

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

На правах рукописи

Леднев Иван Родионович

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

1.4.7. – Высокомолекулярные соединения (химические науки)

Научный руководитель:

доктор химических наук

Смирнова Лариса Александровна

Нижний Новгород – 2023

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. Литературный обзор.....	10
1.1. Полимеры для медицинского применения.....	10
1.2. Хитозан	12
1.3. Полилактид	16
1.4. Поли(ϵ -капролактон)	22
1.5 Катализаторы ROP-полимеризации лактида и ϵ -капролактона	26
1.6. Модификация хитозана по реакциям полимераналогичных превращений	29
1.7 Полимерные смеси на основе хитозана	31
1.8 Полимерные материалы медико-биологического назначения на основе биodeградируемых полиэфиров и хитозана	32
Глава 2. Экспериментальная часть.....	39
2.1. Используемые вещества и их характеристики.....	39
2.2. Методы исследования.....	39
2.2.1. Определение молекулярной массы и степени деацетилирования хитозана.....	39
2.2.2. Получение пористых образцов на основе хитозана	41
2.2.3. Модификация хитозана энантовым альдегидом.....	42
2.2.4 Синтез салицилата титана	42
2.2.5 MALDI масс-спектроскопия	42
2.2.6 ЯМР-спектроскопия.....	43
2.2.7. Синтез полилактида и поли- ϵ -капролактона.....	43
2.2.8. Определение молекулярной массы полиэфиров	43
2.2.9. Получение ДМСО-растворимого хитозана и смесевых композиций на его основе.....	43
2.2.10 Получение пленок	44
2.2.11. Исследование структуры образцов	44
2.2.12. Изучение смачиваемости	45
2.2.13. Исследование теплофизических свойств композиций.....	45
2.2.14. Исследование клеточной адгезии.....	46
2.2.15. Оценка цитотоксичности – МТТ-тест.....	47

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

ВВЕДЕНИЕ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Научная новизна.

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

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

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

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

На защиту выносятся следующие положения:

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

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

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

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

Структура диссертации. Диссертация включает введение, литературный обзор по выбранной тематике, экспериментальную часть, обсуждение полученных результатов, выводы, список сокращений и цитируемой литературы (217 наименований). Работа изложена на 137 страницах, включает 18 таблиц и 48 рисунков.

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

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

Глава 1. Литературный обзор

1.1. Полимеры для медицинского применения

Актуальность и необходимость разработки новых биосовместимых полимеров и композиций на их основе, обусловлена существующим высоким спросом на них для различных сфер биомедицины и, прежде всего, тканевой инженерии и регенеративной медицины [1-3].

Понятие "биосовместимость материала" не имело четкого определения до недавнего времени. Под термином "биосовместимость" было предложено понимать способность материала, изделий или устройств выполнять свои функции и не вызывать отрицательных реакций в организме "хозяина". Суммируя существующие представления о взаимодействии чужеродного материала с биологическими структурами организма [4, 5], можно сформулировать основные свойства, которыми должно обладать биосовместимое изделие:

- не вызывать воспалительную реакцию;
- не оказывать токсического и аллергического действия на организм;
- не обладать канцерогенным действием;
- не вызывать развитие инфекции;
- сохранять свои свойства в течение предусмотренного срока эксплуатации.

Сегодня особо необходимы специализированные биосовместимые полимеры для появившегося в последние годы нового направления медицинского материаловедения – клеточной и тканевой инженерии [6-10], связанного с регенеративной медициной и разработкой искусственных органов и тканей [11-13]. Эти исследования реализуются на стыке химии полимеров, ряда биологических и медицинских дисциплин, а также химии твердого тела, в

случае если необходимо обеспечить регенерацию твердых тканей, таких как костная ткань или зубы [14, 15]. Таким образом, тканевая инженерия сочетает в себе комплекс взаимосвязанных фундаментальных задач: разработку новых материалов, методов модификации и их переработки в специализированные изделия биомедицинского назначения; изучение механизма взаимодействия биоматериалов с кровью, клетками и тканями; оценку физико-химических и медико-биологических свойств биоматериалов и изделий из них; экспериментально-клиническое исследование применений новых материалов и изделий [16-20].

В соответствии с разнообразием устройств и предметов медицинского назначения так же велико и разнообразие биосовместимых полимеров. По поведению в организме хозяина их можно поделить на биоинертные (биостабильные) и биоразлагаемые (биodeградируемые, биорезорбируемые) [21, 22].

Биоинертные полимеры не разлагаются в жидких средах, не разрушаются под воздействием ферментов крови и тканей, под воздействием клеток и предназначены для изготовления имплантатов и устройств длительного функционирования; среди них: полиэтилен, полипропилен, полиэтилентерефталат, политетрафторэтилен, полиметилметакрилаты [23-25].

Разработка новых полимерных материалов, обладающих помимо биосовместимости также и биodeградацией *in vivo*, представляет собой дополнительную проблему, существенно более сложную по сравнению с трудностями, возникающими в ходе конструирования небiodeградируемых *in vivo* полимерных материалов [26-30]. В настоящий момент наибольшее применение нашли:

Полисахариды (хитозан, целлюлоза, альгинаты и гиалуроновая кислота), белки (коллаген, желатин, фиброин, шелк) и биоразлагаемые полиэфиры

(полилактид, полилактид-со-гликолид, поликапролактон и т.д.) [31-35]. Потенциальная опасность применения для этих целей материалов белковой природы вызвала ряд законодательных запретов [36-38] и, соответственно, возросла актуальность к использованию изделий на основе полисахаридов и полиэфиров. Особый интерес среди последних представляют хитозан, полилактид и поликапролактон, как наиболее коммерчески доступные и каждый из которых обладает рядом свойств, удовлетворяющих для применения в регенеративной медицине, а совокупное их использование позволит нивелировать недостатки индивидуальных компонентов. [39, 40].

1.2. Хитозан

Хитозан – представляет собой деацетилированную форму природного биополимера хитина [41]. Хитин и его производное хитозан являются линейными полисахаридами [42]. Исследованиями хитина и хитозана занимаются ученые по всему миру, при этом наблюдается рост количества публикаций по хитозану каждый год, что свидетельствует об актуальности данных исследований [43, 44]. Хитин близок к целлюлозе по химической структуре и занимает второе место после нее по распространенности среди природных полимеров [45]. Биосферные запасы хитина в мировом океане в среднем оцениваются более чем в 2 млрд. тонн/год. Источником хитинсодержащего сырья в России являются ряд морских членистоногих, таких как крабы, креветки и криль [46].

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

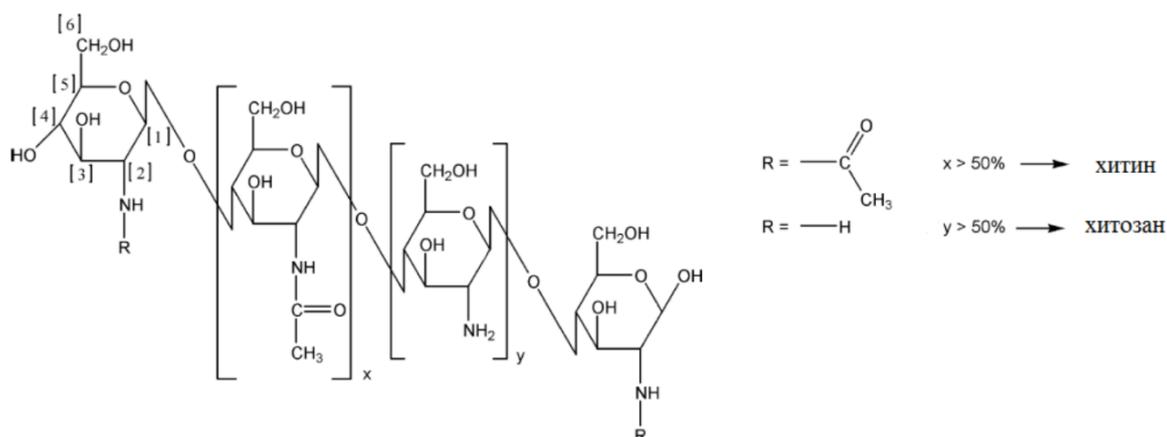


Рис. 1 Схематическое представление структуры макромолекул хитина и хитозана

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

За счет протонирования первичных аминогрупп хитозан хорошо растворяется в разбавленных водных растворах органических и ряда неорганических кислот. Растворимость хитозана в основном определяется его СД и распределением структурных звеньев в цепи полисахарида. Гидродинамический радиус макромолекул хитозана в растворах может варьироваться от нескольких десятков до нескольких сотен нанометров [49]. В зависимости от молекулярных характеристик хитозан из растворов (солевая форма) начинает осаждаться при значениях рН среды в диапазоне 6-6.5 и эта способность используется для перевода материалов на его основе в нерастворимую форму (основная форма) (Рис. 2), а также для создания

наноразмерных частиц методом снизу-вверх, то есть с помощью контролируемого осаждения [50-52].

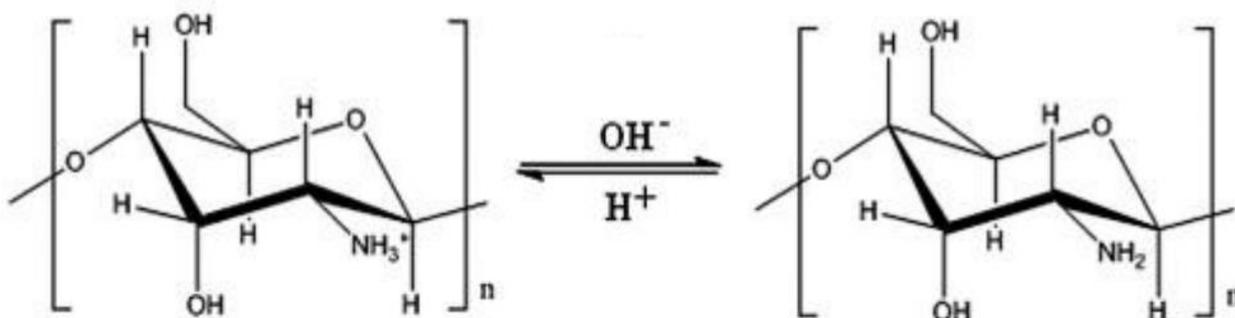


Рис. 2 Схема перевода хитозана в основную форму из солевой формы.

Так же, как и в хитине макромолекулы хитозана образуют прочную систему водородных связей. Температура стеклования хитозана находится в диапазоне 140-150 °С [53]; температура плавления хитозана превышает температуру его разложения, поэтому формование материалов возможно только из его растворов или из смесей с большим количеством термопластичного полимера как второго компонента.

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

Хитозан, ввиду низких механических свойств и сложности формования изделий из него, все чаще подвергается химической и физической модификации для создания гибридных материалов с необходимыми

свойствами, что может расширить спектр его применения, особенно в биомедицине [81-82]. Исследования показывают перспективность хитозана и его производных для регенерации мягких тканей. Хитозан способствует адгезии клеток и образованию естественного внутриклеточного матрикса, улучшая восстановление ткани [83, 84]. Композитные гидрогели на основе хитозана и кальций фосфатных керамик исследуются для костной тканевой инженерии и для терапии остеоартроза [85, 86].

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

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

При формировании пленок и нанесении покрытий из хитозана для биомедицинского назначения следует учесть 2 момента:

1. зависимость свойств от химической структуры полисахарида

2. необходимость формирования пленок/покрытий из растворов, что требует их дальнейшей обработки для перевода хитозана в нерастворимую в воде форму.

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

1.3. Полилактид

Одним из самых широкоиспользуемых на данный момент биodeградируемых полимеров является полилактид (ПЛА) – линейный, гидрофобный, полимер, входящий в группу алифатических сложных полиэфиров (рис. 3) [101].

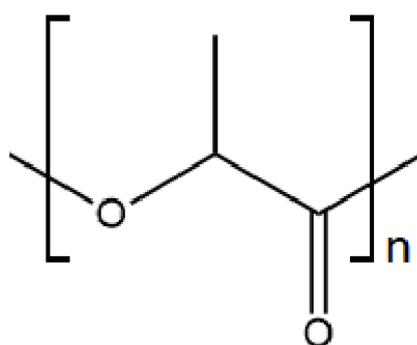


Рис. 3 Структурная формула повторяющегося звена ПЛА

Для его производства используется возобновляемое растительное сырье (маниок, картофель, сахарный тростник, кукуруза, рис и др.), что делает его альтернативой полимерам, получаемым из нефтехимического сырья [102-105]. По статистике на рынок всех биоразлагаемых пластмасс 43% приходится на

ПЛА, а мировое его потребление растет с каждым годом в среднем на 20% [106].

Полилактид не растворяется в воде и этаноле при комнатной температуре, но обладает хорошей растворимостью в хлороформе, ацетоне, ТГФ и др. органических растворителях [107, 108].

Одно из главных преимуществ ПЛА – это возможность его переработки практически всеми методами, применяемыми для промышленных крупнотоннажных полимеров (экструзия, литье под давлением, пневмоформование и др.). Из этого полимера изготавливают различные бытовые изделия [109-115]. Важно отметить, что ПЛА уже используется как биоразлагаемый материал для аддитивных технологий (3D-печати), как в биомедицинских, так и в бытовых изделиях.

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

Исходными мономерами для синтеза ПЛА выступают молочная кислота (МК), которая, из-за наличия в ее молекуле асимметрического атома углерода может существовать в двух оптически активных формах (L-МК и D-МК) или циклический димер – лактид. Лактид может существовать в виде оптически активных D- и L-форм (D-лактид и L-лактид) и неактивной мезо-формы (D, L-лактид) (рис. 4) [121, 122].

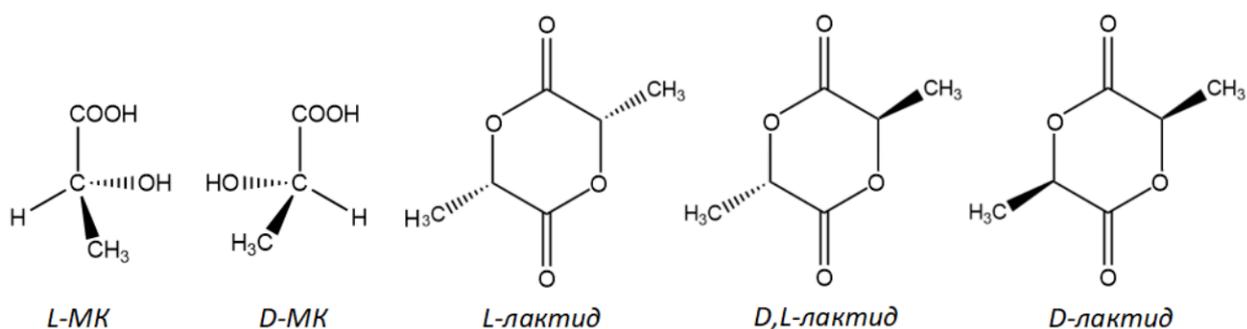


Рис. 4. Оптические изомеры МК и лактида.

В настоящее время существует несколько способов получения ПЛА.

Первый способ – прямая гомополиконденсация молочной кислоты – наименее дорогостоящий путь синтеза, но получить высокомолекулярный продукт при этом не удастся из-за сложностей отвода низкомолекулярного побочного продукта процесса – воды (ММ 1-5 кДа) [123, 124]. Удаление воды в процессе азеотропной поликонденсации молочной кислоты позволяет синтезировать ПЛА с достаточно высокой ММ (до 300 кДа) [125].

В основе следующего метода получения высокомолекулярного ПЛА лежит использование удлинителей цепи. Из продукта поликонденсации молочной кислоты отдельно получают олигомер с концевыми гидроксильными группами и отдельно – с концевыми карбоксильными. Полученные олигомеры подвергают конденсации между собой с получением полимера, ММ которого складывается из ММ прореагировавших олигомеров [126, 127].

Более распространенным способом синтеза высокомолекулярного ПЛА (ММ > 100 кДа) является полимеризация лактида с раскрытием цикла в присутствии катализатора – чаще октаноата олова (II) и спирта [128-132]. Для контроля ММ образующегося полимера применяют низкомолекулярные спирты.

В данной реакции, предполагается, что на первом этапе образуется комплекс между мономером, катализатором и со-инициатором (спиртом), что сопровождается перестройкой ковалентных связей (рис. 5). Затем, мономер

присоединяется через атом кислорода карбонильной группы к атому металла катализатора, и его циклическая структура раскрывается.

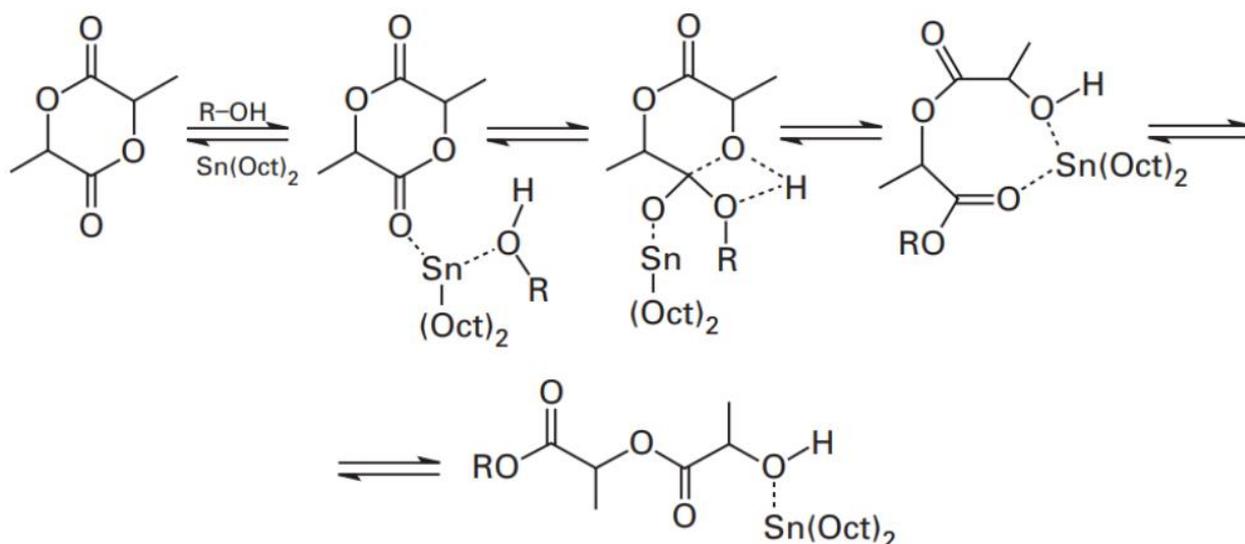


Рис. 5 Схема реакции полимеризации лактидов по координационному механизму в присутствии октаноата олова (II) и предельного спирта [130].

Важно отметить, что структура, степень кристалличности и механические свойства ПЛА в значительной степени зависят от его стереорегулярности, которые определяются стереохимическим составом мономеров, их природой и температурой полимеризации. Высокочистые L- и D-формы лактидов дают поли (L-лактид) и поли (D-лактид). Мезо-лактид дает аморфный поли (D, L-лактид) [133-136].

Чистые поли (L-лактид) и поли (D-лактид) имеют равновесную температуру плавления кристаллической структуры 207 °С, но обычно температура перехода лежит в диапазоне 170-180 °С (вследствие наличия примесей, дефектных кристаллов и возможной рацемизации) [137].

При комнатной температуре поли (L-лактид) – жесткий, частично кристаллический полимер со степенью кристалличности от 40 до 80% [138]. Полимер демонстрирует высокие значения прочности на разрыв (50-70 МПа) и модуля упругости (2.7-4.2 ГПа), но низкое удлинение (2-4%), что делает его пригодным для изготовления фиксирующих изделий для ортопедии [139, 140].

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

Способы устранения хрупкости ПЛА включают добавление в полимер пластификаторов, проведение высокотемпературной ориентационной вытяжки или смешение с другими полимерами с высокой ударной вязкостью (например, с ПКЛ) [144]. Пластично деформирующиеся материалы могут быть получены путем сополимеризации лактидов с ϵ -капролактоном (ϵ -КЛ), бутилен сукцинатом (БС) и другими циклическими эфирами [145-150].

Важная особенность ПЛА – способность к биодеструкции под воздействием факторов окружающей среды [151]. Продукты его распада представляют собой естественные метаболиты, которые могут безопасно перерабатываться в одно- и многоклеточных организмах. В организме человека или животного ПЛА разлагается в результате ферментативного гидролиза, а образовавшиеся молочная кислота и растворимые олигомеры разлагаются до углекислого газа, который удаляется с помощью дыхательной системы организма, и воды. Однако иногда возможно закисление тканей при разложении до молочной кислоты и как следствие развитие негативных воспалительных процессов при регенерации тканей [152-155]. Разложение ПЛА в почве происходит в присутствии выделяемых микроорганизмами ферментов. В результате нерастворимый в воде полимер распадается на водорастворимые органические кислоты и олигомеры, которые превращаются в углекислый газ и воду [156-158].

Механизм и скорость деструкции ПЛА зависит от pH среды [159]. В сильноокислой среде ($\text{pH} \leq 2$) преобладает механизм разложения, включающий отщепление концевой звена цепи, а в щелочной ($\text{pH} > 8$) – отщепление димера молочной кислоты (лактида). В слабокислых или нейтральных средах имеет место случайное расщепление сложноэфирных групп и олигомеризация.

Нагрев выше температуры стеклования приводит к резкому росту скорости разложения ПЛА [160], что часто используют для ускорения процесса гидролиза и изучения его кинетических особенностей в более короткие сроки.

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

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

Существенное влияние на закономерности деструкции ПЛА оказывают ММ и степень кристалличности. Срок деструкции высокомолекулярного L-ПЛА составляет до нескольких лет, тогда как для низкомолекулярного – всего

несколько недель. В сравнении с ними для деструкции аморфного высокомолекулярного D, L-ПЛА требуется от 12 до 16 месяцев [165].

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

1.4. Поли(ε-капролактон)

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

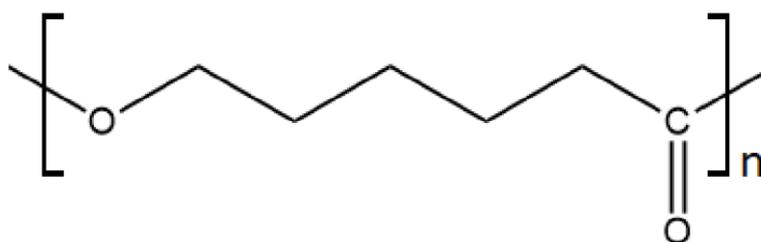


Рис. 6. Структурная формула повторяющегося звена ПКЛ

ПКЛ, в отличие от ПЛА, производится только из нефтехимического сырья. Это частично кристаллический (степень кристалличности 50-69%), линейный, гидрофобный, термопластичный полимер с температурой стеклования аморфной фазы $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ и температурой плавления кристаллической фазы $59\text{-}64\text{ }^{\circ}\text{C}$ [167].

Высокомолекулярный ПКЛ не растворяется в воде и этаноле при комнатной температуре, но обладает хорошей растворимостью в хлороформе, дихлорметане, четыреххлористом углероде и др. органических растворителях [168-170].

ПКЛ привлекает внимание благодаря своим ценным свойствам, таким как биосовместимость, биоразлагаемость, относительно низкая стоимость (самая низкая на рынке по сравнению с другими полиэфирами-аналогами), высокие ударная вязкость и термостабильность, превосходные реологические и вязкоупругие свойства, простота переработки [171]. Он демонстрирует редкое свойство образовывать смеси с большим числом полимеров как природного (крахмал, хитозан и др.), так и синтетического (поливинилхлорид (ПВХ), полиуретаны, полиэтиленгликоль и др.) происхождения [172-175].

ПКЛ получил одобрение от FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) для использования в биомедицинских целях, включающих разработку систем доставки лекарств с контролируемым высвобождением, нервных проводников, трехмерных каркасов для тканевой инженерии, микрокапсул, имплантатов длительного действия и др. [176-180].

ПКЛ не проявляет цитотоксических эффектов, способен к биodeградации в организме, однако, выраженная гидрофобность и недостаточная смачиваемость затрудняют адгезию и пролиферацию клеточных элементов на поверхности тканеинженерных конструкций, изготовленных из этого полимера [181, 182]. Для увеличения гидрофильности ПКЛ используют аминлиз, плазменную обработку поверхности, сополимеризацию ϵ -капролактона (ϵ -КЛ) с другими мономерами или путем смешения с гидрофильными полимерами [183, 184]

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

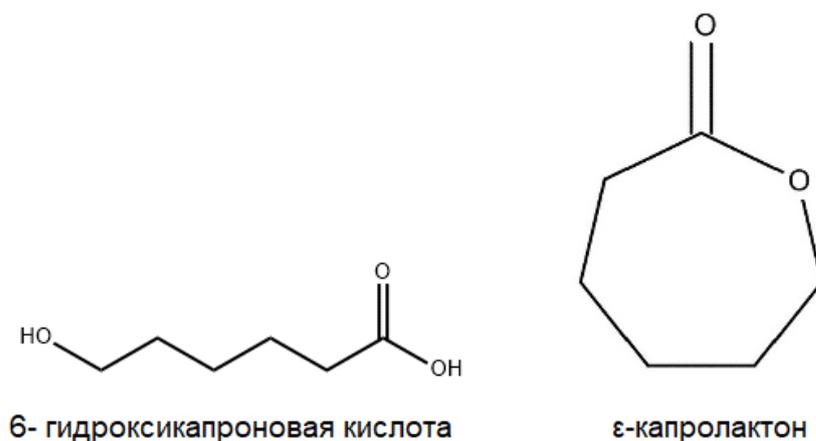


Рис. 7. Структурные формулы 6- гидроксикапроновой кислоты и ε-капролактона.

Существуют два основных способа синтеза ПКЛ –гомополиконденсация 6-ГГК и полимеризация ε-КЛ с раскрытием цикла [185].

Реакция поликонденсации проводится под вакуумом, который создается для удаления воды, выделяющейся в ходе реакции, что позволяет сместить равновесие в сторону получения полимера [186]. Реакция проходит в отсутствие катализатора при возрастающей температуре от 80 до 150 °С, и завершается за 6 часов. В литературе описан ферментативный способ синтеза поликапролактона из 6- гидроксикапроновой кислоты [187]. Использование липазы *Candida Antarctica* медленно (в течение 48 ч) приводит к образованию олигомера со средней степенью полимеризации около 63 и дисперсностью 1.6. Однако этот метод не так распространен, как полимеризация ε-капролактона, поскольку образуется полимер с низкой молекулярной массой.

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

Анионный механизм (Рис. 8) подразумевает образование анионных комплексов, которые раскрываются. Основным недостатком данного метода является значительная внутримолекулярная переэтерификация, на поздних

стадиях полимеризации. Это приводит к снижению молекулярной массы полимера, остановке полимеризации или получению полимеров с циклической структурой.

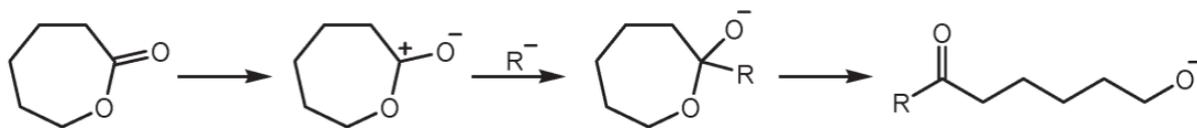


Рис. 8. Схема анионного механизма синтеза поликапролактона

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

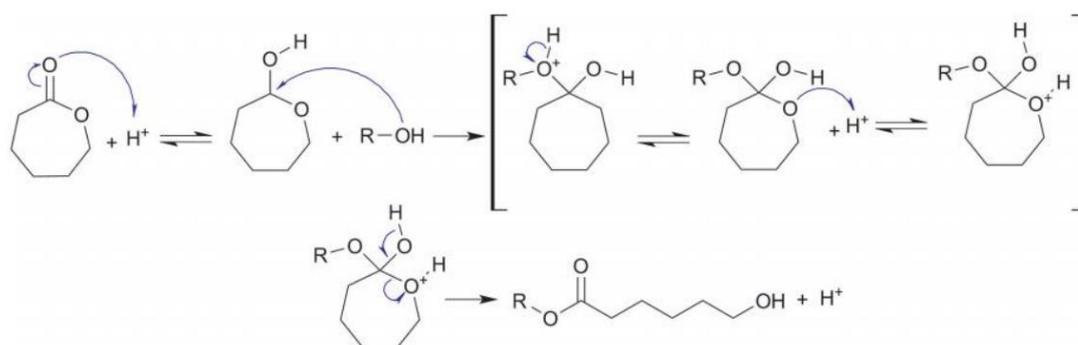


Рис. 9. Схема катионного механизма синтеза поликапролактона

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

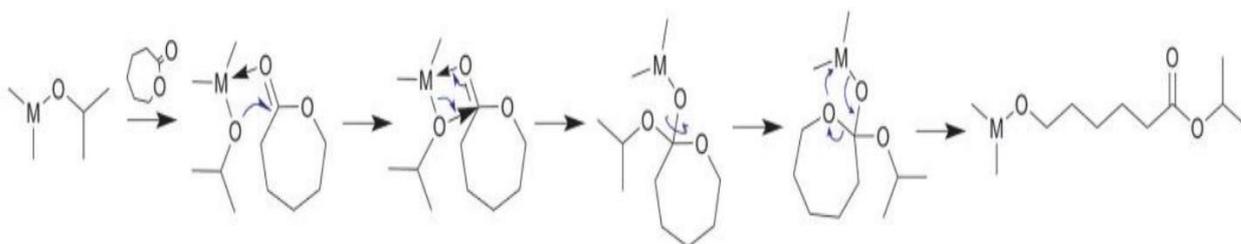


Рис. 10. Схема синтеза поликапролактона по механизму активации мономера

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

Конечная молекулярная масса полимера, молекулярно-массовое распределение и наличие функциональных групп могут варьироваться в зависимости от механизма полимеризации [193]. Как правило, ПКЛ получают с молекулярной массой от 3 000 до 80 000 [194].

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

1.5 Катализаторы ROP-полимеризации лактида и ϵ -капролактона

Полиэфиры могут быть синтезированы с использованием различных катализаторов. В обзоре [195] упоминаются более чем 100 катализаторов для синтеза полилактида и поликапролактона. Ключевыми параметрами при выборе катализатора являются скорость полимеризации, стереоконтроль желательными характеристиками являются низкая стоимость, распространенность, отсутствие цвета, запаха и низкая токсичность [196]. Поскольку, наиболее используемый механизм по которому происходит

реакции полимеризации, является механизм coordination-insertion (координация-вставка) [197], рассмотрим более подробно каталитические системы, используемые для данного варианта.

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

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

Обширные исследования по полимеризации эфиров ведутся в направлении использования новых металлоорганических катализаторов [204,205]. В работе [206] обсуждаются реакционные способности алкоксигрупп, при реакциях полимеризации. Было установлено, что алкоксиды металлов, такие как $Al(O-iPr)_3$ и $Ti(O-iPr)_4$ способны к образованию структур, различающихся по реакционной способности. В последнее время активно исследуется использование органических соединений титана как катализаторов, поскольку они характеризуются нетоксичностью, в отличие от алкоксидов алюминия. Авторы [207] предполагают, что высокая каталитическая активность алкоксидов титана при полимеризации лактида обусловлена образованием комплексов схожих по структуре с полтитаноксидом. Работа [208] показала возможность синтеза полилактида при использовании алкоксидов титана как

катализаторов, полученный полимер характеризовался невысокой молекулярной массой ($35-40 \times 10^3$) и индексом полидисперсности (1.7-2.2). В работе [209] рассмотрена полимеризация лактида на хлор-замещенном изопроксиде титана. Молекулярная масса полилактида достигала ($85-90 \times 10^3$) при индексе полидисперсности (1.3 – 1.5), однако выход реакции составил всего (20-30%). Несмотря на ряд положительных свойств таких как высокая молекулярная масса и нетоксичность, катализаторы на основе алкоксидов титана активно гидролизуются при контакте с влагой, а образующийся при том TiO_2 не обладает каталитическими свойствами, поэтому перспективным видится, замена лигандов на атоме титана, обеспечивающих стабильность катализатора на воздухе.

Установлено, что титан-карбоксилатные комплексы более стабильны, чем алкоксиды титана [210]. Каталитическая активность карбоксилатов титана рассмотрена в работах [211,212]. Авторами был получен полилактид с молекулярной массой ($M_w = 55000-60000$), однако поскольку синтез проводили при относительно низкой температуре синтеза ($T = 90 \text{ C}$), скорость процесса была сравнительно низкой и составляла 48 часов. Введение ароматических заместителей в качестве лигандов повышает термическую стабильность катализатора, что важно с точки зрения их использования в условиях промышленной высокотемпературной полимеризации [213]. Таким образом значительный интерес вызывают, производные в которых атом титана координирован на карбоксилатные группы, поскольку вследствие индуктивных эффектов (электроотрицательность), электронная плотность на атоме титана понижается. В результате увеличивается льюисовская кислотность атома титана [214]. Следовательно, мономеры ϵ -капролактон и D, L - лактид легче координируются на атом титана, сопровождающиеся иницированием полимеризации с раскрытием цикла.

С учетом результатов вышеупомянутых работ, крайне перспективным является получение эффективных каталитических систем на основе титана с

лигандами производных салициловой кислоты, что должно обеспечивать термическую стабильность, и хорошие биологические свойства. Наряду с этим салициловая кислота является одной из коммерчески доступных органических кислот с ароматическими заместителями [215].

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

1.6. Модификация хитозана по реакциям полимераналогичных превращений

Наличие в хитозане двух типов реакционноспособных групп позволяет проводить реакции полимераналогичных превращений

как по аминным, так и по гидроксильным группам, что. В настоящее время данный метод используют, как для прямой модификации с целью получить различные материалы в зависимости от необходимых свойств, так и использовать эти производные для защиты функциональных групп с целью направленной модификации. (рис.5) [216-220].

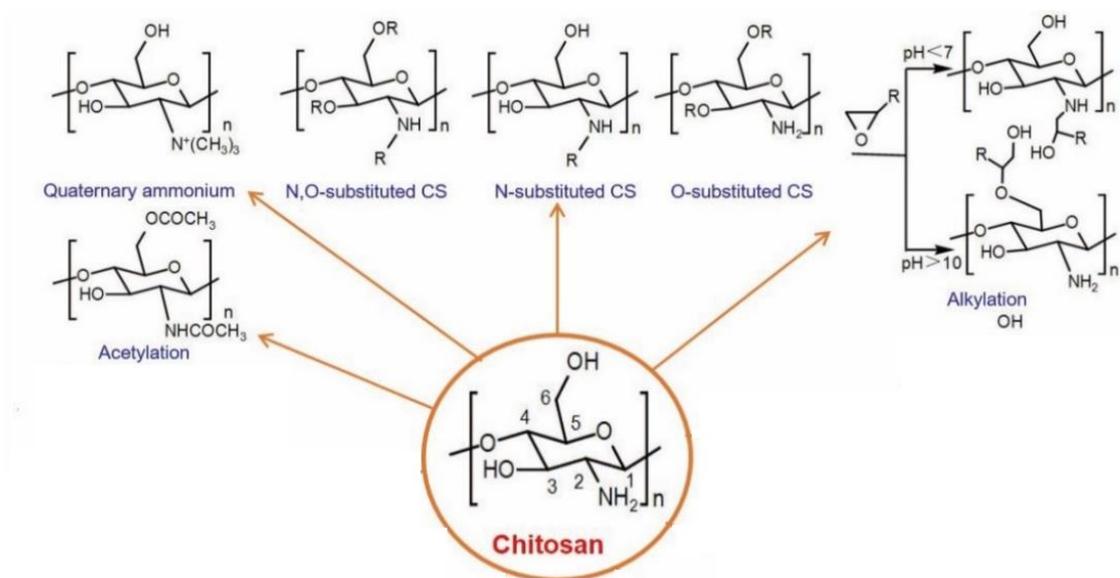


Рис. 11. Возможные пути модификации хитозана по реакциям полимераналогичных превращений.

Методами химической модификации хитозана создан ряд новых биологически активных материалов. Приоритетный интерес к этим продуктам связан с тем, что сохраняются основные физико-химические и биологические свойства исходного полимера и, в зависимости от характера вводимых групп, он приобретает новые свойства

Остановимся более подробно, на модификации хитозана по аминогруппе, поскольку это позволяет проводить модификацию с большей степенью замещения, чем по гидроксильной группе [221]. Аминогруппы хитозана способны реагировать с альдегидами, образуя основания Шиффа [222]. Основания Шиффа образуются в результате реакции первичной аминогруппы с альдегидом при определенных условиях. Структурно основание Шиффа представляет собой азотзамещенный аналог альдегида или кетона, в котором карбонильная группа ($C=O$) заменена имино- или азометиновой группой [223]. Образование оснований Шиффа в результате реакции аминогрупп хитозана с альдегидами, позволяет достаточно легко вводить алкильные или арильные фрагменты в макромолекулы хитозана, что повышает их механические свойства и может способствовать лучшей совместимости с синтетическими линейными полимерами.

Интерес к синтезу производных хитозана, модифицированных альдегидами, обусловлен наличием у них ряда специфических свойств:

1. Способность вещества разрушаться в природе, не нанося ей вреда – биodeградируемость, которая обеспечивается свойствами как хитозана, так и свойствами используемых альдегидов.
2. Биосовместимость с тканями человека. Использование в качестве модификаторов ряда альдегидов продиктовано, прежде всего, возможностью использования таких материалов в медицине

3. Возможность регулировки гидрофильно-гидрофобного баланса. Хитозан является гидрофильным полимером, а применение в качестве модификаторов альдегидов с объемным заместителем придает хитозану гидрофобность, что важно в случае применения таких материалов в медицине при непосредственном контакте с кровью и тканями организма.

1.7 Полимерные смеси на основе хитозана

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

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

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

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

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

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

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

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

В этом разделе будут рассмотрены методы получения материалов на основе хитозана с полиэфирами, как в виде сополимеров, так и в виде смесевых композиций.

В работах [238-240] рассмотрено получение методом поликонденсации и привитой полимеризации без катализатора при $T = 80-90^{\circ}\text{C}$ привитых сополимеров хитозана с лактидом. Привитые сополимеры хитозана с L-

молочной кислотой являются цитосовместимыми и перспективны для тканевой инженерии [239].

Авторами работы [241], были получены водорастворимые привитые сополимеры 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 в диметилформамиде в атмосфере азота при $T = 80^{\circ}\text{C}$ на основе изоционат-прекурсора ПЛА (PLLA-NCO), дилаурата дибутилолова (II) (0.2 мол. % от PLLA-NCO) и хитозана [242]. 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.

В последнее десятилетие усилился интерес к получению сополимеров хитозана с лактидом, получаемых методом твердофазного синтеза, достоинствами метода отмечаются не только простота метода и эффективность получения таковых сополимеров, но и отсутствие необходимости использования растворителей [243-246].

Авторами работы [243] получены привитые сополимеры хитозана с олиго (L- и D, L-лактидами) с использованием двухшнекового экструдера. В зависимости от условий проведения процесса и характеристик исходных компонентов степень прививки составила 4-44 мас. %. Важным явилось выявление зависимости прочностных характеристик привитых сополимеров от стереоизомерии ПЛА. Прививка на хитозан олиго(L-лактида) приводит к незначительному снижению прочности при разрыве, относительно хитозана, 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 [244] твердотельный 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.

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

Авторы статьи [245] 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 относительно исходного полилактида.

В работе [246] композиционные смесевые материалы ПЛА: хитозан с весовыми соотношениями от 10: 1 до 10: 4 соответственно, получали путем твердофазного смешения гомополимеров. Показана возможность контролировать скорость деградации композитов путем изменения соотношения компонентов. 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.

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 соответствующих растворителей.

В работе [247] на основе смесей хитозана и ПЛА / поли(L-лактида) были изготовлены пористые мембраны. Авторы показали, что для эффективного смешивания двух гомополимеров необходимо использовать смешанные растворители с учетом растворимости органических растворителей в воде. При этом важна последовательность введения растворов, необходимо вводить растворы поли (D, L-лактида) 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 (с 3.1 МПа до 2 МПа, для прочности на растяжение и с 90 до 37 МПа для модуля Юнга), а их удлинение при растяжении увеличивается (с 5.1 до 13%).

Авторы [248] 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 и после перемешивания смеси осаждали ацетоном. Авторами показано образование межмолекулярных водородных связей между двумя компонентами через взаимодействие карбонильных групп поли(L-лактида) и аминогрупп хитозана. Однако, данная работа вызывает много вопросов, так как поли-L-лактид нерастворим в ДМСО, и кроме того, при добавлении воды полилактид будет высаживаться из растворителя. Изучено влияние межмолекулярного взаимодействия на

кристаллическую структуру смесей поли(L-лактид): хитозан. Данных о физико-механических свойствах композитов авторами не было представлено.

Авторы работ [249 - 251] предприняли попытки разработки тройных систем на основе смеси хитозана с ПЛА с третьим полимером в качестве компатибилизатора, для использования в качестве упаковочных материалов.

Авторы работы [249] получили смесевые композиции из эмульсий на основе водного раствора хитозана с ПЛА, в хлороформе с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ) в качестве компатибилизатора. Выявлено, что ПЭГ (16.6 мас. %) улучшает механические свойства пленок хитозана и ПЛА, увеличивая гибкость материалов (величины разрушающего напряжения σ и деформации ϵ пленок в статье не были представлены). В то же время, авторы отмечают, что несмотря на хорошие биологические характеристики, низкий уровень прочностных свойств таких гетерогенных пленок ограничивает их применение.

Авторы исследования [250] показали, что смеси хитозана и ПЛА с увеличением содержания последнего показывают уменьшение значения модуля Юнга, прочности на растяжение σ и увеличение удлинения при разрыве ϵ . Авторы предположили, исходя из анализа теплофизических свойств, что уменьшение значения модуля упругости при увеличении доли ПЛА, может быть результатом разделения фаз системы, следовательно, хитозан: ПЛА в смеси полученной данным методом несовместимы.

Авторы [251] разработали способ получения смесевых композиций на основе хитозана и ПЛА через совмещение их растворов в условиях высоких сдвиговых напряжений (22 000 об /мин) в течение 60 с с образованием устойчивой эмульсии. Поливиниловый спирт (ПВС) использовали в качестве компатибилизатора для стабилизации эмульсии. Водный раствор хитозана в 1 % CH_3COOH и ПВС в воде смешивали с раствором ПЛА в хлороформе. Прочность на разрыв для пленок из хитозана, ПВС и ПЛА составляют ~ 28 , \sim

17 и 18 МПа, соответственно. Для бинарных смесей ПВС: ПЛА и хитозан: ПЛА испытания на растяжение были невозможны, так как пленки на их основе после приготовления распадались. Для тройных смесей хитозан: ПВС: ПЛА при соотношении компонентов 1: 2: 2 , 6: 1: 1, 1: 6: 1 по массе величина прочности на разрыв составляет 16.0, 20.5 и 11.0 МПа, соответственно. Анализируя данные сканирующей электронной микроскопии, авторы расположили смеси хитозан: ПВС: ПЛА от наименее до наиболее совместимых в порядке 1: 2: 6 < 6: 1: 1 < 1: 2: 2 < 1: 6: 1, что согласуется с данными ДСК и ИК-спектроскопии. Эти результаты подтверждают важность ПВС, не только в качестве стабилизатора эмульсии, но и в качестве компатибилизатора смеси хитозана с ПЛА.

Авторы работы [252] предложили подход, в котором совместимость между двумя несовместимыми полимерами может быть осуществлена посредством химических реакций между функциональными группами хитозана (-ОН и -NH₂) и ПЛА (-ОН и -COOH) с образованием компатибилизатора *in situ*. В процессе смешивания в систему добавляли метилендифенилдиизоцианат (МФИ).

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

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

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

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

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1. Используемые вещества и их характеристики

В работе использовали хитозан (ЗАО «Биопрогресс», Россия) с ММ = 2.5×10^5 и СД = 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 г/см³), молочную кислоту «х.ч.» (ООО «Азур», содержание основного вещества 80 %), салициловую кислоту «х.ч.» (ООО «Химреактив»).

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

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

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

2.2. Методы исследования

2.2.1. Определение молекулярной массы и степени деацетилирования хитозана

ММ хитозана определяли методами вискозиметрии и гель-проникающей хроматографии

Вискозиметрический метод.

ММ хитозана определяли вискозиметрическим методом на вискозиметре Уббелюде при температуре 21°C. Навеску хитозана 0.1 г растворяли в 30 мл раствора CH_3COOH 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 $[\eta] = 3.41 \times 10^{-5} M^{1.02}$ [47].

Метод гель-проникающей хроматографии.

ММ хитозана определяли, используя его водноуксуснокислые растворы. Хроматографический анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы Shimadzu CTO20A/20AC (Япония) с программным модулем LC-Solutions-GPC с применением колонки Tosoh Bioscience TSKgelG3000SWxl с диаметром пор 5 мкм, детектор - низкотемпературный светорассеивающий детектор ELSD-LT II. Элюентом служил 0.5 М раствор уксусной кислоты. Скорость потока 0.8 мл/мин. Калибровку выполняли, используя узкодисперсные образцы декстрана в диапазоне ММ от 1000 до 410000 Да (Fluca).

Определение степени деацетилирования

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 0.1 М растворе HCl , заранее приготовленного из фиксанала. Раствор титровали 0.1 М NaOH при постоянном перемешивании. На основании полученных результатов строили график зависимости рН раствора от объёма титранта (NaOH). Кривая потенциометрического титрования раствора хитозана имеет два перегиба, первый перегиб кривой соответствует $V_1(\text{NaOH})$, пошедшему на титрование избыточного количества HCl ,

несвязанной с аминогруппами хитозана, а второй - $V_2(\text{NaOH})$ – на титрование HCl , связанной с аминогруппами хитозана.

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

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

$$v_{\text{теор}} = m / \text{ММ}$$

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

2.2.2. Получение пористых образцов на основе хитозана

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

Впитывающую способность и открытость пор губки проверяли по поглощению ей физиологического раствора (0,9% раствор NaCl), находящегося в контакте с губкой. Для визуализации процесса раствор окрашивали бриллиантовым зеленым. Губку погружали в раствор на 5 мм. Через определенные промежутки времени наблюдали на какую высоту поднимается уровень жидкости и рассчитывали скорость процесса. Степень набухания губки рассчитывали по формуле:

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

Где $m(w)$ – масса набухшей пленки

$m(d)$ – масса сухой пленки

2.2.3. Модификация хитозана энантовым альдегидом

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

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

2.2.4 Синтез салицилата титана

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

2.2.5 MALDI масс-спектроскопия

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

2.2.6 ЯМР-спектроскопия

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали в DMSO-d₆, D₂O, CDCl₃ на спектрометре Bruker ARX 200 на рабочих частотах 200 и 50 МГц соответственно. Химические сдвиги приведены относительно Me₄Si.

2.2.7. Синтез полилактида и поли-ε-капролактона

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

2.2.8. Определение молекулярной массы полиэфиров

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

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

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

2.2.10 Получение пленок

Пленки получали на машине XiamenTMAX-TMH путем полива раствора на лавсановую подложку, предварительно растворы центрифугировали для удаления пузырьков воздуха. Пленки сушили в условиях равномерного испарения при температуре 50°C и атмосферном давлении до постоянной массы. Для перевода хитозана из солевой формы в основную пленки, имеющие в своем составе хитозан погружали на 30 минут в 10% водно-спиртовой (50 - 50 об. %) раствор NaOH, после чего промывали дистиллированной водой до нейтральных значений pH. Затем пленки в вакуумном шкафу до постоянных значений массы.

Физико-механические характеристики образцов в виде пленок определяли на универсальной разрывной машине «ZWICK/ROELLZ005» (Германия) Испытания проводили при скорости растяжения 10 мм/мин на образцах толщиной 60 ± 5 мкм в виде прямоугольников шириной 15 мм. Для каждого состава пленок измеряли не менее 10 образцов.

2.2.11. Исследование структуры образцов

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

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

Пористость, размер и распределение пор образцов определяли, используя ртутный интрузионный порометр Pascal 140 and 440 (ThermoFisherScientific, Rodano, Italy). Использование уникального ультрамакропористого dilatометра делает возможным анализ пор в размере от 3.6 нм до 1200 мкм. Для измерений, образцы нарезались на маленькие части (100-200 мг). Эксперименты выполнены в Институте металлоорганической химии РАН к.х.н. Ковылиным Р.С.

2.2.12. Изучение смачиваемости

Изменение смачиваемости образцов исследовали по изменению краевого угла смачивания их поверхности водой с помощью цифрового USB-микроскопа Levenhuk DTX 30 (увеличение в 200 раз). Образцы помещали на ровную поверхность в специально сконструированную ячейку. На поверхность плёнки наносили каплю воды объёмом 1 мкл. Микроскоп позволял сфотографировать каплю, а программное обеспечение к данному микроскопу – определить размеры капли: высоту (h) и диаметр основания (d). Значение косинуса краевого угла смачивания (θ) рассчитывали по формуле:

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

2.2.13. Исследование теплофизических свойств композиций

Теплофизические свойства образцов в области температур 0–350°C изучали с использованием дифференциального сканирующего калориметра DSC 204 F1 Phoenix (NETZSCH Gerätebau, Германия). Измерения проводили в атмосфере аргона при скорости нагревания 5°C/мин. Проверку надежности работы калориметра осуществляли посредством стандартных калибровочных экспериментов по определению термодинамических характеристик плавления. Было установлено, что аппаратура и методика ДСК-измерений позволяют определять

температуры фазовых превращений с погрешностью $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. 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 ± 0.1 мкг. Методика проведения ТГ-анализа стандартная, согласно Netzsch Software Proteus. За температуру начала разложения принимали температуру, соответствующую потере массы 2 %.

2.2.14. Исследование клеточной адгезии

Были исследованы адгезия и цитотоксичность на поверхности пленок при культивировании фибробластов человека клеточной линии hTERT BJ-5ta. Пленки материала, после стерилизации автоклавированием при температуре 110°C , помещали в лунки планшета для культивирования клеток и заполняли 500 мкл среды DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium). Клетки высевали на поверхность пленки с плотностью $1.6 \times 10^5/\text{см}^2$ и культивировали в течение 24 часов. Визуализацию клеток и оценку их жизнеспособности оценивали методом люминесцентной микроскопии. В качестве красителя для окрашивания фибробластов использовали 2×10^{-4} мас. % раствор акридина оранжевого в фосфатном буфере. Этот краситель путем интеркаляции или электростатического притяжения избирательно взаимодействует с ДНК и РНК, расположенными в ядре и митохондриях клетки, соответственно. Это позволяет оценить общее состояние клеток - активность, пролиферацию и апоптоз. Микросэмплирование пленок проводили на инверторном микроскопе Olympus IX71 (Япония / Германия) с использованием «зеленого» фильтра (эмиссия 510–555 нм, возбуждение 460 – 495 нм), что позволяет визуализировать зеленый цвет ядра живых клеток

2.2.15. Оценка цитотоксичности – МТТ-тест

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

Для тестирования использовали культуру 4 пассажа. Перед вводом в эксперимент клетки культуры представляли собой конфлюэнтный монослой, сформированный клетками преимущественно веретеновидной формы с выраженными отростками, плотными ядрами. Жизнеспособность клеток составляла 98%. Фенотип клеток был типичен для клеток мезенхимального ряда: CD90+, CD105+, CD73+, CD 10+, CD 34-, CD 45-, CD14-, CD HLA-DR-.

Первоначально оценивали уровень цитотоксичности пленок, сформированных на основе тройной системы (хитозан-поликапролактон-полилактид). Для оценки цитотоксичности использовали стандартный МТТ-тест. Для получения экстрактов испытуемые образцы заливали средой DMEM с добавлением 2%-ной эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина и 1% антибиотиков (пенициллина-стрептомицин) и помещали в инкубатор на 1 сутки и на 7 суток при стандартных условиях (37°C, 5% CO₂, увлажненная атмосфера). Клетки тестовой культуры засеивали в лунки плоскодонного 96 луночного планшета в количестве 10×10^3 кл/см² и культивировали в стандартных условиях в течение 24 часов. Через 24 часа ростовую среду над клетками заменяли 1-суточным и/или 7-суточным экстрактом испытуемых образцов в нескольких разведениях (0:1 – контроль; 1:0; 1:1; 1:2; 1:3 и 1:4 –

экстракт : ростовая среда, соответственно) и культивировали ещё 72 часа при стандартных условиях. Затем, в каждую лунку планшета добавляли рабочий раствор МТТ (5 мг/мл), и после 3 часов инкубации среду с МТТ полностью заменяли на ДМСО. Через 30 минут регистрировали оптическую плотность (ОП) на планшетном ридере TECAN (Sanrais, Austria) при длине волны 540 нм. Интенсивность роста клеток (ОИР) определяли по следующей формуле:

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

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

Таблица 1. Ранговая шкала оценки цитотоксичности.

Относительная интенсивность роста (ОИР,%)	Уровень (ранг) цитотоксичности
100	0
75 – 99	1
50 – 74	2
25 – 49	3
1 – 24	4
0	5

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

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

Для исследования образцы тестируемого материала помещали в лунки плоскодонного 24-луночного планшета, а на их поверхность высевали тестовую культуру с плотностью 2×10^4 кл/см² и культивировали в стандартных условиях. Для каждого срока исследования брали по 3 образца исследуемого материала. В качестве контроля использовали клетки той же культуры, культивируемые на пластике. Через 1, 3 и 7 суток клетки на

поверхности образцов и клетки в контрольных лунках окрашивали флуоресцентными красителями. Для визуализации ядер использовали флуорохром Hoechst 3334 (BD Pharmingen™), отличающийся специфичностью к двухцепочечной молекуле ДНК (максимумы возбуждения/эмиссии 377/447 нм). Для маркировки погибших клеток использовали TO-PRO™3 Ready Flow™ (Invitrogen, USA), специфически окрашивающий только ядра мертвых клеток (максимумы возбуждения/эмиссии 642/661 нм). Визуализацию и видеоархивирование проводили на цифровом имиджере Cytation™5 (Biotec, USA). С каждого образца делали не менее 10 микрофотографий. Используя полученные микрофотографии, проводили количественный анализ с подсчетом общего количества ядер клеток, количества ядер мертвых клеток и последующим их пересчётом на 1мм².

2.2.16. Исследование биосовместимости и биоразлагаемости композиций

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

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

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

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

Биосовместимость оценивали по отсутствию или наличию фиброзной капсулы вокруг имплантата.

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

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

3. Результаты и обсуждение

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

3.1. Получение трехмерных пористых образцов на основе хитозана

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

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

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

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

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

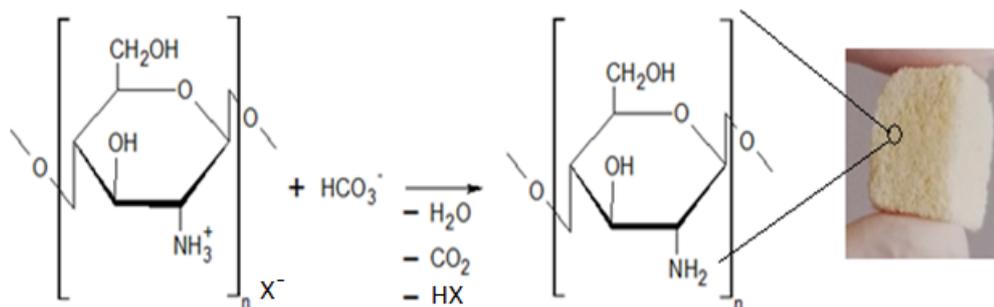


Рис. 12. Схема реакции взаимодействия солевой формы хитозана с гидрокарбонатом

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

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

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

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

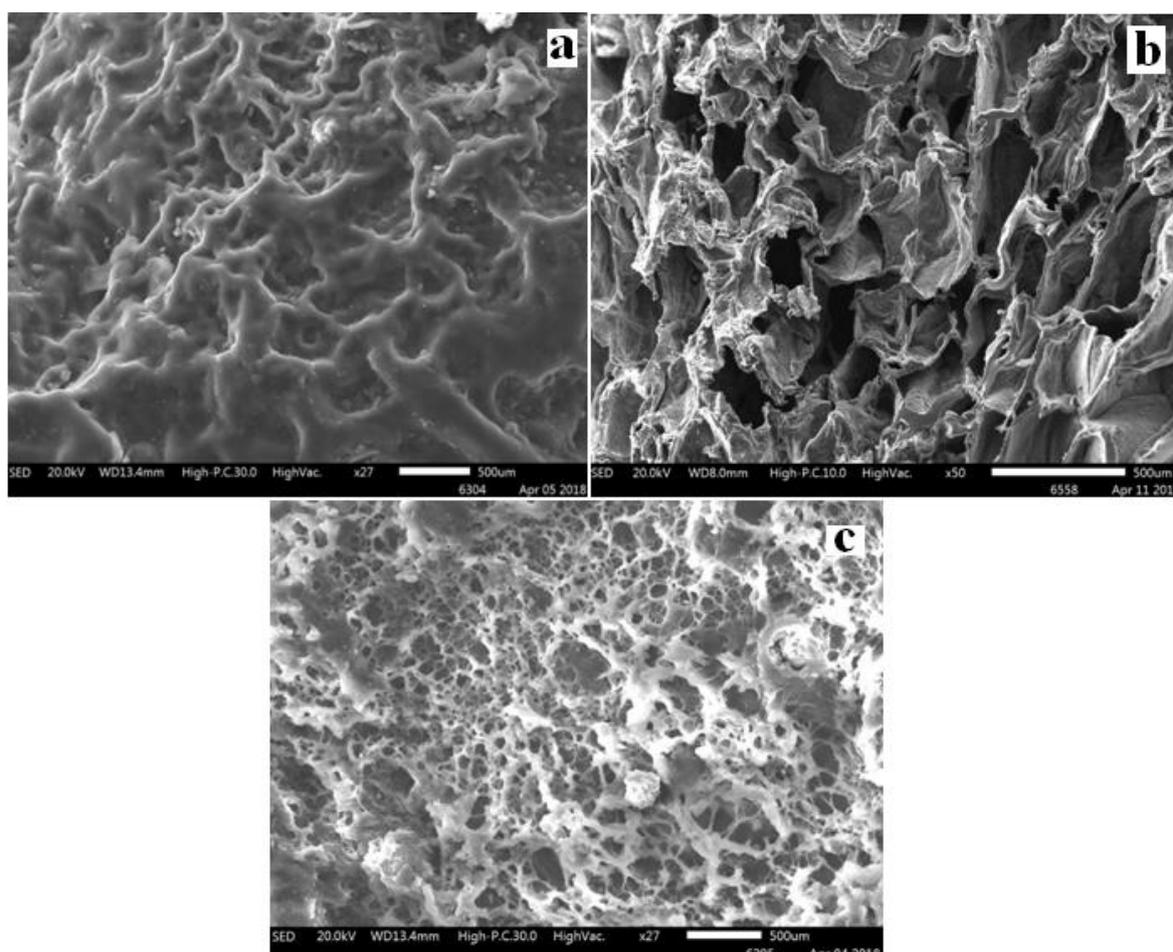


Рис. 13. Микрофотографии губок из а – из ацетата хитозана; б – хлорида хитозана; с – лактата хитозана.

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

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

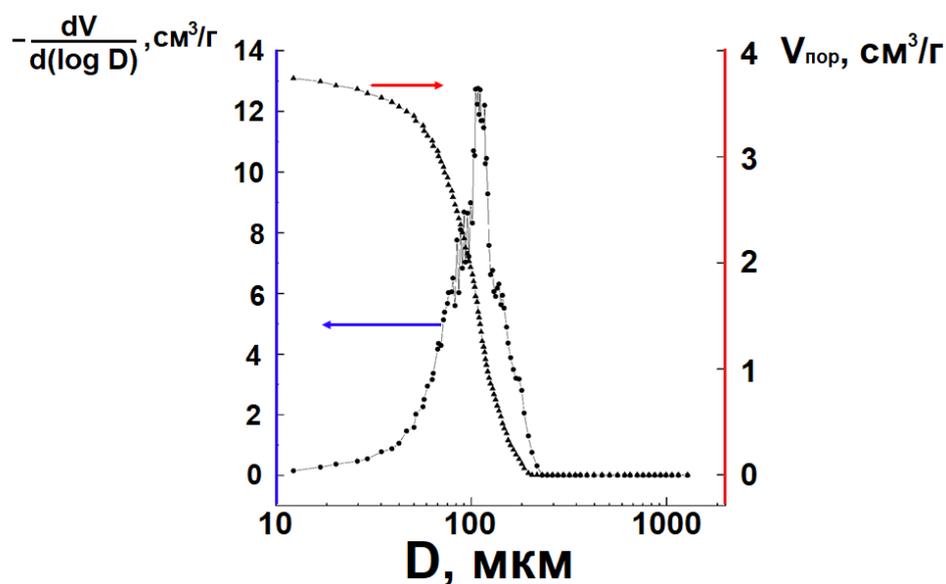


Рис.14. (а) Кривые инфузий для образца, полученного при взаимодействии гидрокарбоната натрия и хитозана.

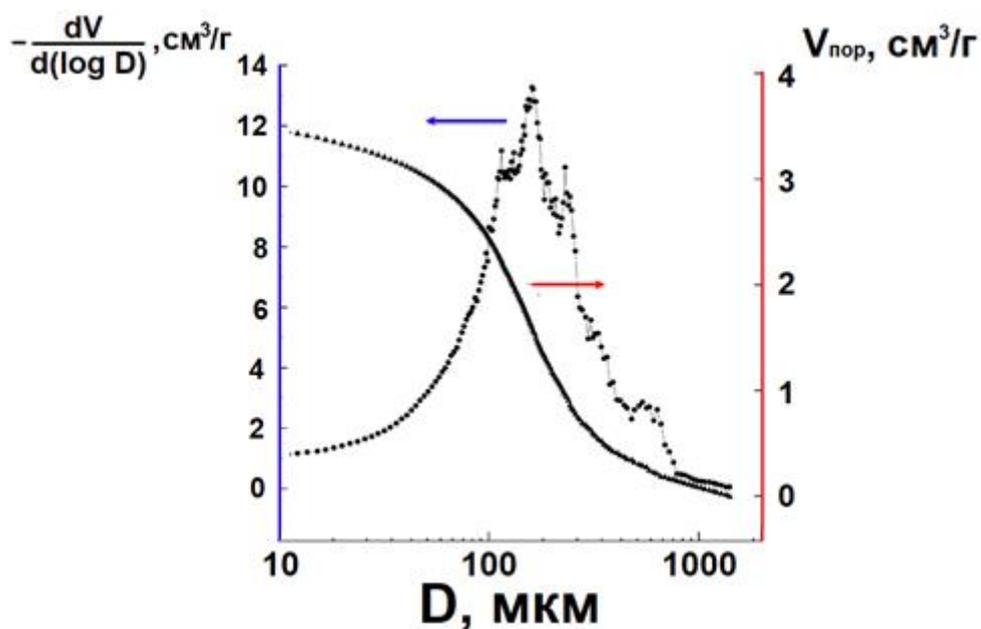


Рис.14. (б) Кривые инфузий для образца, полученного при взаимодействии гидрокарбоната калия и хитозана.

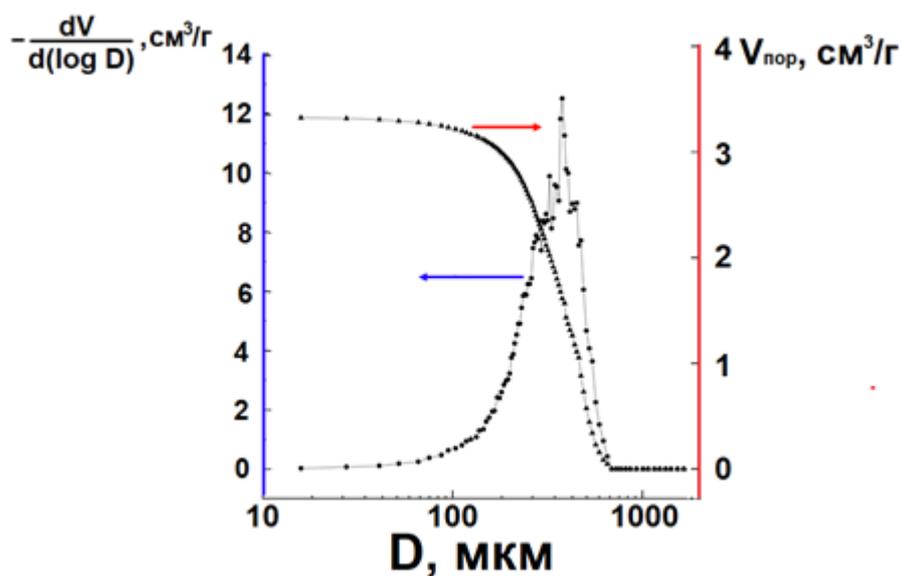


Рис.14. (в) Кривые инфузий для образца, полученного при взаимодействии гидрокарбоната аммония и хитозана.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Биоразлагаемость оценивали по изменению массы образцов (табл.3).

Материал имплантировали в межлопаточную область спины крыс и наблюдали уменьшение массы через 1, 2 и 3 недели соответственно

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

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

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

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

Таблица 4.1. Показатели крови крыс через неделю после введения имплантата

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

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

Показатели	Контроль	Группа 1	Группа 2
Лейкоциты($\times 10^9$ кл/л)	8.80 \pm 2.48*	9.50 \pm 0.14*	11.58 \pm 0.96
Лимфоциты %	62.36 \pm 3.64*	52.15 \pm 3.06	63.2 \pm 2.10*
Моноциты %	10.8 \pm 1.27	12.5 \pm 0.4*	9.1 \pm 0.13
Нейтрофилы %	26.23 \pm 3.70*	34.05 \pm 1.74**	25.45 \pm 1.11*
Эозинофилы %	0.6 \pm 0.4*	1.25 \pm 0.94	2.25 \pm 0.85**
Эритроциты($\times 10^{12}$ кл/л)	5.76 \pm 0.43	5.72 \pm 0.34	6.26 \pm 0.31*
Гемоглобин (г/л)	125.62 \pm 11.86	130.8 \pm 3.76 *	137.6 \pm 4.76 *

Показатели крови интактных животных см.табл. 4.1

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

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

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

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

Таким образом, разработан новый метод получения трехмерных пористых объектов на основе хитозана. Полученный матрикс является биоразлагаемым, биосовместимым и гипоаллергенным и характеризуется микроструктурой сходной с пористыми структурами, полученными методом лиофилизации. Разработанный метод может составить конкуренцию лиофилизации и для получения трехмерных пористых структур на основе хитозана.

3.2. Модификация хитозана энантовым альдегидом

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

относительно нетоксичным ($LD_{50} = 3200$ мг/кг) и коммерчески более доступным продуктом, по сравнению с альдегидами с алкильным заместителем (C_5-C_{10}).

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

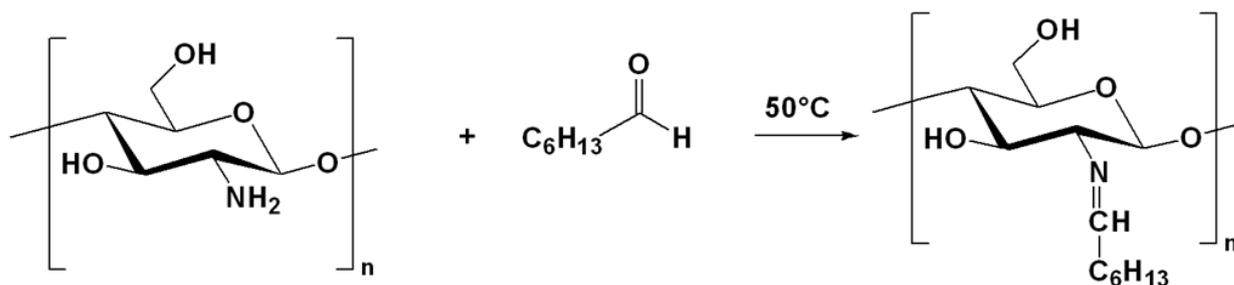


Рис. 15. Схема реакции нуклеофильного присоединения энантового альдегида к аминогруппе хитозана с образованием основания Шиффа.

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

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

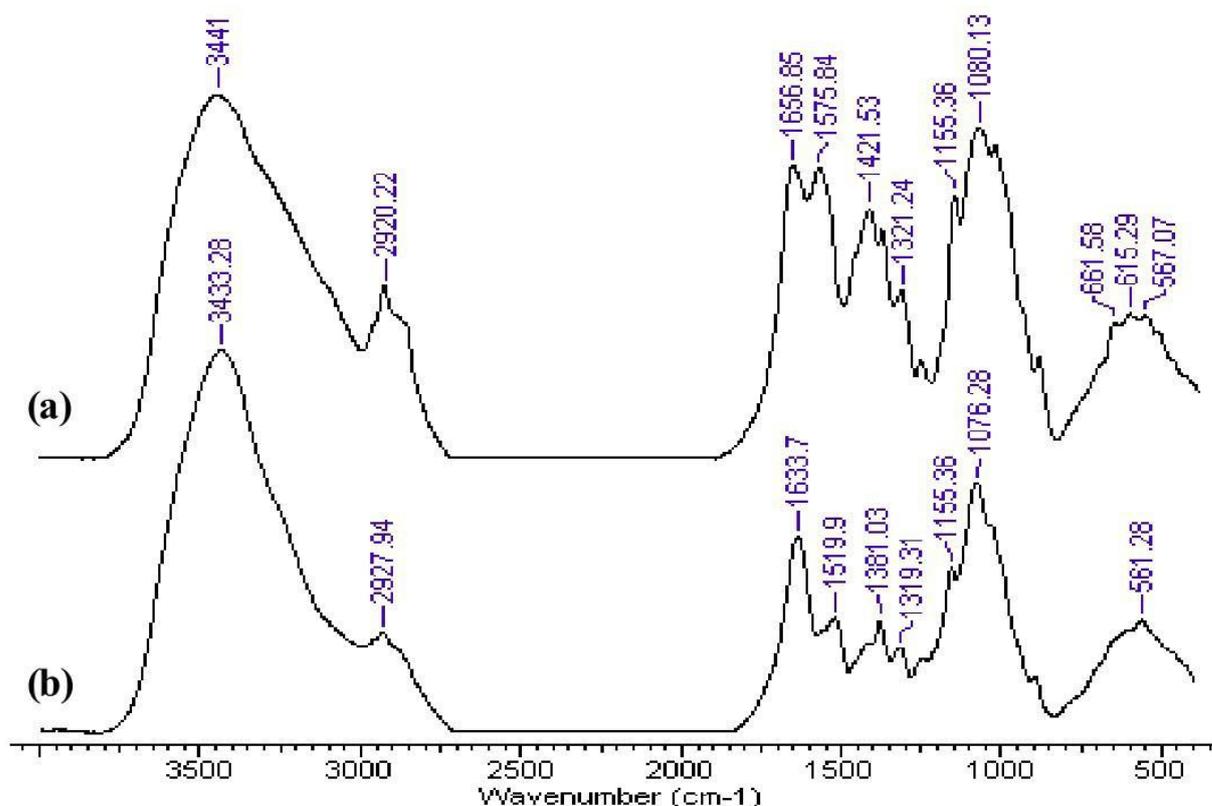


Рис.16. ИК-спектры хитозана (а) и хитозана, модифицированного энантиомерным альдегидом (б).

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

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

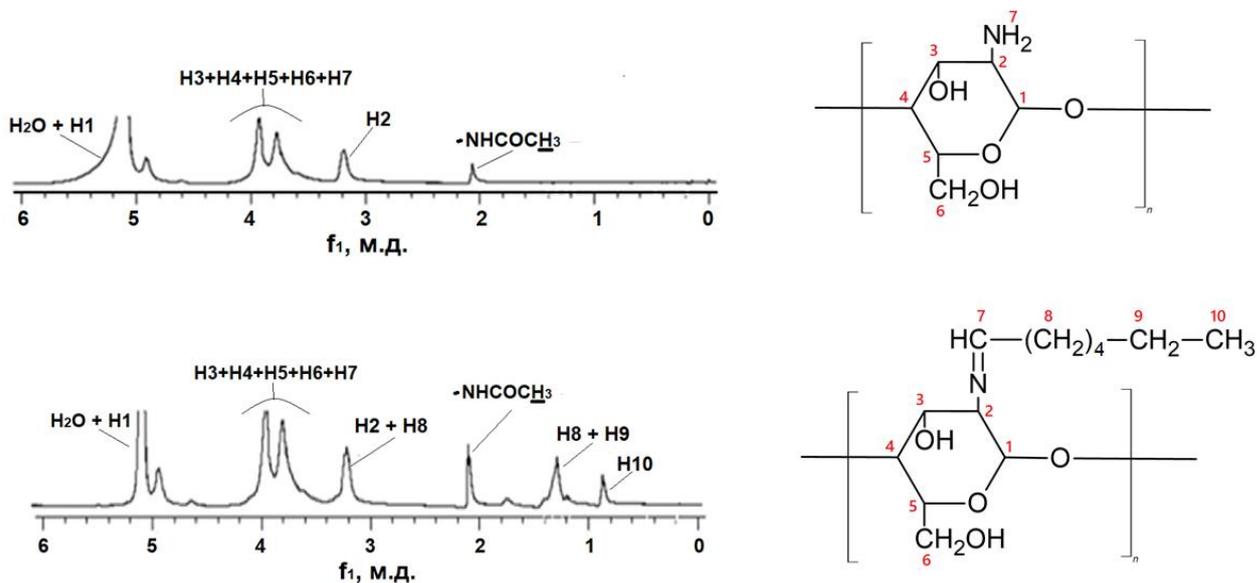


Рис.17. ЯМР-спектр (А) исходного хитозана и (В) модифицированного хитозана

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

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

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

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

Таблица 5. Результаты элементного CHNS-анализа образцов

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

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

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

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

Таблица 6. Степень влагопоглощение пленок на основе хитозана

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

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

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

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

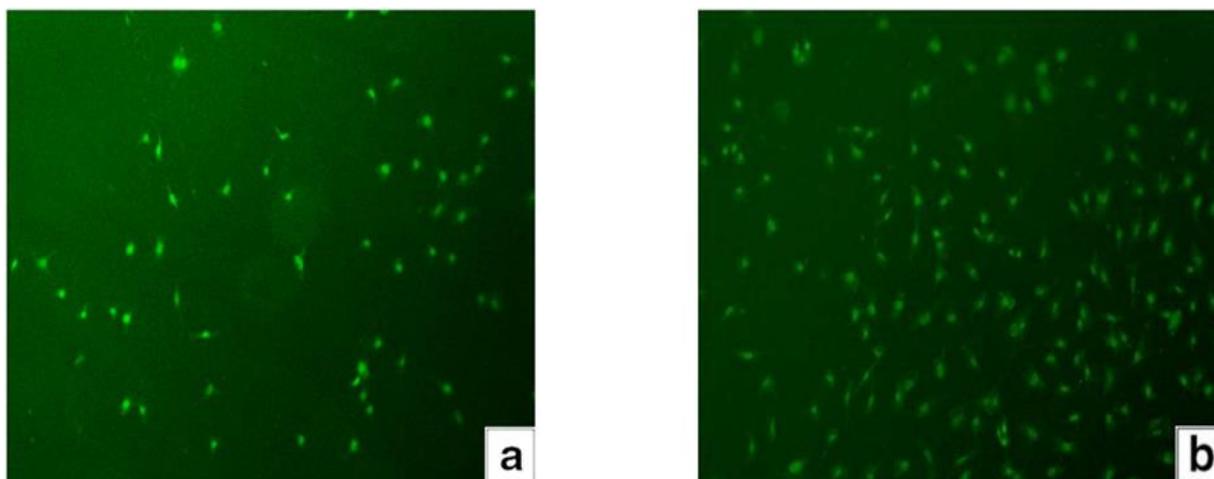


Рис. 18. Фотографии пленок, заселенные фибробластами через 24ч. (а) – пленка из чистого хитозана, (б) – пленка из хитозан-М3

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

Таблица 7.1. Механические характеристики пленок хитозана и модифицированного хитозана.

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

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

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

Таблица 7.2. Механические характеристики и влагопоглощение трехмерных пористых композиций.

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

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

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

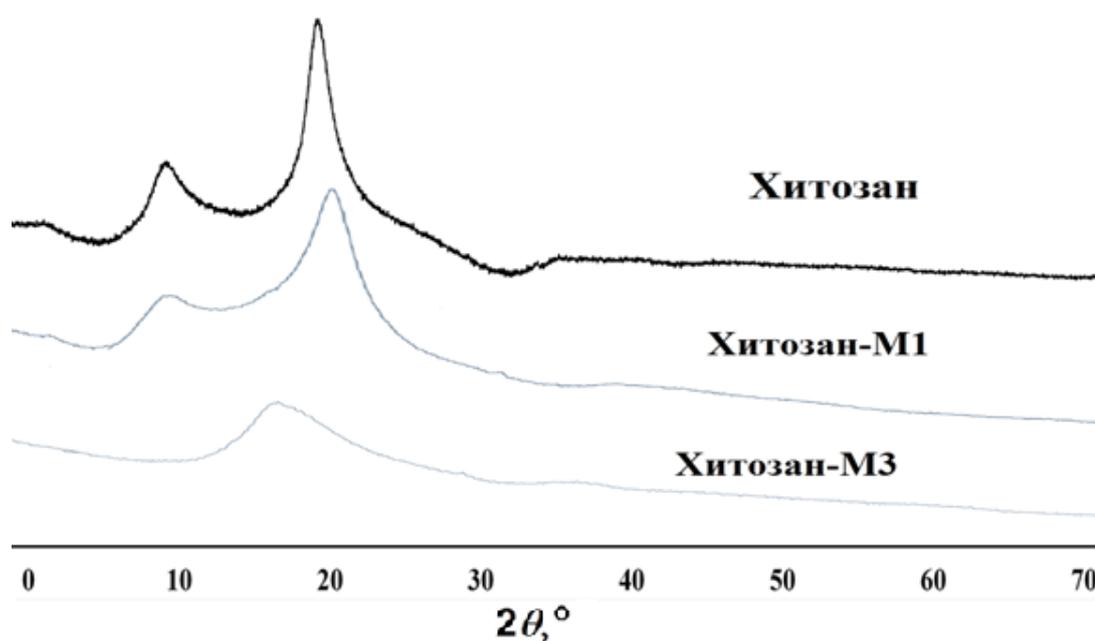


Рис.19. Рентгенофазовый анализ образцов

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

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

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

3.3. Синтез полиэфиров

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

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

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

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

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

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

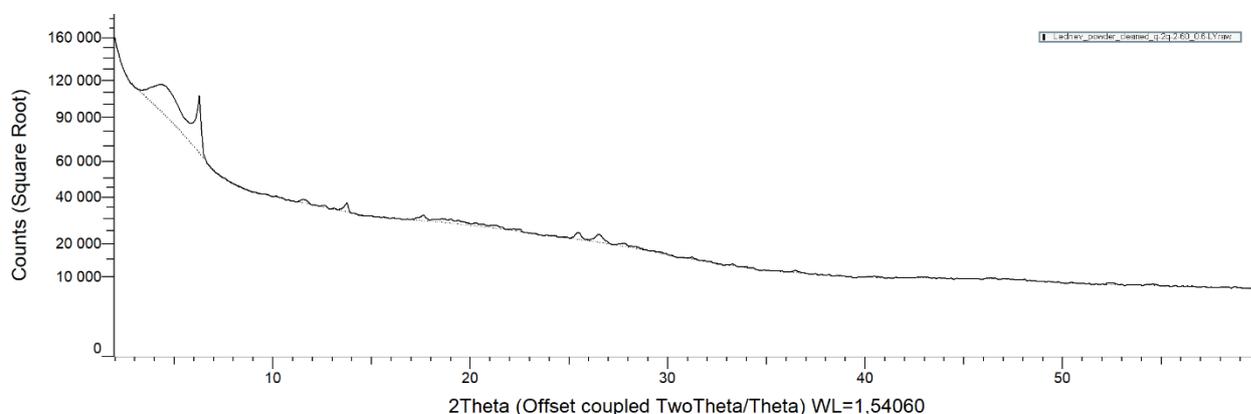


Рис.20. Рентгенограмма салицилата титана

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

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

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

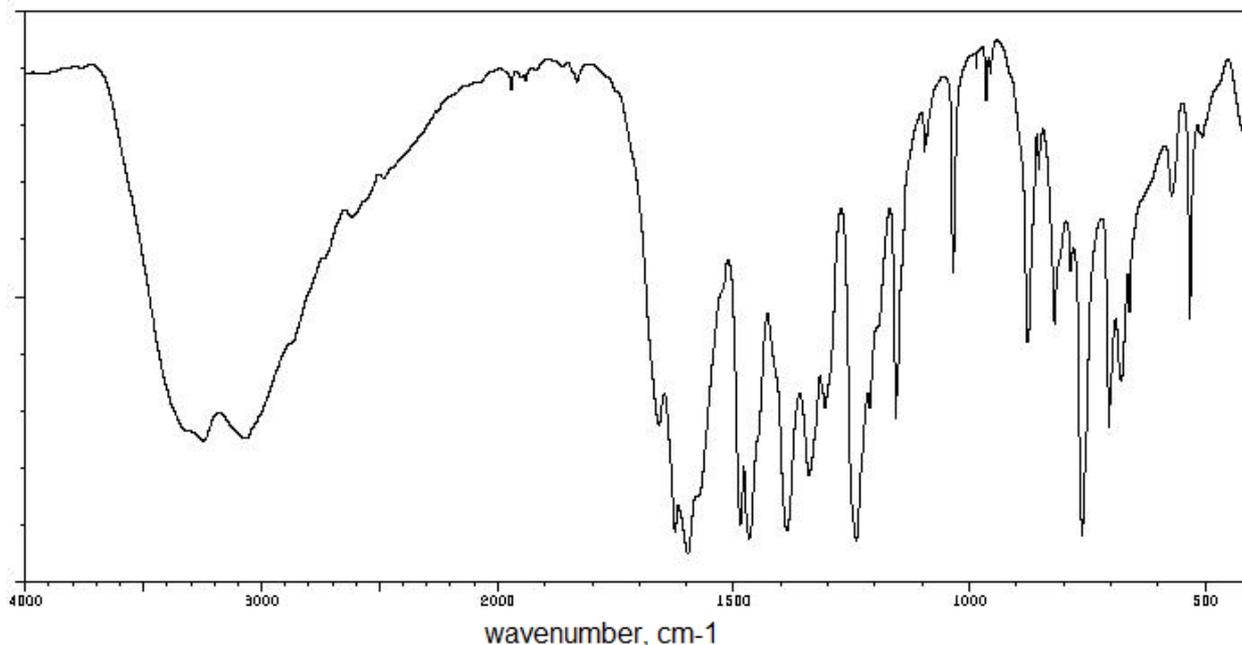


Рис.21. ИК-спектр салицилата титана

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

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

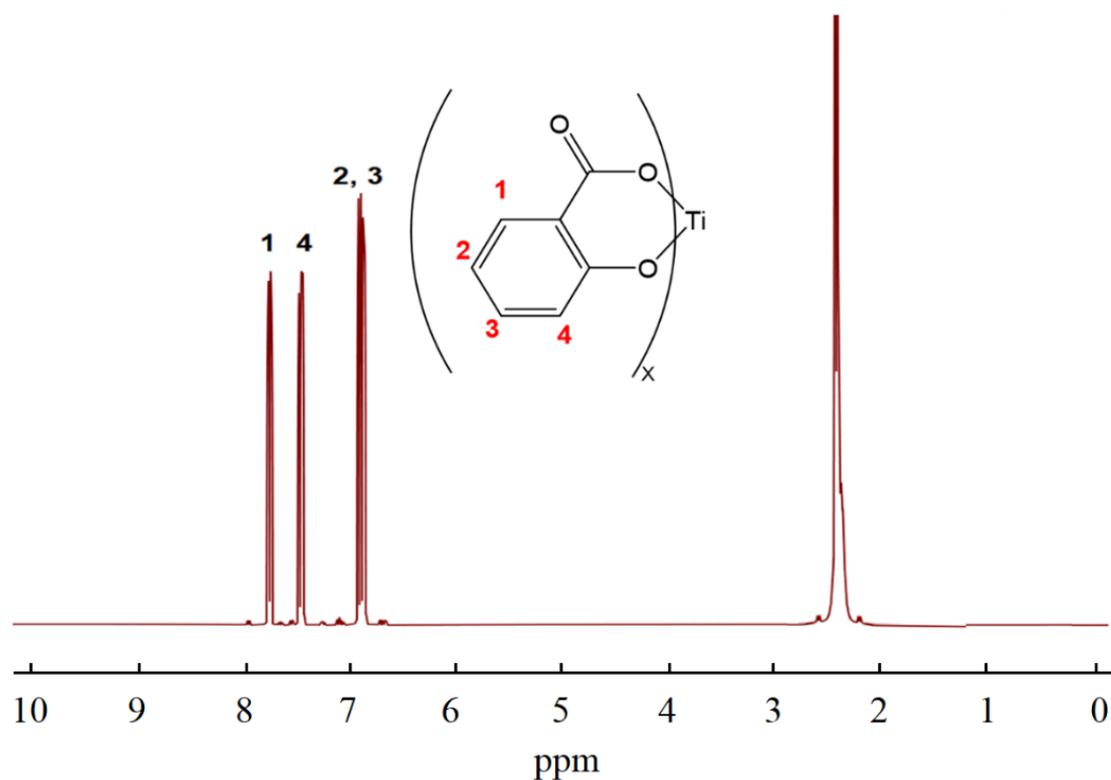


Рис.22. ЯМР-спектр салицилата титана

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

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

Таблица 8. Результаты элементного анализа комплекса

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

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

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

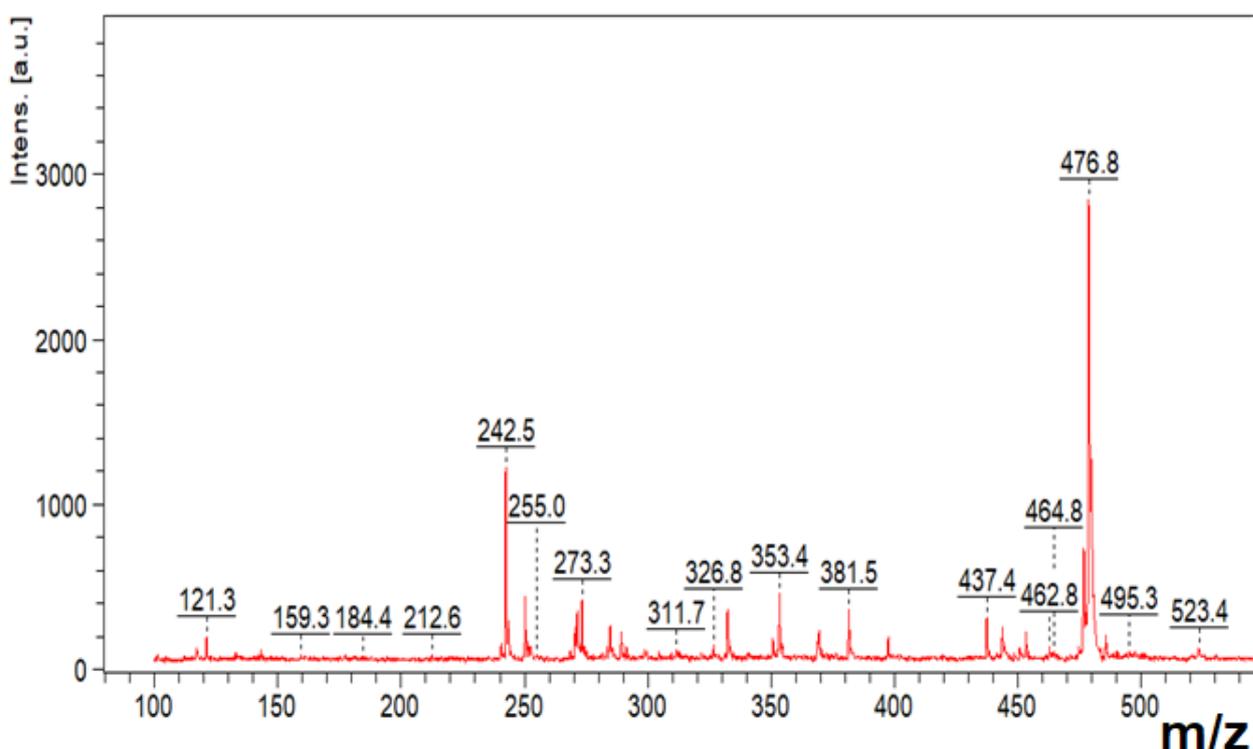


Рис. 23. MALDI-спектр салицилата титана

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

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

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

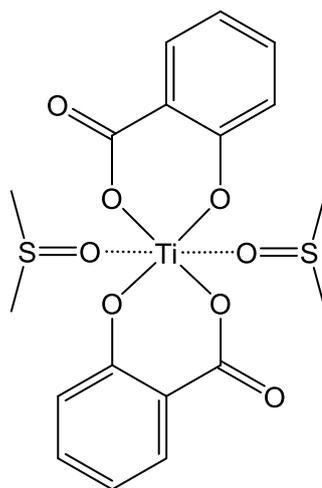


Рис.24. Предполагаемая структура катализатора

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

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

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

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

Таблица 9. Молекулярно-массовые характеристики получаемых полимеров

Мономер (М)	[Катализатор] : [М]	Mw, * 10 ⁻³	Mn, * 10 ⁻³	Mw/Mn
D, L- лактид	1:50	83,8	66,1	1,27
D, L- лактид	1:100	78,9	64,6	1,24
D, L- лактид	1:200	74,3	62,4	1,29
ε-капролактон	1:50	82,7	65,9	1,25
ε-капролактон	1:100	77,5	64,0	1,21
ε-капролактон	1:200	73,2	61,3	1,3
L - лактид	1:50	89,6	75,9	1,18
L - лактид	1:100	86,3	70,7	1,22
L - лактид	1:200	78,7	68,4	1,15

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

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

Таблица 10. Молекулярно-массовые характеристики в процессе синтеза полиэфиров

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

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

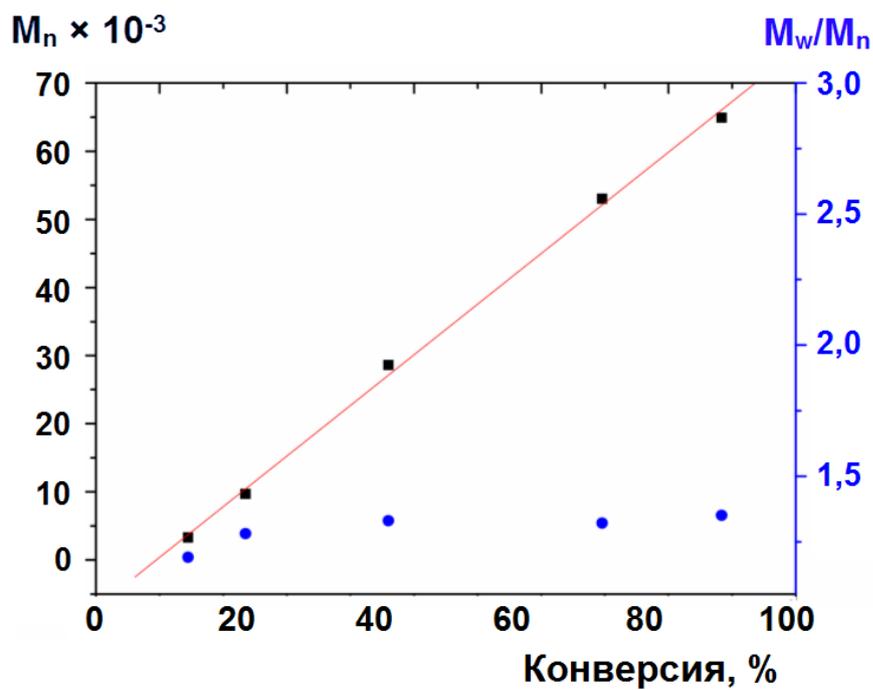


Рис.25.1. Зависимость среднечисловой молекулярной массы поли-D, L-лактида от конверсии

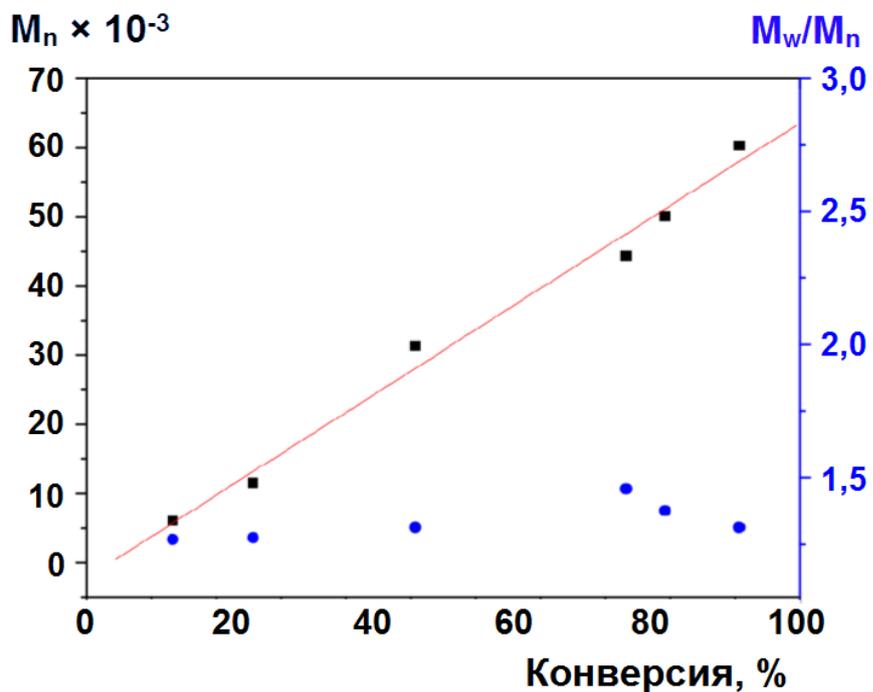


Рис.25.2 Зависимость среднечисловой молекулярной массы поли-капролактона от конверсии

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

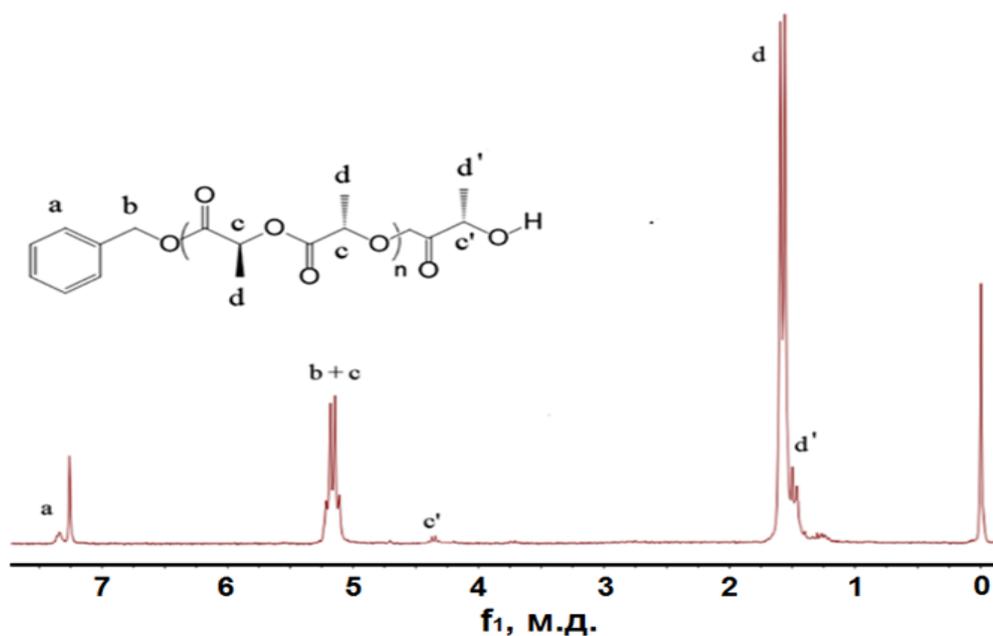


Рис.26.1. ЯМР-спектр полилактида

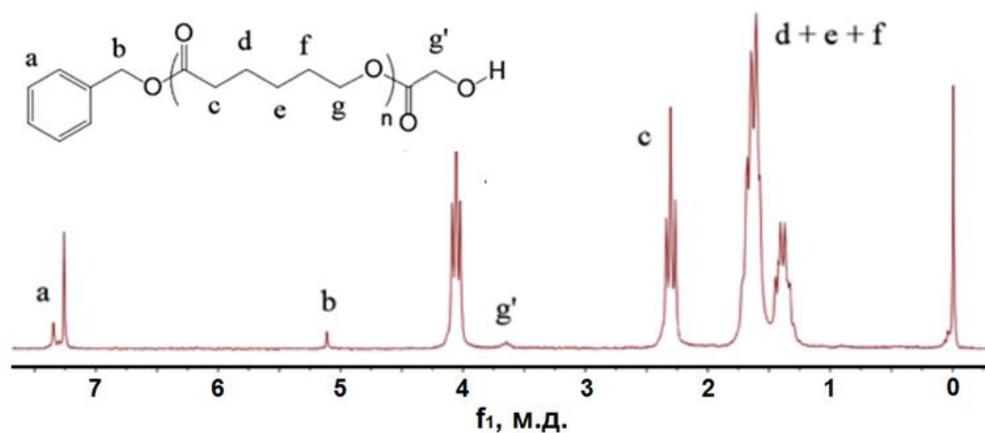


Рис.26.2. ЯМР-спектр поликапролактона

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

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

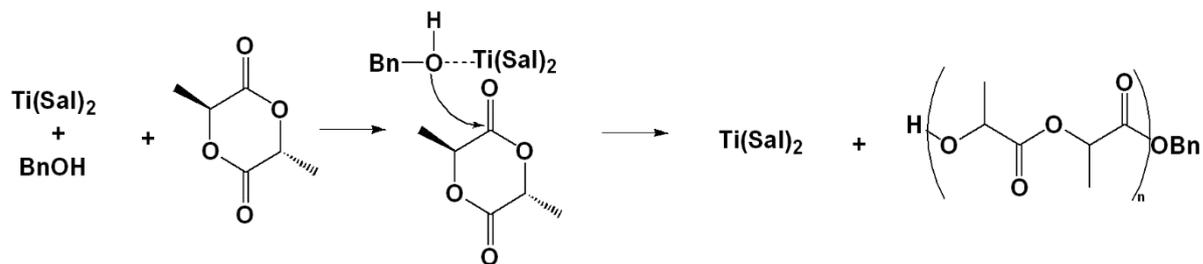


Рис.27. Схема реакции полимеризации

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

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

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

Таблица 11. Результаты поляриметрии полилактида

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

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

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

3.4. Получение ДМСО-растворимой формы хитозана и смесевых композиций

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

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

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

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

Таблица 12. Соотношения полимеров в композитах

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

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

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

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

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

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

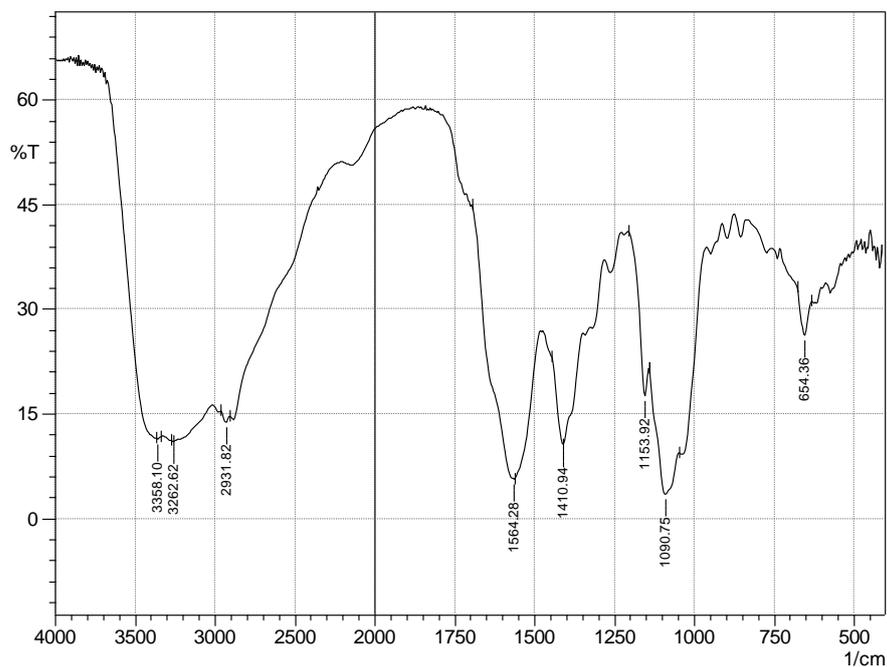


Рис.28.1. ИК-спектр исходного порошка хитозана

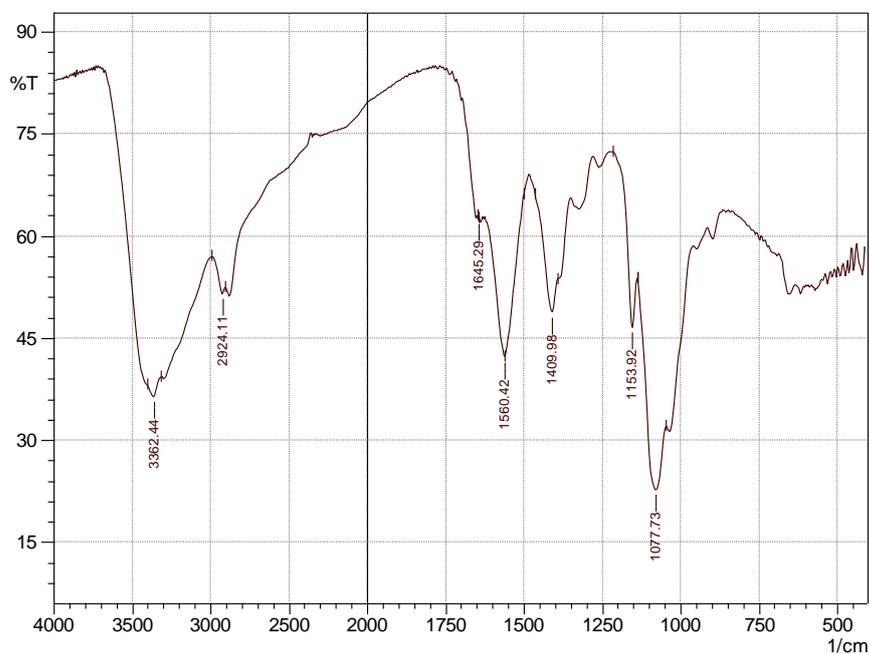


Рис.28.2. ИК-спектр пленки основной формы хитозана, полученной из раствора ДМСО-салициловая кислота

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

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

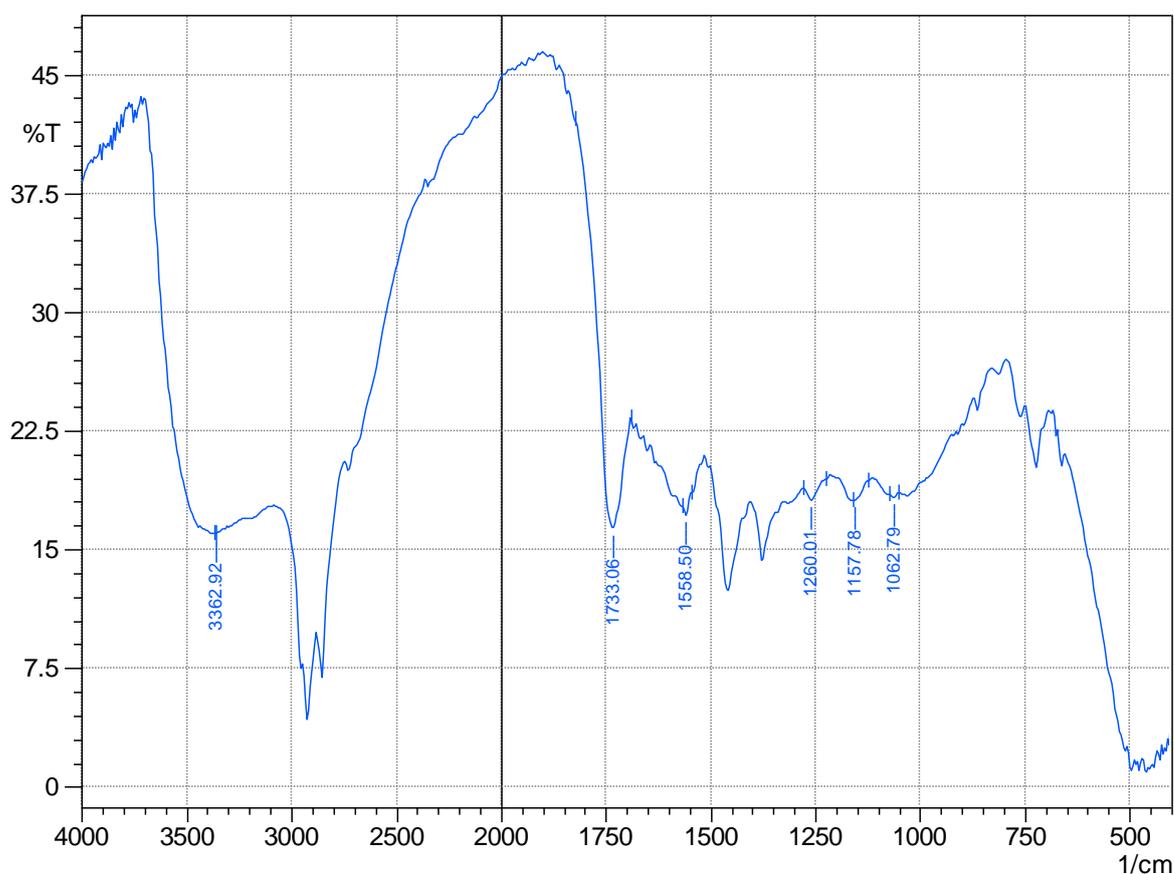


Рис.29.1. ИК-спектр смесевой композиции ХТЗ:ПЛА (1:2)

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

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

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

1157.78 см^{-1} - Полоса растяжения $\text{C}-\text{O}$, связана с колебаниями связи $\text{C}-\text{O}$ в сложноэфирной группе

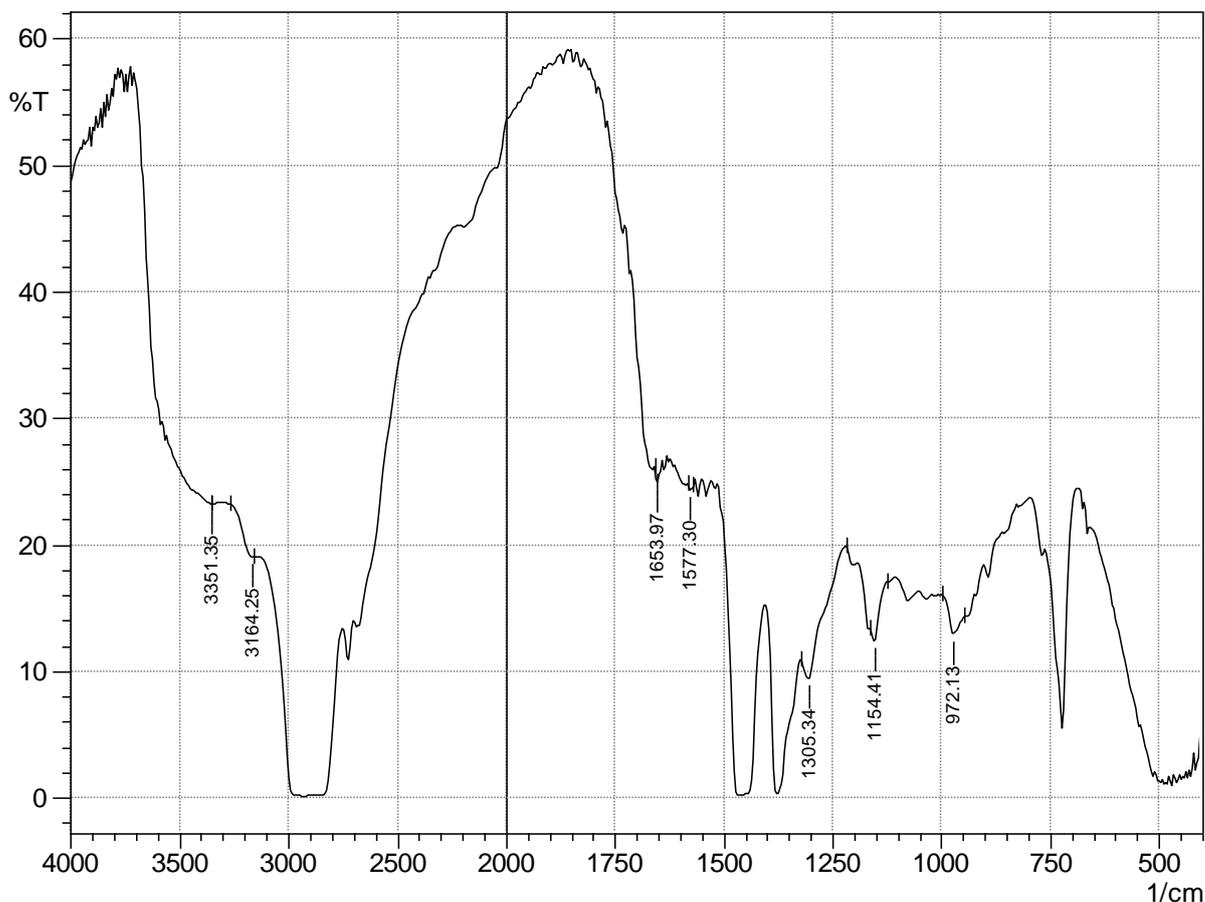


Рис. 29.2. ИК-спектр смесевой композиции ХТЗ:ПКЛ (1:2)

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

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

1154.41 см^{-1} - Колебания $\text{C}-\text{O}$, представляющей сложноэфирную связь в ПКЛ

720 cm^{-1} - Растяжение СС, соответствует колебаниям растяжения связей углерод-углерод (С-С) в цепи ПКЛ

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

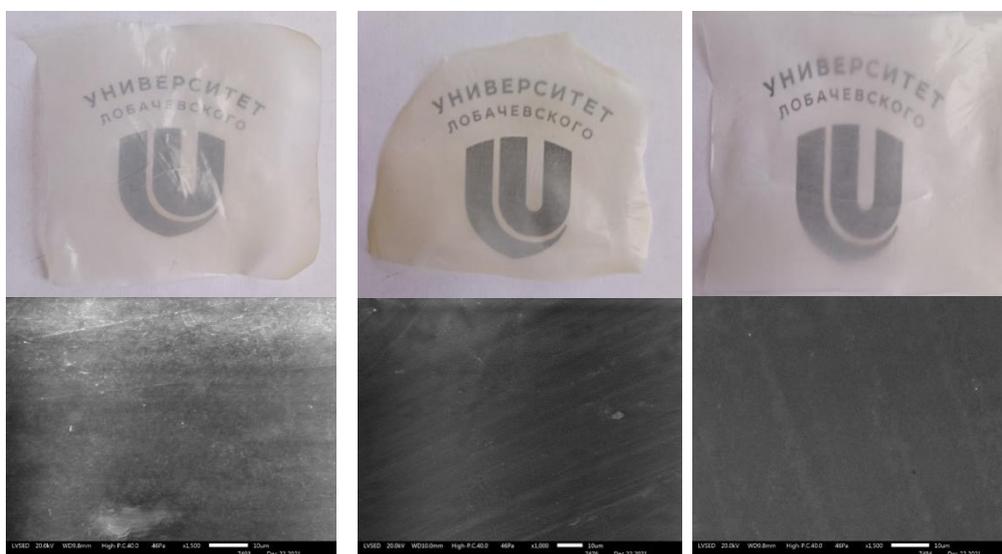


Рис. 30. – Фотографии пленок составов ХТЗ : ПЛА (1:2), ХТЗ : ПКЛ (1:2), ХТЗ : ПЛА : ПКЛ (1:1:1) соответственно

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

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

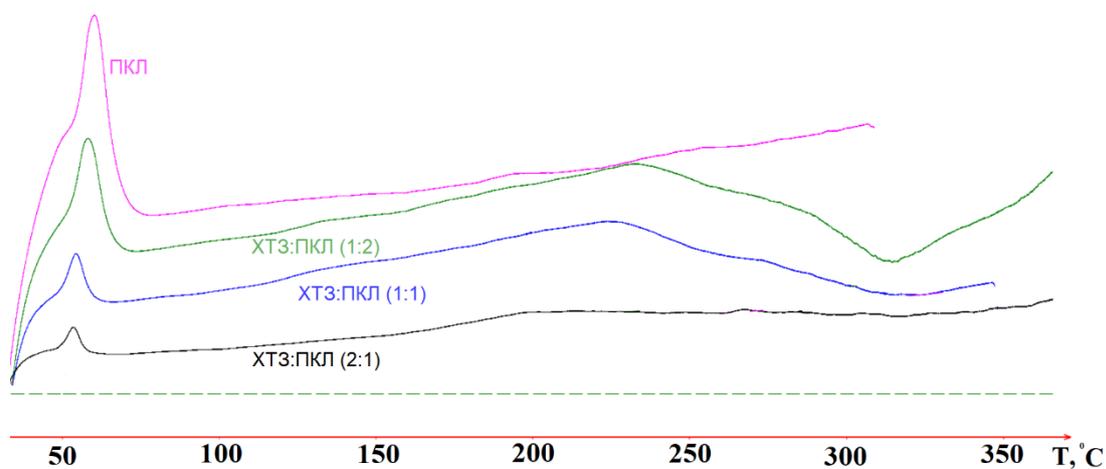


Рис. 31. – ДСК-кривые смесевых композиций хитозана с поликапролактоном

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

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

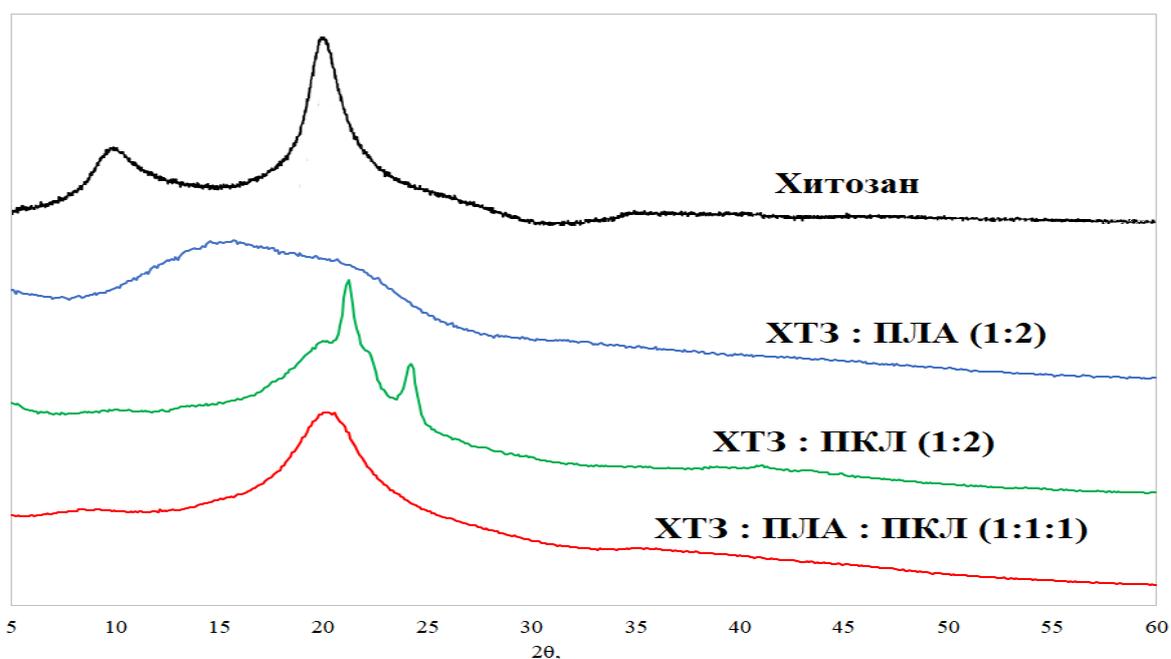


Рис.32. Рентгенофазовый анализ образцов

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

Таблица 13. Физико-механические характеристики образцов

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 14. Значения ПТР для композиций

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

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

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

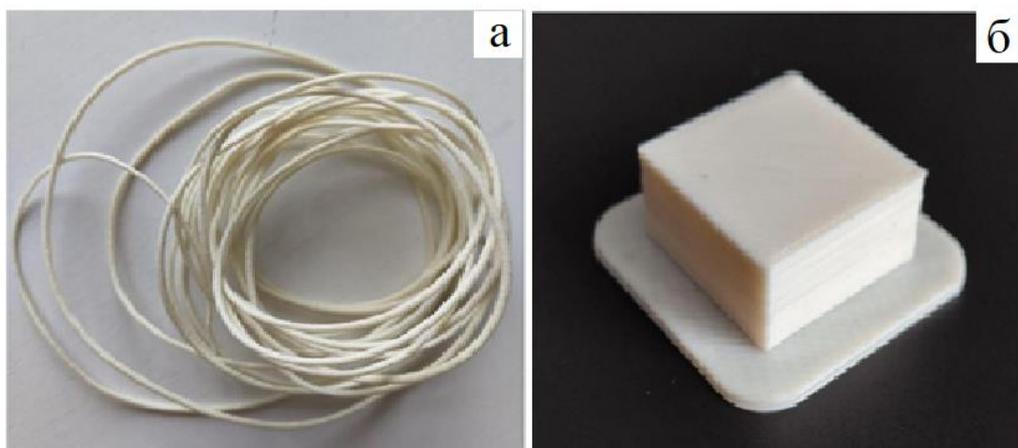


Рис. 33. Фотографии образца филамента состава ХТЗ :ПЛА : ПКЛ (1:1:1) (а), и объемного образца полученного из него (б)

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

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

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

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

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

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

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

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

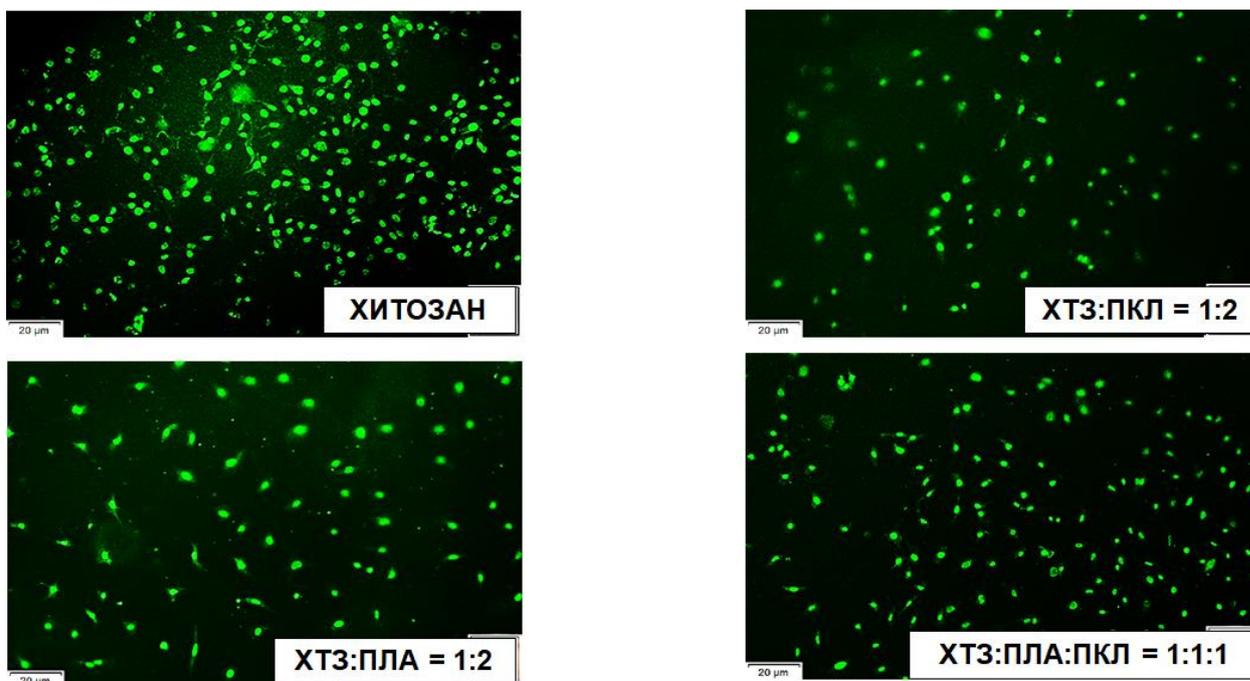


Рис. 34. Фотографии пленок после 24 часов инкубации клеток

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Количество погибших клеток на всех тестируемых образцах составляет не более 2% и не отличается от контроля на пластике для всех временных точек в первые 14 дней культивирования. Низкий процент погибших клеток свидетельствует об отсутствии токсического влияния материалов на них. Также показано, что клетки на всех образцах не прекращают пролиферировать по крайней мере в первые 14 дней культивирования.

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

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

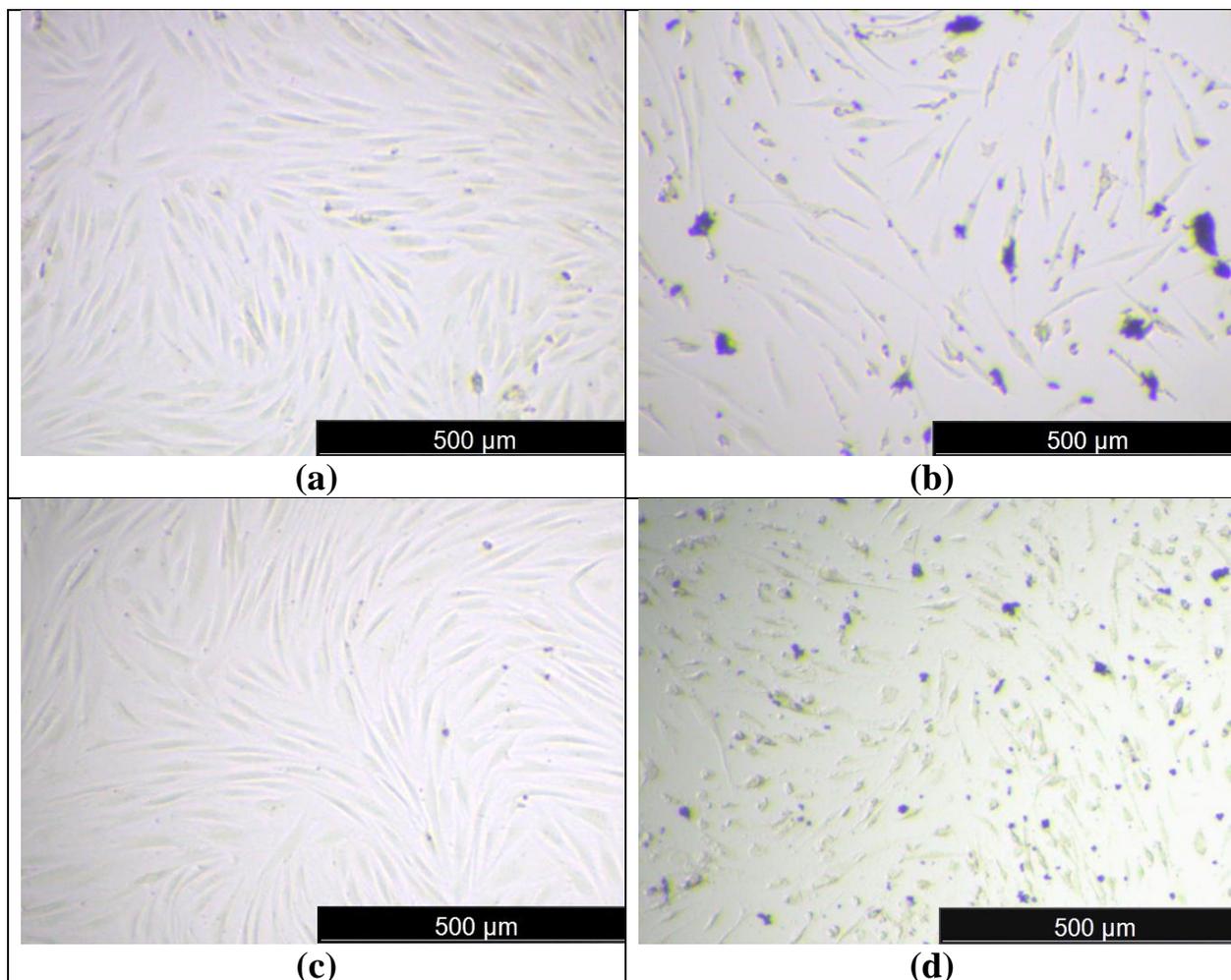


Рис.35. Дермальные фибробласты человека после 72-часовой инкубации с экстрактами. Репрезентативные фотографии: (а, с) – клетки в контрольных лунках; (b) – клетки после взаимодействия с 1-суточным экстрактом, (d) – клетки после взаимодействия с 7-суточным экстрактом.

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

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

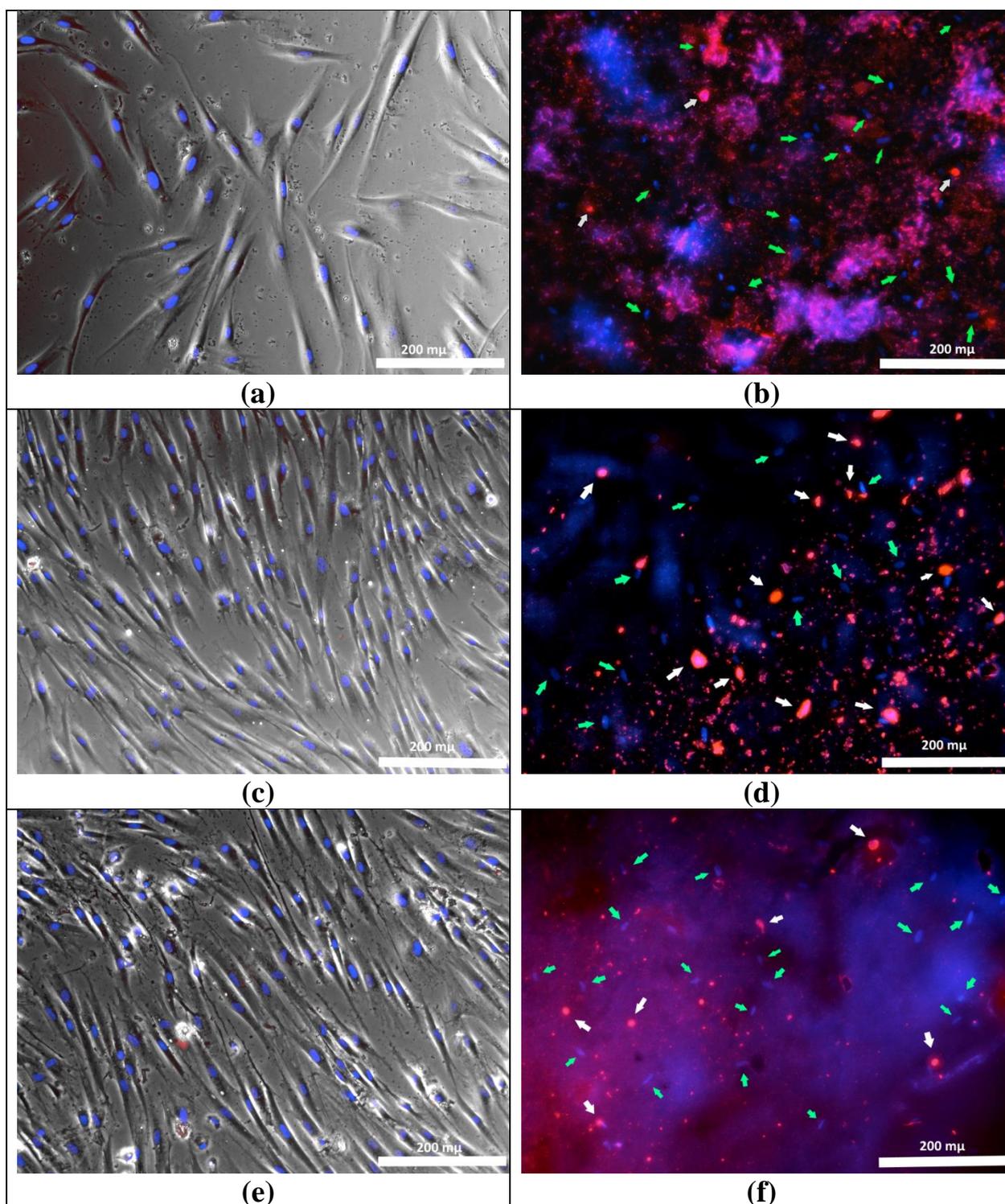


Рис. 36. Оценка жизнеспособности и пролиферативной активности клеток. Репрезентативные фотографии. (a) – контроль 1 сутки, (b) – опыт 1 сутки, (c) – контроль 3 сутки, (d) – опыт 3 сутки, (e) – контроль 7 сутки, (f) – опыт 7

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

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

Таким образом, разработана однородная композиция на основе смеси трех гомополимеров (хитозан – полилактид – поликапролактон), которая обладает высокими механическими свойствами, хорошей биологической активностью, а также термопластичностью, что перспективно для получения изделий методом 3D-печати в регенеративной медицине.

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ХТЗ – хитозан

ПЛА – полилактид

ПКЛ – поликапролактон

МК – молочная кислота

ЭА – энантовый альдегид

ДМСО - диметилсульфоксид

РФА – рентгенофазовый анализ

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

СЭМ – сканирующий электронный микроскоп

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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. Аكوпова, Т. А. Образование хитозана из хитина в условиях сдвиговых деформаций / Т. А. Аكوпова, С. З. Роговина, Г. А. Вихорева, С. Н. Зеленецкий, Л.С. Гальбрайх, 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. Kaur S. Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes: a review / S. Kaur, G.S. Dhillon // *Crit. Rev. Biotechnol.* - 2015. - V. 35 - № 1. -P. 44–61.
12. Jin H. Polysaccharide-based nanocrystals: Chemistry and applications / ed. Huang J., Chang P.R., Lin N., Dufresne A. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, - 2015. - 328 p.
13. Wijesena R.N. A method for top down preparation of chitosan nanoparticles and nanofibers / R.N. Wijesena, N. Tissera, Y.Y. Kannangara, Y. Lin, G.A.J. Amaratunga, K.M.N. De Silva // *Carbohydr. Polym.* - 2015. - V. 117. - P. 731– 738.
14. Lin N. Preparation, properties and applications of polysaccharide nanocrystals in advanced functional nanomaterials: A review / N. Lin, J. Huang, A. Dufresne // *Nanoscale*. - 2012. - V. 4. - № 11. - P. 3274–3294.
15. Scaffaro R. Polysaccharide nanocrystals as fillers for PLA based nanocomposites / R. Scaffaro, L. Botta, F. Lopresti, A. Maio, F. Sutura // *Cellulose*. - 2017. - V. 24. - № 2. - P. 447–478.
16. Cheikh B.F. Chitin nanocrystals as Pickering stabilizer for O/W emulsions: Effect of the oil chemical structure on the emulsion properties / B.F. Cheikh, A.B. Mabrouk, A. Magnin, J.-L. Putaux, S. Boufi // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. - 2021. - V. 200. - P. 111604.
17. Anitha A., Chitin and chitosan in selected biomedical applications / A. Anitha, S. Sowmya, P.T.S. Kumar, S. Deepthi, K.P.P. Chennazhi, H. Ehrlich, M. Tsurkan, R. Jayakumar // *Prog. Polym. Sci.* - 2014. - V. 39. - № 9. - P. 1644–1667.
18. Popa-Nita S. Continuum of structural organization from chitosan solutions to derived physical forms / S. Popa-Nita, P. Alcouffe, C. Rochas, L. David, A. Domard // *Biomacromolecules*. - 2010. - V. 11. - № 1. - P. 6–12.

19. Wei Z. Chitosan nanoparticles as particular emulsifier for preparation of novel pH-responsive Pickering emulsions and PLGA microcapsules / Z. Wei, C. Wang, S. Zou, H. Liu, Z. Tong // *Polymer*. - 2012. - V. 53. - № 6. - P. 1229–1235.
20. Dong Y. Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques / Y. Dong, Y. Ruan, H. Wang, Y. Zhao, D. Bi // *J. Appl. Polym. Sci.* - 2004. - V. 236 93. - № 4. - P. 1553–1558.
21. de Britto D. Kinetics of the thermal degradation of chitosan / D. de Britto, S.P. Campana-Filho // *Thermochim. Acta.* - 2007. - V. 465. - № 1–2. - P. 73–82.
22. Wan Ngah W.S. Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review / W.S. Wan Ngah, L.C. Teong, M.A.K.M. Hanafiah // *Carbohydrate Polymers*. - 2011. - V. 83. - № 4. - P. 1446–1456.
23. Crini G. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature / G. Crini, P.M. Badot // *Progress in Polymer Science*. - 2008. - V. 33. - № 4. - P. 399–447.
24. Zhang L. Removal of heavy metal ions using chitosan and modified chitosan: A review / L. Zhang, Y. Zeng, Z.Cheng // *Journal of Molecular Liquids*. - 2016. - V. 214. - P. 175–191.
25. Venkataraman P. Attachment of a hydrophobically modified biopolymer at the oil–water interface in the treatment of oil spills / P. Venkataraman, J. Tang, E. Frenkel, G.L. McPherson, J. He, S.R. Raghavan, V. Kolesnichenko, A. Bose, V.T. John // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. - 2013. - V. 5. - № 9. - P. 3572–3580.
26. Yang R. A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment / R. Yang, H. Li, M. Huang, H. Yang, A. Li // *Water Research*. - 2016. - V. 95. - P. 59–89.

27. Vunain E. Dendrimers, mesoporous silicas and chitosan-based nanosorbents for the removal of heavy-metal ions: A review / E. Vunain, A. Mishra, B. Mamba // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2016. - V. 86. - P. 570–586.
28. Hosseinnejad M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan / M. Hosseinnejad, S.M. Jafari // *International Journal of Biological Macromolecules.* - 2016. - V. 85. - P. 467–475.
29. Sahariah P., Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: A review of the structure–activity relationship / P. Sahariah, M. Másson // *Biomacromolecules.* - 2017. - V. 18. - № 11. - P. 3846–3868.
30. Arfin T. Chitosan and its derivatives: overview of commercial applications in diverse fields / T. Arfin // *Chitosan.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., - 2017. - P. 115–149.
31. 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; Опубл. 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. Cheung R. Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications / R. Cheung, T. Ng, J. Wong, W. Chan // *Mar. Drugs*. - 2015. - V. 13. - № 8. - P. 5156–5186.
41. Saravanan S. Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering / S. Saravanan, R.S. Leena, N. Selvamurugan // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2016. - V. 93. - P. 1354–1365.
42. Ahmed S. Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing / S. Ahmed, S. Ikram // *Achiev. Life Sci.* - 2016. - V. 10. - № 1. - P. 27–37.
43. Kim I.Y. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications / I.Y. Kim, S.J. Seo, H.S. Moon, M.K. Yoo, I.Y. Park, B.C. Kim, C.S. Cho // *Biotechnol. Adv.* - 2008. - V. 26. - № 1. - P. 1–21.

44. Casettari L. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs / L. Casettari, L. Illum // *Journal of Controlled Release*. - 2014. - V. 190. - P. 189–200.
45. Huang M. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation / M. Huang, E. Khor, L.- Y. Lim // *Pharm. Res.* - 2004. - V. 21. - № 2. - P. 344–353.
46. Balan V. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review / V. Balan, L. Verestiuc // *Eur. Polym. J.* - 2014. - V. 53. - № 1. - P. 171–188.
47. Dowling M.B. A self-assembling hydrophobically modified chitosan capable of reversible hemostatic action / M.B. Dowling, R. Kumar, M.A. Keibler, J.R. Hess, G.V. Bochicchio, S.R. Raghavan // *Biomaterials*. - 2011. - V. 32. - № 13. - P. 3351–3357.
48. Delmar K. Composite chitosan hydrogels for extended release of hydrophobic drugs / K. Delmar, H. Bianco-Peled // *Carbohydr. Polym.* - 2016. - V. 136. - P. 570–580.
49. Racine L. Chitosan-based hydrogels: recent design concepts to tailor properties and functions / L. Racine, I. Texier, R. Auzély-Velty // *Polym. Int.* - 2017. - V. 66. - № 7. - P. 981–998.
50. de Azevedo E.P. Chitosan hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications / E.P. de Azevedo // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* - 2015. - V. 7. - № 12. - P. 8–14.
51. 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. Préat // *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. Luo L.-J. Effect of deacetylation degree on controlled pilocarpine release from injectable chitosan-g-poly(N-isopropylacrylamide) carriers / L.-J. Luo, C.-C. Huang, H.-C. Chen, J.-Y. Lai, M. Matsusaki // *Carbohydr. Polym.* - 2018. - V. 197. - P. 375–384.
60. Kiang T. The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection / T. Kiang, J. Wen, H.W. Lim, K.W. Leong // *Biomaterials*. - 2004. - V. 25. - № 22. - P. 5293–5301.
61. Foster L.J.R. Chitosan films are NOT antimicrobial / L.J.R. Foster, J. Butt // *Biotechnol. Lett.* - 2011. - V. 33. - № 2. - P. 417–421.

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

70. 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. Nud'ga L.A. Effect of allyl substitution in chitosan on the structure of graft copolymers / L.A. Nud'ga, V.A. Petrova, M.F. Lebedeva // *Russ. J. Appl. Chem.* - 2003. - V. 76. - № 12. - P. 1978–1982.
78. Illy N. Synthesis of water-soluble allyl-functionalized oligochitosan and its modification by thiol-ene addition in water / N. Illy, M. Robitzer, R. Auvergne, S. Caillol, G. David, B. Boutevin // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* - 2014. - V. 52. - № 1. - P. 39–48.

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

87. Aziz, N. A. A. Synthesis of chitosan-grafted-poly(methyl methacrylate) with Fenton's Reagent (Fe^{2+} - H_2O_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 (Fe^{2+} - H_2O_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. Т. 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. Цверова Н.Е. Получение и свойства композиций на основе хитозана и полилактида с использованием компатибилизаторов / Н.Е. Цверова, А.Е. Мочалова, А.Г. Морозов, П.А. Юнин, Л.А. Смирнова, И.Д. Гришин // *Высокомолекулярные соединения Б.* - 2015. - Т. 57. - № 3. - P. 214–219.
95. Banerjee R. An overview of the recent advances in polylactide-based sustainable nanocomposites / R. Banerjee, S.S. Ray // *Polym. Eng. Sci.* - 2021. - V. 61. - № 3. - P. 617–649.
96. Garlotta D. A literature review of poly(lactic acid) / D. Garlotta // *J. Polym. Environ.* - 2001. - V. 9. - № 2. - P. 63–84.
97. Hamad K. Properties and medical applications of polylactic acid: A review / K. Hamad, M. Kaseem, H.W. Yang, F. Deri, Y.G. Ko // *Express Polym. Lett.* - 2015. - V. 9. - № 5. - P. 435–455.
98. Madhavan N.K. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research / N.K. Madhavan, N.R. Nair, R.P. John // *Bioresour. Technol.* - 2010. - V. 101. - № 22. - P. 8493–8501.
99. Polylactic acid PLA biopolymer technology and applications / ed. L.T. S., Rahmat A.R., Rahman W.A.W.A. Elsevier Science Ltd, - 2012. - 352 p.
100. Никишев П.А. Синтез блок-сополимеров стирола с D,L-лактидом методами последовательной контролируемой катионной полимеризации и анионной полимеризации с раскрытием цикла / П.А. Никишев, Ю.А. Пискун, И.В. Василенко, Л.В. Гапоник, П.С. Тимашев, А.А. Акованцева, С.В. Костюк // *Высокомолекулярные соединения Б.* - 2017. - V. 59. - № 6. - P. 413–423.
101. Badia J.D. Mechanical recycling of polylactide, upgrading trends and combination of valorization techniques / J.D. Badia, A. Ribes-Greus // *Eur. Polym. J.* - 2016. - V. 84. - P. 22–39.
102. Armentano I. Multifunctional nanostructured PLA materials for packaging and tissue engineering / I. Armentano, N. Bitinis, E. Fortunati, S. Mattioli, N.

Rescignano, R. Verdejo, M.A.A. Lopez-Manchado, J.M.M. Kenny // *Prog. Polym. Sci.* - 2013. - V. 38. - № 10–11. - P. 1720–1747.

103. Abdel-Rahman M.A. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes / M.A. Abdel-Rahman, Y. Tashiro, K. Sonomoto // *Biotechnol. Adv.* - 2013. - V. 31. - № 6. - P. 877–902.

104. Ögmundarson Ó. Environmental hotspots of lactic acid production systems / Ó. 245 Ögmundarson, S. Sukumara, A. Laurent, P. Fantke // *GCB Bioenergy.* - 2020. - V. 12. - № 1. - P. 19–38.

105. Ichikawa F., Kobayashi M., Ohta M., Yoshida Y., Obuchi S., Itoh H. Process for preparing polyhydroxycarboxylic acid: pat. US5440008A USA. - 1995. - P. 9.

106. Auras R. An overview of polylactides as packaging materials / R. Auras, B. Harte, S. Selke // *Macromol. Biosci.* - 2004. - V. 4. - № 9. - P. 835–864.

107. Timashev P. Novel biodegradable star-shaped polylactide scaffolds for bone regeneration fabricated by two-photon polymerization / P. Timashev, D. Kuznetsova, A. Koroleva, N. Prodanets, A. Deiwick, Y. Piskun, K. Bardakova, N. Dzhoyashvili, S. Kostjuk, E. Zagaynova, Y. Rochev, B. Chichkov, V. Bagratashvili // *Nanomedicine.* - 2016. - V. 11. - № 9. - P. 1041–1053.

108. Vert M. Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity / M. Vert, J. Mauduit, S. Li // *Biomaterials.* - 1994. - V. 15. - № 15. - P. 1209–1213.

109. Richbourg N.R. Tuning the biomimetic behavior of scaffolds for regenerative medicine through surface modifications / N.R. Richbourg, N.A. Peppas, V.I. Sikavitsas // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* - 2019. - V. 13. - № 8. - P. 1275–1293.

110. Ma Z. Immobilization of natural macromolecules on poly-L-lactic acid membrane surface in order to improve its cytocompatibility / Z. Ma, C. Gao, Y. Gong, J. Ji, J. Shen // *J. Biomed. Mater. Res.* - 2002. - V. 63. - № 6. - P. 838–847.

111. Li L. Preparation and degradation of PLA/chitosan composite materials / L. Li, S. Ding, C. Zhou // *J. Appl. Polym. Sci.* - 2004. - V. 91. - № 1. - P. 274–277.
112. Bonilla J. Effects of chitosan on the physicochemical and antimicrobial properties of PLA films / J. Bonilla, E. Fortunati, M. Vargas, A. Chiralt, J.M. Kenny // *J. Food Eng.* - 2013. - V. 119. - № 2. - P. 236–243.
113. Singh S. 3D printed biodegradable composites: An insight into mechanical properties of PLA/chitosan scaffold / S. Singh, G. Singh, C. Prakash, S. Ramakrishna, L. Lamberti, C.I. Pruncu // *Polym. Test.* - 2020. - V. 89. - P. 106722.
114. Xu J. Preparation of chitosan/PLA blend micro/nanofibers by electrospinning / J. Xu, J. Zhang, W. Gao, H. Liang, H. Wang, J. Li // *Mater. Lett.* - 2009. - V. 63. - 246 № 8. - P. 658–660.
115. Râpă M. Influence of chitosan on mechanical, thermal, barrier and antimicrobial properties of PLA-biocomposites for food packaging / M. Râpă, A.C. Miteluț, E.E. Tănase, E. Grosu, P. Popescu, M.E. Popa, J.T. Rosnes, M. Sivertsvik, R.N. Darie-Niță, C. Vasile // *Compos. Part B Eng.* - 2016. - V. 102. - P. 112–121.
116. Liu Y. Composite poly(lactic acid)/chitosan nanofibrous scaffolds for cardiac tissue engineering / Y. Liu, S. Wang, R. Zhang // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2017. - V. 103. - P. 1130–1137.
117. Thomas M.S. Electrospun polylactic acid-chitosan composite: a bio-based alternative for inorganic composites for advanced application / M.S. Thomas, P.K.S. Pillai, M. Faria, N. Cordeiro, H. Barud, S. Thomas, L.A. Pothen // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* - 2018. - V. 29 - № 9.
118. Correlo V.M. Properties of melt processed chitosan and aliphatic polyester blends / V.M. Correlo, L.F. Boesel, M. Bhattacharya, J.F. Mano, N.M. Neves, R.L. Reis // *Mater. Sci. Eng. A.* - 2005. - V. 403. - № 1–2. - P. 57–68.

119. Li G. Preparation, characterization and aggregation behavior of amphiphilic chitosan derivative having poly (l-lactic acid) side chains / G. Li, Y. Zhuang, Q. Mu, M. Wang, Y. Fang // *Carbohydr. Polym.* - 2008. - V. 72. - № 1. - P. 60–66.
120. Luckachan G.E. Chitosan/oligo L-lactide graft copolymers: Effect of hydrophobic side chains on the physico-chemical properties and biodegradability / G.E. Luckachan, C.K.S. Pillai // *Carbohydr. Polym.* - 2006. - V. 64. - № 2. - P. 254–266.
121. Feng H. Preparation, characterization, and self-assembled properties of biodegradable chitosan–poly(L-lactide) hybrid amphiphiles / H. Feng, C.-M. Dong // *Biomacromolecules.* - 2006. - V. 7. - № 11. - P. 3069–3075.
122. Liu Y. Synthesis and characterization of a brush-like copolymer of polylactide grafted onto chitosan / Y. Liu, F. Tian, K.A. Hu // *Carbohydr. Res.* - 2004. - V. 339. - № 4. - P. 845–851.
123. Wu Y. Synthesis and characterization of a novel amphiphilic chitosan-poly lactide graft copolymer / Y. Wu, Y. Zheng, W. Yang, C. Wang, J. Hu, S. Fu // *Carbohydr. Polym.* - 2005. - V. 59. - № 2. - P. 165–171.
124. Bhattarai N. Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolonged drug delivery / N. Bhattarai, H.R. Ramay, S.-H. Chou, M. Zhang // *Int. J. Nanomedicine.* - 2006. - V. 1. - № 2. - P. 181–187.
125. Goryunova P.E. Thermodynamic properties of block copolymers of chitosan with poly(D,L-lactide) / P.E. Goryunova, S.S. Sologubov, A.V. Markin, N.N. Smirnova, S.D. Zaitsev, N.E. Silina, L.A. Smirnova // *Thermochim. Acta.* - 2018. - V. 659. - P. 19–26.
126. Feng H. Synthesis and characterization of phthaloyl-chitosan-g-poly(l-lactide) using an organic catalyst / H. Feng, C.-M. Dong // *Carbohydr. Polym.* - 2007. - V. 70. - № 3. - P. 258–264.

127. Liu L. Preparation of chitosan-g-poly lactide graft copolymers via self-catalysis of phthaloylchitosan and their complexation with DNA / L. Liu, A. Shi, S. Guo, Y. Fang, S. Chen, J. Li // *React. Funct. Polym.* - 2010. - V. 70. - № 5. - P. 301–305.
128. Qu X. Synthesis and characterization of pH-sensitive hydrogels based on chitosan and D,L-lactic acid / X. Qu, A. Wirsén, A. Albertsson // *J. Appl. Polym. Sci.* - 1999. - V. 74. - № 13. - P. 3193–3202.
129. Силина Н.Е. Получение блок-сополимеров хитозана и D,L-лактида под действием ультразвука. Структура и свойства / Н.Е. Силина, А.Г. Морозов, Е.Е. Горностаева, Л.А. Смирнова, С.Д. Зайцев // *Высокомолекулярные соединения Б.* - 2017. - Т. 59б - № 5. - С. 355–364.
130. Luo B. Rapid synthesis and characterization of chitosan-g-poly(D,L-lactide) copolymers with hydroxyethyl chitosan as a macroinitiator under microwave irradiation / B. Luo, J. Yang, J. Zhao, C. Hsu, J. Li, C. Zhou // *J. Appl. Polym. Sci.* - 2012. - V. 125. - P. 125–131.
131. The IUPAC compendium of chemical terminology / ed. Gold V. Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), - 2019.
132. Gomollón-Bel F. Ten chemical innovations that will change our world: IUPAC identifies emerging technologies in chemistry with potential to make our planet 248 more sustainable / F. Gomollón-Bel // *Chem. Int.* - 2019. - V. 41. - № 2. - P. 12– 17.
133. Boldyrev V.V. Mechanochemistry of solids: past, present, and prospects / V.V. Boldyrev, K. Tkáčová // *J. Mater. Synth. Process.* - 2000. - V. 8. - № 3/4. - P. 121–132.
134. Барамбойм Н.К. Механохимия высокомолекулярных соединений. Химия, - 1978. - 386 p.

135. Жаров В.А. Процессы в полимерах и низкомолекулярных веществах, сопровождающие пластическое течение под высоким давлением / В.А. Жаров // *Высокомолекулярные соединения*. - 1994. - Т. 36. - № 4. - С. 559–579.
136. Boldyreva E. Mechanochemistry of inorganic and organic systems: what is similar, what is different? / E. Boldyreva // *Chem. Soc. Rev.* - 2013. - V. 42. - № 18. - P. 7719.
137. Ляхов Н.З. Механохимический синтез органических соединений и композитов с их участием / Н.З. Ляхов, Т.Ф. Григорьева, А.П. Барина, И.А. Ворсина // *Успехи Химии*. - 2010. - Т. 79. - № 3. - С. 218–233.
138. Ениколопов Н.С. Твердофазные химические реакции и новые технологии / Н.С. Ениколопов // *Успехи химии*. - 1991. - Т. 60 - № 3. - С. 586–594.
139. Friščić T., Mottillo C., Titi H.M. Mechanochemistry for synthesis / T. Friščić, C. Mottillo, H.M. Titi // *Angew. Chemie Int. Ed.* - 2020. - V. 59. - № 3. - P. 1018–1029.
140. Momzyakov A.A. Kinetic features of mechanosynthesis of calcium stearate / A.A. Momzyakov, A.A. Zharov, T.R. Deberdeev, R.F. Nafikova, L.B. Stepanova, R.Y. Deberdeev // *Russ. J. Phys. Chem. B.* - 2020. - V. 14. - № 2. - P. 270–277.
141. Wang G.W. Mechanochemical organic synthesis / G.W. Wang // *Chem. Soc. Rev.* - 2013. - V. 42. - № 18. - P. 7668–7700.
142. Li J., Nagamani C., Moore J.S. Polymer mechanochemistry: from destructive to productive / J. Li, C. Nagamani, J.S. Moore // *Acc. Chem. Res.* - 2015. - V. 48. - № 8. - P. 2181–2190.
143. Klukovich H.M. A backbone lever-arm effect enhances polymer mechanochemistry / H.M. Klukovich, T.B. Kouznetsova, Z.S. Kean, J.M. Lenhardt, S.L. Craig // *Nat. Chem.* - 2013. - V. 5. - № 2. - P. 110–114.

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

152. Прут Э.В., Зеленецкий А.Н. Химическая модификация и смешение 250 полимеров в экструдере-реакторе / Э.В. Прут, А.Н. Зеленецкий // Успехи химии. - 2001. - Т. 70. - № 1. - С. 72–87.
153. Tan D. Towards medicinal mechanochemistry: evolution of milling from pharmaceutical solid form screening to the synthesis of active pharmaceutical ingredients (APIs) / D. Tan, L. Loots, T. Friščić // Chem. Commun. - 2016. - V. 52. - № 50. - P. 7760–7781.
154. Халиков С.С. О методах улучшения растворимости антигельминтных лекарственных веществ / С.С. Халиков, А.В. Душкин // Химикофармацевтический журнал. - 2020. - Т. 54. - № 5. - С. 33–37.
155. Stolar T. Control of pharmaceutical cocrystal polymorphism on various scales by mechanochemistry: Transfer from the laboratory batch to the large-scale extrusion processing / T. Stolar, S. Lukin, M. Tireli, I. Sović, B. Karadeniz, I. Kereković, G. Matijašić, M. Gretić, Z. Katančić, I. Dejanović, M.M. Di, I. Halasz, K. Užarević // ACS Sustain. Chem. Eng. - 2019. - V. 7. - № 7. - P. 7102–7110.
156. Baláž P. Mechanochemistry in technology: From minerals to nanomaterials and drugs / P. Baláž, M. Baláž, Z. Bujňáková // Chem. Eng. Technol. - 2014. - V. 37. - № 5. - P. 747–756.
157. Ivashchenko G.L. Effect of mechanical activation on the physicochemical properties of piroxicam with chitosan / G.L.Ivashchenko, T.P. Shakhtshneider, V.V. Boldyrev, N.G. Bazarnova, A.S. Medvedeva, L.P. Safronova // Mendeleev Commun. - 2003. - V. 13. - № 1. - P. 3–5.
158. Wang L. Microstructure and gelation behavior of hydroxyapatite-based nanocomposite sol containing chemically modified silk fibroin / L. Wang, G.-L. Ning, M. Senna // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. - 2005. - V. 254. - № 1–3. - P. 159–164.

159. Роговина, С.З. Химическая модификация природных полисахаридов целлюлозы, хитина и хитозана в твердой фазе под действием сдвиговых деформаций: дис...д.х.н.: 02.00.06. / Роговина Светлана Захаровна. - М., 2003. - 232 с.
160. Акопова, Т.А. Твердофазный синтез, структура, свойства и перспективы применения материалов на основе полисахарида хитозана: дис...д.х.н.: 02.00.06. / Акопова Татьяна Анатольевна. М., 2013. - 284 с.
161. Bychkov A. Current achievements in the mechanically pretreated conversion of plant biomass / A. Bychkov, E. Podgorbunskikh, E. Bychkova, O. Lomovsky // *Biotechnol. Bioeng.* - 2019. - V. 116. - № 5. - P. 1231–1244.
162. Dome K. Changes in the crystallinity degree of starch having different types of crystal structure after mechanical pretreatment / K. Dome, E. Podgorbunskikh, A. Bychkov, O. Lomovsky // *Polymers (Basel)*. - 2020. - V. 12. - № 3. - P. 641.
163. Rogovina S.Z. Biodegradable polymer composites based on synthetic and natural polymers of various classes / S.Z. Rogovina // *Polym. Sci. Ser. C.* - 2016. - V. 58. - № 1. - P. 62–73.
164. Rogovina S.Z. Composites based on cellulose and chitosan / S.Z. Rogovina, R.Y. Deberdeev, K.S. Fadeeva // *Polym. Sci. Ser. D.* - 2018. - V. 11. - № 4. - P. 448–453.
165. Zelenetskii A.N. Immobilization of trypsin on polysaccharides upon intense mechanical treatment / A.N. Zelenetskii, T.A. Akopova, N.R. Kildeeva, G.A. Vikhoreva, E.S. Obolonkova, A.A. Zharov // *Russ. Chem. Bull.* - 2003. - V. 52. - № 9. - P. 2073–2077.
166. Вихорева, Г.А. Синтез и свойства водорастворимых производных хитина: дис...д.х.н.: 02.00.06. / Вихорева Галина Александровна. - М., 1998. - 389 с.
167. Enikolopian N.S. Some aspects of chemistry and physics of plastic flow / N.S. Enikolopian // *Pure Appl. Chem.* - 1985. - V. 57. - № 11. - P. 1707–1711.

168. Enikolopian N.S. Processes of wood delignification and cellulose mercerization under conditions of shear deformations / N.S. Enikolopian, E.A. Balashova, L.S. Sakhonenko, S.Z. Rogovina // *J. Appl. Polym. Sci.* - 1992. - V. 44. - № 3. - P. 459–466.
169. Роговина С.З. Модификация полисахаридов в условиях сдвиговых деформаций (Обзор) / С.З. Роговина, Т.А. Аكوпова // *Высокомолекулярные соединения.* - 1994. - Т. 36. - № 4. - С. 593–600.
170. Аكوпова Т.А. Образование хитозана из хитина в условиях сдвиговых деформаций / Т.А. Аكوпова, С.З. Роговина, Г.А. Вихорева, Л.С.Гальбрайт, Н.С. Ениколопян // *Высокомолекулярные соединения.* - 1991. - Т. 32. - № 10. - С. 735–737.
171. Rogovina S.Z. Modification of cellulose in conditions of plastic flow under pressure / S.Z. Rogovina, V.A. Zhorin, N.S. Enikolopian // *J. Appl. Polym. Sci.* - 1995. - V. 57. - № 4. - P. 439–447.
172. Роговина С.З. Модификация хитозана ангидридами дикарбоновых кислот в условиях сдвиговых деформаций / С.З. Роговина, Т.А. Аكوпова, Г.А. Вихорева, И.Н. Горбачева, С.Н. Зеленецкий // *Высокомолекулярные соединения.* - 1998. - Т. 40. - № 8. - С. 1389–1393.
173. Rogovina S.Z. Investigation of properties of chitosan obtained by solid-phase and suspension methods / S.Z. Rogovina, T.A. Akopova, G.A. Vikhoreva // *J. Appl. Polym. Sci.* - 1998. - V. 70. - № 5. - P. 927–933.
174. Mogilevskaya E.L. The crystal structure of chitin and chitosan / E.L. Mogilevskaya, T.A. Akopova, A.N. Zelenetskii, A.N. Ozerin // *Polym. Sci. Ser. A.* - 2006. - V. 48. - № 2. - P. 116–123.
175. Роговина С.З. Исследование взаимодействия хитозана с твердыми органическими кислотами в условиях сдвиговых деформаций / С.З. Роговина,

Г.А. Вихорева, Т.А. Аكوпова, И.Н. Горбачева, А.Н. Зеленецкий // *Высокомолекулярные соединения*. - 1997. - Т. 39. - № 6. - С. 941–946.

176. Аكوпова Т.А. Получение карбоксиметилловых эфиров хитина и хитозана в условиях пластического течения / Т.А. Аكوпова, С.З. Роговина, Г.А. Вихорева, С.Н. Зеленецкий // *Высокомолекулярные соединения*. - 1995. - Т. 37. - № 10. - С. 1797-1801.

177. Леснякова Л.В. Влияние условий твердофазного получения привитых сополимеров хитозана и поливинилового спирта на их строение и растворимость / Л.В. Леснякова, Т.А. Аكوпова, Г.А. Вихорева, Н.С. Перов, А.Н. Зеленецкий // *Композиты и наноструктуры*. - 2012. - Т. 1. - № 13. - С. 44–55.

178. Аكوпова Т.А. Solid-state synthesis of amphiphilic chitosan-polyethylene systems 253 by the maleinization of both components / Т.А. Аكوпова, L.V. Vladimirov, V.A. Zhorin, A.N. Zelenetskii // *Polym. Sci. Ser. B*. - 2009. - V. 51. - № 3–4. - P. 124–134.

179. Zaytseva-Zotova D. Biocompatible smart microcapsules based on chitosanpoly(vinyl alcohol) copolymers for cultivation of animal cells / D. ZaytsevaZotova, V. Balysheva, A. Tsoy, M. Drozdova, Т.А. Аكوпова, L. Vladimirov, I. Chevalot, A. Marc, J.L. Goergen, E. Markvicheva // *Adv. Eng. Mater.* - 2011. - V. 13. - № 12. - P. 493–503.

180. Ozerin A.N. Nanocomposites based on modified chitosan and titanium oxide / A.N. Ozerin, A.N. Zelenetskii, Т.А. Аكوпова, O.B. Pavlova-Verevkina, L.A. Ozerina, N.M. Surin, A.S. Kechek'yan // *Polym. Sci. Ser. A*. - 2006. - V. 48. - № 6. - P. 638–643.

181. Ozerin A.N. Hybrid nanocomposites based on graft copolymer of chitosan with poly(vinyl alcohol) and titanium oxide / A.N. Ozerin, N.S. Perov, A.N. Zelenetskii,

- T.A. Akopova, L.A. Ozerina, A.S. Kechek'yan, N.M. Surin, L.V. Vladimirov, V.D. Yulovskaya // *Nanotechnologies Russ.* - 2009. - V. 4. - № 5–6. - P. 331–339.
182. O'Brien F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering / F.J. O'Brien // *Mater. Today.* - 2011. - V. 14. - № 3. - P. 88–95.
183. Севастьянов В.И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины / В.И. Севастьянов // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* - 2014. - Т. 16. - № 3. - С. 93–108.
184. K.H. Hussein Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application / K.H. Hussein, K.-M. Park, K.-S. Kang, H.- M. Woo // *Mater. Sci. Eng. C.* - 2016. - V. 67. - P. 766–778.
185. Hunsberger J.G. An industry-driven roadmap for manufacturing in regenerative medicine / J.G. Hunsberger, T. Shupe, A. Atala // *Stem Cells Transl. Med.* - 2018. - V. 7. - № 8. - P. 564–568.
186. Holzapfel B.M. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view / B.M. Holzapfel, J.C. Reichert, J.-T. Schantz, U. 254 Gbureck, L. Rackwitz, U. Nöth, F. Jakob, M. Rudert, J. Groll, D.W. Hutmacher // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2013. - V. 65. - № 4. - P. 581–603.
187. Mujtaba M. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review / M. Mujtaba, R.E. Morsi, G. Kerch, M.Z. Elsabee, M. Kaya, J. Labidi, K.M. Khawar // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2019. - V. 121. - P. 889– 904.
188. Elsabee M.Z. Chitosan based edible films and coatings: A review / M.Z. Elsabee, E.S. Abdou // *Mater. Sci. Eng. C.* - 2013. - V. 33. - № 4. - P. 1819–1841.
189. Van Den Broek L.A.M. Chitosan films and blends for packaging material / L.A.M. Van Den Broek, R.J.I. Knoop, F.H.J. Kappen, C.G. Boeriu // *Carbohydr. Polym.* - 2015. - V. 116. - P. 237–242.

190. Ali A. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery / A. Ali, S. Ahmed // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2018. - V. 109. - P. 273–286.
191. Miguel S.P. Chitosan based-asymmetric membranes for wound healing: A review / S.P. Miguel, A.F. Moreira, I.J. Correia // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2019. - V. 127. - P. 460–475.
192. Mengatto L.N. Recent advances in chitosan films for controlled release of drugs / L.N. Mengatto, I.M. Helbling, J.A. Luna // *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* - 2012. - V. 6. - № 2. - P. 156–170.
193. Ruprai H. Porous chitosan films support stem cells and facilitate sutureless tissue repair: research-article / H. Ruprai, S. Romanazzo, J. Ireland, K. Kilian, D. Mawad, L. George, R. Wuhrer, J. Houang, D. Ta, S. Myers, A. Lauto // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* - 2019. - V. 11. - № 36. - P. 32613–32622.
194. De Masi A. Chitosan films for regenerative medicine: fabrication methods and mechanical characterization of nanostructured chitosan films / A. De Masi, I. Tonazzini, C. Masciullo, R. Mezzena, F. Chiellini, D. Puppi, M. Cecchini // *Biophys. Rev.*, - 2019. - V. 11. - № 5. - P. 807–815.
195. Kholkhoev B.C. Convenient approach to making nanocomposites based on a chitosan-poly(vinyl pyrrolidone) polymer matrix and a graphene nanofiller / Kholkhoev B.C., S.A. Bal'zhinov, V.G. Makotchenko, V.E. Fedorov, I.A. Farion, 255 M.N. Kozlova, P.S. Timashev, V.F. Burdukovskii // *J. Appl. Polym. Sci.* - 2017. - V. 134. - № 27. - P. 45038.
196. Banerjee S. Antimicrobial and biocompatible fluorescent hydroxyapatite-chitosan nanocomposite films for biomedical applications / S. Banerjee, B. Bagchi, S. Bhandary, A. Kool, N.A. Hoque, P. Biswas, K. Pal, P. Thakur, K. Das, P. Karmakar, S. Das // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* - 2018. - V. 171. - P. 300–307.

197. Spasova M. Electrospun chitosan-coated fibers of poly(L-lactide) and poly(L-lactide)/poly(ethylene glycol): preparation and characterization / M. Spasova, D. Paneva, N. Manolova, P. Radenkov, I. Rashkov // *Macromol. Biosci.* - 2008. - V. 8. - № 2. - P. 153–162.
198. Zhu Y. Surface modification of polycaprolactone membrane via aminolysis and biomacromolecule immobilization for promoting cytocompatibility of human endothelial cells / Y. Zhu, C. Gao, X. Liu, J. Shen // *Biomacromolecules.* - 2002. - V. 3. - № 6. - P. 1312–1319.
199. Lao L. Chitosan modified poly(l-lactide) microspheres as cell microcarriers for cartilage tissue engineering / L. Lao, H. Tan, Y. Wang, C. Gao // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* - 2008. - V. 66. - № 2. - P. 218–225.
200. Chen P. Influence of plasticiser type and nanoclay on the properties of chitosanbased materials / P. Chen, F. Xie, F. Tang, T. McNally // *Eur. Polym. J.* - 2021. - V. 144. - P. 110225.
201. Silva S.S. Plasma surface modification of chitosan membranes: Characterization and preliminary cell response studies / S.S. Silva, S.M. Luna, M.E. Gomes, J. Benesch, I. Pashkuleva, J.F. Mano, R.L. Reis // *Macromol. Biosci.* - 2008. - V. 8. - № 6. - P. 568–576.
202. Zhang H.Y. Effects of Ar-H₂-N₂ microwave plasma on chitosan and its nanoliposomes blend thin films designed for tissue engineering applications / H.Y. Zhang, F. Cleymand, C. Noël, C.J.F. Kahn, M. Linder, A. Dahoun, G. Henrion, E. Arab-Tehrany // *Carbohydr. Polym.* - 2013. - V. 93. - № 2. - P. 401–411.
203. Lahann J. Vapor-based polymer coatings for potential biomedical applications / J. 256 Lahann // *Polym. Int.* - 2006. - V. 55. - № 12. - P. 1361–1370.
204. Zefirov V.V. Deposition of a chitosan coating on celgard porous matrices in the presence of carbon dioxide under pressure / V.V. Zefirov, M.A. Pigaleva, V.G.

- Sergeyev, M.O. Gallyamov // Polym. Sci. Ser. A. - 2020. - V. 62. - № 2. - P. 123–131.
205. Oliveira J.A.M. Characterization of the chitosan-tungsten composite coating obtained by electrophoretic deposition / J.A.M. Oliveira, R.A.C. de Santana, N.A. Wanderley // Prog. Org. Coatings. - 2020. - V. 143 - P. 105631.
206. Demina T.S. Coating of polylactide films by chitosan: Comparison of methods / T.S. Demina, A.A. Frolova, A.V. Istomin, S.L. Kotova, M.S. Piskarev, K.N. Bardakova, M.Y. Yablokov, V.A. Altyinov, L.I. Kravets, A.B. Gilman, T.A. Akopova, P.S. Timashev // J. Appl. Polym. Sci. - 2020. - V. 137. - № 3. - P. 48287.
207. Demina T.S. Plasma treatment of poly(ethylene terephthalate) films and chitosan deposition: DC- vs. AC-discharge / S. Demina T, M.S. Piskarev, O.A. Romanova, A.K. Gatin, B.R. Senatulin, E.A. Skryleva, T.M. Zharikova, A.B. Gilman, A.A. Kuznetsov, T.A. Akopova, P.S. Timashev // Materials (Basel). - 2020. - V. 13. - № 3. - P. 508.
208. S. Park Improvements in barrier properties of poly(lactic acid) films coated with chitosan or chitosan/clay nanocomposite / S. Park, H.S. Lee, J.H. Choi, C.M. Jeong, M.H. Sung, H.J. Park // J. Appl. Polym. Sci. - 2012. - V. 125. - № S1. - P. 2658–2667.
209. Cui Y.L. Biomimetic surface modification of poly(L-lactic acid) with chitosan and its effects on articular chondrocytes in vitro / Y.L. Cui, A.D. Qi, W.G. Liu, X.H. Wang, H. Wang, D.M. Ma, K.D. Yao // Biomaterials. - 2003. - V. 24. - № 21. - P. 3859–3868.
210. Khorshidi S. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue engineering applications / S. Khorshidi, A. Solouk, H. Mirzadeh, S. Mazinani, J.M. Lagaron, S. Sharifi, S. Ramakrishna // J. Tissue Eng. Regen. Med. - 2016. - V. 10. - № 9. - P. 715–738. 257

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

219. Hardiansyah A. Electrospinning and antibacterial activity of chitosan-blended poly(lactic acid) nanofibers / A. Hardiansyah, H. Tanadi, M.-C. Yang, T.-Y. Liu // J. Polym. Res. - 2015. - V. 22. - № 4. - P. 59.
220. Stoleru E. Novel procedure to enhance PLA surface properties by chitosan irreversible immobilization / E. Stoleru, R.P. Dumitriu, B.S. Munteanu, T. Zaharescu, E.E. Tănase, A. Mitelut, G.-L. Ailiesei, C. Vasile // Appl. Surf. Sci. - 258 2016. - V. 367. - P. 407–417.
221. Zhang L. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments / L. Zhang, F. Gu, J. Chan, A. Wang, R. Langer, O. Farokhzad // Clin. Pharmacol. Ther. - 2008. - V. 83. - № 5. - P. 761–769.
222. Das S.S. Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for drug / S.S. Das, P. Bharadwaj, M. Bilal, M. Barani, A. Rahdar, P. Taboada, S. Bungau, G. Kyzas // Polymers (Basel). - 2020. - V. 12. - P. 1–45.
223. Tong X. Recent advances in natural polymer-based drug delivery systems / X. Tong, W. Pan, T. Su, M. Zhang, W. Dong, X. Qi // React. Funct. Polym. - 2020. - V. 148. - P. 104501.
224. Nasongkla N. Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRIultrasensitive drug delivery systems / N. Nasongkla, E. Bey, J. Ren, H. Ai, C. Khemtong, J.S. Guthi, S.F. Chin, A.D. Sherry, D.A. Boothman, J. Gao // Nano Lett. - 2006. - V. 6. - № 11. - P. 2427–2430.
225. Жаворонок Е.С., Кедик С.А., Панов А.В., Петрова Е.А., Суслов В.В. Полимерные микрочастицы для медицины и биологии. Москва: ИФТ, - 2014. - 480 с.
226. Yuan S. Polymeric composites for powder-based additive manufacturing: Materials and applications / S. Yuan, F. Shen, C.K. Chua, K. Zhou // Prog. Polym. Sci. - 2019. - V. 91. - P. 141–168.

227. Derakhti S. Attachment and detachment strategies in microcarrier-based cell culture technology: A comprehensive review / S. Derakhti, S.H. Safiabadi-Tali, G. Amoabediny, M. Sheikhpour // Mater. Sci. Eng. C. - 2019. - V. 103. - P. 109782.
228. Markvicheva E., Grandfils C. Microcarriers for animal cell culture // Fundamentals of cell immobilization biotechnology, focus on biotechnology / ed. Nedovich V., Villaert R. Springer, - 2004. - V. 007. - № 095. - P. 141–161.
229. Van Wezel A.L. Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture / A.L. Van Wezel // Nature. - 1967. - V. 216. - P. 64–65.
230. Li B. Past, present, and future of microcarrier-based tissue engineering / B. Li, X. Wang, Y. Wang, W. Gou, X. Yuan, J. Peng, Q. Guo, S. Lu // J. Orthop. Transl. - 259 2015. - V. 3. - № 2. - P. 51–57.
231. Chen X.-Y. Recent advances in the use of microcarriers for cell cultures and their ex vivo and in vivo applications / X.-Y. Chen, J.-Y. Chen, X.-M. Tong, J.-G. Mei, Y.-F. Chen, X.-Z. Mou // Biotechnol. Lett. - 2020. - V. 42. - № 1. - P. 1–10.
232. Tavassoli H. Large-scale production of stem cells utilizing microcarriers: A biomaterials engineering perspective from academic research to commercialized products / H. Tavassoli, S.N. Alhosseini, A. Tay, P.P.Y. Chan, O.S.K. Weng, M.E. Warkiani // Biomaterials. - 2018. - V. 181. - P. 333–346.
233. Neto M.D. Microparticles in contact with cells: from carriers to multifunctional tissue modulators / M.D. Neto, M.B. Oliveira, .F. Mano J// Trends Biotechnol. - 2019. - V. 37. - № 9. - P. 1011–1028.
234. Privalova A. Biodegradable polyester-based microcarriers with modified surface tailored for tissue engineering / A. Privalova, E. Markvicheva, C. Sevrin, M. Drozdova, C. Kottgen, B. Gilbert, M. Ortiz, C. Grandfils // J. Biomed. Mater. Res. Part A. - 2015. - V. 103. - № 3. - P. 939–948.
235. He T. 5-Fluorouracil monodispersed chitosan microspheres: Microfluidic chip fabrication with crosslinking, characterization, drug release and anticancer activity /

T. He, W. Wang, B. Chen, J. Wang, Q. Liang, B. Chen // Carbohydr. Polym. - 2020. - V. 236. - P. 116094.

236. Amiri A. Fabrication of cumin loaded-chitosan particles: Characterized by molecular, morphological, thermal, antioxidant and anticancer properties as well as its utilization in food system / A. Amiri, A. Mousakhani-Ganjeh, Z. Amiri, Y. Guo, S.A. Pratap, K.R. Esmailzadeh // Food Chem. - 2020. - V. 310. - P. 125821.

237. Rescignano N. Use of alginate, chitosan and cellulose nanocrystals as emulsion stabilizers in the synthesis of biodegradable polymeric nanoparticles / N. Rescignano, E. Fortunati, I. Armentano, R. Hernandez, C. Mijangos, R. Pasquino, J.M. Kenny // J. Colloid Interface Sci. - 2015. - V. 445. - P. 31–39.

238. Rosca I.D. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation / I.D. Rosca, F. Watari, M. Uo // J. Control. Release. - 2004. - V. 99. - № 2. - P. 271–280.

239. Bandari S. Continuous twin screw granulation – An advanced alternative granulation technology for use in the pharmaceutical industry / S. Bandari, D. Nyavanandi, V.R. Kallakunta, K.Y. Janga, S. Sarabu, A. Butreddy, M.A. Repka // Int. J. Pharm. - 2020. - V. 580. - P. 119215.

240. Sahoo S.K. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-coglycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake / S.K. Sahoo, J. Panyam, S. Prabha, V. Labhasetwar // J. Control. Release. - 2002. - V. 82. - № 1. - P. 105–114.

241. Messai I. Adsorption of chitosan onto poly(D,L-lactic acid) particles: A physicochemical investigation / I. Messai, T. Delair // Macromol. Chem. Phys. - 2005. - V. 206. - № 16. - P. 1665–1674.

242. Guo C. Understanding the adsorption mechanism of chitosan onto poly(lactide-coglycolide) particles / C. Guo, R.A. Gemeinhart // Eur. J. Pharm. Biopharm. - 2008. - V. 70 - № 2. - P. 597–604.

243. Satpute S.K. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms / S.K. Satpute, I.M. Banat, P.K. Dhakephalkar, A.G. Banpurkar, B.A. Chopade // *Biotechnol. Adv.* - 2010. - V. 28. - № 4. - P. 436–450.
244. Bouyer E. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? / E. Bouyer, G. Mekhloufi, V. Rosilio, J.-L. Grossiord, F. Agnely // *Int. J. Pharm.* - 2012. - V. 436. - № 1–2. - P. 359–378.
245. Rodriguez M.S. Emulsification capacity of chitosan / M.S. Rodriguez, L.A. Albertengo, E. Agullo // *Carbohydr. Polym.* - 2002. - V. 48. - № 3. - P. 271–276.
246. Del Blanco L.F. Influence of the deacetylation degree on chitosan emulsification properties / L.F. Del Blanco, M.S. Rodriguez, P.C. Schulz, E. Agulló // *Colloid Polym. Sci.* - 1999. - V. 277. - № 11. - P. 1087–1092.
247. Li X. Effects of concentration, degree of deacetylation and molecular weight on emulsifying properties of chitosan / X. Li, W. Xia // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2011. - V. 48. - № 5. - P. 768–772.
248. Jiang T. Chitosan–poly(lactide-co-glycolide) microsphere-based scaffolds for bone tissue engineering: In vitro degradation and in vivo bone regeneration studies / T. Jiang, S.P. Nukavarapu, M. Deng, E. Jabbarzadeh, M.D. Kofron, S.B. Doty, W.I. Abdel-Fattah, C.T. Laurencin // *Acta Biomater.* - 2010. - V. 6. - № 9. - P. 3457–3470.
249. Chevalier Y. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions / Y. Chevalier, M.A. Bolzinger // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* - 2013. - V. 439. - P. 23–34.
250. Yang Y. An overview of pickering emulsions: Solid-particle materials, classification, morphology, and applications / Y. Yang, Z. Fang, X. Chen, W. Zhang, Y. Xie, Y. Chen, Z. Liu, W. Yuan // *Front. Pharmacol.* - 2017. - V. 8. - P. 1–20.

251. Wu J. Recent studies of Pickering emulsions: particles make the difference / J. Wu, G.-H. Ma // *Small*. - 2016. - V. 12. - № 34. - P. 4633–4648.
252. Momziakova K.S. Preparation of nanocellulose from nonwood plant raw materials / K.S. Momziakova, T.R. Deberdeev, M.S. Vershinin, V.V. Leksin, A.A. Momziakov, R.Y. Deberdeev // *Russ. J. Bioorganic Chem.* - 2020. - V. 46. - № 7. - P. 1304–1309.
253. Sotnikova Y.S. Application of micro- and nanocrystalline cellulose / Y.S. Sotnikova, T.S. Demina, A.V. Istomin, G.P. Goncharuk, C. Grandfils, T.A. Akopova, A.N. Zelenetskii, P.G. Babayevsky // *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* - 2018. - V. 347. - № 1. - P. 012006.
254. Calabrese V. Pickering emulsions stabilized by naturally derived or biodegradable particles / V. Calabrese, J.C. Courtenay, K.J. Edler, J.L. Scott // *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* - 2018. - V. 12. - P. 83–90.
255. Asfour M.H. Chitosan based Pickering emulsion as a promising approach for topical application of rutin in a solubilized form intended for wound healing: In vitro and in vivo study / M.H. Asfour, H. Elmotasem, D.M. Mostafa, A.A.A. Salama // *Int. J. Pharm.* - 2017. - V. 534. - № 1–2. - P. 325–338.
256. Wang J. Fabrication of monodisperse drug-loaded poly(lactic-co-glycolic acid)–chitosan core-shell nanocomposites via pickering emulsion / J. Wang, W.-C. Law, L. Chen, D. Chen, C.-Y. Tang // *Compos. Part B Eng.* - 2017. - V. 121. - P. 99–107.
257. Sharkawy A. Chitosan-based Pickering emulsions and their applications: A review / A. Sharkawy, M.F. Barreiro, A.E. Rodrigues // *Carbohydr. Polym.* - 2020. - V.250. - P. 116885.