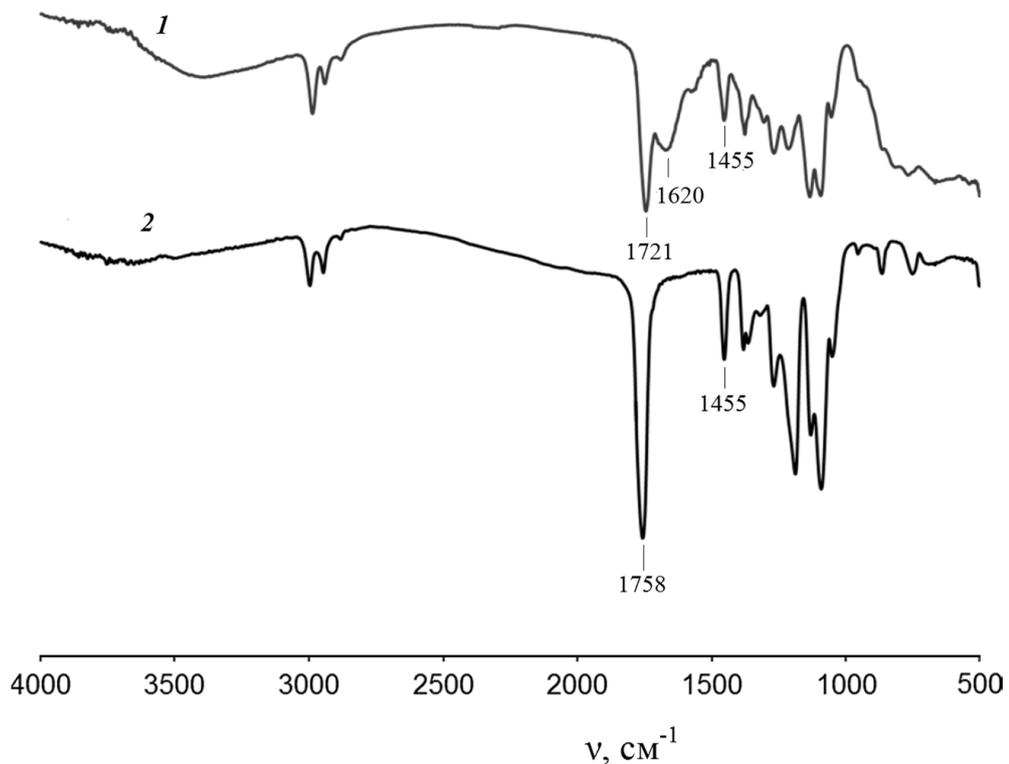


Рисунок 36. ИК-спектры сополимера D,L-лактида с титаноксидом, полученного при мольном соотношении компонентов

[D,L-лактид]:  $[\text{Ti}(\text{OPr}^i)_4] = 3: 1$  (**1**), ПЛА (**2**)

В ИК-спектрах сополимера D,L-лактида с титаноксидом, синтезированного с использованием  $Ti(OPr^i)_4$  (рисунок 36, кривая 1) и ПЛА (рисунок 36, кривая 2) наблюдаются характерные пики поглощения при 2986, 2941 и 2877  $cm^{-1}$  симметричных и асимметричных валентных колебаний СН из  $CH_3$ , соответственно, а также присутствуют полосы поглощения, соответствующие деформационным колебаниям  $CH_3$  – 1455  $cm^{-1}$  (асимметричные). Наблюдаются характерные полосы поглощения при 1215 и 1264  $cm^{-1}$ , характерные для асимметричных и симметричных валентных колебаний С-О-С, соответственно. В спектре сополимера (рисунок 36, кривая 1) происходит смещение полосы поглощения, относящейся к карбонильной группе ПЛА с 1758 до 1720  $cm^{-1}$ .

Стоит подчеркнуть, что отмечается аналогия между ИК-спектром полученного сополимера D,L-лактида с титаноксидом и ИК-спектром полилактидного композитного материала, заполненного порошком  $TiO_2$ , полученного в работе [266]. Широкая полоса поглощения наблюдается в области 3700-3400  $cm^{-1}$  может указывать на характерные тетраэдрические координированные вакансии Ti в виде  $4Ti^{4+}-OH$  и октаэдрические вакансии в виде  $6Ti^{3+}-OH$ . Другие дополнительные полосы в спектрах по сравнению с ПЛА (рисунок 36, кривая 2) представляют собой полосы поглощения в области 864-500  $cm^{-1}$  и при 1621  $cm^{-1}$ . Эти пики относятся к Ti-O и Ti-O-Ti, что, вероятно, может указывать на образование последовательностей поли(титаноксида) в цепи сополимере [266-268].

ММ поли(D,L-лактид-титаноксида), полученного при мольном соотношении компонентов [D,L-лактид]:  $[Ti(OPr^i)_4] = 3: 1$ , исследованная методом ГПХ, составляет  $M_w = 34.0 \times 10^3$ ,  $M_n = 18.9 \times 10^3$ . Длительность синтеза составила 12 часов при  $T = 130^\circ C$ , выход продукта – 48 %. Синтезы были проведены при различных соотношениях [D,L-лактид]:  $[Ti(OPr^i)_4]$ . Содержание звеньев поли(титаноксида) в сополимерах варьировалось от 15 до 35 мас. % [265].

На основе полученных образцов сополимеров D,L-лактида с титаноксидом и хитозана были приготовлены растворы, из которых отлиты пленки, представляющие собой прозрачные материалы. Светопропускание пленок

композиций хитозана и сополимеров D,L-лактида с титаноксидом различного состава в видимой области спектра превышает ~ 70 % (рисунок 37). Уменьшение пропускания пленок на 5-10 % наблюдалось при их УФ-облучении в результате одноэлектронного перехода  $Ti^{4+} + e^- \rightleftharpoons Ti^{3+}$  и образования активных форм кислорода на поверхности пленок вследствие разрыва связи Ti-O.

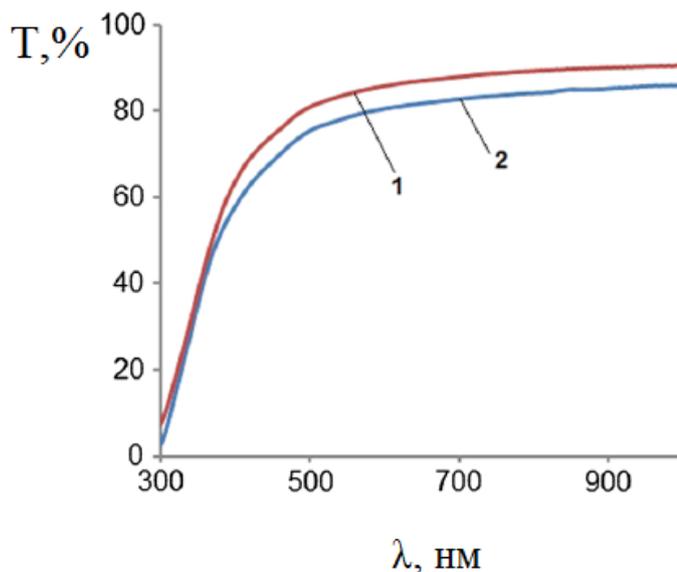


Рисунок 37. Изменение спектра светопропускания пленки состава 66.7 мас. % хитозан + 33.3 мас. % поли(D,L-лактид-титаноксид), ([D,L-лактид]: [Ti(OPr<sup>i</sup>)<sub>4</sub>] = 3: 1): кривая 1 – до УФ-облучения пленки; кривая 2 – спустя 60 минут УФ-воздействия на образец

Характерно, что в данном случае в отличие от системы хитозана с ПЛА при совмещении их в растворе нет необходимости использования компатибилизатора. Можно предположить, что наличие звеньев поли(титаноксида) в сополимере препятствует образованию интерполимерного комплекса с хитозаном.

Исследованы физико-механические свойства композиций хитозана и сополимеров D,L-лактида с титаноксидом. Образцы сополимеров D,L-лактида с титаноксидом были получены при различных мольных соотношениях [D,L-лактид]: [Ti(OPr<sup>i</sup>)<sub>4</sub>], взятых при синтезе (таблица 15) [265].

Из таблицы 15 видно, что при увеличении доли сополимеров D,L-лактида с титаноксидом в образце композиции с хитозаном, а также мольного соотношения

компонентов [D,L-лактид]: [Ti(OPr<sup>i</sup>)<sub>4</sub>] от 1: 1 до 3: 1, величина разрушающего напряжения  $\sigma$  пленок возрастает.

Таблица 15. Разрушающее напряжение и предельная деформация пленок композиций хитозана и сополимеров D,L-лактида с титаноксидом

Состав композиции		$\sigma$ , МПа	$\varepsilon$ , %
Хитозан: поли(D,L-лактид – титаноксид)*, г/г	[D,L-лактид]: [Ti(OPr <sup>i</sup> ) <sub>4</sub> ]*		
100: 0	-	24.0 ± 1.0	1.9 ± 0.2
91: 9	1: 1	28.2 ± 1.9	4.5 ± 0.3
91: 9	2: 1	37.7 ± 2.6	3.5 ± 0.2
91: 9	3: 1	70.5 ± 3.4	6.4 ± 0.3
77: 23	1: 1	32.8 ± 1.7	2.9 ± 0.1
77: 23	3: 1	79.3 ± 4.2	6.7 ± 0.3
66.7: 33.3	1: 1	55.0 ± 3.8	4.5 ± 0.3
66.7: 33.3	3: 1	117.1 ± 8.3	7.2 ± 0.5

\*мольное соотношение [D,L-лактид]: [Ti(OPr<sup>i</sup>)<sub>4</sub>] при синтезе сополимеров

Для изученных композиций хитозана и сополимеров D,L-лактида с титаноксидом с различным соотношением компонентов величины разрушающего напряжения  $\sigma$  и предельной деформации  $\varepsilon$  пленок существенно превышают показатели исходного полисахарида.

Для композиции состава – 66.7 мас. % хитозана + 33.3 мас. % поли(D,L-лактид – титаноксид) величина разрушающего напряжения  $\sigma$  пленок составила 117 МПа при величине предельной деформации  $\varepsilon \sim 7$  %. Содержание звеньев поли(титаноксида) в композиции составляло 10 мас. %.

Композиция 66.7 мас. % хитозан + 33.3 мас. % поли(D,L-лактид–титаноксид) была исследована на биоразлагаемость, биосовместимость и гиппоаллергенность в опытах *in vivo*.

Показатели крови, характеризующие функциональное состояние животных (стресс, относительная норма) спустя 1 и 3 неделю после имплантации образцов, а также возможное развитие воспаления, аллергического ответа представлено в таблице 16 [265]. 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, а увеличение эозинофилов наблюдается при аллергии.

Таблица 16. Показатели крови крыс через 1 и 3 недели после подкожного введения пленки состава 66.7 мас. % хитозан + 33.3 мас. % поли(D,L-лактид-титаноксид)

Показатели крови	Интактные животные	Контрольные животные	Животные опытной группы
1 неделя			
Лейкоциты, $1 \times 10^9$ клеток на 1 литр крови	$7.48 \pm 0.77$	$8.56 \pm 1.29$	$9.62 \pm 0.77^*$
Лимфоциты, %	$70.8 \pm 3.34$	$70.18 \pm 2.85$	$64.00 \pm 3.59$
Моноциты, %	$13.45 \pm 1.63$	$11.8 \pm 0.52$	$13.9 \pm 0.44^{**}$
Гранулоциты, %	$15.8 \pm 2.39$	$18.04 \pm 3.08$	$22.1 \pm 3.57$
Эозинофилы, %	$0.90 \pm 0.18$	$0.85 \pm 0.21$	$1.33 \pm 0.31$
Эритроциты, $1 \times 10^{12}$ клеток на 1 литр крови	$4.45 \pm 0.45$	$4.70 \pm 0.47$	$5.15 \pm 0.31$
Гемоглобин, грамм на 1 литр крови	$85.75 \pm 8.63$	$89.6 \pm 8.71$	$97.8 \pm 6.24$
3 неделя			
Лейкоциты, $1 \times 10^9$ клеток на 1 литр крови	$7.48 \pm 0.76$	$7.34 \pm 2.22$	$8.59 \pm 0.29^*$
Лимфоциты, %	$70.8 \pm 3.33$	$51.18 \pm 11.73$	$65.92 \pm 2.36$
Моноциты, %	$13.45 \pm 1.63$	$13.68 \pm 1.96$	$13.37 \pm 0.48$
Гранулоциты, %	$15.8 \pm 2.39$	$18.74 \pm 2.98$	$16.7 \pm 1.98$
Эозинофилы, %	$0.90 \pm 0.18$	$0.65 \pm 0.26$	$1.32 \pm 0.32$
Эритроциты, $1 \times 10^{12}$ клеток на 1 литр крови	$4.45 \pm 0.45$	$4.52 \pm 0.58$	$5.77 \pm 0.13^*$
Гемоглобин, грамм на литр крови	$85.75 \pm 8.63$	$90.00 \pm 9.11$	$112.00 \pm 3.48^{*.**}$

\*- статистически значимый результат по сравнению с интактной группой,

\*\* - статистически значимый результат по сравнению с контрольной группой, статистически значимые различия при  $p \leq 0.05$

Из таблицы 16 видно, что через 1 неделю количество лейкоцитов в крови животных опытной группы статистически значимо не отличалось от показателей контрольных животных, но было выше значения интактной группы. Это увеличение, по всей видимости, связано с более высоким количеством в крови опытных животных гранулоцитов – главных фагоцитирующих клеток организма. Их увеличение, в данном случае, связано с обеспечением биорезорбируемости имплантируемой пленки.

В опытной и контрольной группах не происходило уменьшения количества лимфоцитов относительно показателей интактных животных, то есть животные не находились в состоянии стресса.

Количество эозинофилов в крови животных опытной группы оставалось на уровне контрольной, что свидетельствует о том, что имплантация пленки не приводила к развитию аллергии. Количество моноцитов в опытной, контрольной группах не отличалось от значений интактных животных, что подтверждало отсутствие воспалительного процесса у животных.

Концентрация гемоглобина, количество эритроцитов в опытной, интактной и контрольной группах не имели статистически значимых межгрупповых различий. Это указывает, что введение пленки в организм не вызывает анемии у животных опытной группы. Животные опытной группы спустя 1 неделю после имплантации находились в состоянии близком к состоянию относительной нормы.

Спустя 3 недели показатели «белой» крови – количество лейкоцитов, моноцитов, лимфоцитов – были практически одинаковые как у интактных, так и у опытных животных. Животные как и на 1-ой неделе не находились в состоянии стресса и не происходило гипериммунного ответа их организма на введение пленки. При этом в крови опытных животных наблюдалось повышенное содержание эритроцитов и гемоглобина по сравнению с интактными. Можно полагать, что это связано с увеличением скорости доставки кислорода в ткани и интенсификацией энергетического обмена в организме животных.

Таким образом, положительные показатели крови доказывают отсутствие у животных признаков воспаления, аллергической реакции и стресса при введении пленки в организм и нетоксичность композита.

Отсутствие у экспериментальных животных состояния стресса дополнительно подтверждается низким содержанием в их крови продуктов ПОЛ (таблица 17).

Таблица 17. Содержание продуктов ПОЛ в крови животных

Группа животных	Диеновые конъюгаты – первичные продукты ПОЛ (отн. ед. экстинкции)	Триеновые конъюгаты – вторичные продукты ПОЛ (отн. ед. экстинкции)	Основания Шиффа – конечные продукты ПОЛ (отн. ед. экстинкции)
1 неделя			
Интактные	0.262 ± 0.028	0.265 ± 0.025	3.741 ± 0.034
Контроль	0.279 ± 0.025	0.331 ± 0.041	4.706 ± 0.570
Опытные	0.768 ± 0.026***	0.398 ± 0.088	0.764 ± 0.071*
3 неделя			
Интактные	0.262 ± 0.028	0.265 ± 0.025	3.741 ± 0.360
Контроль	0.154 ± 0.009	0.302 ± 0.021	1.225 ± 0.140*
Опытные	0.163 ± 0.004	0.108 ± 0.008	1.273 ± 0.141*

статистически значимые различия при  $p \leq 0.05$  (\*) - по сравнению с интактной группой, (\*\*) - по сравнению с контрольной группой.

У животных опытной группы через 1 неделю содержание диеновых конъюгатов – первичных продуктов липопероксидации – примерно в 2.5 раза выше, чем в контрольной и интактной группах. Это связано с повышенным

продуцированием активных форм кислорода фагоцитами (гранулоцитами) – основными представителями этой группы клеток являются нейтрофилы, функцией которых является биоутилизация пленки.

Содержание вторичных продуктов ПОЛ – триеновых конъюгатов – в крови животных контрольной и опытной групп одинаково. Количество конечных продуктов ПОЛ – оснований Шиффа – в опытной группе было ниже, чем у животных контрольной и интактной групп.

Известно, что снижение продуктов ПОЛ наблюдается при увеличении мощности антиоксидантной системы организма. Аналогичная картина наблюдается спустя 3 недели. Содержание продуктов ПОЛ как в крови крыс контрольной группы, так и в опытной, ниже, чем в группе интактных животных.

Как отмечалось выше, показатели крови и содержание продуктов ПОЛ указывают на возможную биоутилизацию и разложение пленки. Это было подтверждено прямыми опытами. В процессе эксперимента часть животных забивали, пленку извлекали с целью определения ее массы и размеров. Спустя 3 недели выявлено, что ее размеры уменьшились в 2 раза, а масса – в 4 раза (таблица 18). Спустя 4 недели пленка полностью биоутилизируется.

Таблица 18. Характеристики пленки состава 66.7 мас. % хитозан + 33.3 мас. % поли(D,L-лактид–титаноксид) в процессе ее биодеградации в организме крыс

Время нахождения пленки в организме животных	Толщина, мм	Масса, г
Исходная пленка	0.130	0.0487
1 неделя	0.090	0.0326
2 недели	0.063	0.0287
3 недели	0.054	0.0117

В результате проведенных исследований можно заключить, что введение пленки в организм животных не приводило к развитию у них стресса и не вызывало гипериммунного ответа организма в виде аллергии.

Как уже отмечалось выше, диоксид титана способен генерировать при действии УФ-излучения активные формы кислорода в виде  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet\text{OH}$ , которые способны подавлять развитие болезнетворных бактерий. В связи с этим были проведены испытания бактерицидного действия пленки состава 66.7 мас. % хитозан + 33.3 мас. % поли(D,L-лактид–титаноксид). Содержание звеньев поли(титаноксида) в композиции составляло 10 мас. %. В качестве тест культур использовали культуру бактерий *Staphylococcus aureus* (стафилококк золотистый), которая является причиной нагноения раневой поверхности.

Исследуемую композицию в виде пленки помещали на поверхность агаризованной питательной среды (мясопептонный агар) в чашки Петри и инокулировали среду и пленку суспензией бактерии *Staphylococcus aureus* (стандарт мутности 1 ед.). Испытания пленочных образцов проводились как при действии УФ-света в течение 15 минут (серия 1), так и в его отсутствии (серия 3). После этого чашки Петри помещались в термостат при температуре 37°C на сутки. Параллельно с этим были поставлены опыты по изучению бактерицидного действия только УФ-излучения (15 минут, серия 2).

О наличии бактерицидной активности судили по зоне ингибирования роста тест-культур бактерий, которая образуется вокруг исследуемых образцов. Результаты проведенных исследований показали, что в первой серии опытов наблюдалось ингибирование роста бактерии на среде до 40 %. Следует также отметить отсутствие роста бактерий под пленкой, то есть сама пленка под действием УФ-света приобретает бактерицидные свойства. Вторая серия опытов также показала, что УФ-излучение подавляет развитие бактерий, но их гибель составляет 20 %. В контрольном опыте (серия 3) в отсутствие УФ-облучения не было отмечено ингибирования роста бактерий - пленка не проявила бактерицидных свойств по отношению к *Staphylococcus aureus*.

Таким образом, подтверждается эффективное бактерицидное действие пленочных образцов, содержащих полититаноксид, при УФ-воздействии на них, так как в этом случае происходит генерирование активных форм кислорода за счет одноэлектронного перехода  $\text{Ti}^{4+} + e^- \rightleftharpoons \text{Ti}^{3+}$ .

В результате проведенных исследований можно заключить, что еще одними достоинствами пленок, полученных на основе разработанной композиции, являются прозрачность и антибактериальные свойства, что в совокупности определяет возможность применения материала в качестве раневого покрытия, через которое можно производить УФ-облучение раны для подавления развития бактерий, и, благодаря чему, не требующего частой замены [265].

Таким образом, можно сделать вывод, что сочетание повышенных прочностных характеристик и прозрачности, отсутствия токсичности и аллергического ответа, способности пленок к биодegradации определяет перспективность полученного материала в травматологии как основы тканезамещающих матриц различного назначения – компонентов раневых покрытий, заместителей костной ткани.

Основные результаты исследований, представленные в данном разделе, опубликованы в работе [265].

### **Заключение**

Разработан способ получения композиционных рассасывающихся материалов на основе хитозана и ПЛА. Полученные материалы могут найти применение в изделиях биомедицинского назначения, в том числе как материалы для остеосинтеза и носители лекарственных препаратов пролонгированного действия.

1. Патент RU Способ получения композиционных рассасывающихся материалов на основе хитозана и полилактида / Л.А. Смирнова, А.Е. Мочалова, Н.Е. Цверова, И.Л.Федюшкин, А.Г. Морозов, В.М. Карюк, А.В. Мальков. - №2540468; Заявл. 06.11.2012; Опубл. 10.02.2015; Бюл. № 4 - 6 с.

## Выводы

1. Подобраны и теоретически обоснованы условия формирования однородных растворов хитозана и ПЛА с содержанием последнего до 50 мас. % на основании расчетов значения параметров растворимости гомополимеров как в смешанном растворителе с использованием модификаторов, так и при введении compatibilizators - блок-сополимеров хитозана с D,L-лактидом для приготовления смесевых композиций хитозана с ПЛА с улучшенными прочностными характеристиками.

2. Впервые методом УЗ воздействия на растворы смесей гомополимеров получены блок-сополимеры хитозана с D,L-лактидом, имеющие полиблочное строение с ММ блоков ПЛА от 2.9 до  $22.5 \times 10^3$  в зависимости от соотношения компонентов в реакционной смеси.

3. Введение звеньев ПЛА в хитозан приводит к существенному улучшению физико-механических свойств блок-сополимеров по сравнению с исходным хитозаном. Установлено, что при содержании ПЛА 16 мас. % в сополимере и максимальной ММ его блоков  $22.5 \times 10^3$  материал обладает оптимальными физико-механическими характеристиками – величина разрушающего напряжения пленок  $\sigma = 47$  МПа при величине предельной деформации  $\epsilon = 20$  %.

4. Получены материалы с высокой термической стойкостью на основе хитозана и ГА и прозрачные, гипоаллергенные, биосовместимые, биodegradable композиции с высокими физико-механическими свойствами, перспективные для тканевой инженерии. Величины разрушающего напряжения  $\sigma$  и предельной деформации  $\epsilon$  материала на основе смеси 66.7 мас. % хитозан + 33.3 мас. % поли(D,L-лактид–титаноксид) составляют  $\sim 117$  МПа и  $\sim 7$  %, соответственно.

**Список сокращений**

АА – акриламид

ГА – гидроксиапатит

ГПХ – гель-проникающая хроматография

ДАК – 2,2'-азо-бис-изобутиронитрил

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

ИК – инфракрасная спектроскопия

MALDI-TOF – масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

ММ – молекулярная масса

МФИ – 4,4'-метиленис(фенилизоцианат)

СД – степень деацетилирования

ПАА – полиакриламид

ПВС – поливиниловый спирт

ПЛА – поли(D,L-лактид)

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ТГФ – тетрагидрофуран

ТГ – термогравиметрический анализ

T<sub>g</sub> – температура стеклования

УЗ – ультразвуковой

УФ – ультрафиолетовая спектроскопия

**Список литературы**

1. Muzzarelli, R.A.A. Chitin / R.A.A. Muzzarelli. - Oxford: Pergamon Press, 1977, - 309 p.
2. Быкова В. М., Немцов В.С. Сырьевые источники и способы получения хитина и хитозана. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихревой, В.П. Варламова – Изд. «Наука». – М. – 2006. – С.7-23.
3. Khor, E. Chitin: fulfilling a biomaterials promise / E. Khor. – Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Applied Science, 2001, – 136 p.
4. Pillai, C.K.S. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation / C.K.S. Pillai, W. Paul, C. P. Sharma // Progress in Polymer Science. – 2009. - V. 34. - № 7. - P. 641–678.
5. Акопова, Т. А. Образование хитозана из хитина в условиях сдвиговых деформаций / Т. А. Акопова, С. З. Роговина, Г. А. Вихорева, С. Н. Зеленецкий, Л. С. Гальбрайт, Ениколопян Н. С // Высокомолекулярные соединения. 1991. – Т. 33. – № 10. – С. 735 - 737.
6. Croisier, F. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering / F. Croisier, C. Jérôme // European Polymer Journal. – 2013. - V. 49. - № 4. - P. 780–792.
7. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications / M. Rinaudo // Progress in Polymer Science. - 2006. - V. 31. - № 7. - P. 603–632.
8. Clark, G. L. X-ray diffraction studies of chitin, chitosan, and derivatives / G. L. Clark, A. F. Smith // Journal of Physical Chemistry. - 1936. - V. 40. - № 7. - P. 863–879.
9. Samuels, R. J. Solid state characterization of the structure of chitosan films / R. J. Samuels // Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition. - 1981. - V. 19. - № 7 – P. 1081–1105.
10. Ogawa, K. A new polymorph of chitosan / K. Ogawa, S. Hirano, T. Miyanishi, T. Yui, T. Watanabe // Macromolecules. – 1984. - V. 17. - P. 973-975.
11. Kumar, M. N. R. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives / M.N.R. Kumar, R.A.A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa, A.J. Domb // Chemical

Reviews. - 2004. - V. 104. - № 12. - P. 6017–6084.

12. Dutta, P.K. Chitin and Chitosan: chemistry, properties and applications / P.K. Dutta, J. Dutta, V. S. Tripathi // Journal of Scientific and Industrial Research. – 2004. – V. 63. – № 1. – P. 20-31.

13. Chatelet, C. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films / C. Chatelet, O. Damour, A. Domard // Biomaterials.- 2000. - V. 22. - P. 261–268.

14. Li, X. Characterization and biodegradation of chitosan-alginate polyelectrolyte complexes / X. Li, H. Xie, J. Lin, W. Xie, X. Ma // Polymer Degradation and Stability. – 2009. - V. 94. - №1. – P. 1–6.

15. Rosca, C. Polyelectrolyte complexes of chitosan with dextran sulphate. Synthesis and characterization / C. Rosca, O. Novac, G. Lisa, M. I. Popa // Cellulose Chemistry and Technology. - 2011. – V. 45. - № 3-4. – P. 185-189.

16. Mao, S. Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan derivatives and insulin / S. Mao, U. Bakowsky, A. Jintapattanakit, T. Kissel // J. Pharm. Sci. - 2006. - V. 95. - № 5. - P. 1035-1048.

17. Бакулин, А.В. Использование хитозана для выделения  $\beta$ -лактоглобулина из смеси белков молочной сыворотки / А.В. Бакулин, Н.В. Гавриленко, Е.М. Червяковский, В.П. Курченко, В.П. Варламов // Биотехнология. - 2011. - № 1. - С. 34–41.

18. Иощенко, Ю. П. Получение и исследование полимолекулярных комплексов хитозана с белками и гидроксилсодержащими полимерами. Автореф. дисс. ... канд. тех. наук: 02.00.06 / Иощенко Юлия Павловна. – Волгоград, 2006. – 21 с.

19. Erbacher, P. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability / P. Erbacher, S. Zou, T. Bettinger, A.M. Steffan, J.S. Remy // Pharmaceutical Research. - 1998. - V. 15. № 9. - P. 1332–1339.

20. Saranya, N. Chitosan and its derivatives for gene delivery / N. Saranya, A. Moorthi, S. Saravanan, M. P. Devi, N. Selvamurugan // International Journal of

Biological Macromolecules. - 2011. - V.48. - № 2. - P. 234-238.

21. Balan, V. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review / V. Balan, L. Verestiuc // *European Polymer Journal*. - 2014. - V. 53. - № 1. - P. 171–188.

22. Anitha, A. Chitin and chitosan in selected biomedical applications / A. Anitha, S. Sowmya, P.T.S. Kumar, S. Deepthi, K.P. Chennazhi, H. Ehrlic, M. Tsurkan, R. Jayakumar // *Progress in Polymer Science*. - 2014. - V. 39. - № 9. - P. 1644–1667.

23. Verheul, R.J. Influence of the degree of acetylation on the enzymatic degradation and in vitro biological properties of trimethylated chitosans / R.J. Verheul, M. Amidi, M.J. van Steenberg, E. van Riet, W. Jiskoot, W.E. Hennink // *Biomaterials*. - 2009. - V. 30. - № 18. - P. 3129–3135.

24. Kean, T. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan / T. Kean, M. Thanou // *Advanced Drug Delivery Reviews*. - 2010. - V. 62. - № 1. - P. 3–11.

25. Han, T. Methods of N-acetylated chitosan scaffolds and its in vitro biodegradation by lysozyme / T. Han, N. Nwe, T. Furuike, S. Tokura, H. Tamura // *Journal of Biomedical Science and Engineering*. - 2012. - V. 5. - №1. - P. 15–23.

26. Ahmadi, R. Biocompatibility and gelation of chitosan glycerol phosphate hydrogels / R. Ahmadi, J.D. De Bruijn // *J Biomed Mater Res A*. - 2008. - V. 86. - № 3. - P. 824-832.

27. Helander, I.M. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria / I.M. Helander, E. L. Nurmiäho-Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades, S. Roller // *Int. J. Food Microbiol.* - 2001. - V. 71. - № 2-3. - P. 235–244.

28. Sudarshan, N.R. Antibacterial action of chitosan / D.G. Hoover, D. Knorr // *Food Biotechnol.* - 1992. - V. 6. - № 3. - P. 257–72.

29. Ong, S.Y. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties / S.Y. Ong, J. Wu, S.M. Mochhala, M.H. Tan, J. Lu // *Biomaterials*. 2008. - V. 29. - № 32. - P. 4323–32.

30. Aziz, M.A. Antimicrobial properties of a chitosan dextran-based hydrogel for surgical use / M.A. Aziz, J.D. Cabral, H.J.L. Brooks, S.C. Moratti, L.R. Hanton // *Antimicrob Agents Chemotherapy*. -2012. - V. 56. - № 1. - P. 280–287.

31. Cruz-Romero, M.C. Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications / M.C. Cruz-Romero, T. Murphy, M. Morris, E. Cummins, J.P. Kerry // *Food Control*. - 2013. - V 34. - № 2. - P. 393–397.

32. Knowles, J. Efficacy of chitosan, carvacrol, and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel / J. Knowles, S. Roller // *Journal of Food Protection*. - 2001. - V. 64. - №. 10. - P. 1542–1548.

33. Berger, J. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications / J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, R. Gurny // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. - 2004. - V. 57. - № 1. - P. 35–52.

34. Lee, Y.H. Acceleration of wound healing in diabetic rats by layered hydrogel dressing / Y.H. Lee, J.J. Chang, M.C. Yang, C.T. Chien, W.F. Lai // *Carbohydrate Polymer*. -2012. - V. 88. - № 3. - P. 809–819.

35. Патент RU Кровоостанавливающий препарат / К. В. Апрятина, Л. А. Смирнова, А. Е. Мочалова, А. С. Корягин, О. Н. Смирнова, А. В. Мальков, А.В. Афонин. - №2545991; Заявл. 18.07.2013; Оpubл. 10.04.2015; Бюл. № 10 - 6 с.

36. Ueno, H. Topical formulations and wound healing applications of chitosan / H. Ueno, T. Mori, T. Fujinaga // *Advanced Drug Delivery Reviews*. - 2001. - V.52. - № 2. - P. 105-115.

37. Корягин А.С. Анализ антиоксидантных свойств хитозана и его мономеров / А.С. Корягин, Е.А. Ерофеева, Н.О. Якимова и др. // *Бюлл. экс- пер. биол. и мед.* - 2006. - № 10. - С. 444 – 446.

38. Габитов, В.Х. Влияние хитозана, гиалуроновой кислоты и ангиогенина на регенерацию кожи после термической травмы / В.Х. Габитов, А.Б. Уметалиева // *Вестник КРСУ*. - 2014. - Т. 14. - № 4. - С. 57-59.

39. Nath, S.D. Chitosan–hyaluronic acid polyelectrolyte complex scaffold crosslinked with genipin for immobilization and controlled release of BMP-2 / S.D. Nath, C. Abueva, B. Kim, B.T. Lee // *Carbohydrate Polymers*. - 2015. - V. 115. - P. 160–

169.

40. Liu, B. Adsorption of heavy metal ions, dyes and proteins by chitosan composites and derivatives — A review / B. Liu, D. Wang, G. Yu, X. Meng // *Journal of Ocean University of China*. - 2013. - V. 12. - № 3, - P. 500–508.

41. Куликов, С.Н. Влияние молекулярной массы хитозана на его противовирусную активность в растениях / С.Н. Куликов, С.Н. Чирков, А.В. Ильина, С.А. Лопатин, В.П. Варламов // *Прикладная биохимия и микробиология*. –2006. – Т. 42. № 2. – С.224–228.

42. Jung, B.O. Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities / B.O. Jung, C.H. Kim, K.S. Choi, Y.M. Lee, J.J. Kim // *Journal of Applied Polymer Science*. -1999. - V. 72. - № 13. - P. 1713–1719.

43. Yang, R. A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment / R. Yang, H. Li, M. Huang, H. Yang, A. Li // *Water Research*. -2016. - V. 95. – P. 59–89.

44. Yang, Z. Cationic content effects of biodegradable amphoteric chitosan-based flocculants on the flocculation properties / Z. Yang, Y. Shang, X. Huang, Y. Chen, Y. Lu, A. Chen, Y. Jiang, W. Gu, X. Qian, H. Yang, R. Cheng // *Journal of Environmental Sciences*. - 2012. - V. 24. - № 8. – P. 1378–1385.

45. Liu, B. Adsorption of heavy metal ions, dyes and proteins by chitosan composites and derivatives — A review / B. Liu, D. Wang, G. Yu, X. Meng // *Journal of Ocean University of China*. – 2013. - V. 12. - № 3. - P. 500-508.

46. Селиверстов, А.Ф. Сорбция металлов из водных растворов хитиносодержащими материалами / А.Ф. Селиверстов, А.Ю. Емельянов, Б.Г. Ершов // *Журнал прикладной химии*. – 1993. – Т. 66. - № 10. – С. 2331-2336.

47. Каблов, В.Ф. Получение полимолекулярных комплексов хитозана с биоразлагаемыми полимерами и исследование их свойств / В.Ф. Каблов, И.М. Агаянц, Ю.П., Иощенко Д.А. Кондруцкий // *Вестник МИТХТ*. - 2006. - №5. - С. 17-23.

48. Zhang, L. Removal of heavy metal ions using chitosan and modified chitosan: A review / L. Zhang, Y. Zeng, Z. Cheng // *Journal of Molecular Liquids*. -

2016. - V. 214. - P. 175-191.

49. Aranaz, I. Cosmetics and cosmeceutical applications of chitin, chitosan and their derivatives / I. Aranaz, N. Acosta, C. Civera, B. Elorza, J. Mingo, C. Castro, M. L. Gandía, A. H. Caballero // *Polymers*. - 2018. - V. 10. - № 2. - P. 213-238.

50. Bordenave, N. Water and Moisture Susceptibility of Chitosan and Paper-Based Materials: Structure–Property Relationships / N. Bordenave, S. Grelier, F. Pichavant, V. Coma // *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. - 2007. - V.55. - № 23. - P. 9479-9488.

51. Wang, G.H. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan / G.H. Wang // *Journal of Food Protection*. - 1992. - V. 55. - № 11. - P. 916–919.

52. M. Rani, A. Agarwal, Y. S. Negi. Review: Chitosan based hydrogel polymeric beads - As drug delivery system / M. Rani, A. Agarwal, Y. S. Negi // *Bioresources*. - 2010. -V. 5. - №. 4. - P. 2765–2807.

53. Riva, R. Chitosan and chitosan derivatives in drug delivery and tissue engineering / R. Riva, H. Ragelle, A. Rieux, N. Duhem, C. Jérôme, V. Prétat // *Advances in Polymer Science*. -2011. - V. 244. - P. 19–44.

54. Sonia, T.A. Chitosan and its derivatives for drug delivery perspective / T.A. Sonia, C.P. Sharma // *Advances in Polymer Science*. - 2011. - V. 243. - P. 23–53.

55. Bhattarai, N. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery / N. Bhattarai, J. Gunn, M. Zhang // *Advanced Drug Delivery Reviews*. - 2010. - V. 62. - № 1. - P. 83–99.

56. Elgadir, M.A. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review / M.A. Elgadir, M.S. Uddin, S. Ferdosh, A. Adam, A.J.K. Chowdhury, M.Z.I. Sarker // *Journal of Food and Drug Analysis*. - 2015. - V. 23. - № 4. - P. 619–629.

57. Петрович, Ю.А. Хитозан: структура и свойства. Использование в медицине / Ю.А. Петрович, Л.А. Григорьянц, А.Н. Гурин, А.Н. Гурин // *Стоматология*. - 2008. - Т.87. - №4. - С.72–78.

58. Choi, C. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials /

C. Choi, J. P. Nam, J.W. Nah // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. – 2016. – V. 33. - P. 1–10.

59. Ярема, И.В. Перспективы применения полифункциональных биополимеров хитина и хитозана в абдоминальной хирургии / И.В. Ярема, Ю.А. Петрович, С.М. Киченко // *Хирург*. - 2008. - № 2. - С. 63–70.

60. Ярема, И.В. Перспективы использования уникального биополимера хитозана при местном лечении ран кожи в хирургии / И.В. Ярема, Ю.А. Петрович, С.М., Киченко, А.Н. Гурин // *Хирург*. - 2008. - №4. - С. 40–46.

61. Петрович, Ю.А. Перспективы применения в стоматологии полифункциональных биополимеров хитозана и альгината / Ю.А. Петрович, А.Н. Гурин, Н.А. Гурин, С.М. Киченко // *Российский стоматологический журнал*. -2008. - № 2. - С. 67-73.

62. Jian, T. Micro- and nanofabrication of chitosan structures for regenerative engineering / T. Jian, M. Deng, R. James, L. S. Nair, C. T. Laurencin // *Acta Biomaterialia*. -2014. - V. 10. - P. 1632–1645.

63. Ahadian, S. Bioconjugated hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine / S. Ahadian, R.B. Sadeghian, S. Salehi, S. Ostrovidov, H. Bae, M. Ramalingam, A. Khademhosseini // *Bioconjugate Chemistry*. - 2015. - V. 26. - № 10. - P. 1984-2001.

64. Sharma, C. Fabrication and characterization of novel nano-biocomposite scaffold of chitosan–gelatin–alginate–hydroxyapatite for bonetissue engineering / C. Sharma, A.K. Dinda, P.D. Potdar, C.F. Chou, N.C. Mishra // *Materials Science and Engineering: C*. - 2016. -V. 64. - P. 416-427.

65. Kanimozhi, K. Processing and characterization of chitosan/PVA and methylcellulose porous scaffolds for tissue engineering / K. Kanimozhi, S. K. Basha, V. S. Kumari // *Materials Science and Engineering: C*. - 2016. - V. 61. - P. 484-491.

66. Kaderli, S. A novel biocompatible hyaluronic acid–chitosan hybrid hydrogel for osteoarthritis therapy / S. Kaderli, C. Boulocher, E. Pillet, D. Watrelot-Virieux, A.L. Rougemont, T. Roger, E. Viguiet, R. Gurny, L. Scapozza, O. Jordan // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2015. – V. 483. –№ 1–2. – P. 158–168.

67. Li, Q. Biomaterials for in situ tissue regeneration: development and perspectives / Q. Li, L. Ma, C.Y. Gao // *Journal of Materials Chemistry B*. - 2015. - V. 3. - P. 8921–8938.
68. Park, H. Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering / H. Park, B. Choi, J. Hu, M. Lee // *Acta Biomaterialia*. - 2013. - V. 9. - № 1. - P. 4779–4786.
69. LogithKumar, R. A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering / R. LogithKumar, A. KeshavNarayan, S. Dhivya, A. Chawla, S. Saravanan, N. Selvamurugan // *Carbohydrate Polymers*. - 2016. - V. 151. – P. 172-188.
70. Ge, Z. Hydroxyapatite-chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes / Z. Ge, S. Bagueard, L.Y. Lim, A. Wee, E. Khor // *Biomaterials*. - 2004. - V. 25. - № 6. - P. 1049-58.
71. Venkatesan, J. Chitosan composites for bone tissue engineering – an overview / J Venkatesan, S.K. Kim // *Marine Drugs*. - 2010. - V. 8. - № 8. - P. 2252–66.
72. Ngo, D.H. Biological effects of chitosan and its derivatives / D.H. Ngo, T.S. Vo, D.N. Ngo, K.H. Kang, J.Y. Je, H.N.D. Pham, H. G. Byung, S. K. Kim // *Food Hydrocolloids*. - 2015. -V. 51. - P. 200–216.
73. Гальбрайт, Л.С. Хитин и хитозан: строение, свойства, применение / Л.С. Гальбрайт // *Соросовский образовательный журн.* - 2001. - Т. 7. -№ 1. - С. 51–56.
74. Плиско, Е.А. Хитин и его химические превращения / Е.А. Плиско, Л.А. Нудьга, С.И. Данилов // *Успехи химии*. -1977. - Т.46, - №. 8. - С. 1470–1487.
75. Prashanth, K.V.H. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential — an overview / K.V.H. Prashanth, R.N. Tharanathan // *Trends in Food Science and Technology*. - 2007. – V. 18. - №3. - P. 117–131.
76. Hadjichristidis, N. Graft copolymers / N. Hadjichristidis, S.Pispas, M. Pitsikalis, H. Iatrou, D. J. Lohse // *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*: Wiley. - 2002.
77. Pourjavadi, A. Modified chitosan. I. Optimized cerium ammonium nitrate-

induced synthesis of chitosan-g-polyacrylonitrile / A. Pourjavadi, G.R. Mahdavinia, M.J. Zohuriaan-Mehr, H. Omidian // *J. Appl. Polym. Sci.* - 2003. - V. 88. - P. 2048-2054.

78. Mahdavinia, G.R. Modified chitosan. III. Superabsorbency, salt- and pH-sensitivity of smart ampholytic hydrogels from chitosan-g-polyacrylonitrile / G.R. Mahdavinia, M.J. Zohuriaan-Mehr, A. Pourjavadi // *Polym. Adv. Technol.* - 2004. - V. 15. - P. 173-180.

79. Pourjavadi, A. Modified chitosan. II. H-ChitoPAN, a novel pH-responsive superabsorbent hydrogel / A. Pourjavadi, G.R. Mahdavinia, M.J. Zohuriaan-Mehr // *J. Appl. Polym. Sci.* - 2003. - V. 90. - P. 3115-3121.

80. Shanmugapriya, A. Optimization of Ceric Ammonium Nitrate Initiated Graft Copolymerization of Acrylonitrile onto Chitosan / A. Shanmugapriya, R. Ramammurthy, V. Munusamy, S.N. Parapurath // *Journal of Water Resource and Protection.* - 2011. - V. 3. - P. 380-386.

81. Radhakumary, C. Graft copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate onto chitosan with cerium (IV) ion. I. Synthesis and characterization / C. Radhakumary, G. Divya, P.D. Nair, S. Mathew, C.P.R. Nair // *Journal of Macromolecular Science, Pure and Applied Chemistry.* - 2003. - V.40. - № 7. - P. 715–730.

82. Kim, S.Y. Thermo- and pH-responsive behaviors of graft copolymer and blend based on chitosan and N-isopropylacrylamide / S.Y. Kim, S.M. Cho, Y.M. Lee, S.J. Kim // *J. Appl. Polym. Sci.* - 2000. - V. 78. -P. 1381-1391.

83. Don, T.M. Synthesis and properties of chitosan-modified poly(vinyl acetate) / T.M. Don, C.F. King, W.Y. Chiu // *J. Appl. Polym. Sci.* - 2002. - V. 86. - P. 3075-3063.

84. Don, T.M. Preparation of chitosan-graft-poly(vinyl acetate) copolymers and their adsorption of copper ion / T.M. Don, C. F. King, W.Y Chiu // *Polymer Journal.* - 2002. - V. 34. - P. 418-425.

85. Gong, S. Chitosan-g-PAA hydrogels for colon-specific drug delivery: Preparation, swelling behavior and in vitro degradability / S. Gong, H. Tu, H. Zheng, H. Xu, Y. Yin // *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* - 2010. -

V. 25. - № 2. - P. 248–251.

86. Shantha, K.L. Tailor-made chitosans for drug delivery / K.L. Shantha, U. Bala, K.P. Rao // *Eur. Polym. J.* - 1995. - V. 31. - № 4. - P. 377-382.

87. Aziz, N. A. A. Synthesis of chitosan-grafted-poly(methyl methacrylate) with Fenton's Reagent ( $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$ ) as a redox initiator / N.A.A. Aziz, A.A. Bakar, A. Hassan, N. Azmi // *Malaysian Journal of Analytical Sciences.* – 2014. - V.18. - № 2. - P. 415-422.

88. Jenkins, D.W. Review of vinyl graft copolymerization featuring recent advances toward controlled radical-based reactions and illustrated with chitin/chitosan trunk polymers / D.W. Jenkins, S.M. Hudson // *Chem Rev.* - 2001. - V.101. - № 11. - P. 3245-3273.

89. Lagos, A. Grafting onto chitosan. I. Graft copolymerization of methyl methacrylate onto chitosan with Fenton's reagent ( $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$ ) as a redox initiator/ A. Lagos, J. Reyes // *Journal of Polymer Science.* - 1988. - V. 26. - P. 985-991.

90. Смирнов, В.Ф. Получение биodeградируемых материалов на основе блок- и привитых сополимеров хитозана и метилакрилата / В.Ф. Смирнов, А.Е. Мочалова, И.В. Бельшева, А.В. Маркин, М.А. Батенькин, Л.А. Смирнова // *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского.* - 2009. - № 5. С. - 95–102.

91. Mochalova A.E., Kruglova E.N., Yunin P.A., Apryatina K.V., Smirnova O.N., Smirnova L.A. Graft and block copolymers of chitosan with vinyl monomers: Synthesis, structure, and properties. // *Polymer Science. Series B.* 2015. T. 57. № 2. С. 93-105.

92. Kumbar, S.G. Synthesis and characterization of polyacrylamide-grafted chitosan hydrogel microspheres for the controlled release of indomethacin / S.G. Kumbar, K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi // *Journal of Applied Polymer Science.* – 2003. - V. 87. - № 9. - P. 1525–1536.

93. Don, T.M. Structures and thermal properties of chitosan-modified poly(methyl methacrylate) / T.M. Don, S.C. Hsu, W.Y. Chiu // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry.* - 2001. - V. 39. - №10. - P. 1646–1655.

94. Lv, P. Studies on graft copolymerization of chitosan with acrylonitrile by the redox system / P. Lv, Y. Bin, Y. Li, R. Chen, X. Wang, B. Zha // *Polymer*. - 2009. - V. 50. - № 24. - P. 5675-5680.
95. Prashanth, K.V.H. Studies on graft copolymerization of chitosan with synthetic monomers / K.V.H. Prashanth, R.N. Tharanathan // *Carbohydrate Polymers*. - 2003. - V. 54. - P. 343–351.
96. El-Shafei, A. Graft Copolymerization of Chitosan with Butyl Acrylate and Application of the Copolymers to Cotton Fabric / A. El-Shafei, S. Shaarawy, A. Hebeish // *Polymer-Plastics Technology and Engineering*. - 2005. - V. 44. - №. 8-9. - P.1523-1535.
97. Nud'ga, L.A. Synthesis and microbiological stability of graft copolymers of N-vinylpyrrolidone and chitosan / L.A. Nud'ga, V.A. Petrova, N. V. Klishevich, L.S. Litvinova, A.Yu. Babenko, V.N. Shelegedin // *Russian Journal of Applied Chemistry*. - 2002. - V. 75. -№ 10. - P. 1678–1682.
98. Singh, V. Use of microwave irradiation in the grafting modification of the polysaccharides – A review / V. Singh, P. Kumar, R. Sanghi // *Progress in Polymer Science*. - 2012. - V.37. - № 2. - P. 340–364.
99. Singh, V. Microwave promoted synthesis of chitosan-graft-poly(acrylonitrile) / V. Singh, A. Tiwari, D. N. Tripathi, R. Sanghi // *Journal of Applied Polymer Science*. - 2004. - V. 95. - P. 820–825.
100. Singh, V. Microwave synthesized chitosan-graft-poly(methylmethacrylate) : An efficient  $Zn^{2+}$  ion binder / V. Singh, D.N. Tripathi, A. Tiwari, R. Sanghi // *Carbohydrate Polymers*. - 2006. - V.65. - № 1. - P.35-41.
101. Pengfei, L. Study on radiation-induced grafting of styrene onto chitin and chitosan / L. Pengfei, Z. Maolin, W. Jilan // *Radiation Physics and Chemistry*. - 2001. - V. 61. - P. 149–153.
102. Shigeno, Y. Functional Monomers and Polymers. 90 Radiation-Induced Graft Polymerization of Styrene onto Chitin and Chitosan / Y. Shigeno, K. Kondo, K. Takemoto // *Journal of Macromolecular Science: Part A – Chemistry*. - 1982. -V.17. - №4. - P. 571-583.

103. Lia, Y. Preparation of chitosan/poly(butyl acrylate) hybrid materials by radiation-induced graft copolymerization based on phthaloylchitosan / Y. Lia, L. Liu, X. Shen, Y. Fang // *Radiation Physics and Chemistry*. - 2005. - V. 74. - P. 297–301.
104. Huang, L. Poly(methacrylic acid)-grafted chitosan microspheres via surfaceinitiated ATRP for enhanced removal of Cd(II) ions from aqueous solution / L. Huang, S. Yuan, L. Lv, G. Tan, B. Liang, S.O. Pehkonen // *Journal of Colloid and Interface Science*. - 2013. - V. 405. - P. 171-182.
105. Huang, W. A facile approach for controlled modification of chitosan under  $\gamma$ -ray irradiation for drug delivery / W. Huang, Y. Wang, S. Zhang, L. Huang, D. Hua, X. Zhu // *Macromolecules*. - 2013. - V. 46. - P. 814-818.
106. Ifuku, S. Thermoresponsive chitosan/N-isopropylacrylamide copolymer through atom transfer radical polymerization / S. Ifuku, T. Miwa, M. Morimoto, H. Saimoto // *International Journal of Biological Macromolecules*. - 2013. - V 52. - P. 14-19.
107. Chen, C. A convenient way to synthesize comb-shaped chitosan-graft-poly(N-isopropylacrylamide) copolymer / C. Chen, M. Liu, C. Gao, S. Lü, J. Chen, X. Yu, E. Ding, C. Yu, J. Guo, G. Cui // *Carbohydrate Polymers*. - 2013. - V. 92. - P. 621-628.
108. Zhang, K. Dual stimuli-responsive N-phthaloylchitosan-graft-(poly(N-isopropylacrylamide)-block-poly(acrylic acid)) copolymer prepared via RAFT polymerization / K. Zhang, Z. Wang, Y. Li, Z. Jiang, Q. Hu, M. Liu, Q. Zhao // *Carbohydrate Polymers*. - 2013. - V. 92. - №1. - P. 662-667.
109. Jiang, J. Synthesis and property of poly(sodium 4-styrenesulfonate) grafted chitosan by nitroxide-mediated polymerization with chitosan-TEMPO macroinitiator / J. Jiang, D. Hua, J. Jiang, J. Tang, X. Zhu // *Carbohydrate Polymers*. - 2010. - V. 81. - № 2. - P. 358-364.
110. Lefay, C. Heterogeneous modification of chitosan via nitroxide-mediated polymerization / C. Lefay, Y. Guillaneuf, G. Moreira, J. Thevarajah, P. Castignolles, F. Ziarelli, E. Bloch, M. Major, L. Charles, M. Gaborieau, D. Bertin, D. Gigmes // *Polymer Chemistry*. - 2013. - V. 4. - P. 322-328.

111. Yuan, W. Synthesis and self-assembly of pH-responsive chitosan graft copolymer by the combination of atom transfer radical polymerization and click chemistry / W. Yuan, Z. Zhao, S. Gu, T. Ren, J. Ren // *Materials Letters*. - 2011. - V. 65. - P. 793-796.
112. Jiang, J. Synthesis and property of chitosan graft copolymer by RAFT polymerization with tosylic acid–chitosan complex / J. Jiang, X. Pan, J. Cao, J. Jiang, D. Hua, X. Zhu // *International Journal of Biological Macromolecules*. - 2012. - V. 50. - P. 586-590.
113. Fei, B. Schizophrenic copolymer from natural biopolymer by facile grafting / B. Fei, Z. Yang, H. Yang, Z. Hu, R. Wang, J. H. Xin // *Polymer*. - 2010. - V. 51. - P. 890-896.
114. Li, X. Surface molecular imprinting onto magnetic yeast composites via atom transfer radical polymerization for selective recognition of cefalexin / X. Li, J. Pan, J. Dai, X. Dai, L. Xu, X. Wei, H. Hang, C. Li, Y. Liu // *Chemical Engineering Journal*. - 2012. - V. 198-199. - P. 503-511.
115. Bao, H. Thermo-Responsive Association of Chitosan-graft-Poly(N-isopropylacrylamide) in Aqueous Solutions / H. Bao, L. Li, W. C. Leong, L. H. Gan // *Journal of Physical Chemistry B*. - 2010. - V. 114. - P. 10666-10673.
116. Bao, H. Thermo- and pH-Responsive Association Behavior of Dual Hydrophilic Graft Chitosan Terpolymer Synthesized via ATRP and Click Chemistry / H. Bao, L. Li, L.H. Gan, Y. Ping, J. Li, P. Ravi // *Macromolecules*. - 2010. - V. 43. - P. 5679-5687.
117. Liu, C.B. A new multifunctional polymer: Synthesis and characterization of mPEG-b-PAA-grafted chitosan copolymer / C.B. Liu, X.J. Wang, R.H. Liu, Y.L. Wu, S.L. Luo // *J. Cent. South Univ. Technol.* - 2010. - V. 17. - P. 936-943.
118. Li, C. A novel glutathione modified chitosan conjugate for efficient gene delivery / C. Li, T. Guo, D. Zhou, Y. Hu, H. Zhou, S. Wang, J. Chen, Z. Zhang // *Journal of Controlled Release*. - 2011. - V. 154. - P. 177-188.
119. Yang, W.J. Biomimetic Anchors for Antifouling and Antibacterial Polymer Brushes on Stainless Steel / W.J. Yang, T. Cai, K.G. Neoh, E.T. Kang, G. H. Dickinson,

S.L.M. Teo, K. Ridge, D. Rittschof // *Langmuir*. - 2011. - V. 27. - P. 7065-7076.

120. Shi, Z. Grafting chitosan oxidized by potassium persulfate onto Nylon 6 fiber, and characterizing the antibacterial property of the graft / Z. Shi // *J Polym. Res.* - 2014. - V. 21. - P. 534.

121. Баттерд, Г. Свойства привитых и блок-сополимеров / Г. Баттерд, Д. Трегер. – Л.: Химия, 1970. – 215 с.

122. Порицкая, А.Ю. Твердофазный синтез сополимеров хитозана с олиго(L,L-/L,D-лактидами) и получение материалов на их основе / А.Ю. Порицкая, Ю.С. Сотникова, Т.С. Демина, В.В. Киреев // *Успехи в химии и химической технологии*. - 2016. - Т. 30. - № 10(179). - С. 79-81.

123. Demina, T.S. Polylactide-based microspheres prepared using solid-state copolymerized chitosan and D,L-lactide / T.S. Demina, T.A. Akopova, L.V. Vladimirov, A.N. Zelenetskii, E.A. Markvicheva, Ch. Grandfils // *Materials Science and Engineering: C*. - 2016. - V. 59. - P. 333-338.

124. Демина, Т.С. Твердофазная сополимеризация L,D-лактида с хитозаном / Т.С. Демина, Л.В. Владимиров, Т.А. Аكوпова, А.Н. Зеленецкий // *Химия в интересах устойчивого развития*. - 2013. - Т. 21. - № 6. - С. 631 -637.

125. Демина, Т.С. привитые сополимеры хитозана с олиго(L,L-/L,D-лактидом): синтез и применение / Т.С. Демина, А.Ю. Порицкая, А.В. Истомин, Г.П. Гончарук, Т.А. Аكوпова, А.Н. Зеленецкий // *Известия Уфимского научного центра РАН*. - 2016. - Т. 3. - № 1. - С. 27-29.

126. Аكوпова, Т.А. Твердофазный синтез, структура, свойства и перспективы применения материалов на основе полисахарида хитозана. Автореф. дисс. ... докт. хим. наук: 02.00.06 / Аكوпова Татьяна Анатольевна. Москва, 2013. - 46 с.

127. Гинстлинг, А.М. Ультразвук в процессах химической технологии / А.М. Гинстлинг, А.А. Барам. - Л.: Госхимиздат, 1960. - 96 с.

128. Барамбойм, Н.К. Механохимия высокомолекулярных соединений / Н.К. Барамбойм. Изд. 3-е, перераб. и доп. — М.: Химия, 1978. — 384 с.

129. Симионеску, К. Механохимия высокомолекулярных соединений / К.

Симионеску, К.М. Опра. — М.: Мир, 1970. — 360 с.

130. Sivalingam, G. Distributed midpoint chain scission in ultrasonic degradation of polymers / G. Sivalingam, N. Agarwal, G. Madras // *AIChE journal*. — 2004. - V. 50. - № 9. - P. 2258-2265.

131. Geller, B.E. Ultrasonic degradation of polyacrylonitrile solutions / B.E. Geller, G.V. Goriachko, N.A. Dmitrieva, N.I. Larionov // *Vysokomol. soedin. 1.* - 1959. - № 11. - P. 1610-1616.

132. Сливкин, А. И. Изучение свойств растворов хитозана / А. И. Сливкин, А. С. Беленова, Г. В. Шаталов, В. А. Кузнецов, Д. А. Сливкин, Л. И. Фирсова // *Вестник ВГУ, серия: химия. Биология. Фармация.* — 2014. - № 1. С. 138-137.

133. Шибает, В.П. Жидкокристаллические полимеры / В.П. Шибает, Н.А. Платэ // *Высокомолекулярные соединения, серия А.* — 1977. - V. 19. - P. 923-975.

134. Terbojevich, M. Chitosan: chain rigidity and mesophase formation / M. Terbojevich, A. Cosani, G. Conio, E. Marsano, E. Bianchi. *Carbohydrate Research*. - 1991. - V. 209. - P. 251–260.

135. Мочалова А.Е., Извозчикова В.А., Смирнова Л.А., Семчиков Ю.Д. Синтез гибридных сополимеров хитозана с диметиламиноэтилметакрилатом, структура и свойства / А.Е. Мочалова, В.А. Извозчикова, Л.А. Смирнова, Ю.Д. Семчиков // *Вестник ННГУ. Серия "Химия"*. — 2004. - №1 (4). - С. 117-122.

136. Czechowska-Biskupa, R. Degradation of chitosan and starch by 360-kHz ultrasound / R.Czechowska-Biskupa, B. Rokita, Salah Lotfy, P. Ulanski, J. M. Rosiak // *Carbohydrate Polymers*. - 2005 - V. 60. - P. 175–184.

137. Qu, X. Effect of lactic/glycolic acid side chains on the thermal degradation kinetics of chitosan derivatives / X. Qu, A. Wirse'n, A.C. Albertsson // *Polymer*. - 2000. - V. 41. - № 13. - P. 4841-4847.

138. Yao, F.L. A study on cytocompatible poly(chitosan-g-L-lactic acid) / F.L. Yao, W. Chen, H. Wang, H.F. Liu, K.D. Yao, P.C. Sun, H. Lin // *Polymer*. - 2003. - V. 44. - P. 6435.

139. Wu, Y. Synthesis and characterization of a novel amphiphilic chitosan–polylactide graft copolymer / Y. Wu, Y. Zheng, W. Yang, C. Wang, J. Hu, S. Fu //

Carbohydrate Polymers. - 2005. - V. 59. - № 2. - P. 165-171.

140. Feng, H. Preparation, characterization, and self-assembled properties of biodegradable chitosan-poly(L-lactide) hybrid amphiphiles / H. Feng, C.M. Dong // Biomacromolecules. - 2006. - V. 7. - № 11. - P. 3069 - 3075.

141. Luckachan, G.E. Chitosan/oligo L-lactide graft copolymers: Effect of hydrophobic side chains on the physico-chemical properties and biodegradability / G.E. Luckachan, C.K.S. Pillai // Carbohydrate Polymers. - 2006. - V. 64. - № 2. - P. 254-266.

142. Liu, L. Preparation of chitosan-g-poly(lactide) graft copolymers via self-catalysis of phthaloylchitosan and their complexation with DNA / L. Liu, A. Shi, S. Guo, Y. Fang, S. Chen, J. Li // Reactive & Functional Polymers. - 2010. - V. 70. - P. 301-305.

143. Li, J. A facile method for preparing biodegradable chitosan derivatives with low grafting degree of poly(lactic acid) / J. Li, M. Kong, X.J. Cheng, J.J. Li, W.F. Liu, X.G. Chen // International Journal of Biological Macromolecules. - 2011. - V. 49. - №5. - P. 1016-1021.

144. Suyatma, N.E. Different Pla Grafting Techniques on Chitosan / N.E. Suyatma, A. Copinet, E. Legin-Copinet, F. Fricoteaux, V. Coma // J Polym Environ. - 2011. - V. 19. - №1. - P. 166-171.

145. Luo, B. Rapid synthesis and characterization of chitosan-g-poly(D,L-lactide) copolymers with hydroxyethyl chitosan as a macroinitiator under microwave irradiation / B. Luo, J. Yang, J. Zhao, C.E. Hsu, J. Li, C. Zhou // J Appl Polym Sci. - 2012. - V. 125. - P. 125-131.

146. Lu, H.W. Facile synthesis of amphiphilic chitosan-g-poly(lactic acid) derivatives and the study of their controlled drug release / H.W. Lu, H. He., B. Zhang, G.Q. Liu, M.Y. Li, Q.L. Nie // J. Appl. Polym. Sci. - 2013. - V. 130. - P. 908-915.

147. Li, L. Preparation and degradation of PLA/chitosan composite materials / L. Li, S. Ding, C. Zhou // J. Appl. Polym. Sci. - 2004. - V. 91. - № 1. - P. 274-277.

148. Wan, Y. Mechanical properties of porous polylactide / chitosan blend membranes / Y. Wan, Q. Wu, S. Wang, S. Zhang, Z. Hu // Macromol. Mater. Eng. - 2007. - V. 292. - № 5. - P. 598-607.

149. Wan, Y. Biodegradable polylactide/chitosan blend membranes / Y. Wan, H. Wu, A. Yu, D. Wen // *Biomacromolecules*. -2006. -V. 7. -№ 4. -P. 1362-1372
150. Chen, C. Preparation and characterization of biodegradable poly(L-lactide)/chitosan blends / C. Chen, L. Dong, M. K. Cheung // *European Polymer Journal*. - 2005. - V. 41. - № 5. - P. 958-966.
151. Sébastien, F. Novel biodegradable films made from chitosan and poly(lactic acid) with antifungal properties against mycotoxinogen strains / F. Sébastien, G. Stéphane, A. Copinet, V. Coma // *Carbohydrate Polymers*. - 2006. - V. 65. - P. 185–193.
152. Suyatma, N.E. Mechanical and barrier properties of biodegradable films made from chitosan and poly (lactic acid) blends / N.E. Suyatma, A. Copinet, L. Tighzert, V. Coma // *Journal of Polymers and the Environment*. - 2004. - V.12. - №.1. - P. 1-6.
153. Grande, R. Compatible ternary blends of chitosan/poly(vinyl alcohol)/poly(lactic acid) produced by oil-in-water emulsion processing / R. Grande, A.J.F. Carvalho // *Biomacromolecules*. - 2011. - V.12. - № 4. - P. 907- 914.
154. Correlo, V.M. Properties of melt processed chitosan and aliphatic polyester blends / V.M. Correlo, L.F. Boesel, M. Bhattacharya, J.F. Mano, N.M. Neves, R.L. Reis // *Materials Science and Engineering A*. - 2005. - V. 403. - №1-2. - P. 57-68.
155. Suyatma, N.E. Compatibilization method applied to the chitosan-acid poly(L-lactide) solution / N.E. Suyatma, A. Copinet, V. Coma, F. Fricoteaux // *Journal of Applied Polymer Science*. - 2010. - V.117. - № 5. - P. 3083-3091.
156. Кузнецова, Д.С. Костные имплантаты на основе скаффолдов и клеточных систем в тканевой инженерии (обзор) / Д.С. Кузнецова, П.С. Тимашев, В.Н. Баграташвили, Е.В. Загайнова // *Современные технологии в медицине*. - 2014. - Т. 6. - № 4. - С. 201-212.
157. Turnbull, G. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering / G. Turnbull, J. Clarke, F. Picard, P. Riches, L. Jia, F. Han, B. Li, W. Shu // *Bioactive Materials*. - 2017. - V. 3. - № 3. - P. 1-37.
158. Roseti, L. Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new

perspectives / L. Roseti, V. Parisi, M. Petretta, C. Cavallo, G. Desando, I. Bartolotti, B. Grigolo // *Materials Science and Engineering C*. - 2017. - V. 78. - P. 1246–1262.

159. Jing, X. Comparison between PCL/hydroxyapatite (HA) and PCL/halloysite nanotube (HNT) composite scaffolds prepared by co-extrusion and gas foaming / X. Jing, H.Y. Mi, L.S. Turng // *Materials Science and Engineering C*. - 2017. - V. 72. - P. 53–61.

160. Milovac, D. PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: Morphology, mechanical properties and bioactivity / D. Milovac, G.G. Ferrer, M. Ivankovic, H. Ivankovic // *Materials Science and Engineering C*. - 2014. - V. 34. - P. 437–445.

161. Jiao, Y. Fabrication and characterization of PLLA–chitosan hybrid scaffolds with improved cell compatibility / Y. Jiao, Z. Liu, C. Zhou // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. - 2007. - V. 80A. - № 4. - P.820-825.

162. Wu, L. In vitro degradation of three-dimensional porous poly(D,L-lactide-co-glycolide)scaffolds for tissue engineering / L. Wu, J. Ding // *Biomaterials*. - 2004. - V. 25. - № 27 - P. 5821-5830.

163. Cui, Y. The nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted c oligomer for bone repair / Y. Cui, Y. Liu, Y. Cui, X. Jing; P. Zhang, X. Chen // *Acta Biomaterialia*. - 2009. - V. 5. - № 7. P. 2680-2692.

164. Lao, L. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering / L. Lao, Y. Wang, Y. Zhu, Y. Zhang, C. Gao // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. - 2011. - V. 22. - № 8. - P. 1873-1884.

165. Sonseca, A. Electrospinning of biodegradable polylactide / hydroxyapatite nanofibers: Study on the morphology, crystallinity structure and thermal stability / A. Sonseca, L. Peponi, O. Sahuquillo, J.M. Kenny, E. Giménez // *Polymer Degradation and Stability*. - 2012. - V. 97. - № 10. - P. 2052–2059.

166. Tanodekaew S., Channasanon S., Kaewkong P., Uppanan P. PLA-HA scaffolds: preparation and bioactivity. // *Procedia Engineering*. - 2013. - V. 59. P. 144 –

149.

167. Senatov, F.S. Mechanical properties and shape memory effect of 3D-printed PLA-based porous scaffolds / F.S. Senatov, K.V. Niaza, M. Yu. Zadorozhnyy, A.V. Maksimkin, S.D. Kaloshkin, Y.Z. Estrin // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. - 2016. - V. 57. - P. 139–148.

168. Santoro, M. Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering / M. Santoro, S.R. Shah, J.L. Walker, A.G. Mikos // *Advanced Drug Delivery Reviews*. - 2016. - V. 107. - P. 206-212.

169. Штильман М.Н. Полимеры медико-биологического назначения. М.: ИКЦ Академкнига, 2006. – 400 с.

170. Qin, Z. Thickness of hydroxyapatite nanocrystal controls mechanical properties of the collagen–hydroxyapatite interface / Z. Qin, A.K. Gautieri, A. Nair, H. Inbar, M.J. Buehler // *Langmuir*. - 2012. - V. 28. – № 4. - P. 1982–1992.

171. Kane, R.J. Effects of hydroxyapatite reinforcement on the architecture and mechanical properties of freeze-dried collagen scaffolds / R.J. Kane, R.K. Roeder // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. - 2012. - V. 7. - P. 41–49.

172. Jia, L. Human-like collagen/nano-hydroxyapatite scaffolds for the culture of chondrocytes / L. Jia, Z. Duan, D. Fan, Y. Mi, J. Hui, L. Chang // *Materials Science and Engineering C*. - 2013. - V. 33. - P. 727–734.

173. Yu, C.C. Electrospun scaffolds composing of alginate, chitosan, collagen and hydroxyapatite for applying in bone tissue engineering / C.C. Yu, J.J. Chang, Y.H. Lee, Y.C. Lin, M.H. Wu, M.C. Yang, C.T. Chien // *Materials Letters*. - 2013. - V. 93. - P. 133–136.

174. Libonati, F. Mechanics of collagen–hydroxyapatite model nanocomposites / F. Libonati, A.K. Nair, L. Vergani, M. J. Buehler // *Mechanics Research Communications*. - 2014. - V. 58. - P. 17–23.

175. Wang, J. Biomimetic Collagen/Hydroxyapatite Composite Scaffolds: Fabrication and Characterizations / J. Wang, C. Liu // *Journal of Bionic Engineering*. - 2014. - V. 11. - № 4. - P. 600-609.

176. Socrates, R. Novel fibrillar collagen–hydroxyapatite matrices loaded with

silver nanoparticles for orthopedic application / R. Socrates, N. Sakthivel, A. Rajaram, U. Ramamoorthy, S. N. Kalkura // *Materials Letters*. - 2015. - V. 161. - P. 759–762.

177. Quinlan, E. Development of collagen–hydroxyapatite scaffolds incorporating PLGA and alginate microparticles for the controlled delivery of rhBMP-2 for bone tissue engineering / E. Quinlan, A. López-Noriega, E. Thompson, H.M. Kelly, S.A. Cryan, F. J. O'Brien // *Journal of Controlled Release*. - 2015. - V. 198. - P. 71–79.

178. Kane, R.J. Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties / R.J. Kane, H.E. Weiss-Bilka, M.J. Meagher, Y. Liu, J. A. Gargac, G.L. Niebur, D.R. Wagner, R. K. Roeder // *Acta Biomaterialia*. - 2015. - V. 17. - P. 16–25.

179. Cholas, R. Scaffolds for bone regeneration made of hydroxyapatite microspheres in a collagen matrix / R. Cholas, S.K. Padmanabhan, F. Gervaso, G. Udayan, G. Monaco, A. Sannino, A. Licciulli // *Materials Science and Engineering: C*. - 2016. - V. 63. - P. 499–505.

180. Захаров, Н.А. Синтез и исследование органоминерального нанокompозита гидроксиапатит/каррагинан / Н.А. Захаров, К.В. Скибинский, И.М. Байриков, П.Г. Мизина, В.Е. Кузьмина, И.М. Ермак, А.Е. Чалых, В.Т. Калинин // *Конденсированные среды и межфазные границы*. - 2007.- Т. 9. - № 2. - С. 112-124.

181. Захаров, Н.А. Взаимодействие гидроксиапатита кальция и метилцеллюлозы при их совместном осаждении / Н.А. Захаров, М.Ю. Сенцов // *Краткие сообщения. Сорбционные и хроматографические процессы*. 2011. - Т. 11. - № 2. - С.178-184.

182. Ежова, Ж.А. Синтез и физико-химическое исследование гидроксиапатита кальция, содержащего карбоксиметилцеллюлозу / Ж.А. Ежова, Е.М. Коваль, Н.А. Захаров // *Журнал неорганической химии*. - 2006. - Т. 51. - № 2. - С. 375–379.

183. Levengood, S.K.L. Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering/ S.K.L. Levengood, M. Zhang // *Journal of Materials Chemistry B*. - 2014. - V. 2. - №21. - P. 3161–3184.

184. Madihally, S.V. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering / S.V. Madihally, H.W. Matthew // *Biomaterials*. - 1999. - V. 20. - P. 1133–1142.

185. Ma, L. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering / L. Ma, C. Gao, Z. Mao, J. Zhou, J. Shen, X. Hu, C. Han // *Biomaterials*. - 2003. - V. 24. - № 26. - P. 4833–4841.

186. Lao, L.H. Chitosan modified poly(L-lactide) microspheres as cell microcarriers for cartilage tissue engineering / L.H. Lao, H.P. Tan, Y.J. Wang, C.Y. Gao // *Colloid Surf B*. - 2008. - V. 66. - P. 218–225.

187. Гурин, А.Н. Влияние хитозанового матрикса, содержащего гранулы карбонаргидроксиапатита, на заживление костных дефектов в эксперименте / А.Н. Гурин, В.С. Комлев, А.Ю. Федотов, И.В. Фадеева, В.В. Смирнов, С.М. Баринов // *Перспективные материалы. Приложение: Материалы I-ой Международной конференции «Функциональные наноматериалы и высокочистые вещества»*. - 2008. - С.1-6.

188. Duarte, A.R.C. Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethasone for tissue engineering applications using supercritical fluid technology / A.R.C. Duarte, J.F. Mano, R.L. Reis // *Eur Polym J*. - 2009. - V. 45. - P. 141–148.

189. Thein-Han, W.W. Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering / W.W. Thein-Han, R.D.K. Misra // *Acta Biomaterialia*. - 2009. - V. 5. - № 4. - P.1182-1197.

190. Ezhova, Zh.A. Synthesis and physicochemical study of nanocrystalline magnesium containing calcium hydroxylapatites and chitosan / Zh.A. Ezhova, E.M. Koval, N.A. Zakharov, V.T. Kalinnikov // *Russian Journal of Inorganic Chemistry*. - 2010. - V. 55. - №. 7. - P. 1127–1132.

191. Li, H. Preparation and characterization of homogeneous hydroxyapatite/chitosan composite scaffolds via in-situ hydration / H. Li, C.R. Zhou, M.Y. Zhu, J.H. Tian, J.H. Rong // *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. - 2010. - V. 1. - P. 42-49.

192. Федотов, А.Ю. Гибридные композиционные материалы на основе хитозана и желатины, армированные гидроксиапатитом, для тканевой инженерии /

А.Ю. Федотов, В.С. Комлев, В.В. Смирнов, И.В. Фадеева, С.М. Баринов, В.М. Иевлев, С.А. Солдатенко, Н.С. Сергеева, И.К. Свиридова, В.А. Кирсанова, С.А. Ахмедова // *Материаловедение*. - 2010. - № 7. - С. 41-46.

193. Jayakumar, R. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications / R. Jayakumar, M. Prabakaran, P. Kumar, S. Nair, H. Tamura // *Biotechnol. Adv.* - 2011. - V. 29. - P. 322-337.

194. Dash, M. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications / M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini // *Prog Polym Sci.* - 2011. - V. 36. - P. 981-1014.

195. Muzzarelli R.A.A., Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: a review / R.A.A. Muzzarelli, F. Greco, A. Busilacchi, V. Sollazzo, A. Gigante // *Carbohydrate Polymers.* - 2012. - V. 89. - № 3. - P. 723-739.

196. Новочадов, В.В. Инновационные подходы к оптимизации скаффолд-технологий на основе хитозана в тканевой инженерии суставного хряща / В.В. Новочадов, П.С. Семенов, М.П. Лябин // *Вестник Волгоградского гос. университета. Сер. 10, Инноват. деят.* - 2013. - №2 (9). - С.135-143.

197. Rogina, A. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite within chitosan matrix / A. Rogina, M. Ivanković, H. Ivanković // *Materials Science and Engineering: C.* - 2013. - V.33. -№ 8. - P. 4539-4544.

198. Иванов, А.Н. Возможности и перспективы использования скаффолд-технологий для регенерации костной ткани / А.Н. Иванов, И.А. Норкин, Д.М. Пучиньян // *Цитология*. – 2014. - Т. 56. - №8. – С. 543-548.

199. Tsiourvas, D. Hydroxyapatite/chitosan-based porous three-dimensional scaffolds with complex geometries / D. Tsiourvas, A. Sapalidis T. Papadopoulos // *Materials Today Communications.* - 2016. - V. 7. - P. 59-66.

200. Deepthi, S. An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering / S. Deepthi, J. Venkatesan, S.K. Kim, J. D. Bumgardener, R. Jayakumar // *International Journal of Biological Macromolecules.* - 2016. - V. 93. Part B. - P. 1338-1353.

201. Bayrak, G.K. Microwave-induced biomimetic approach for hydroxyapatite coatings of chitosan scaffolds / G.K. Bayrak, T.T. Demirtaş, Dr.M. Gümüşderelioğlu // *Carbohydrate Polymers*. - 2017. - V. 157. - P. 803–813.
202. Roller, S. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice / S. Roller, N. Covill // *Int J Food Microbiol.* – 1999. - V.47. - № (1-2). - P. 67-77.
203. Helander, I.M. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria / I.M. Helander, E. L. Nurmiäho-Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades, S. Roller // *Int. J. Food Microbiol.* - 2001. - V. 71. - № 2-3. - P. 235–244.
204. Boyan, B.D. Bone Tissue Grafting and Tissue Engineering Concepts / B.D. Boyan, D.J. Cohen, Z. Schwartz // *Comprehensive Biomaterials II*. - 2017. - V. 7. - P. 298-313.
205. Zhou, H. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering / H. Zhou, J. Lee // *Acta Biomaterialia*. - 2011. - V.7. - P.2769–2781.
206. Son, J.S. Porous hydroxyapatite scaffold with three-dimensional localized drug delivery system using biodegradable microspheres / J.S. Son, M. Appleford, J.L. Ong, J.C. Wenke, J.M. Kim, S.H. Choi, D.S. Oh // *Journal of Controlled Release*. - 2011. - V. 153. - №2. - P. 133-140.
207. Wan, Y. Fibrous poly(chitosan-g-DL-lactic acid) scaffolds prepared via electro-wet-spinning / Y. Wan, X. Cao, S. Zhang, S. Wang, Q. Wu // *Acta Biomaterialia*. - 2008. - V. 4. - P. 876–886.
208. Jiang, T. Chitosan–poly(lactide-co-glycolide) microsphere-based scaffolds for bone tissue engineering: In vitro degradation and in vivo bone regeneration studies / T. Jiang, S. P. Nukavarapu, M. Deng, E. Jabbarzadeh, M.D. Kofron, S.B. Doty, W. I. Abdel-Fattah, C.T. Laurencin // *Acta Biomaterialia*. - 2010. - V.6. - № 9. - P. 3457-3470.
209. Martel-Estrada, S.A. Chitosan/poly(DL,lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering / S.A. Martel-Estrada, I. Olivas-Armendáriz, C.A. Martínez-Pérez, T. Hernández, E.I. Acosta-Gómez, J.G. Chacón-Nava, F. Jiménez-Vega, P. E. García-Casillas // *J Mater Sci: Mater Med*. - 2012. - V. 23. - P. 2893–2901.

210. Cui, W. Preparation of hydrophilic poly(l-lactide) electrospun fibrous scaffolds modified with chitosan for enhanced cell biocompatibility / W. Cui, L. Cheng, H. Li, Y. Zhou, Y. Zhang, J. Chang // *Polymer*. - 2012. - V. 53. - № 11. - P. 2298-2305.

211. Zhan, Z. Biodegradability and biocompatibility study of poly(chitosan-g-lactic acid) scaffolds / Z. Zhan, H. Cui // *Molecules*. - 2012. - V. 17. - P. 3243-3258.

212. Li, Ai.D. Electrospun Chitosan-graft-PLGA nanofibres with significantly enhanced hydrophilicity and improved mechanical property / Ai.D. Li, Z.Z. Sun, M. Zhou, X.X. Xu, J.Y. Ma, W. Zheng, H.M. Zhou, L. Li, Y.F. Zheng // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. - 2013. - V. 102. - P. 674-681.

213. Tao, C. Development and characterization of GRGDSPC-modified poly(lactide-co-glycolide acid) porous microspheres incorporated with protein-loaded chitosan microspheres for bone tissue engineering / C. Tao, J. Huang, Y. Lu, H. Zou, X. He, Y. Chen, Y. Zhong // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. - 2014. - V. 122. - P. 439-446.

214. Yin, D. Fabrication of composition-graded collagen/chitosan-poly(lactide) scaffolds with gradient architecture and properties / D. Yin, H. Wub, C. Liu, J. Zhang, T. Zhou, J. Wu, Y. Wan // *Reactive and Functional Polymers*. - 2014. - V. 83. - P. 98-106.

215. Lou, T. Fabrication and biocompatibility of poly(L-lactic acid) and chitosan composite scaffolds with hierarchical microstructures / T. Lou, X. Wang, X. Yan, Y. Miao, Y.Z. Long, H.L. Yin, B. Sun, G. Song // *Materials Science and Engineering C*. - 2016. - V. 64. - P. 341–345.

216. Zhu, Y. An injectable hydroxyapatite/poly(lactide-co-glycolide) composite reinforced by micro/nano-hybrid poly(glycolide) fibers for bone repair / Y. Zhu, Z. Wang, H. Zhou, L. Li, Q. Zhu, P. Zhang // *Materials Science and Engineering: C*. - 2017. - V. 80. - P. 326-334.

217. Li, X. Biocompatibility and physicochemical characteristics of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/poly(lactide-co-glycolide)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering / X. Li, S. Zhang, X. Zhang, S. Xie, G. Zhao, L. Zhang // *Materials & Design*. - 2017. - V. 114. - P. 149-160.

218. Mao, D. Fabrication of 3D porous poly(lactic acid)-based composite scaffolds with tunable biodegradation for bone tissue engineering / D. Mao, Q. Li, D. Li, Y. Chen, X. Chen, X. Xu // *Materials & Design*. - 2018. - V. 142. - P. 1-10.

219. Кулаков, А.А. Процессы регенерации в костных дефектах при имплантации в них композиционного материала различной плотности на основе полилактида, наполненного гидроксиапатитом / А.А. Кулаков, А.С. Григорьян, Л.И. Кротова, В.К. Попов, А.И. Воложин, В.Ф. Лосев // *Стоматология*. - 2009. - № 1. - С. 17-23.

220. Jafarkhani, M. Mechanical and structural properties of polylactide/chitosan scaffolds reinforced with nano-calcium phosphate / M. Jafarkhani, A. Fazlali, F. Moztafzadeh, M. Mozafari // *Iranian Polymer Journal*. - 2012. - V. 21. - P. 713-720.

221. Wang, Q. Porous hydroxyapatite scaffolds containing dual microspheres based on poly(lactide-co-glycolide) and chitosan for bone regeneration / Q. Wang, J. Li, T. Xu, X. Lu, W. Zhi, J. Weng // *Materials Letters*. - 2017. - V. 188. - P. 387-391.

222. Fedushkin, I.L. Magnesium(II) complexes of the dpp-BIAN radical-anion: synthesis, molecular structure, and catalytic activity in lactide polymerization / I.L. Fedushkin, A.G. Morozov, V.A. Chudakova, G.K. Fukin, V.K. Cherkasov // *Eur. J. Inorg. Chem.* - 2009. - № 33. - P. 4995-5003.

223. Морозов, А.Г. Полимеризация с раскрытием цикла L-лактида на магниевом катализаторе на основе аценафтен-1,2-дииминового лиганда: разработка биосовместимых материалов для остеопластики / А.Г. Морозов, И.Л. Федюшкин, Д.Я. Алейник // *Журнал прикладной химии*. - 2016. - Т. 89. - № 12. - С. 1572-1578.

224. Swift, G. Directions for environmentally biodegradable polymer research / G. Swift // *Acc. Chem. Res.* - 1993. - V. 26. - № 3. - P. 105-110.

225. Drumright, R.E. Polylactic Acid Technology / R.E. Drumright, P.R. Gruber, D.E. Henton // *Adv. Mater.* - 2000. - V. 12. - № 23. - P. 1841-1846.

226. Dechy-Cabaret, O. Controlled ring-opening polymerization of lactide and glycolide / O. Dechy-Cabaret, B. Martin-Vaca, D. Bourissou // *Chem. Rev.* - 2004. - V.

104. - № 12. - P. 6147-6176.

227. Armarego, W.L.F. Purification of Laboratory Chemicals, 7th ed. / W.L.F. Armarego, C.C.L. Chai – Elsevier Inc. Oxford, 2013 – 1002 p.

228. Патент RU Способ получения наногидроксиапатита / Е.Н. Буланов, А.В. Князев, В.Ж. Корокин, А.Г. Блохина. - №2614772; Заявл. 17.12.2015; Опубл. 29.03.2017; Бюл. № 10 - 14с.

229. Погодина, Н.В. Конформационные характеристики молекул хитозана по данным диффузионно-седиментационного анализа и вискозиметрии / Н.В. Погодина, Г.М. Павлов, С.В. Бушин, А.Б.Мельников, Е. Б. Лысенко, Л.А. Нудьга, В.Н. Маршева, Г.Н. Марченко, В.Н. Цветков // Высокомолек. соед. А. - 1986. - Т. 28 А. - № 2. - С. 232–239.

230. Тагер, А.А. Физикохимия полимеров. Изд. 4-е, перераб. и доп. - М.: Научный мир, 2007. – 573 с.

231. ГОСТ 9.049 - 91 Единая система защиты от коррозии и старения. Материалы полимерные и их компоненты. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. – М.: Комитет стандартизации и метрологии СССР, 1992. – 15 с.

232. Höhne, G. W. H. Differential Scanning Calorimetry / G. W. H. Höhne, W. F. Hemminger, H.-J. Flammersheim. – Berlin: Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH, 2003. – 310 p.

233. Drebuschak, V. A. Calibration coefficient of heat-flow DSC. Part II. Optimal calibration procedure / V. A. Drebuschak // J. Therm. Anal. Calorim. - 2005. - V. 79. -№ 1. - P. 213–218.

234. Волчегорский, И.А. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови / И.А. Волчегорский, А.Г. Налимов, Б.Г., Яровинский Р.И. Лифшиц // Вопросы медицинской химии. - 1989. - №1. - С. 127–131.

235. Degirmenci, M. Synthesis of block copolymers by combined ultrasonic irradiation and reverse atom transfer radical polymerization processes. / M. Degirmenci,

H. Catalgil-Giz, Y. Yagci // *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. - 2004. - V. 42. - № 3. - P. 534–540.

236. Ношей, А. Блок-сополимеры, пер. с англ. / А. Ношей, Дж. Мак-Грат. – М.: Мир, 1980 – 474 с.

237. Ameta, G. Sonochemistry: a pollution free pathway / G. Ameta, S. Benjamin, V. Sharma, S. Bhardwaj // *Green Chemistry: Fundamentals and Applications*. Ed. by Ameta S.C., Ameta R. – New York: Apple Academic Press, 2013. – 385 p.

238. Аскадский, А.А. Химическое строение и физические свойства полимеров / А.А. Аскадский, Ю.И. Матвеев. – М.: Химия, 1983. – 248 с.

239. Геллер, А.А. Практическое руководство по физико-химии волокнообразующих полимеров / А.А. Геллер, Б.Э. Геллер, В. Г. Чиртулов. Учеб. пособ. для вузов: 2-е изд., исправл. и доп. – М.: Химия, 1996. – 432 с.

240. Кулезнев В.Н. Смеси и сплавы полимеров. Конспект лекций / В.Н. Кулезнев. — СПб.: Научные основы и технологии, 2013. – 216 с.

241. Цверова, Н.Е. Получение и свойства композиций на основе хитозана и полилактида с использованием компатибилизаторов / Н.Е. Цверова, А.Е. Мочалова, А.Г. Морозов, П.А. Юнин, Л.А. Смирнова, И.Д. Гришин // *Высокомолекулярные соединения. Серия Б.* – 2015. – Т. 57. – № 3. – С. 214–219.

242. Силина, Н.Е. Получение блок-сополимеров хитозана и D,L-лактида под действием ультразвука. Структура и свойства / Н.Е. Силина, А.Г. Морозов, Е.Е. Горностаева, Л.А. Смирнова, С.Д. Зайцев // *Высокомолекулярные соединения. Серия Б.* – 2017. – Т. 59. – № 5. – С. 355–364.

243. Патент RU Способ получения композиционных рассасывающих материалов на основе хитозана и полилактида / Л.А. Смирнова, А.Е. Мочалова, Н.Е. Цверова, И.Л.Федюшкин, А.Г. Морозов, В.М. Карюк, А.В. Мальков. – №2540468; Заявл. 06.11.2012; Опубл. 10.02.2015; Бюл. № 4–6 с.

244. Семчиков Ю. Д. Высокомолекулярные соединения. Учеб. для вузов / Ю. Д. Семчиков. – Н.Новгород: Издательство Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского; М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 368 с.

245. Koning, C. Strategies for compatibilization of polymer blends / C. Koning, M. Van Duin, C Pagnouille, R. Jerome // *Progress in Polymer Science*. - 1998. - V. 23. - № 4. - P. 707–757.

246. Phetwarotai, W. Reactive compatibilization of polylactide, thermoplastic starch and poly(butylene adipate-co-terephthalate) biodegradable ternary blend films / W. Phetwarotai, D. Aht-Ong // *Materials Science Forum*. - 2011 - V. 695. – P. 178–181.

247. Yamaguchi, I. Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites / I. Yamaguchi, K. Tokuchi, H. Fukuzaki, Y. Koyama, K. Takakuda, J. Monma, H. Tanaka // *Journal of Biomedical Material Research*. - 2001. - V. 55. - №1. - P. 20-27.

248. Yin, Y.J. Preparation and characterization of hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite / Y.J Yin, F. Zhao, X.F. Song, K.D. Yao, W.W. Lu, J.C. Leong // *Journal of Applied Polymer Science*. - 2000. - V. 77. - № 13. - P. 2929 - 2938.

249. Нарисава, И. Прочность полимерных материалов: пер. с яп. / И. Нарисава. - М.: Химия, 1987. – 398 с.

250. Goryunova, P.E. Thermodynamic properties of block copolymers of chitosan with D,L-lactide / P.E. Goryunova, S.S. Sologubov, A.V. Markin, N.N. Smirnova, S.D. Zaitsev, N.E. Silina, L.A. Smirnova // *Thermochimica Acta*. – 2018. – V. 659. – P. 19–26.

251. Калашников, И. Н. Биодеструкция композитных материалов на основе хитозана и акриловых полимеров, вызванная микромицетами и факторами климатического старения. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.02.08 / Калашников Илья Николаевич. – Нижний Новгород, 2013. – 25 с.

252. Патент RU Пористые композиционные материалы на основе хитозана для заполнения костных дефектов / С.М. Баринов, В.В. Смирнов, А.Ю. Федотов, В.С. Комлев, И.В. Фадеева, Н.С. Сергеева, И.К. Свиридова, В.А. Кирсанова, С.А. Ахмедова. - № 2376019; Заявл. 26.12.2007; Оpubл. 20.12.2009; Бюл. № 35 - 8 с.

253. Pippi, P. Post-surgical clinical monitoring of soft tissue wound healing in periodontal and implant surgery / P. Pippi // *Int J Med Sci*. - 2017. - V. 14. - № 8. - P.

721–728.

254. López-Huerta, F. Biocompatibility and surface properties of TiO<sub>2</sub> thin films deposited by DC magnetron sputtering / F. López-Huerta, B. Cervantes, O. González, J. Hernández-Torres, L. García-González, R. Vega, A. L. Herrera-May, E. Soto // *Materials*. - 2014. - V. 7. - № 6. - P. 4105-4117.

255. Matsunaga, T. Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders / T. Matsunaga, R. Tomoda, T. Nakajima, H. Wake // *FEMS Microbiology Letters*. - 1985. - V. 29. - № 1-2. - P. 211–214.

256. Hoffmann, M.R. Environmental Applications of Semiconductor Photocatalysis / M.R. Hoffmann, S.T. Martin, W. Choi, D.W. Bahnemann // *Chemical Reviews*. - 1995. - V. 95. - № 1. - P. 69-96.

257. Kormann, C. Photocatalytic production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and organic peroxides in aqueous suspensions of TiO<sub>2</sub>, ZnO, and desert sand / C. Kormann, D.W. Bahnemann, M.R. Hoffmann // *Environ. Sci. Technol.* - 1988. - V. 22. - P. 798–806.

258. Fujishima, A. Heterogeneous photocatalysis: from water photolysis to applications in environmental clean up / A. Fujishima, X. Zhang, D.A. Tryk // *International Journal of Hydrogen Energy*. - 2007. - V. 32. - № 14. - P. 2664 – 2672.

259. Ireland, J. C. Inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation / J. C. Ireland, P. Klostermann, E. W. Rice, R. M. Clark // *Applied and Environmental Microbiology*. - 1993. - V. 59. - № 5 - P.1668-1670.

260. Sjogren, J. C. Inactivation of phage MS2 by iron-aided titanium dioxide photocatalysis / J. C. Sjogren, R. A. Sierka // *Applied and Environmental Microbiology*. - 1994. - V. 60. - № 1. - P. 344–347.

261. Archana, D. In vivo evaluation of chitosan–PVP–titanium dioxide nanocomposite as wound dressing material / D. Archana, B.K. Singh, J. Dutta, P.K. Dutta // *Carbohydrate Polymers*. - 2013. - V. 95. - P. 530–539.

262. Kim, Y. Titanium alkoxides as initiators for the controlled polymerization of lactide / Y. Kim, G. K. Jnaneshwara, J.G. Verkade // *Inorganic Chemistry*. - 2003. - V. 42. - № 5. - P. 1437-1447.

263. Kim, Y. Living polymerization of lactide using titanium alkoxide catalysts/ Y. Kim, J.G. Verkade // *Macromolecular Symposia*. - 2005. - V. 24. - № 1. - P. 105 – 118.
264. Dijkstra, P. J. Single site catalysts for stereoselective ring-opening polymerization of lactides / P. J. Dijkstra, H. Du, J. Feijen // *Polymer Chemistry*. - 2011. - V. 2. - № 3. - P. 520–527.
265. Salomatina, E.V. Biocompatible compositions based on chitosan and copolymer (lactide–titanium oxide) for engineering of tissue substitutes for wound healing / E.V. Salomatina, I.R. Lednev, N.E. Silina, E.A. Gracheva, A.S. Koryagin, O.N. Smirnova, M.K. Gorshenin, L.A. Smirnova // *Polymer Bulletin*. – 2019. – P. 1–19.
266. Liao, H.T. New biodegradable blends prepared from polylactide, titanium tetraisopropylate, and starch / H.T. Liao, Ch.S. Wu // *Journal of Applied Polymer Science*. - 2008. – V. 108. - № 4. – P. 2280 – 2289.
267. Chiang, P.C. The synthesis and morphology characteristic study of BAO-ODPA polyimide/ TiO<sub>2</sub> nano hybrid films / P.C. Chiang, W.T. Whang // *Polymer*. - 2003. - V. 44. - № 8. - P. 2249 - 2254.
268. Shao, P.L. [Perfluorosulfonate ionomer]/[SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub>] nanocomposites via polymer in situ sol-gel chemistry: Sequential alkoxide procedure / P.L. Shao, K.A. Mauritz, R.B. Moore // *J Polym Sci Part B: Polym Phys*. - 1996. - V. 34. - P. 873 – 882.