

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный университет имени А.Н.Косыгина»
(Технологии. Дизайн. Искусство)

На правах рукописи



Черногорцева Марина Вячеславовна

**РАЗРАБОТКА ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ МЕДИКО-
БИОЛОГИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ГИАЛУРОНОВОЙ
КИСЛОТЫ И ЕЕ КОМПЛЕКСОВ С ХИТОЗАНОМ**

Специальность 05.17.06 – Технология и переработка
полимеров и композитов

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
Доктор химических наук, профессор
Кильдеева Н.Р.

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ:

	Стр.
Введение	5
1 Литературный обзор	11
Перспективы использования биополимеров в регенеративной	
1.1 медицине и тканевой инженерии: разработка матриц для	11
выращивания живых тканей	
1.2 Получение гидрогелей на основе гиалуроновой кислоты	15
1.2.1 Гиалуроновая кислота: особенности строения и свойства	15
1.2.2 Модификация и химическая сшивка гиалуроновой кислоты	18
1.3 Химическое модифицирование хитозана: получение	21
гидрогелей медико-биологического назначения	
1.3.1 Влияние химического строения и структуры хитозана на	21
свойства материалов медицинского назначения	
1.3.2 Получения гидрогелей хитозана с использованием	25
сшивающих реагентов	
1.4 Электроформование как метод получения матриц для	30
тканевой инженерии и регенеративной медицины	
1.4.1 Особенности метода электроформования из растворов	31
полимеров	
1.4.2 Возможности использования волокнистых материалов,	36
полученных электроформованием, в регенеративной	
медицине	
1.4.3 Технологические параметры электроформования из	38
растворов полимеров	
1.5 Полиэлектролитные комплексы на основе полисахаридов	47
хитозана и гиалуроновой кислоты. Применение в медицине	
2 Методическая часть	54
2.1 Характеристика сырья и реактивов	54
2.2 Методы исследования	55

3	Результаты и их обсуждение	65
3.1	Разработка материалов медико-биологического назначения на основе гиалуроновой кислоты	65
3.1.1	Сравнительное изучение гидродинамических свойств и стабильности растворов гиалуроновой кислоты в солевой форме и форме поликислоты	65
3.1.2	Получение гидрогелей путем сшивки гиалуроновой кислоты диглицидиловым эфиром 1,4 бутандиола (БДДЕ)	70
3.1.3	Получение и исследование биополимерных матриц на основе гидрогелей гиалуроновой кислоты, сшитой БДДЕ для выращивания клеток	74
3.1.4	Электроформование волокнистых материалов на основе гиалуроновой кислоты	78
3.1.4.1	Получение нановолокон из растворов гиалуроновой кислоты	78
3.1.4.2	Получение нановолокон из водных растворов гиалуроновой кислоты и поливинилового спирта	80
3.2	Разработка новых материалов для медицины и тканевой инженерии на основе полиэлектролитных комплексов гиалуроновой кислоты и хитозана	85
3.2.1	Изучение закономерностей фазового разделения в системе гиалуроновая кислота – хитозан	86
3.2.2	Изучение условий образования водорастворимых ПЭК хитозана и гиалуроновой кислоты	90
3.2.3	Изучения условий гелеобразования в растворах хитозана и гиалуроновой кислоты в процессе химической сшивки	95
3.2.4	Получение и исследование процесса набухания гидрогелей на основе химически сшитого хитозана и ГК	98
3.2.5	Получение макропористых биodeградируемых матриц с использованием нерастворимых комплексов хитозана и гиалуроновой кислоты	101

	Влияние способа модифицирования хитозановых матриц	
3.2.6	гиалуроновой кислотой на их цитотоксичность и процесс культивирования клеток	105
	Получение композиционных гидрогелей, на основе	
3.2.7	гиалуроновой кислоты и хитозана, сшитых диглицидиловым эфиром 1,4 бутандиола	110
	Получение нановолокнистых материалов на основе	
3.2.8	композиций полиэлектролитов гиалуроновой кислоты и хитозана	114
	Модифицирование хирургической шовной нити	
3.2.9	композициями на основе полисахаридов хитозана и ГК	119
	Выводы	135
	Список литературы	136

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Благодаря возобновляемости источников получения, экологической безопасности, биосовместимости и биологической активности полисахариды являются уникальным сырьем для создания полимерных материалов медико-биологического назначения. Гиалуронат натрия - соль гиалуроновой кислоты (ГК) – природный полисахарид, естественный компонент межклеточного вещества мягких тканей позвоночных. Важнейшие функции ГК в организме, выполняющей роль суставной смазки, поддерживающей регенерацию, гидратацию и упругость тканей, определяются особенностями строения и свойствами: полиэлектролитной природой, высокой влагоудерживающей способностью, растворимостью в воде, высокой вязкостью и способностью к гелеобразованию. Полиэлектролитные комплексы на основе биополимеров участвуют практически во всех биохимических процессах в живом организме, в связи с этим, разработка методов переработки гиалуроновой кислоты и хитозана в материалы биомедицинского назначения в виде интерполиэлектролитных комплексов является актуальной задачей, решение которой может послужить основой для создания новых биоподобных материалов, применяемых в регенеративной медицине и тканевой инженерии и сочетающих в себе оптимальные биологические свойства обоих компонентов.

В настоящее время различными отечественными и зарубежными научными коллективами показана возможность получения полимерных материалов медико-биологического назначения на основе комплексов хитозана и ГК. Однако, в технологии переработки биополимеров остаются актуальными задачи поиска новых путей управления процессом структурообразования в растворах полисахаридов и альтернативных решений по стабилизации полиэлектролитных комплексов при получении

высокопористых гидрогелевых матриц для регенеративной медицины или модификации поверхности хирургических шовных нитей

Работа посвящена актуальной проблеме создания полимерных материалов для новых биомедицинских технологий и выполнялись в соответствии с приоритетными направлениями науки РФ в рамках Госзадания Минобрнауки РФ (проект №10.7554.2017/8.9) и грантов Российского фонда фундаментальных исследований №15-04-07669 и №18-29-17059.

Объекты исследования – ГК и интерполиэлектролитные комплексы (ИПЭК) на основе полисахаридов хитозана и гиалуроновой кислоты; сшитые гидрогели биополимеров; пористые биodeградируемые матрицы; методы получения материалов медико-биологического назначения.

Предмет исследования – научное обоснование методов получения материалов на основе гиалуроновой кислоты и ее полиэлектролитных комплексов.

Целью работы является разработка методов получения и модификации материалов медико-биологического назначения на основе гиалуроновой кислоты и ее комплексов с хитозаном.

Для достижения поставленной цели в работе решены следующие **задачи:**

- изучены особенности вязкостных свойств и стабильность растворов гиалуроновой кислоты разной степени нейтрализации;

- изучены закономерности фазового разделения в системе хитозан-ГК-вода при разной кислотности среды и в присутствии стабилизирующих соединений;

- определены оптимальные составы и условия получения биополимерных композиций на основе гиалуроновой кислоты и сшивающих реагентов, обеспечивающие возможность направленного регулирования упругих свойств и влагопоглощения гидрогелей;

- оптимизированы составы и исследована цитотоксичность биodeградируемых пористых матриц на основе ГК, хитозана и ИПЭК хитозан-ГК;

- обоснована технология получения биосовместимой поверхностно-модифицированной хирургической шовной нити из натурального шелка;

- разработаны формовочные композиции и показана возможность электроформования нановолокнистых материалов из растворов, содержащих ГК и ее ИПЭК с хитозаном.

Методы исследования и технические средства решения задач.

С целью определения физико-химических свойств растворов биополимеров применялись методы вибрационной и ротационной вискозиметрии. Фазовое разделение системы хитозан - гиалуроновая кислота проводили с использованием нефелометрии, кондуктометрии и вискозиметрии. Получение композиционных матриц для тканевой инженерии осуществляли методом лиофильной сушки композиций и растворов ГК и хитозана. Степень набухания биополимерных пленок и биodeградируемых матриц изучали гравиметрическим методом. С применением метода атомно-силовой, оптической, конфокальной лазерной и сканирующей электронной микроскопии были изучены морфология матриц и распределение клеток при их культивировании. Получение нановолокнистых материалов на основе растворов ГК проводилось методом бескапиллярного электроформования. Цитотоксичность биополимерных матриц определяли с помощью метода тестирования экстрактов.

Исследования проводились на оборудовании кафедры химии и технологии полимерных материалов и нанокомпозитов и Центра коллективного пользования Российского государственного университета им. А.Н. Косыгина, лаборатории термостойких термопластов ИСПМ им. Н.С. Ениколопова РАН, лаборатории полимеров для биологии ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Исследование цитотоксичности

пористых гидрогелевых матриц проводилось н.с. ИБХ РАН Дроздовой М.А.

Научная новизна исследования:

Впервые установлена взаимосвязь гидродинамических свойств и степени нейтрализации ГК, установлено, что стабильность вязкостных свойств уменьшается в ряду растворов с рН 6,5 > 3,5 > 4,3. Показано, что низкая стабильность растворов с рН 4,3, является результатом релаксационного процесса перераспределения плотности зарядов вдоль цепей поликислоты, приводящее к компактизации последних и снижению степени структурирования раствора.

Изучено влияние ионной силы на процесс комплексообразования в растворах слабых полиэлектролитов хитозана и Н-формы ГК, что позволило выявить область гомогенности их растворов и получить гидрогели гиалуроновой кислоты и хитозана из общего растворителя.

Установлена взаимосвязь состава биополимерных композиций на основе гиалуроновой кислоты и хитозана, физико-химических свойств растворов биополимеров, структуры и свойств сформированных композиционных матриц, степени фиксации клеток на их поверхности и возможности для их роста;

Впервые выявлены особенности гелеобразования в водных растворах хитозана при его сшивке дженипином в присутствии этанола: введение спирта влияет на реакцию взаимодействия аминогрупп с дженипином, снижая скорость реакции и, соответственно увеличивая время начала гелеобразования в растворе хитозана.

Теоретическая значимость. Выявленные закономерности и особенности комплексообразования хитозана с разными формами ГК позволяют воздействовать на параметры процесса получения гидрогелей и управлять их важнейшими структурными, осмотическими и морфологическими параметрами, что является эффективным инструментом регулирования свойств биоматериалов.

Практическая значимость работы заключается в том, что разработанные принципы получения композиционных матриц и параметры модифицирования поверхности хирургической шовной нити композициями на основе ИПЭК гиалуроновой кислоты и хитозана могут служить основой для технологии получения разных типов материалов для хирургии, регенеративной медицины и тканевой инженерии. Установлено влияние добавки остеокондуктивного компонента на структуру и пролиферацию клеток матрикса, на основе сшитого БДДЕ гидрогеля гиалуроновой кислоты.

На защиту выносятся:

Результаты комплексных исследований вязкости, стабильности растворов ГК разной степени нейтрализации и комплексообразования в растворах хитозана и Н-формы ГК, которые составляют основу технологии переработки биополимеров из общего растворителя или поверхностной модификации нерастворимыми ИПЭК.

Обобщенные данные по оценке структурных особенностей, физико-механических и функциональных свойств биополимерных матриц из ГК, хитозана и их ИПЭК, полученных с использованием сшивающих реагентов;

Апробация и реализация результатов работы.

Результаты работы были доложены на *Всероссийских научных конференциях*: Всероссийский конкурс научно-технического творчества молодежи НТТМ-2016 13-16 апреля 2016 г., Москва; Второй Всероссийский научный форум «Наука будущего — наука молодых», 20 - 23 сентября 2016 г., Казань; XI Всероссийская инновационная молодежная научно-инженерная выставка «ПОЛИТЕХНИКА», 04-07 октября 2016 г., Москва. *Международных конференциях*: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016», 11 – 15 апреля 2016 г., Москва; 7,8,9th International conference «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues» including Russian–Hellenic workshop and School of Young Scientists, 2016, 2017, 2018. Heraklion, Crete-Greece; 3rd International Conference «Bio-Based Polymers

and Composites» BiPoCo-2016, 28 August – 1 September, Szeged, Hungary; X Международный биотехнологический форум-выставка «РосБиоТех-2016», конкурс молодых ученых, изобретателей, аспирантов и студентов, 1-3 ноября 2016 года, Москва; Международный форум: Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни, «БИОТЕХ 2018» 23-25 мая 2018; V Международная научно-техническая конференция «Дизайн, технологии и инновации в текстильной и легкой промышленности» (ИННОВАЦИИ-2018) 14-15 ноября 2018; XIV Международная конференция «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (РосХит-2018).

Публикации. Основные положения диссертационной работы опубликованы в **18** печатных работах, из которых **6** – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, **3** – индексируются в Web of Science.

Структура и объем работы. По своей структуре диссертационная работа состоит из введения, трех глав, общих выводов по работе, списка литературы, приложения. Работа изложена на 150 страницах машинописного текста, содержит 78 рисунков, 19 таблиц. Список литературы включает 198 библиографических и электронных источников.

1 Литературный обзор

1.1 Перспективы использования биополимеров в регенеративной медицине и тканевой инженерии: разработка матриксов для выращивания живых тканей

Термин «регенеративная медицина» был впервые упомянут в конце XX века при попытке описать возникшую область медицины, в которой объединялись достижения и знания таких предметов как тканевая инженерия, трансплантация клеток, клеточная биология, биомеханика, протезирование, нанотехнологии и биохимия [1]. Несмотря на все успехи медицины, все же существуют некоторые патологии и травмы, которые не поддаются лечению путем сохранения пораженных органов, и требуют резекции поражений или восстановления с помощью аутологичных тканей или даже замены их аллотрансплантатами [2], но трансплантация органов и тканей связана с возможностью их отторжения в результате иммуносупрессии, а также с нехваткой доноров [3], поэтому главной задачей регенеративной медицины является поиск и использование таких материалов, которые бы минимизировали возможность резкого иммунного ответа при интеграции в организм.

В настоящее время в большой кластер регенеративной медицины входят различные направления науки, отвечающие за восстановление некоторых функций поврежденного организма. Одним из таких направлений является «тканевая инженерия» - отрасль науки, которая направлена на восстановление и регенерацию утраченных или поврежденных тканей с использованием в качестве материала скаффолдов (матриксов), которые в сочетании с клетками и факторами роста обеспечивают решение поставленной задачи [4]. Можно выделить несколько подходов в осуществлении функций тканевой инженерии:

1. Применение биоматериалов в качестве матриксов;
2. Использование клеток для создания искусственных тканей и органов;

3. Создание матриксов и использование биосигналов, которые способны стимулировать клеточный рост, пролиферацию и клеточную дифференцировку [5, 6].

Регенерация тканей может быть достигнута путем стимулирования механизмов восстановления организма, в частности, путем доставки стволовых клеток во внеклеточный матрикс (ВКМ), которые могут выполнять биологические функции, и материалов, которые могут функционировать в качестве каркасов для стимулирования пролиферации клеток.

Экстрацеллюлярный матрикс формирует уникальное микроокружение клетки, выполняя различные структурные и регуляторные функции, для успешного функционирования искусственной системы - ее основа, т.е. подложка, должна удовлетворять целому ряду требований, среди которых биосовместимость, способность к биодеградации с образованием естественных метаболитов, определенные физико-химические, механические и адгезионные свойства, пористая структура носителя [4].

Такой каркас, подложка, роль которых призвана выполнять биополимерный матрикс, должен представлять собой трехмерную конструкцию, по аналогии с ВКМ, обладающую высоким сродством к клеткам ткани, и имеющим способность к деградации в организме со скоростью, соизмеримой с образованием новых тканей (10-15 суток для кожного покрова). Материалы, используемые в регенеративной медицине можно классифицировать следующим образом (таблица 1):

Таблица 1 – Материалы для регенеративной медицины

Используемые материалы:	Примеры:
Природные полимеры	Коллаген, фиброин шелка, хитозан, декстран, альгинат, желатин, гиалуроновая кислота и пр.
Синтетические полимеры	Полигликолиевая кислота, полимолочная кислота, поликапролактон, полидиоксан и пр.
Межклеточная ткань	Ацеллюлярная матрица мочевого пузыря, подслизистая оболочка тонкой кишки, перикард быка, плацентарная мембрана человека.

Четко прописанных стандартов материалов, применяемых в регенеративной медицине и тканевой инженерии, нет, однако из многочисленных работ [7-10], можно выделить ряд требований, которым материал должен соответствовать:

- Биосовместимость;
- биodeградируемость (недеградируемость – в зависимости от нужд);
- атравматичность;
- высокая способность к сорбции;
- минимальный иммунный ответ организма;
- наличие взаимопроникающих пор, необходимых для пролиферации клеток;
- физико-механические характеристики, приближенные к свойствам ВКМ.

В зависимости от назначения матрикса, материал для его получения может быть биodeградируемым, на основе, в частности, природных полимеров, способным к растворению в биологических жидкостях и гидролизу внутри тканей (как химическому, так и ферментативному) или недеградируемым, на основе гидрофобных полиолефинов или полисилоксанов, которые не вступают во взаимодействие с биологической средой и с течением времени, в результате наращивания ткани обрастают тканевой капсулой. Такие полимеры, используют, чаще всего, для получения имплантантов, которые могут находиться в организме в течении длительного периода [11, 12].

Синтетические полимеры, такие как гидроксипроизводные алкановых кислот (полилактид; полигликолид), обладают свойством контролируемой биodeградации, высоким пределом упругости, жесткости и эластичности, они активно применяются в регенеративной медицине, однако, в силу того, что растворяются такие полимеры в агрессивных растворителях, продукты их деструкции обладают некоторой степенью токсичности, что может

ограничивать использование материалов на их основе в некоторых областях тканевой инженерии [13, 14].

ВКМ состоит преимущественно из протеогликанов, гликозаминогликанов, гликопротеинов и гликолипидов [15, 16] ввиду этого из-за со сходством с компонентами ВКМ (наличие гликановых фрагментов, возможность модифицирования полимеров), природные полисахариды (а именно хитозан, альгинаты и гиалуроновая кислота) по данным базы Web of Science рассматриваются как самые актуальные при разработке биоматериалов для тканевой инженерии (рисунок 1) [17, 18].

Использование значительного структурного и функционального разнообразия полисахаридов, делает их наиболее предпочтительными для использования в регенеративной медицине и тканевой инженерии. Однако, для получения материала, свойства которого возможно изменять согласно поставленным задачам, то есть, получать контролируемый продукт, для тканевой инженерии необходимо знать функции биополимеров, от макро- до молекулярного масштаба. Особенности строения и свойства некоторых полисахаридов будут рассмотрены ниже.

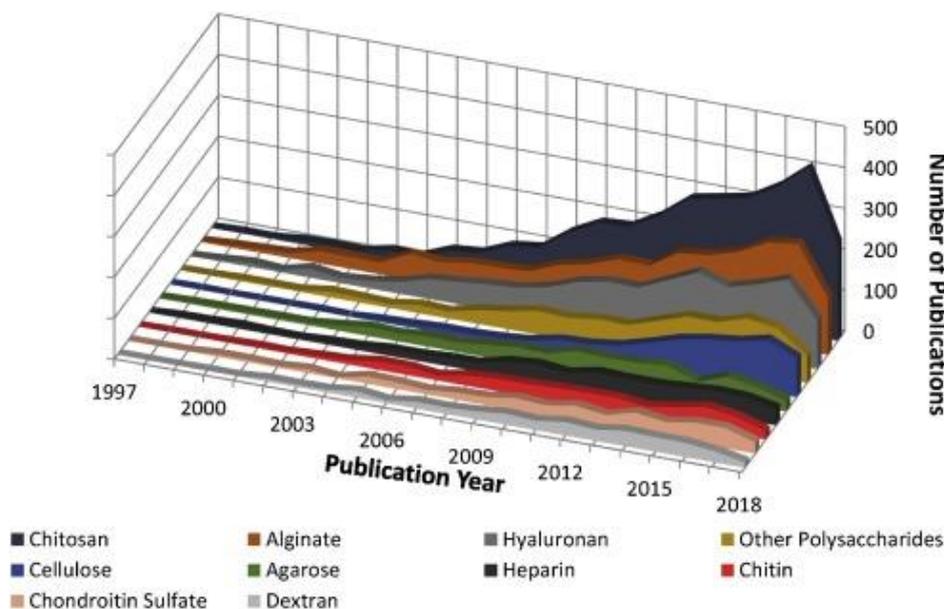


Рисунок 1 – Количество публикаций базы данных Web of Science (по состоянию на 2018 год) с использованием полисахаридов в регенеративной медицине и тканевой инженерии [19].

Чтобы обеспечить прикрепление и пролиферацию клеток, материалы на основе природных и синтетических биodeградируемых полимеров должны обладать определенными адгезионными свойствами и пористой структурой. Высокая пористость и необходимый размер пор в биополимерных матриксах являются основными условиями для заселения клетками и прорастания тканей [20, 21]. Получение материалов с такой морфологией и свойствами поверхности требует особых технологий, которые в последние годы получили импульс к развитию именно благодаря развитию клеточных технологий – это электроформование и использования криотехнологий для формирования пористых гидрогелевых материалов. В литературном обзоре рассмотрены современные методы получения гидрогелей на основе ГК и хитозана, а также особенности электроформования биополимерных волокнистых материалов.

1.2 Получение гидрогелей на основе гиалуроновой кислоты

1.2.1 Гиалуроновая кислота: особенности строения и свойства

Гиалуроновая кислота (ГК), представляет собой анионный, однолинейный гликозаминогликан, который состоит из регулярно повторяющихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина (рисунок 2). Аминосахар в молекуле ГК связан с D-глюкуроновой кислотой через -1,3-гликозидные связи, а дисахаридные звенья сообщаются через -1,4-гликозидные связи [22]. Наличие гидроксильных, карбоксильных и ацетамидных групп, содержащихся в молекуле ГК, придают ей высокую гидрофильную способность, а также могут создавать множество внутри- и межмолекулярных водородных связей в водном растворе; водородные связи придают определенную жесткость молекулярной цепи ГК, и в конформационном виде она может предстать в виде как двойной или одинарной спирали, в виде вытянутых цепей или же зацепляться в виде петелек. Благодаря присутствию полярных и неполярных участков в макромолекуле, ГК обладает способностью вступать во взаимодействия с различными химическими соединениями, что позволяет перерабатывать ее в

материалы различного спектра применения [23]. Так, например, в [24] показано, что гиалуроновая кислота в солевой форме, выступает как наиболее совместимый компонент для получения гидрогелевых систем с альгинатом натрия по сравнению с пектином, галактуроновой кислоты и сукцинированным хитозаном. Благодаря включению ГК в структуру альгинатных гидрогелей и ее высокой влагоудерживающей способности, склонность альгинатных гидрогелей к синерезису не увеличивается, тогда как для других компонентов, этот показатель становится критическим. А в работе [25] был получен лечебный гидрогелевый материал на основе гиалуроната натрия и альгината, наполненный лекарственными препаратами (деринат, диоксидин, лидокаин), который, обладая пролонгированным лечебным действием, способствовал восстановлению защитных функций стенок мочевого пузыря у крыс. Альгинат натрия в такой системе, отвечает за адгезивные свойства материала, а гиалуронат – способствует восстановлению функций стенок мочевого пузыря. Биополимерные композиции на основе альгината натрия- ГК в солевой форме соотношением компонентов 70/30 и включенными наночастицами серебра были использованы для стимулирования репаративной способности мягких тканей при дефекте. Такие композиции обладали выраженным стимулированным эффектом регенерации мягких тканей [26].

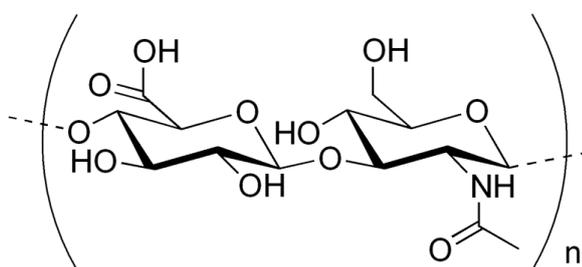


Рисунок 2 - Строение элементарного звена гиалуроновой кислоты

Так как гиалуроновая кислота - полисахарид, являющийся одним из основных компонентов внеклеточного матрикса, входящий в состав соединительной, эпителиальной и нервной тканей сырьем для получения выступают различные клеточные структуры позвоночных (петушиные гребни,

мозговые хрящи, синовиальная жидкость суставов), помимо этого существует биотехнологический способ выделения ГК из растительного сырья с помощью ферментации бактерий типа *Streptococci* и *Lactococcuslactis* [27, 28]. Полученная из сырьевых источников ГК представляет собой сильно гидратированную натриевую соль (ГК-Na), которую обозначают как гиалуронат или гиалуронат. ГК и ее соли – водорастворимые полимеры, имеющие отличительное свойство, растворяясь при физиологических значениях pH в воде, полимерная цепь макромолекулы ГК принимает конформацию клубка, что приводит к образованию высоковязких растворов при малых концентрациях, а при более высоких (1-4 % масс.) – псевдопластических жидкостей, именуемых в некоторых литературных источниках «псевдогелями», которые нестабильны при воздействии сдвига [29, 30].

При введении гиалуроновой кислоты в организм, например, в кожный покров, под действием тканевых гиалуронидаз и свободных радикалов происходит биодеструкция полисахарида с образованием низкомолекулярных фрагментов и олигосахаров, которые и отвечают за комплекс положительных свойств ГК, и позволяют использовать данный полимер в качестве носителя для замедленного высвобождения веществ. Связываясь с фибробластами и кератиноцитами, они запускают цепь внутриклеточных реакций, обеспечивающих не только синтез новых биологически активных веществ, но и активацию миграции клеток в место внедрения, и как результат – обновление состояния межклеточного матрикса – среды и микроокружения, в котором функционируют клетки.

Как известно, реологические и биологические свойства гиалуроновой кислоты меняются в зависимости от ее молекулярной массы, значения которой находятся в диапазоне от 5 до 9000 кДа, поэтому знания о свойствах, сопутствующих каждому значению молекулярной массы полимера необходимы для правильного использования ГК при получении биоматериалов. Так, в работах [31,32] показано, что использование

гиалуроновой кислоты с молекулярной массой выше 500 кДа подавляет размножение и пролиферацию клеток, тогда как продукты ее деградации значения молекулярной массы которой не превышают 100 кДа, значительно увеличивают скорость пролиферации фибробластов и положительно влияют на образования новых кровеносных сосудов. ГК с молекулярной массой 135 кДа, стимулирует образование дендритных клеток и усиливает реакцию иммунной системы на чужеродные антигены, что важно при трансплантации органов [33]. В исследовании [34], изучение влияния молекулярной массы (10 кДа, 100 кДа, 1 МДа, и 2 МДа) на реологические характеристики и ферментативную активность, показало, что ГК с высокой молекулярной массой при низких концентрациях и низкомолекулярная ГК с высокой концентрацией, имеют сходные значения со значениями слюны человека в диапазоне скоростей сдвига, необходимых для нормального функционирования ротовой полости. А ингибирующее действие высокомолекулярной ГК на активность лизоцима и пероксидазы гораздо выше по сравнению с очищенными ферментами.

Деградация гиалуроновой кислоты может происходить по разным направлениям, одним из которых, как показано выше является деструкция под действием гиалуронидаз в живых тканях, так называемая – ферментная деструкция. Помимо этого, ГК чувствительна к кислотнo-щелoчному гидролизу [35] и к воздействию окислительно-восстановительных сред [36].

1.2.2 Модификация и химическая сшивка гиалуроновой кислоты

Как уже было сказано, в макромолекуле ГК находится большое количество гидроксильных групп, наличие которых обуславливает высокую влагоудерживающую способность полимера. После растворения в воде ГК, при высоких концентрациях образуются упругие, но хрупкие гидрогели, стабилизированные гидрофобными и водородными связями. Однако, чтобы такие гидрогели ГК можно было использовать в регенеративной медицине качестве матрицoв, необходимо их стабилизировать путем ковалентной

модификации исходного полимера, для получения трехмерной молекулярной структуры, способной набухать в воде или водной среде как до заданного значения, так и до полного растворения полимера во времени [37]. На рисунке 3 показаны возможные способы модифицирования ГК по карбоксильным или гидроксильным группам, приводящие к процессу перекрестного сшивания, и образованию поперечных связей между линейными молекулами полимера [38].

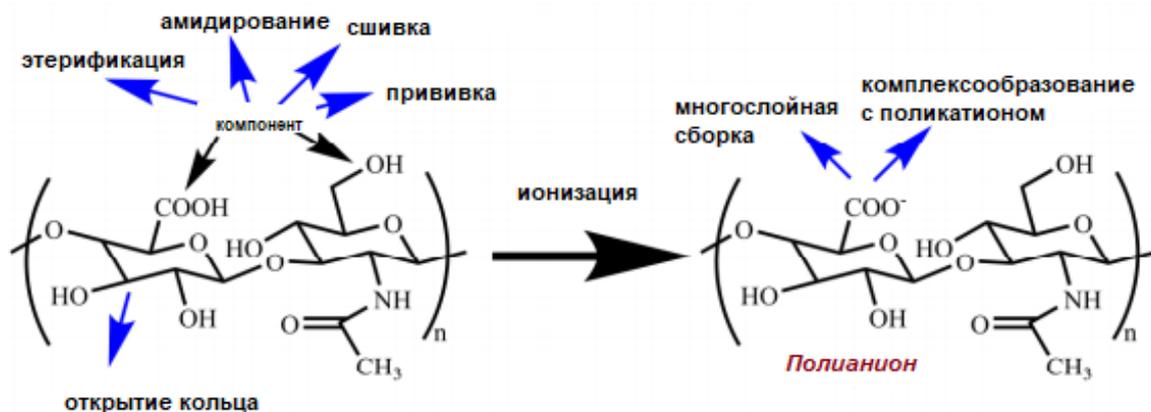


Рисунок 3 – Возможные способы модифицирования ГК [39]

Спектр использования гидрогелей на основе гиалуроновой кислоты в медицине обширен. В основном такие гидрогели используются для получения филлеров – инъекционных препаратов, использующихся в эстетической косметологии для выравнивания кожного покрова, коррекции рубцов или шрамов [40, 41, 42]. Для получения филлеров используется способ модифицирования ГК методом сшивки, образования прочных поперечных связей, в результате чего сшитый гидрогель пролонгировано разлагается; с 24 часов, время деградации может увеличиться до 6-12 месяцев [43]. В качестве сшивающих реагентов гиалуроновой кислоты используют такие реагенты как: диальдегиды, карбодиимиды, бутадиенсульфоны, диэпоксиды и соли двухвалентных металлов. Согласно литературным данным [44], наиболее распространенными сшивающими реагентами для ГК выступают дивинилсульфон (ДВС) и 1,4-бутандиол-диглицидиловый эфир (БДДЕ). Реакцию сшивания ДВС, запатентованную в 1968 году [45], проводят в жестких щелочных условиях ($\text{pH} \geq 13$; 0,2М NaOH), при этом образуются

сульфонильные бис-этильные связи между гидроксильными группами ГК (рисунок 4). Данный вид сшивающего реагента предпочтителен тем, что реакция сшивания проходит при комнатной температуре и 60 минут достаточно для завершения сшивки, дополнительное введение в реакционную смесь NaCl, увеличивает степень сшивания. В результате такой реакции образуются гели, способные в силу своих высоких влагоудерживающих способностей применяться в медицинской области [46, 47].

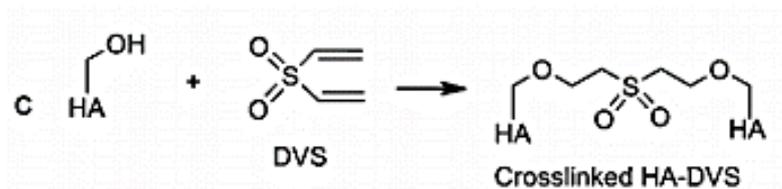


Рисунок 4 – Схема реакции сшивки ГК-ДВС

Реакция сшивания с использованием в качестве реагента 1,4 бутандиол диглицидилового эфира (рисунок 5), так же, как и с ДВС проходит в присутствии раствора щелочи (0,25M), однако в этом случае, реакция сшивки может протекать как с первичной (-CH₂OH) так и со вторичной (-CHOH) гидроксильной группой элементарного звена гиалуроновой кислоты [48].

Реакция сшивки ГК-БДДЕ при высоких значениях pH (≥ 13) состоит в раскрытии эпоксидного кольца с образованием эфирных связей (рисунок 6, а), так как при pH 10, что выше pKa гидроксильных групп, они являются нуклеофильными по сравнению с депротонированными карбоксильными группами, в следствии этого эпоксиды вступают во взаимодействие с гидроксильными группами с образованием простых эфирных связей [49, 50]. Однако, когда pH раствора ниже значения pKa, депротонируется меньшее количество гидроксильных групп и преобладает анионная карбоксильная группа, что способствует образованию сложноэфирной связи (рисунок 6, б). Это было подтверждено в [51], когда реакцию сшивки ГК с БДДЕ проводили в кислых условиях при pH 2 - 4,5. При проведении реакции в слабокислых условиях, авторы [52], наблюдали образование простых эфирных связей, вместо сложноэфирных связей, что было связано с используемыми

значениями pH (4.7, 6.1 и 8), при которых количество депротонированных гидроксильных групп больше, чем при pH ниже 4,5.

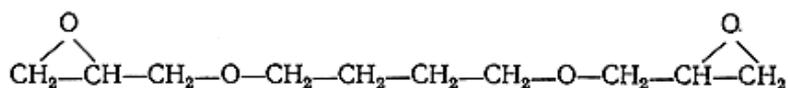


Рисунок 5 – Молекула 1,4 бутандиол диглицидилового эфира

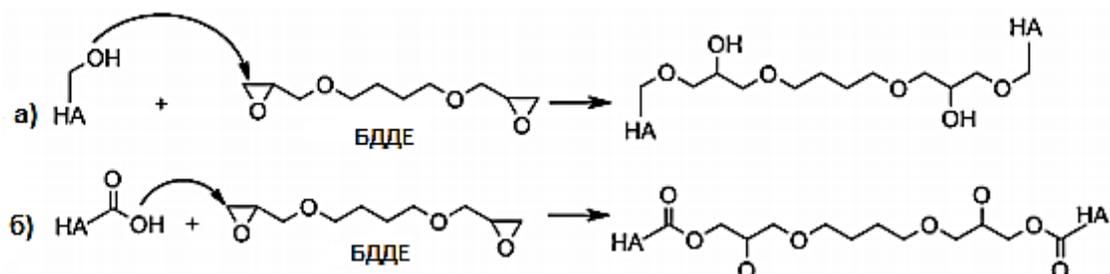


Рисунок 6 – Взаимодействие БДДЕ с ГК с образованием: а) простых эфирных связей; б) сложноэфирных связей

Следует отметить, что продукты разложения сшитой системы ГК-БДДЕ не обладают цитотоксичностью, а эпоксидные соединения гидролизуются в простые диолы не оказывающие токсического воздействия на организм, что было показано в [53, 54].

1.3 Химическое модифицирование хитозана: получение гидрогелей медико-биологического назначения

1.3.1 Влияние химического строения и структуры хитозана на свойства материалов медицинского назначения

Аминополисахарид хитозан (рисунок 7), состоящий из β - (1 \rightarrow 4) связанного линейного сополимера, содержащего N-ацетил-D-глюкозамин и D-глюкозамин в качестве мономерных звеньев - продукт щелочного деацетилирования хитина, соединения, находящегося в природе в экзоскелете ракообразных, насекомых и некоторых видов грибов [55, 56].

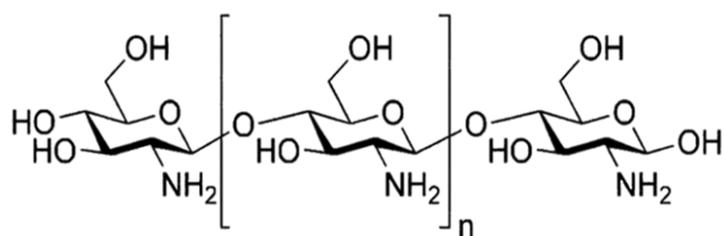


Рисунок 7 – Фрагмент макромолекулы хитозана

Являясь полиоснованием, хитозан хорошо растворим в водных растворах некоторых минеральных и органических кислот, что наряду с хорошими показателями биоразлагаемости и биосовместимости позволяет находить свое применение в широком спектре областей, в том числе медицине. Важная особенность хитозана – это его структурная универсальность. Благодаря наличию двух гидроксильных групп (положение С-3 и С-6) и аминной группы (положение С-2) в каждом повторяющемся звене делает его гибким для химической модификации в качестве материала для получения различных функциональных форм таких как: гели, нановолокна, мембраны, наночастицы, микрочастицы и матриксы.

Из-за своей катионной природы, хитозан обладает мукоадгезивными свойствами, которые полезны для улучшения биодоступности лекарств перорального введения [57, 58]. В работе [59] раствор хитозана, в который предварительно был введен лекарственный препарат (лидокоин) использовался для аппретирования нетканого материала на основе льна, применяемого для лечения местных поражений кожи. Транспортные свойства такого материала будут существенно отличаться от обычной полимерной пленки. Показано, что полученные методом аппретирования материалы на основе хитозана и волокнистой матрицы методом пропитки под давлением, характеризуются более длительным временем высвобождения лекарственного препарата, по сравнению с поверхностной модификацией волокнистого материала раствором хитозана.

В организме, деградация хитозана происходит под действием ферментативного гидролиза лизоцимами. Разрушение хитозана лизоцимами происходит путем распада гликозидных связей между полисахаридными

звеньями в полимере, продуктами такого распада являются глюкозамин и сахарид, которые могут вступать в метаболизм или же хранится в организме в виде протеогликанов [60]. Отсутствие цитотоксичности хитозана и его антимикробные свойства были продемонстрированы в серии работ, в отношении ряда грамположительных бактерий / грамотрицательных бактерий с высоким уровнем ответа. Уровень антимикробной активности хитозана как показано в работах [61, 62], зависит от его молекулярной массы, степени деацетилирования и полидисперсности. Так, хитозановые микросферы, полученные в работе [63] с высокой степенью деацетилирования (97,5%) приводили к более высокой плотности положительного заряда, что придавало более сильную антибактериальную активность, чем умеренная степень деацетилирования (83,7%), в борьбе с *Staphylococcus aureus* при pH 5,5. Сравнительное изучение влияния хитозана с различными молекулярными массами (ММ = 1671, 1106, 746, 470, 224, и 28 кДа) и его олигомеров (ММ = 22, 10, 7, 4, 2, и 1 кДа) на антимикробную активность ряда бактерий показало, что хитозан имеет более высокую антибактериальную активность, чем олигомеры. Он заметно ингибировал рост большинства протестированных бактерий, хотя ингибирующее действие различалось в зависимости от молекулярной массы и конкретной бактерии. Было отмечено, что хитозан обычно проявлял более сильное бактерицидное действие на грамположительные бактерии, чем на грамотрицательной бактерии. Так же на активность хитозана влиял используемый диапазон pH 4,5 - 5,9. При более низком значении pH уровень антибактериальной активности хитозана был значительно выше [64].

Изменяя параметры степени деацетилирования, молекулярной массы и pH раствора, становится возможным контролировать высвобождение лекарственных средств при изготовлении лекарственных форм с замедленной скоростью деградации в организме. Авторы ряда работ [65, 66, 67], продемонстрировали влияние pH исходного раствора хитозана на образование наночастиц/микрочастиц хитозана используемых для адресной доставки

лекарств выделив три зоны влияния рН на размер частиц: 1) рН = 3,30-4,5. В промежутке этих значений, хитозан содержит протонированные $-\text{NH}^{3+}$ группы, что приводит к образованию крупных частиц; 2) при рН = 4,5 - 5,0 образуются мелкие частицы; 3) зона агрегации, где рН раствора хитозана равен значению рКа 6,5.

Большое количество работ посвящено получению пленочных, волокнистых и гидрогелевых материалов на основе хитозана, такие материалы используются в качестве покрытия на раны, оболочек для лекарственных средств. Для повышения эффективности таких материалов в состав, например, пленок вводят различные типы биологически активных соединений, или же используют хитозан в качестве полимерной композиции. Например, разработана и исследована [68] полимерная композиция на основе бактериального поли-3-гидроксибутирата и хитозана с инкапсулированным в ней антибиотиком широкого спектра действия - рифампицином. Оба биополимера биосовместимы и способны к ферментативной и гидролитической деструкции. Варьируя соотношение поли-3-гидроксибутирата и хитозана в смеси, изменяя, тем самым, соотношение гидрофильного и гидрофобного компонентов, можно воздействовать не только на сорбционную емкость воды и лекарственного вещества, но и на профиль его контролируемого высвобождения.

Гелевые коллоидные формы производных хитозана разной молекулярной массы и высокой степени деацетилирования, содержащих кислотные группы могут быть успешно использованы в лечении тяжелых форм заболеваний в сфере офтальмологии, стоматологии, акушерства и гинекологии, брюшной хирургии. Раневые покрытия на основе коллаген-хитозановых систем были предложены [69], для культивирования и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток человека в клетки нервной и сердечной ткани, кожи.

Растворы хитозана могут быть использованы не только для получения новых материалов медицинского назначения, но и для модификации готовых

полимерных изделий, например, синтетических шовных нитей [70, 71, 72] с целью повышения их биосовместимости.

С целью придания материалам на основе хитозана свойств, обеспечивающих нерастворимость, но способность к высокой степени набухания в воде используют метод химического модифицирования активных функциональных групп, используя сшивающие реагенты.

1.3.2 Получения гидрогелей хитозана с использованием сшивающих реагентов

Степень, тип и условия сшивания являются важными параметрами в синтезе гидрогелей [73]. Высокая степень сшивки приводит к образованию хрупких гидрогелей с низкой набухаемостью и адсорбционной способностью из-за снижения количества свободных amino- и гидроксильных групп, участвующих в реакции сшивки, поэтому необходимо подбирать условия проведения сшивания для получения материала с оптимальным комплексом свойств [74].

Основные механизмы сшивания хитозана происходят с использованием сшивающих реагентов ковалентного и ионного типа. Ковалентное сшивание хитозана представляет собой химическую реакцию, которая приводит к образованию стабильных ковалентных связей между сшивающим агентом и полисахаридными цепями. Любое соединение с по меньшей мере двумя функциональными группами, способными к реакции конденсации с полимером, может служить ковалентным сшивающим реагентом. Наиболее распространенным ковалентным сшивающим реагентом является глутаровый альдегид (ГА). При взаимодействии с раствором хитозана альдегидные группы ГА вступают в реакции с первичными аминогруппами хитозана, образуя основания Шиффа, рисунок 8.

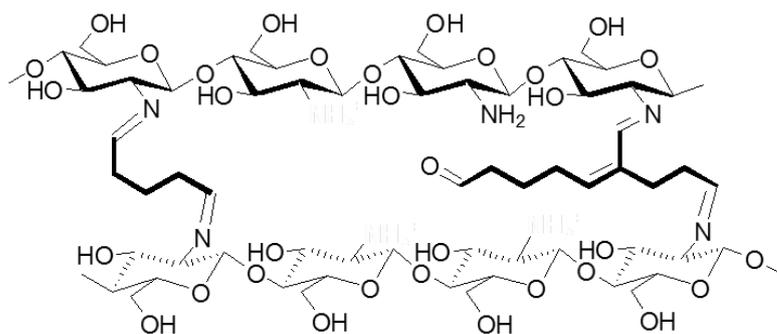


Рисунок 8 – Продукт взаимодействия хитозана с глутаровым альдегидом

В качестве ковалентных сшивающих реагентов могут выступать соединения, обладающие эпоксидными группами, такие как – эпихлоргидрин [75] или диглициловый эфир этиленгликоля [76]. Процесс сшивания в случае их использования протекает с открытием эпоксидного кольца реагента и реакцией конденсации, проходящую с гидроксильными группами хитозана. Ковалентное сшивание является необратимой реакцией, а гидрогели хитозана сшитые по такой схеме остаются стабильными даже при очень низком значении рН среды (рН=1) [77, 78].

В процессе ионного сшивания происходит образование ионных связей между сшивающим агентом и макромолекулой хитозана. В водном растворе заряд ионного сшивающего реагента противоположен заряду полимера, возникающее электростатическое притяжение полимерных цепей к ионным зарядам вызывает эффект ионного сшивания (рисунок 9, тип Б). Сшивающим реагентом ионного типа могут выступать любые химические соединения имеющие функциональные группы способные генерировать отрицательный заряд в водной среде: $-\text{COO}^-$, $-\text{SO}_3^-$, $-\text{O}-\text{PO}_3^{2-}$. Наиболее распространенными сшивающими реагентами являются цитраты, полифосфаты, а также щавелевая и сульфосукциновая кислоты. По сравнению с хитозаном, сшитым ковалентными связями, ионно-сшитый хитозан менее стабилен в кислых растворах (растворяется при рН = 3) [73].

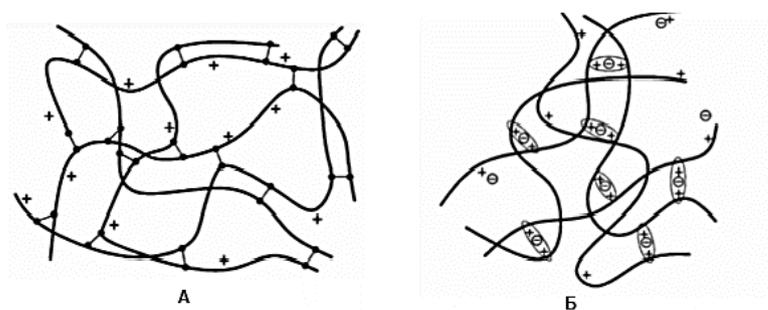


Рисунок 9 – Схематическое изображение сшивания гидрогеля: А – ковалентными сшивающими реагентами; Б – ионными сшивающими реагентами

Однако все вышеуказанные сшивающие реагенты могут придавать токсичность полученным гидрогелям, даже после обязательной стерилизацией материала перед введением в организм присутствие свободных непрореагировавших диальдегидов не может быть полностью исключено, что представляет собой серьезную проблему для использования биосовместимых материалов [79]. В качестве альтернативного сшивающего агента авторы [80, 81], предлагают использовать продукт природного происхождения – дженипин (компонент полученный из растения *Gardenia jasminoides Ellis*). Дженипин взаимодействует с хитозаном по типу ковалентного сшивающего агента, взаимодействуя с аминогруппами полимера, рисунок 10 [82].

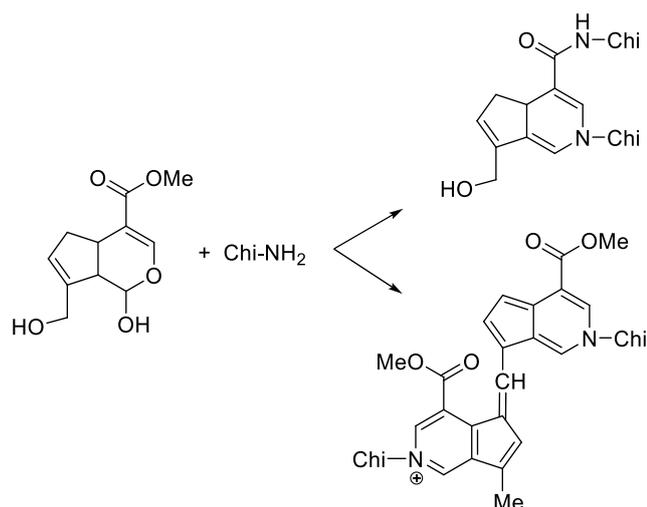


Рисунок 10 - Строение дженипина и продуктов его взаимодействия с хитозаном [83]

Использование такого сшивающего реагента для получения гидрогелей на основе хитозана не оказывает цитотоксичности на бактерии *Helicobacter Pylori* используемых для лечения желудочных инфекций, пролиферацию фибробластов и клеточную адгезию [84, 85, 86].

В исследовании [87], в качестве сшивающего был использован бифункциональный сшивающий реагент на основе диэпоксида (диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола), который взаимодействует с хитозаном через реакционноспособную аминогруппу полисахарида (рисунок 11).

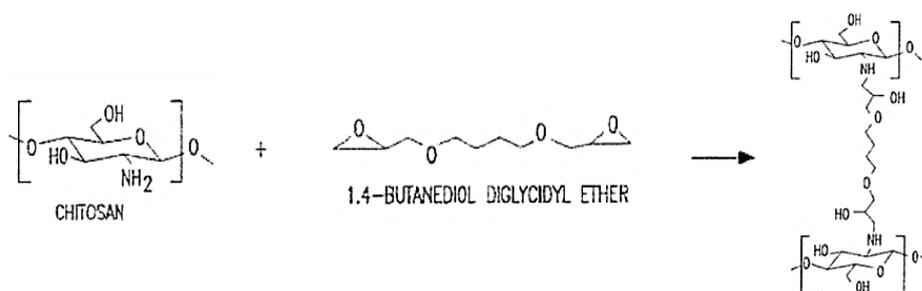


Рисунок 11 – Схема реакции сшивки хитозана и БДДЕ [87]

Изменяя молярный стехиометрический избыток диэпоксида (содержание диэпоксида в группах NH_2 на хитозане составляло от 1/2 до 1 ($0,5 <$), от 1 до 1 ($1 <$) и от 5 до 1 ($5 <$)), получали пленки и скаффолды на основе хитозана, которые сушили замораживанием для получения материалов с различной степенью сшивания, для роста и профилирования суставных хондроцитов. Использование такого способа сшивки позволил придать скаффолду дополнительную жесткость, не влияя на биосовместимость или свойства адгезии клеток, напротив, повышение механической прочности обеспечивало дополнительную пролиферацию клеток и сохранение морфологии. На снимках СЭМ, морфология клеток была типичной для хондроцитов.

Как показано на рисунке 12, предложенная схема реакции взаимодействия хитозана с БДДЕ, может привести к образованию структур 1 и 2, их соотношение возможно контролировать путем оптимизации условий реакции, а именно температуры и процентного содержания диэпоксида в

реакционной смеси: концентрацию конечного эпоксидного фрагмента (структура 2) оценивали, как функцию температуры реакции и процента диэпоксида путем титрования тиосульфата натрия. Свободные эпоксидные группы могут быть превращены в диолы путем гидролиза при последующей обработке кислотой (например, 0,1М HCl) или основанием (например, NaOH) [88].

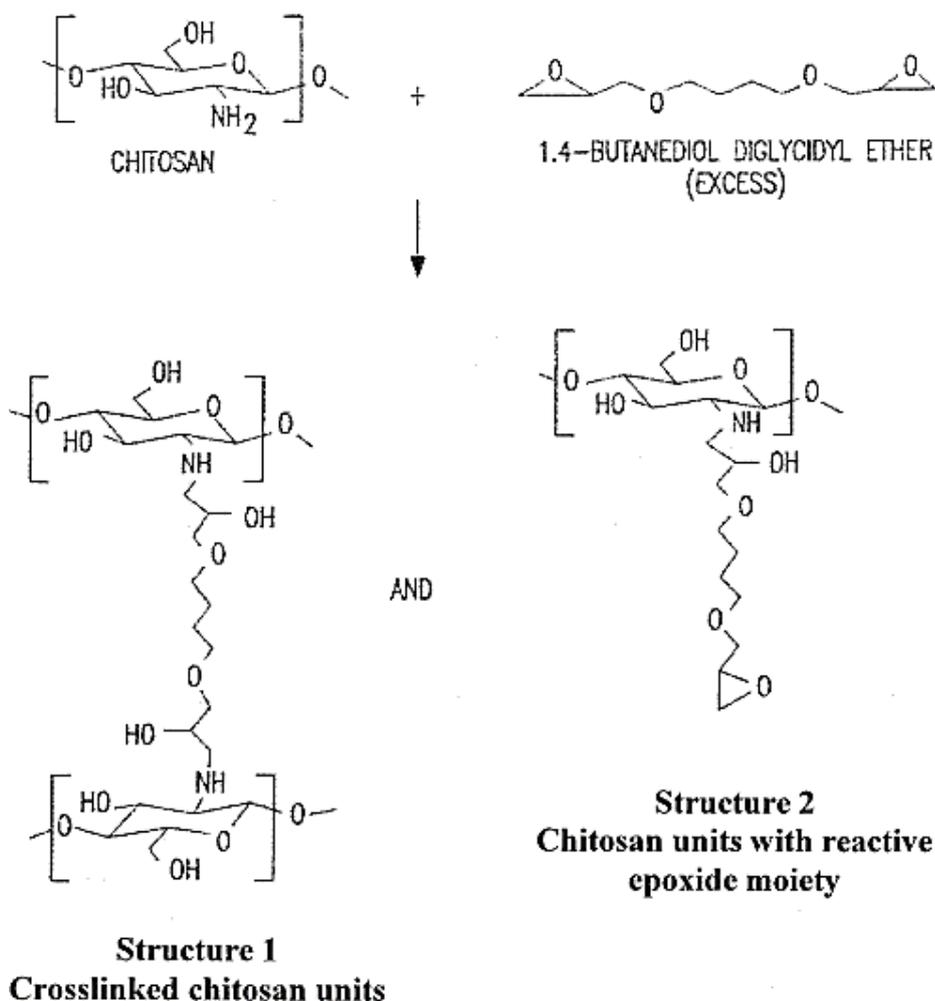


Рисунок 12 – Взаимодействие БДДЕ с первичными аминогруппами хитозана с образованием матрицы (а) и непрореагировавшей эпоксидной группой сшивающего реагента (б) [88]

Однако, в некоторых литературных источниках встречаются скептические взгляды на использование эпокси соединений в качестве сшивающих реагентов для получения материалов медико-биологического назначения в силу возможного возникновения диолов, которые оказывают токсичное действие на организм. Для устранения остаточных продуктов

реакции, композицию сшитого полисахаридного геля подвергают термическому, кислотному или основному гидролизу, или нуклеофильному раскрытию кольца. Одновременно или после инактивации эпоксидных групп (например, нагреванием, гидролизом или нуклеофильным присоединением) образующиеся продукты реакции эпоксида удаляются путем очистки, например, методом диализа. Полученная гелевая композиция, обедненная эпоксидными соединениями, может быть подвергнута стерилизации для получения стерильного сшитого полисахаридного геля, подходящего для использования в качестве наполнителя мягких тканей (филлеров) [89].

В работе [90], была поставлена задача получения гемостатического материала на основе ковалентно сшитого раствора хитозана (концентрация 1%-3%) с использованием БДДЕ. Соотношение БДДЕ/моносахаридное звено ХТЗ было использовано в пределах от 0,001:1 до 1:1 моль/моль. Реакция проводилась в кислой среде (растворитель ХТЗ уксусная кислота 1%-3%). Результаты показывали, что полученный лиофильным высушиванием макропористый матрикс на основе сшитого гидрогеля обладает превосходными гемостатическими свойствами. Благодаря способности такого материала к влагоудерживанию, эритроциты и тромбоциты собираются на поверхности матрикса приводя к уменьшению потери крови. Положительный заряд на поверхности матрикса ХТЗ может активировать процесс свертывания крови, например, активировать ускорение коагуляции гепаринизированной крови.

1.4 Электроформование как метод получения матриксов для тканевой инженерии и регенеративной медицины

Наравне с получением 3D матриксов из гидрогелей на основе природных биополимеров с использованием метода сублимационной сушки, для создания структуры имитирующей естественный внеклеточный матрикс организмов в последнее время все чаще и чаще используется метод формования волокон из растворов полимеров под действием сил электростатического поля.

1.4.1 Особенности метода электроформования из растворов полимеров

По совокупности процессов сопровождающих образование волокон электроформование (ЭФ) можно отнести к сухому безфильтрному методу, при котором волокнообразование из полимерного раствора происходит в электростатическом поле высокого напряжения. Высокое напряжение генерируется между волокнообразующим (до 60 кВ) и собирательным электродом, который может быть в виде стержня, пластины или цилиндра, а также может быть движущимся, а не стационарным [91].

Под действием индуцированных в растворе полимера одноименных электрических зарядов, в результате кулоновского электростатического взаимодействия, происходит деформация поверхности исходного раствора полимера, образование конуса Тейлора [92, 93] и вытягивание его в тонкую струю, которая при определенном значении вязкости, поверхностного натяжения и напряженности электростатического поля может расщепляться на более тонкие струи (рисунок 13), которые за счет испарения растворителя отверждаются и осаждаются на приемном электроде в виде волокнистого облака, диаметр таких волокон находится в диапазоне от 1 до 100 нм [94].

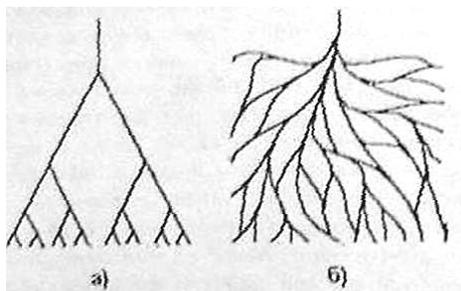


Рисунок 13 – Характер последовательных расщеплений: а) идеальное последовательное расщепление струи; б) реальное последовательное расщепление струи

В настоящее время производятся установки (рисунок 14, б), позволяющие в полупромышленном масштабе получать ленты из сформованных нановолокон шириной свыше 3-х метров [95]. В таких установках, формование волокон происходит с поверхности гладкого цилиндра (или струнного), наполовину погруженного в формовочный раствор.

По мере вращения цилиндра, на поверхности электрода образуется тонкий слой полимера, из которого под действием электростатических сил вытягиваются струи, которые в электрическом поле после испарения растворителя принимают форму волокон. При осаждении на поверхности нетканого материала (подложки) образуется тонкий цельный слой из нановолокон, который наматывается на приемную бобину.

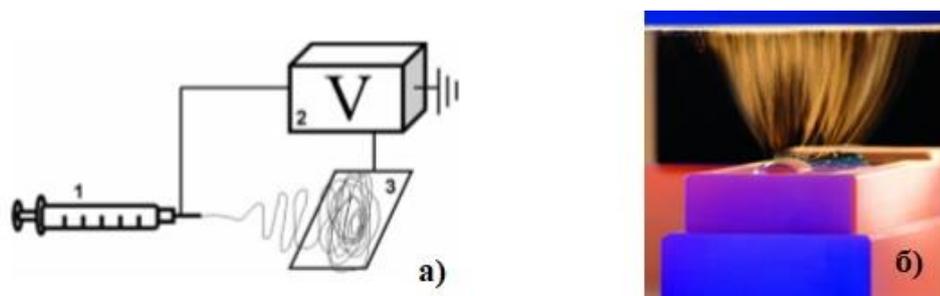


Рисунок 14 – а) 1 – формирующая игла; 2 – источник напряжения; 3 – приемная медная пластина [90]; б) Установка для электроформования

NS Lab «Nanospider™»: 1) собирательный электрод (подложка - нетканое полотно); 2) волокнообразующий электрод (цилиндрический; струнный) [95]

Важной характеристикой процесса ЭФ из растворов полимеров являются свойства формовочного раствора, от которых напрямую зависят свойства нетканого волокнистого материала (таблица 2). Величина *коэффициента поверхностного натяжения* является основополагающей характеристикой раствора. Так как деформация поверхности раствора приводит к росту свободной поверхности, то чем ниже коэффициент поверхностного натяжения формовочного раствора, тем устойчивее струя, образуемая с поверхности волокнообразующего электрода (рисунок 15).

Таблица 2 – Параметры, влияющие на процесс электроформования и свойства полученных нановолокон

Параметры полимера	Параметры формовочного раствора	Дополнительные параметры
Молекулярная масса Молекулярно-массовое распределение	Вязкость Вязкоупругие свойства Концентрация	Свойства подложки Скорость подачи раствора

Температура стеклования Растворимость	Поверхностное натяжение Электропроводность	Напряженность электростатического поля Геометрия электрода Давление паров растворителя Относительная влажность в камере
--	---	--

Разные растворители имеют разное поверхностное натяжение, и в случае использования одного типа растворителя можно получать дефекты в виде бусинок на сформованных волокнах, а при использовании растворителя с более низким значением поверхностного натяжения (этиловый спирт) получатся гладкие волокна при той же концентрации полимера в растворе. Величина коэффициента поверхностного натяжения формовочных растворов равная не более 0,05 Н/м, считается достаточной для формования нановолокон, такое значение характерно для большинства чистых растворителей полимеров, исключение составляют вода и диметилацетамид [96].

Использование в качестве соразтворителей соединений с низким значением поверхностного натяжения, поверхностно-активных веществ, делает возможным снижение коэффициента поверхностного натяжения формовочного раствора [97] и способствует получению гладких волокон.

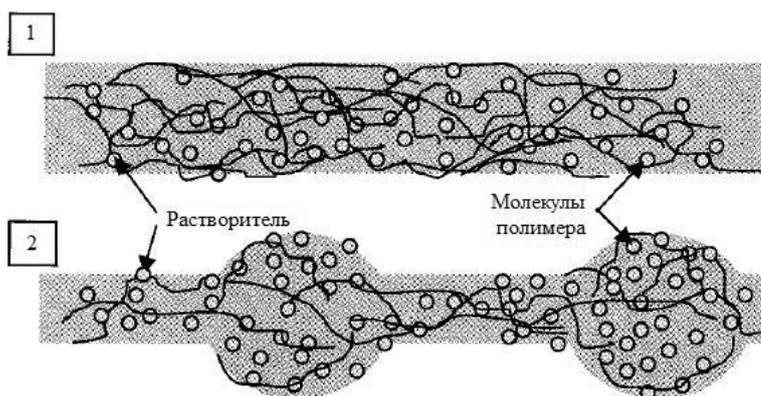


Рисунок 15 – Влияние поверхностного натяжения на струю растворителя: 1 – при высокой вязкости молекулы растворителя распределены между молекулами полимера; 2 – при низкой вязкости, молекулы растворителя создают ассоциаты под действием поверхностного натяжения

Динамическая вязкость еще одна важная характеристика формовочного раствора. Высокая концентрация полимера позволяет стабилизировать вытягивающуюся струю с поверхности формовочного раствора [98]. Установлено, что оптимальными для ЭФ являются растворы полимеров концентрацией до 20% и вязкостью от 0,05 до 1 Па*с, молекулярная масса полимера может варьироваться в широком диапазоне значений (несколько десятков или сотен тысяч).

Такая характеристика формовочного раствора как *удельная объемная электропроводность* определяется периодом релаксации в растворе свободных электрических зарядов под действием электростатического поля. Продолжительность периода релаксации не должна превышать время деформации струи под действием электрических сил [99]. Оптимальный диапазон значений электропроводности находится в области $10^{-6} - 10^{-2}$ 1/Ом*м, верхнем пределом считается нарушение устойчивости струи из-за возникающего газового разряда. Регулирование электропроводности можно проводить путем добавления в формовочный раствор незначительного количества соли или электролитов, благодаря чему в растворе происходит увеличение заряда струи и как следствие, увеличение зоны осаждения волокон [100]. Наиболее предпочтительными значениями относительной диэлектрической проницаемости прядильных растворов являются значения от 5 до 30, но не более 100 в пределе.

Оптимальная *температура кипения прядильного раствора* $T = 50 - 120^{\circ}\text{C}$, при таких значениях температуры происходит отверждение жидкой струи по пути к осадительному электроду, при увеличении значения температуры кипения струя формовочного раствора начинает осаждаться еще на формовочном электроде, что приводит к деформации волокон [101].

Наряду с основными процессами ЭФ описанными выше, немаловажными являются дополнительные факторы. При использовании *легколетучего растворителя*, например, ацетона или хлороформа, вязкость формовочного раствора увеличивается за счет испарения растворителя и

процесс формования затрудняется, или прекращается вовсе. В работах [102, 103], авторы обращают внимание на то, что *при увеличении напряжения*, формование волокон из растворов идет значительно быстрее и стабильнее, однако, диаметр полученных таким образом волокон превышает 100 нм.

Увеличение влажности окружающей среды выше 40% вызывает деформации на поверхности сформованного волокна в виде пор, которые при дальнейшем повышении уровня влажности среды так же будут увеличиваться в размерах, пока не сольются в бесформенные структуры (рисунок 16). При влажности ниже 40% на волокнах, полученных из раствора полисульфона в тетрагидрофуране не наблюдается никаких образований, поверхность волокна ровная, тогда как при увеличении влажности наблюдается вышеописанная деформация поверхности [104].

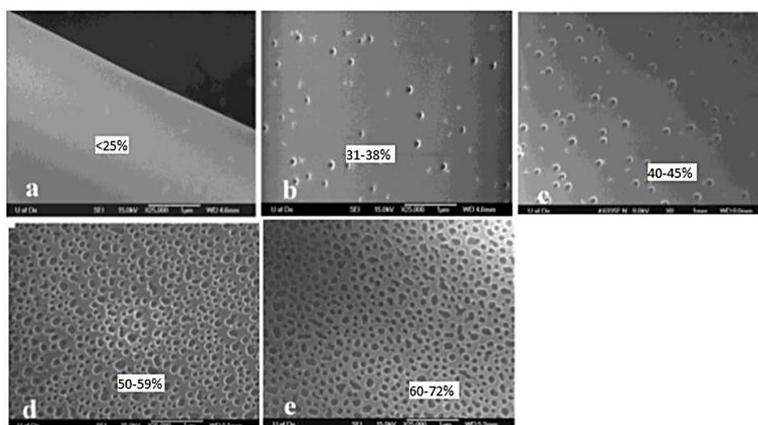


Рисунок 16 – Порообразование на волокнах полисульфона при увеличении влажности окружающей среды в процессе формования. Уровень влажности: а - <25%; б - 31-38%; в - 40-45%; д - 50%-59%; е - 60-72% [105].

С момента появления в научном мире термина «electrospinning» [106] данный способ получения волокон наноразмерного ряда прочно занял позиции в области переработки полимерных материалов. Несмотря на непростой механизм физических процессов сопровождающих электроформование, необходимых для успешного получения наноразмерных волокон, данный метод характеризуется аппаратурной простотой, возможностью регулирования параметров процесса, широким спектром используемых для переработки методом ЭФ полимеров.

1.4.2 Возможности использования волокнистых материалов, полученных электроформованием, в регенеративной медицине

Электроформование – эффективный способ получения нетканых мембранных полотен с наноразмерными волокнами. Такие материалы обладают развитой системой взаимосвязанных волокон диаметром варьирующемся от субмикронного до несколько сотен нанометров. Область применения таких материалов крайне широка. ЭФ волокна применяются для создания спецодежды для хим- и биологической защиты [107], теплоизоляционных материалов, микро/нанoeлектронике, однако, главной сферой применения таких материалов является *фильтрация*.

Универсальность использования нановолокон позволяет создавать комплексные материалы в сочетании со стекловолокном и текстилем, что позволяет расширять область использования фильтрационных материалов. В применениях для фильтрации воздуха такие материалы, как высокоэффективные фильтры для твердых частиц (HEPA), используются для удаления твердых частиц и других загрязнений из воздуха. Исследования нановолоконных мембран из нейлона-6, нанесенных поверх поддерживающих тканей [108], показывают, что добавление нановолокон увеличивает эффективность фильтрации в диапазоне ультрафильтрации, а высокая пористость увеличивает загрязняющую нагрузку фильтра. Добавление ультратонких нановолокон (диаметр 20 нм), позволяет повысить эффективность фильтрации без увеличения веса готового продукта [109]. Наиболее активно используемые в этой области полимеры: нейлон-6, полиэфирсульфон, полиакрилонитрил, поливинилиденфторид и поливиниловый спирт. В работе [110], показана возможность применения поливинилиденфторидных нановолокон в качестве мембран для отделения жидкости и удаления частиц полистирола размером 1, 5 и 10 мкм, результаты исследований показали, более 90% успешного удаления частиц из раствора.

Из-за высокой пористости и большой площади поверхности нановолоконные сетчатые каркасы напоминают строение внеклеточного

матрикса и могут служить в качестве цитосовместимых материалов, облегчающих массовый перенос кислорода и питательных веществ, что улучшает клеточную адгезию, пролиферацию и окончательное формирование функциональных тканей организма, а кроме того, позволяет использовать меньшее количество материала необходимого для биомедицинского применения.

В настоящее время нановолокна активно используются для изготовления *перевязочных материалов*; авторы [111] используют нановолокна на основе поликапролактона в качестве средства доставки куркумина для лечения ран. Способность к заживлению ран *in vivo* у нановолокон, содержащих куркумин, была продемонстрирована повышенной скоростью заживления ран на модели мышей с диабетом.

Ввиду возможности модифицирования волокон еще на стадии электроформования, такие материалы используются для *контролируемой доставки препаратов* [112], а, например, в работе [113] говорится о создании многослойного материала «сэндвич» на основе этилцеллюлозы в роли матрицы и активного наполнителя кетопрофена. Испытания на растворение *in vitro* показали, что нановолокна могут обеспечивать линейное высвобождение кетопрофена в течение 20 часов. Добавление к таким системам стабилизирующих добавок (в том числе гидрофобных), позволяет высвобождать действующее вещество равномерно по диффузионному механизму.

Такой раздел науки как *тканевая инженерия*, является особо перспективной областью применения нановолоконных материалов. Благодаря тому, что материалы, полученные в результате электроформования напоминают по своему строению внеклеточный матрикс, а именно, обладают взаимосвязанной структурой пор и диаметрами волокон в субмикронном диапазоне, их можно использовать в качестве основы для создания трехмерного материала – матрикса (скаффолда), который может восстановить, поддержать или улучшить функцию тканей [114].

Скаффолды для тканевой инженерии функционируют как временный внеклеточный матрикс, такой материал обеспечивает трехмерную структуру необходимую для прикрепления и развития клеток *in vitro*, которая впоследствии может быть имплантирована в дефективный участок ткани организма для восстановления и регенерации [115, 116]. В качестве материала для создания скаффолда могут быть использованы материалы различного происхождения – металлы, биокерамика, полимеры природного и синтетического происхождения, главное, чтобы они соответствовали ряду свойств обязательными для использования в регенеративной медицине, а именно -обладали высокими показателями биосовместимости и биоразлагаемости, не вызывая при интеграции с тканью организма резкого иммунного ответа и дабы исключить повторную операцию для удаления имплантата [117], а также обладать свойством к увеличению скорости роста и пролиферации клеток. Полимерным материалом для создания таких нановолокнистых матриксов чаще всего выступают синтетические: полигликолиевая кислота, полилактид, поли-3- гидроксibuтират [118, 119, 120], однако, немаловажным фактором при получении материалов биомедицинского назначения является использование не токсичных растворителей для полимеров, поэтому, с биологической точки зрения для регенерации кожи, хрящевой и костной ткани, а также кровеносных сосудов лучше проявляют себя полимеры природного происхождения такие как фиброин шелка, коллаген, желатин, полисахариды хитозан и гиалуроновая кислота.

1.4.3 Технологические параметры электроформования из растворов полимеров

Хитин и хитозан. Нановолокна на основе хитина и хитозана полученные методом электроформования обладают потенциалом для широкого спектра биомедицинских применений, поскольку они структурно аналогичны гликозаминогликанам во внеклеточном матриксе и близки по своей

морфологии к волокнистым структурам коллагена (диаметром 50-500 нм). Также, обозначенные полисахариды обладают хорошими показателями биосовместимости и биоразлагаемости, проявляют антитромбогенные, гемостатические и ранозаживляющие свойства [121]. Наиболее технологичным растворителем для хитозана является разбавленный раствор уксусной кислоты (2 – 30%). Однако, ввиду полиэлектролитной природы полимера в кислотном водном растворе, бесфильтрованное электроформование нативного хитозана затруднено. Поликатионный характер полимера значительно увеличивает значение поверхностного натяжения формовочного раствора, и требуется высокая сила электростатического напряжения для его преодоления. Из-за сил отталкивания между ионными группами в основной цепи макромолекулы хитозана при электроформовании из кислотного раствора формирование волокон может происходить с образованием крупных частиц, что приводит к деформации поверхности волокна и прекращению формования. Авторы [122], предлагают в качестве растворителя для получения нативных волокон хитина 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанол. При использовании этого растворителя диаметр полученных волокон имел широкий диапазон значений от 40 до 640 нм, что позволяет варьировать области применения такого материала. Исследование [123] посвящено влиянию растворителя и концентрации раствора хитозана на морфологию электросформованных волокон. Растворителями для хитозана молекулярной массы 2×10^5 (с.д. 0,78) и $1,3 \times 10^6$ (с.д. 0,77) были выбраны разбавленная соляная кислота, чистая муравьиная кислота и трифторуксусная кислота (ТФУК). По мере увеличения концентрации хитозана с 5% до 8% масс. морфология осажденных на подложке волокнистых материалов изменялась от сферических шариков до взаимосвязанных сеток. Добавление дихлорметана к раствору хитозан-ТФУК улучшило гомогенность полученных нановолокон хитозана. Средний диаметр полученных волокон составил 330 нм.

В качестве исходных полимеров для получения наноразмерных матриц могут выступать и производные хитозана такие как –

карбокسيэтилхитозан [124], кватернизованный хитозан [125] и хитозан с L-лактидом [126].

Следует отметить технологическую затрудненность растворения хитина и хитозана в упомянутых выше растворителях, а также их высокую токсичность.

Поскольку получение нативных волокон хитозана сопряжено с непростой технологической схемой переработки полимера и нестабильностью процесса электроформования, введение в формовочный раствор дополнительного полимера, являющегося волокнообразующим, значительно упрощает и стабилизирует процесс получения нановолокон.

Наиболее часто применяемыми полимерами для этих целей являются – полиэтиленоксид, поливиниловый спирт, полилактид [127], коллаген [128] и фиброин шелка [129, 130]. Нановолокна на основе хитозана со средним диаметром волокна 40 нм, были получены из формовочных растворов в 0,5М уксусной кислоте, содержащих хитозан молекулярной массы 190 кДа, полиэтиленоксид (900 кДа) и Triton X-100™ (ПАВ). Реологическое исследование показало сильную зависимость формования и морфологию полученного волокна от вязкости раствора и, следовательно, от соотношения хитозана и ПЭО. Показано, что волокнистая матрица при соотношении хитозан/ПЭО = 90/10 сохраняет целостность волокнистой структуры в водной среде. Анализ СЭМ подтвердил пролиферацию клеток остеобластов и хондроцитов, что позволяет использовать матрицу с таким составом для контролируемого высвобождения лекарственного средства [131].

Поливиниловый спирт обеспечивает стабильный процесс электроформования растворов хитозана. В [132], смешанные растворы хитозан-ПВС 7% масс. в уксусной кислоте 70% с различными объемными соотношениями (30/70, 50/50 и 70/30) подвергали формованию при постоянных параметрах процесса. Структура и морфология полученных нановолокнистых матриц были охарактеризованы методами СЭМ, ИК-спектроскопии и рентгеноструктурным анализом. Наилучший результат был

получен из смеси хитозан-ПВС 30/70 (диаметр волокон 172 ± 60 нм). Методом динамического механического анализа была подтверждена частичная совместимость между двумя полимерами. Результаты исследования поведения клеток показали, что данная матрица способна поддерживать прикрепление и пролиферацию клеток фибробластов L929.

Нановолоконный матрикс, полученный из смешанных растворов 2,7% масс. Хитозан-ПВС соотношением 75/25 в/об. (растворитель 0,5М раствор уксусной кислоты) [133] использовался в качестве перевязочного материала для оценки макро- и микроскопического влияния на заживление кожных язв у крыс, вызванных диабетом. Результаты свидетельствуют о значительном ускорении заживления диабетических ран у крыс. Такой материал обладает высокой скоростью проникновения паров влаги и хорошей антимикробной активностью.

Поскольку сформованные нановолокна растворяются в воде, сшивание волокон хитозана является неотъемлемым шагом к получению материалов, сохраняющих свою структурную целостность в водных растворах для применения в регенеративной медицине. Авторы [134], получали нановолоконные матриксы с использованием в качестве растворителя ТФУК. Растворы 2,7%-го хитозана (ММ 70; 190 и 500 кДа) были электросформованы с получением волокон диаметром 74 ± 28 , 77 ± 29 и 108 ± 42 нм. Волокнистые матриксы помещали в паровую камеру, содержащую 4 мл глутарового альдегида, и проводили реакцию сшивки в течении 24 часов. По окончании реакции сшивки волокна увеличились в диаметре в среднем на 161 нм, и были нерастворимы в течении 72 часов в растворах NaOH, уксусной кислоте и воде, сохраняя свои цвет и форму. Реакция сшивки была подтверждена результатами ИК-спектроскопии.

В работе [135], авторы используют волокнистый матрикс на основе 7%-го раствора хитозана в ТФУК в качестве основы для имитации надкостницы, для улучшения физических и механических свойств материала в систему добавляют минерал – гидроксиапатит (диаметр волокон 227 ± 154 нм). В

качестве сшивающего реагента применяют нетоксичного соединения природного происхождения – дженипин. Процесс сшивки 0,1%-ным раствором дженипина в фосфатном буфере проводили после стабилизации системы в 0,5%-ном растворе гидроксида натрия, растворенном в 100% этаноле с последующими промывками в фосфатном буфере для удаления остатков этанола. По результатам сшивки диаметр волокон увеличился до значений 335 ± 9 нм, значение модуля Юнга увеличилось в пять раз по сравнению с исходным параметром материала и составило 142 ± 13 Мпа, что приблизительно равно значениям нативной не несущей костной ткани. Биоактивность матриксов изученная *in vitro* на примере остеобластных клетках 7F2 показала высокие значения адгезии, пролиферации и остеогенную дифференцировку, что позволяет использовать такой материал для восстанавливания черепно-лицевых повреждений.

Гиалуроновая кислота. Как известно [136, 137], гиалуроновая кислота – гликозамингликан, являющийся основным компонентом внеклеточной матрицы соединительной ткани, которая выполняет различные биологические функции. Благодаря превосходной биосовместимости и биоразлагаемости, ГК и ее производные широко используются в биомедицинских областях, включая матриксы для тканевой инженерии, перевязочные материалы, системы доставки лекарств и материалы для имплантатов.

Основной особенностью ГК, влияющей на процесс получения волокон методом электроформования является то, что даже очень низкие концентрации полимера в водной среде проявляют высокую вязкость раствора и значения поверхностного натяжения что делает невозможным процесс получения волокон данным способом. Помимо этого, сильная влагоудерживающая способность ГК приводит к растворению нановолокон на подложке в процессе формования из-за недостаточного испарения растворителя [138]. Увеличить скорость испарения растворителя возможно путем добавления в формовочный раствор этанола, или ацетона [139], в этом случае содержание волокон на подложке действительно увеличивалось,

однако, струя формирующегося раствора оставалась нестабильной, а изучение СЭМ фотографий показало непоследовательную морфологию волокон.

Положительное влияние на процесс электроформования, в том числе и на устранение эффекта «бисера» может оказать изменение параметров электропроводимости формовочных растворов. Более высокая проводимость будет означать большее количество носителей заряда и, следовательно, более высокую плотность заряда, особенно на поверхности конуса Тейлора. Повышенная плотность заряда в конечном счете увеличивает прочность приложенного электрического поля, поскольку в реакционную емкость поступают больше носителей заряда, в том числе вызванные приложенным полем. Однако, в работе [140], присутствие в растворе как хлорида натрия, так и калия не оказывало положительного влияния на формирование структуры из растворов гиалуроновой кислоты и производство нетканого матрикса.

Нановолокна на основе гиалуроновой кислоты с диаметром 40-100 нм [141], могут быть получены при использовании в качестве растворителя смешанных растворов дистиллированной воды, муравьиной кислоты и диметилформамида в соотношении 25/50/25 по весу. ДМФА известен как хороший компонент для снижения поверхностного натяжения формовочных растворов для электроформования без значительных изменений показателей вязкости [142, 143]. Авторами [141] было установлено, что добавление МК привело к увеличению ионной концентрации и улучшению проводимости раствора (стабильной формовочной струи). Вязкость раствора ГК в этом случае увеличивалась, что объясняется нарушением целостности меж- и внутримолекулярных связей молекулы ГК из-за образования водородных связей с молекулами муравьиной кислоты (рисунок 17). Иными словами, цепная конформация макромолекулы ГК может быть изменена с жесткой альфа-спирали до конформации клубка, что повышает гибкость макромолекулы ГК.

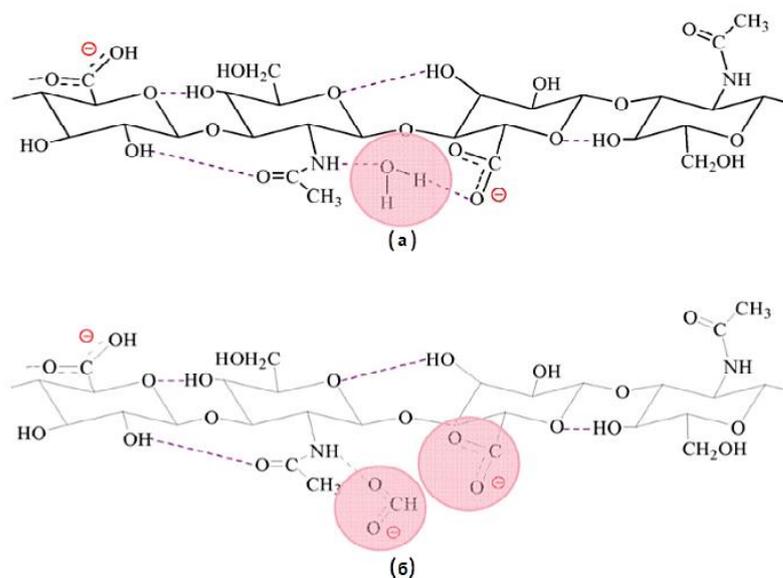


Рисунок 17 - а) Химическая структура ГК, растворенной в МК;

б) Химическая структура ГК, растворенной в системе H₂O/МК [141]

Однако, использование в качестве растворителя муравьиной кислоты делает непригодным к применению такого материала в медицине из-за высокой токсичности (рН системы 2-3) компонента в отношении живых тканей.

В литературе встречаются работы, посвященные получению нановолокон на основе гиалуриновой кислоты в высокоосновной системе растворителей [144] NaOH: ДМФ при соотношении 4/1, рН такой системы составляет 13. Авторы утверждают, что получали волокна диаметром больше 100 нм, что было подтверждено в исследовании [145], однако, ученые столкнулись с нестабильностью такой системы при формовании волокон. Получать волокна из раствора такого состава возможно только в первые 5 минут перемешивания, по истечению 30 минут, наблюдается изменение вязкости, которое, как предполагается, явилось результатом деградации ГК в высокоосновном растворе (рисунок 18), о чем сообщалось в [146]. В этой работе было показано, что при рН <4 и рН > 11 происходит деградация цепи макромолекул ГК, а в диапазоне значений 4 < рН < 11 существенных разрывов цепи не происходит.

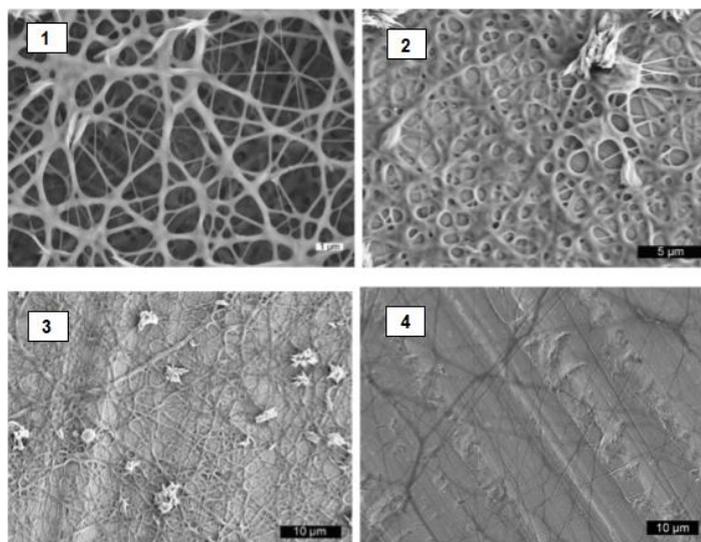


Рисунок 18 – СЭМ изображения волокон ГК, полученных из растворов NaOH: ДМФА 4/1 при различном времени перемешивания: 1) 5 минут, 2) 10 минут, 3) 20 минут, 4) 30 минут [144]

Нельзя не обратить внимание на тот факт, что гиалуроновой кислоте присуща быстрая скорость разложения, и в каких-то областях медицины это приветствуется, однако, для использования в регенеративной медицине в качестве матриц материалы на основе ГК должны обладать способностью к набуханию в жидкой среде (физиологическом растворе) без заметной потери своего веса и формы. Добиться этого возможно с помощью химической сшивки. Авторы [147], для контроля послеоперационной профилактики на брюшине предлагают использовать матрицы на основе дважды сшитых нановолокон ГК в смеси с ПЭО (растворитель МК). Диаметр волокон составил от 250 нм до 1,07 мкм. Процесс сшивания сформованных матриц проводился по двум схемам: 1) с использованием Fe^{3+} (FeCl_3); и 2) в присутствии диглицидилового эфира 1,4-бутандиола (БДДЕ). В первом случае, три карбоксилат-иона взаимодействуют с одним Fe^{3+} , образуя каркасную структуру с Fe^{3+} в центре, что приводит к образованию ионно сшитой системы (рисунок 19, стадия 1); а во втором, взаимодействие с БДДЕ может протекать по двум направлениям (рисунок 19, стадия 2а и стадия 2б) в которых гидроксильные или карбоксильные группы элемента ГК- Fe^{3+} взаимодействуют с эпоксидной группой БДДЕ с образованием ковалентно

сшитой структуры. Из рисунка 20 можно предположить, что на этапе ионного сшивания, Fe^{3+} сближает молекулы ГК, а поскольку БДДЕ является сшивающим агентом с короткой макромолекулой, то этот эффект близости может способствовать реакции сшивки между ГК и БДДЕ. Изучение СЭМ-изображений показали, что диаметры волокон увеличивались с увеличением концентрации сшивающих агентов. Исследования деградации *in vitro* на линии НИИ / ЗТЗ выявили максимальную стабильность деградацию в группе риска до 7 дней. Эффективность сшитого матрикса *in vivo* была дополнительно подтверждена с помощью общего наблюдения и оценки в брюшных стенках лабораторных крыс.

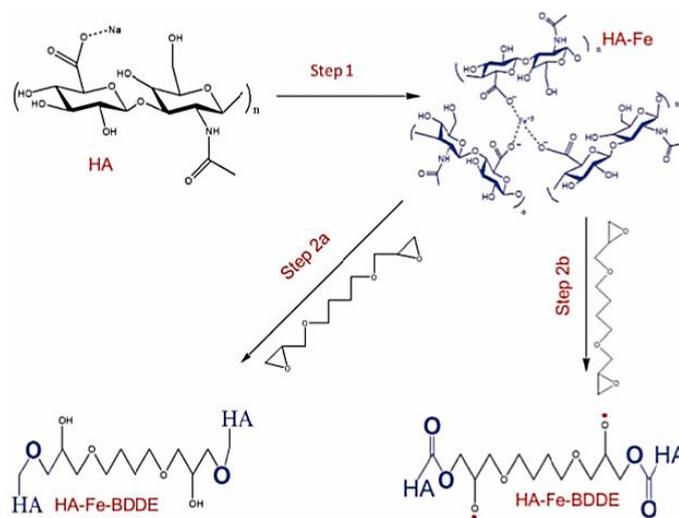


Рисунок 19 – Этапы сшивания нановолокон ГК. Стадия 1 – модификация макромолекулы ГК Fe^{3+} ; Стадия 2а и 2б – взаимодействие макромолекулы ГК с сшивающим агентом БДДЕ [147]

Если во всех ранее указанных работах гиалуроновая кислота была использована в виде соли – гиалуроната, pH водного раствора которого составляет 6-6,5; то в работе [148] для получения нановолокон был использован водный раствор ГК при pH 1,5. Для перевода волокон ГК в нерастворимое состояние авторы использовали физический метод сшивки с усилением водородной связи С-ОН в результате заморозки и оттаивания кислого водного раствора ГК. Сам процесс заключается в обработке нетканого материала на основе ГК парами раствора соляной кислоты (HCl) в

концентрациях от 20% до 37% масс. (не более 10 минут) и замораживании материала при -20°C на период 20-40 дней. Такой способ обработки исключает негативное влияние компонентов на ткани организма, так как в процессе промывки образца удаляются остатки кислоты.

1.5 Полиэлектролитные комплексы на основе полисахаридов хитозана и гиалуроновой кислоты. Применение в медицине.

В водных растворах функциональные группы полиэлектролитами (ПЭ) диссоциируют, что приводит к образованию заряженных полимерных цепей и противоионов, рассеянных в растворе [149]. Создаваемое электростатическое взаимодействие между полианионом и поликатионом (рисунок 20) приводит к образованию полиэлектролитных комплексов (ПЭК) [150], который имеет широкий потенциал применения в медицине для доставки лекарств, или в тканевой инженерии [151, 152]. Для образования ПЭК на основе полисахаридов не требуется применения сшивающих агентов, и материалы, полученные на их основе, приобретают комплекс свойств присущих каждому виду используемого природного ПЭ. Применяться в регенеративной медицине и тканевой инженерии такие ПЭК могут в разнообразном виде – в качестве покрытия на волокнах и шовных нитях, имплантатах, пленок или же гидрогелей для получения матрикса.

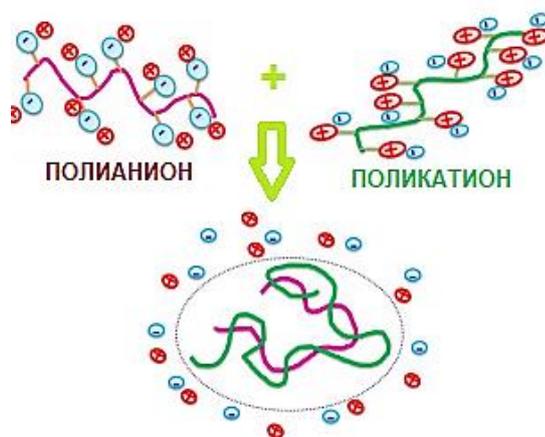


Рисунок 20 – Схема взаимодействия противоионов и образование полиэлектролитного комплекса полимеров

Основной движущей силой комплексообразования полиэлектролитов является увеличение энтропии за счет высвобождения низкомолекулярных противоионов [153]. Вклад энтальпии, вызванный электростатическими взаимодействиями (например, водородными связями и гидрофобными взаимодействиями), выражен не так явно [154]. На образование и стабильность ПЭК влияет множество таких факторов как: степень ионизации каждого ПЭ участвующего в реакции, плотность и распределение зарядов на полимерных цепях ПЭ, коэффициент и порядок смешивания ПЭ, природа и положение ионных групп, температура реакции, ионная сила и pH реакционной среды [155].

Сама полиэлектролитная реакция, это обратимый процесс, так же, в зависимости от условий могут образовываться растворимые и нерастворимые ПЭК, а ввиду образующихся связей кооперативного характера ПЭК становится устойчивым в широких пределах pH и ионной силы раствора [156, 157, 158].

В литературе имеется большое число публикаций, посвященных изучению взаимодействия хитозана с полисахаридами, содержащими кислотные группы, различного строения с образованием стабильных ПЭК. Хитозан является слабым основанием с pK_a 6,2-6,5. А наиболее часто применяемые для создания ПЭК гликозамингликаны - хондроитинсульфаты представляют собой смешанные структуры, включающие как слабую, так и сильную кислоты. Гиалуроновая кислота является слабой поликислотой с низкой плотностью заряда, поскольку на каждые два остатка может приходиться только один заряд.

В работе [159], показано, что полиэлектролитная реакция между ХТЗ и рядом хондроитинсульфатов различной степени замещения как при pH системы 2,8, так и 4,5 протекает с увеличением мутности системы, которая по истечении 24 часов снижалась из-за осаждения ПЭК. Описано образование не растворимых в воде ПЭК между полностью деацетилированным хитозаном и гликозамингликанами, независимо от того, находятся ли они в кислотной или

солевой форме, взаимодействие вызывает депротонирование карбоксильных центров гликозамингликанов, которое зависит от рКа. В работе [160], авторы, основываясь на стехиометрической реакции, представленной уравнением: $\alpha[PA] = \beta[PC]$, где α и β - степень ионизации полианиона и поликатиона, соответственно, а $[PA]$ и $[PC]$ представляют общие концентрации полианионов и поликатионов. Показано, что при добавлении хитозана к раствору хондроитинсульфатов в солевой форме появляется осадок, а максимальная мутность достигается при отношении количества остатков глюкозамина к общему количеству сульфатных и карбоксилатных остатков хондроитинсульфатов (ρ), присутствующих в растворе равным 1. За пределами этого значения новых осадков не наблюдается. Супернатанты, полученные после центрифугирования, не содержали хондроитинсульфатов, а только избыток добавленного хитозана. Аналогичные результаты наблюдалось при добавлении хондроитинсульфатов к раствору хитозана. Стехиометрический состав, соответствующий максимальному количеству осадков при использовании полиэлектролита в форме кислоты, наблюдали при $\rho = 0,75$. Авторы указывают на то, что независимо от значения рН сульфатные группы можно считать полностью диссоциированными, и они всегда образуют ПЭК с $-NH_3^+$ группами хитозана. И напротив, так как рКа карбоксильных групп остатков глюкокуроновой кислоты 3,83, карбоксильные группы частично находятся в свободной недиссоциированной кислой форме и должны депротонироваться, чтобы вызвать такое же взаимодействие. Авторы статьи [159] утверждают, что $\rho = 0,75$ соответствует ситуации, в которой все $-NH_3^+$ используются для формирования ПЭК со всеми $-OSO_3^-$ и только половиной $-COO^-$ хондроитинсульфатов.

Изучение образование ПЭК хитозан с ГК в форме натриевой соли ($1,3 \times 10^{-4}$ моль) показало весьма сходные значения по сравнению с данными для хондроитинсульфатов. Максимальное количество образованных осадков при добавлении раствора хитозана к раствору ГК находится в области $\rho = 1$, что говорит о полном включении анионных участков ГК в реакции

образования ПЭК с $-\text{NH}_3^+$ хитозана. В случае взаимодействия между NH_4^+ хитозана и ГК в форме кислоты большое влияние на комплексообразование оказывает рН.

Работа [161], посвящена получению полиэлектролитных комплексов из гидрохлорида хитозана (190 кДа) и гиалуронана (800 кДа). В ней обсуждается стабильность комплекса, а также роль различных параметров и механизм комплексообразования. Было продемонстрировано, что комплекс является стабильным независимо от рН в основных условиях и диссоциирует в кислой среде; в кислотных условиях диссоциация гиалуронана полностью подавляется, а хитозан полностью ионизируется и растворяется. Кроме того, комплекс дестабилизируется в избытке NaCl (и исчезает в 0,6М NaCl). Также описана роль степени ацетилирования в образовании комплекса, и показано, что его стабильность уменьшается, когда степень деацетилирования увеличивается в связи с меньшей кооперативностью электростатического взаимодействия.

В [162], полиэлектролитные комплексы с соотношением компонентов ГК-хитозан [1:2] получали из гомогенных смесей водных растворов хитозана и гиалуроновой кислоты (1000 кДа) в присутствии хлористого натрия (0,65М) который использовали с целью экранирования электростатических зарядов обоих полиэлектролитов. Для контроля рН растворов применялась уксусная кислота, конечное значение рН смешанной системы соответствовало 5. ПЭК получали путем диализа против воды или 0,15М NaCl. В отсутствие соли в диализной ванне были образованы нерастворимые комплексы, а в присутствии солей формировались водорастворимые или нерастворимые полиэлектролитные комплексы в зависимости от степени деацетилирования и молярной массы хитозана.

Наибольшие перспективы полиэлектролитные комплексы из хитозана и ГК имеют для получения биополимерных матриц для тканевой инженерии и регенеративной медицины, так как именно полисахариды формируют

структуры внеклеточного матрикса, в котором в естественном окружении развиваются клетки.

Как было показано выше, основные способы получения матриксов – это лиофильное высушивание гидрогелей, и формование нетканых волокнистых материалов методом электроформования. Электроформование полисахаридов из их индивидуальных растворов – это сложный процесс, требующий специальных подходов, направленных на разрушение кооперативных межмолекулярных взаимодействий и повышение гибкости макромолекул. Еще более сложной задачей является получение методом электроформования ПЭК противоположно заряженных полиэлектролитов.

Уже отмечалось, что использование в качестве растворителя муравьиной кислоты приводит к повышению концентрации ионов и увеличению проводимости растворов, и, как результат возможности проведения электроформования в силу повышения гибкости макромолекулы ГК. [141],

Тот же принцип использовали в работе [163]. Формовочную композицию полисахаридов, способную к электроформованию получали на основе 1%-ного раствора гиалуроновой кислоты (1000 кДа) и 7%-ного раствора хитозана (200 кДа) в смешанном растворителе муравьиная кислота-вода [20:80]. Объемное соотношение растворов полисахаридов варьировалось от [1:9] до [4:6] хитозан-ГК. Авторы получили бездефектные гладкие ровные волокна диаметром 80 ± 3 нм при соотношении $\text{NH}_3^+/\text{COO}^-$ меньше 1 моль/моль, увеличение соотношения приводило к затрудненному электроформованию, увеличению диаметра волокон (до 300 нм) и образованию на поверхности волокон дефектов в виде бусин. Возможность формования волокон была связана с молекулярными характеристиками полисахаридов; макромолекулярная цепь ГК была более длинной по сравнению с цепью хитозана. Экранирующий эффект от МК при невысоких значениях электропроводности и вязкости, позволил стабилизировать процесс электроформования и получить гладкие ровные волокна.

К сожалению, применение таких волокон, полученных с использованием высокотоксичного растворителя муравьиной кислоты (рН системы 2-3) может оказывать отрицательное воздействие на живые ткани. Следует отметить, что скорость деградации ПЭК хитозан – ГК в среде живого организма может быть слишком высока, поэтому в таких системах целесообразно дополнительно использовать сшивающие реагенты.

Для получения стабильного биополимерного матрикса на основе хитозана и ГК в работе [164], авторы использовали сшивающие реагенты. Методом лиофильного высушивания был получен широкопористый матрикс на основе хитозана сшитого дженипином, содержащий ГК. Анализ СЭМ фотографий матриксов показал наличие широкой области микро- и макропор более развитой по сравнению с матриксом на основе чистого хитозана. Изменяя степень сшивки, можно контролировать степень набухания и скорость деградации матрикса хитозан-гиалуроновая кислота.

Такой способ можно считать оптимальным для получения широкопористых матриксов, применяемых в регенеративной медицине, однако, как уже было упомянуто в литературном обзоре выше, на конечные характеристики готового продукта в большей степени оказывает влияние молекулярная масса исходного полимера, концентрация полимеров в системе, способ внедрения компонентов, а также соотношения полимеров по отношению друг к другу. Не всегда, будучи высокой, молекулярная масса оказывает положительное влияние на рост и пролиферацию клеток в готовом матриксе, в то же время более высокая концентрация полимеров в системе позволяет регулировать процесс структурообразования и варьировать состав формирующей системы позволяя получать в итоге не только объемные матриксы путем лиофильно высушенных гидрогелей, но и перерабатывать такие растворы в материалы медико-биологического назначения, к примеру, методом электроформования.

Из анализа литературных данных можно заключить, что гиалуроновая кислота и ее полиэлектролитные комплексы с хитозаном являются перспективными биополимерными системами, которые могут составить основу для создания матриц для тканевой инженерии и регенеративной медицины, систем направленной доставки биологически активных соединений. Способность к комплексообразованию хитозана с ГК может использоваться для модификации поверхности медицинских материалов с целью повышения их биосовместимости. Для придания биоматериалам устойчивости к воде и средам организма целесообразно использовать химическую сшивку биополимеров нетоксичными полифункциональными соединениями.

Комплексные исследования, выполненные в диссертационной работе, были направлены на выявление закономерностей изменения гидродинамических и реологических свойств гиалуроновой кислоты и хитозана в присутствии и отсутствие сшивающих реагентов, фазового разделения в смешанных растворах ГК. Выявленные особенности комплексообразования и сшивки хитозана и ГК легли в основу разработки технологии получения биополимерных матриц для регенеративной медицины и процесса получения биосовместимых хирургических нитей.

2 Методическая часть

2.1 Характеристика сырья и реактивов

В работе без дополнительной очистки использовали следующие полимеры и реактивы:

- Хитозан с молекулярной массой 190 кДа и степенью деацетилирования $0,86 \pm 0,01$ производитель «Roerig» (Германия);
- Хитозан с молекулярной массой 320 кДа и степенью деацетилирования $0,88 \pm 0,01$; производитель «Биопрогресс» (Россия);
- Гиалуроновая кислота в виде натриевой соли с молекулярной массой 5; 30; 1000 кДа, производитель «Shiseido» (Япония);
- Гиалуроновая кислота в виде натриевой соли с молекулярной массой 100 кДа, производитель «XIAMEN FINE CHEMICAL IMPORT & EXPORT CO., LTD» (Китай);
- Поливиниловый спирт с молекулярной массой 136 кДа и степенью гидролиза 88,4%, производитель ООО «Титан» (Россия);
- Кальций фосфат гидроксид (гидроксиапатит), молекулярной массы 502,31 производитель «Fluka»;
- NaCl х.ч., ТУ 6-09-1232-76;
- Гидроксид натрия (NaOH), х.ч., ГОСТ 4328-66;
- ДМФА х.ч., ГОСТ 20289-74, содержание основного вещества, не $< 99,9 \%$;
- Аммиак водный технический ГОСТ 9-92 – содержание основного вещества не менее 25%;
- Дистиллированная вода, ГОСТ 6709 – 72;
- Уксусная кислота х.ч., ГОСТ 61 – 75 – содержание основного вещества не менее 98%; производитель «Реахим» (Ереванский завод химреактивов);
- Спирт этиловый (ГОСТ 18300-87) чистота 95,8%, производитель ООО «Спирт Люкс» (Россия);
- Смола ионообменная марки КУ-2-20 (ГОСТ 20298-74).

Сшивающие реагенты:

- 25%-ный водный раствор глутарового альдегида производитель «Merck» (Германия);
- дженипин «Sigma-Aldrich» (США);
- 1,4 бутандиол диглицидиловый эфир (БДДЕ) «Sigma-Aldrich» (США).

2.2 Методы исследования

Приготовление растворов хитозана и гиалуроновой кислоты

Растворение хитозана в водном растворе уксусной кислоты необходимых концентраций проводили по навескам сухого полимера ($\pm 0,0001$ г) на магнитной мешалке в стеклянной таре необходимого объема в течение 1,5-2-х часов. Растворы оставляли на несколько часов для обезвоздушивания.

Аналогичным образом готовились водные растворы гиалуроновой кислоты.

В ряде случаев рН раствора хитозана доводили до рН 5,6. Для этого, к исходному раствору хитозана при перемешивании добавляли несколько микролитров высококонцентрированного раствора гидроксида натрия при потенциометрическом контроле.

Для получения спиртосодержащих растворов хитозана и гиалуроновой кислоты после полного растворения сухой навески полимера к растворам хитозана и ГК при перемешивании добавляли этиловый спирт.

Перевод гиалуроната натрия (ГК-Na) в форму свободной кислоты (ГК-H)

Ионообменную смолу (катионит) КУ-2-20 предварительно заряжали путем ее обработки 1М раствором HCl в течение 60 минут при перемешивании на магнитной мешалке с дальнейшей тщательной промывкой катионита от остатков соляной кислоты дистиллированной водой. Полноту промывки проверяли, измеряя значение рН промывных вод.

Ионообменную реакцию перевода ГК-Na в ГК-H проводили в статических условиях, при одинаковом мольном соотношении групп SO_3H катионита и COONa гиалуроновой кислоты, равным [50:1], что обеспечивает высокую скорость и полноту протекания обменной реакции за 30 минут. К примеру: к 5 мл 0,2 %-ного водного раствора ГК-Na содержащего $5 \cdot 0,002 : 390 \cdot 1000 = 0,025$ ммоль COONa , добавляли 0,88 г влажного катионита, содержащего $0,88 \cdot 1,49 = 1,3$ ммоль SO_3H ($\text{SO}_3\text{H}:\text{COONa} = 1,3:0,025 = 52$ моль/моль), полученную смесь перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 минут, после чего раствор ГК-H отделяли фильтрацией на фильтре из капроновой ткани.

Приготовление растворов поливинилового спирта

Растворение ПВС в воде проводили по точно взвешенной навеске полимера, на водяной бане при температуре $88 \pm 2^\circ\text{C}$.

Приготовление формовочных растворов

Формовочный раствор гиалуроновой кислоты готовили путем растворения точной навески полимера в системе растворителей $\text{NH}_4\text{OH}:\text{DMFA}$ [2:3], на магнитной мешалке в течение 1,5 часов;

Приготовление формовочных растворов смеси гиалуроновая кислота-ПВС, проводили путем смешения приготовленных водных растворов полимеров при перемешивании на магнитной мешалке для обеспечения соотношения ПВС:ГК [50:50] и [40:60];

Приготовление формовочных растворов хитозана, ПВС и их смесей с ГК включает проведение следующих операций: к приготовленному водному раствору ПВС при перемешивании добавляли ледяную уксусную кислоту для обеспечения необходимой для растворения хитозана концентрации, далее в полученную систему вводили сухую навеску хитозана – растворение проводили при постоянном перемешивании на магнитной мешалке; полученный раствор хитозан-ПВС смешивали с раствором ГК в Н-форме и оставляли на некоторое время для обезвоздушивания.

Приготовление растворов сшивающих реагентов

- необходимые для работы концентрации глутарового альдегида готовили путем разбавления исходного 25%-ного раствора;
- растворы дженипина заданной концентрации готовили в колбе подходящего объема по точной навеске ($\pm 0,0001$ г);
- раствор диглицидилового эфира 1,4-бутандиола (96%) в работе использовался без предварительной подготовки.

Определение реологических характеристик растворов хитозана и гиалуроновой кислоты

Вязкость растворов полисахаридов определяли на двух приборах: ротационном вискозиметре «Rheotest – 2» (Германия) в ячейке цилиндр – цилиндр при заданной температуре и вибрационном вискозиметре «SV-10А» производства «AND» (Япония) в открытой ячейке при заданной температуре.

Степень структурированности, то есть отклонение поведения растворов от ньютоновских жидкостей характеризуют показателем в уравнении:

$$\tau = A * j^n \quad (1)$$

которое рассчитывали с использованием стандартной программы как тангенс угла наклона кривой течения в координатах $\lg \tau = f(\lg j)$ в заданном интервале, например, $\tau = 50 - 200$ Па.

Величину энергии активации E_a , рассчитывали по уравнению Аррениуса, исходя из температурной зависимости вязкости растворов полимера в интервале 25 – 50 °С.

$$\eta_0 = B * e^{-E_a/RT} \quad (2)$$

где: B – предэкспоненциальный множитель; R – газовая постоянная, (8,31 Дж/моль * К); T – температура, К; E_a - энергия активации течения раствора, (Дж/моль), рассчитанная как:

$$E_a = 2,3 * R * tg \alpha \quad (3)$$

Значение динамической вязкости η рассчитывали, как отношение напряжения сдвига τ к скорости сдвига $\dot{\gamma}$, точность измерения $\pm 3\%$:

$$\eta = \frac{\tau}{\gamma}, [\text{Па}\cdot\text{с}] \quad (4)$$

Данные, полученные на вибрационном вискозиметре представляли в виде кривых на графике в координатах $\text{Lg } \eta = f(1/T \cdot 10^3)$. Относительная погрешность определения по результатам серии измерений не более 1%.

Определение электропроводности растворов

Электропроводность растворов хитозан-ГК и формовочных растворов ПВС-хитозан-ГК измеряли на кондуктометре «Эксперт-002» (Эконикс, Россия).

Определение времени гелеобразования

Гелеобразование в системах раствор хитозана – глутаровый альдегид или дженипин, изучали при разном соотношении Сш.реа-т/ NH_2 - группы хитозана. За точку гелеобразования в системе принимали время, при котором раствор полисахарида объемом 1 см³ переставал течь под действием собственного веса при переворачивании бюкса диаметром 1 см. Результаты исследования представлялись в виде зависимости времени гелеобразования в растворах хитозана от соотношения Сш.реа-т/ NH_2 . Изменение соотношения Сш.реа-т/ NH_2 достигалось изменением концентрации раствора сшивающего реагента.

Получение гидрогелей гиалуроновой кислоты (ГК)

Гидрогели ГК получали путем сшивки 1,4 -диглицидиловым эфиром бутандиола (БДДЕ) в щелочной или кислой среде.

К навеске гиалуроновой кислоты добавляли раствор БДДЕ в 0,25М растворе гидроксида натрия, содержащий расчетное количество сшивающего реагента. Полученную смесь перемешивали до образования гелеобразной массы и термостатировали на водяной бане при температуре $T=55^\circ\text{C}$ в течение двух часов. Полученный гель был оптически прозрачный.

Для получения сшитых гидрогелей ГК, содержащих гидроксиапатит, били использованы лиофильно высушенные композиции с ГАП с ГК,

предоставленные к.х.н. Деминой Т.С. (с.н.с. ИСПМ им. Н.С. Ениколопова РАН), содержащие 5% и 10% гидроксиапатита.

Для получения гидрогелей в кислой среде навеску гиалуроновой кислоты предварительно растворенную в дистиллированной воде добавляли к смеси БДДЕ с ледяной уксусной кислотой. Полученную смесь инкубировали на водяной бане при $T=55^{\circ}\text{C}$ в течении различного времени. Полученные гели были прозрачными, но имели насыщенный желтый цвет, который исчезал при последующей промывке водой.

Измерение модуля упругости гидрогелей

Измерение модуля упругости гидрогелей, проводили с использованием метода ступенчатого нагружения гидрогелей с помощью аналитических весов «АДВ-200». Гидрогель помещали между измерительными элементами, которые приводили в соприкосновение с гелем, путем нагружения и уравнивания противоположной чашки весов. Далее с чаши весов поочередно снимали грузы и определяли степень деформации геля в условных единицах. На основании полученных результатов строили зависимости $h=f(F)$, где h – деформация геля под действием нагрузки F . По котангенсу линейного участка кривой, который соответствует обратимым деформациям, рассчитывали эффективный модуль по формуле:

$$G = 8,1 \times 10^5 \times \text{ctg } \alpha, \quad (5)$$

где $8,1 \cdot 10^5$ – пересчетный коэффициент, учитывающий соответствие условных единиц абсолютным величинам деформации и пересчет результата в систему СИ.

Ротационная реометрия гидрогеля гиалуроновой кислоты

Реологические измерения свойств сшитого БДДЕ гидрогеля ГК полученного в щелочной среде проводились методом осцилляционного теста с использованием реометра Anton Paar MCR 302 (Австрия), блока контроля температуры Пельтье и системы измерения плоскость-плоскость PP25-1,5 (\varnothing 25 мм; величина зазора 1,5 мм). Температура составляла 20°C для всех испытаний. Регистрировались составляющие комплексного модуля сдвига:

модуль упругости G' (Па), который представляет накопленную энергию деформации, и модуль потерь G'' , характеризующий энергию деформации, потерянную (рассеянную) в результате внутреннего трения при течении (диссипация энергии).

Получение широкопористых матриц

Биополимерные матрицы получали замораживанием гидрогелей хитозана, гиалуроновой кислоты или их смеси, сшитых Дж, ГК или БДДЕ, при $T = -5^\circ\text{C}$ с последующей сушкой из замороженного состояния в вакууме с использованием лиофилизатора «Alpha 1-4/2-4» («Christ», Германия). При необходимости перед лиофильным высушиванием, полученные гидрогели промывали от остатков NaOH в подкисленной дистиллированной воде (pH 5,5-6,0).

Формование плёнок

Пленки из хитозана, смеси хитозана и гиалуроновой кислоты и системы ПВС-хитозан-ГК формовали из растворов методом полива на чашки Петри с последующим выдерживанием при комнатной температуре для испарения растворителя до постоянной массы пленки. Массу формовочного раствора рассчитывали по формуле:

$$m = \frac{S \times h \times \rho}{C} \quad (6)$$

где: s - площадь подложки, см^2 ; h - толщина пленки, см ; ρ - плотность полимера, $\text{г}/\text{см}^3$; C - концентрация раствора, $\text{г}/\text{г}$.

Определение степени набухания пленок и влагопоглощения гидрогелей

Для определения степени набухания пленок и гидрогелей использовали гравиметрический метод. Степень набухания α , % рассчитывали по формуле:

$$\alpha = \frac{m - m_0}{m_0} \cdot 100 \quad (7)$$

где: m – навеска пленки или геля после набухания, г ; m_0 – навеска до набухания в воде, г .

По полученным данным строили график зависимости степени набухания от времени $\alpha = f(t)$.

Исследование морфологии поверхности пленок и волокнистых материалов методом атомно-силовой микроскопии

Образцы пленок на основе хитозана и его комплексов с ГК, шовной нити на основе фиброина, с послойным нанесением полисахаридов исследовали на микроскопе Ntegra Prima (NT-MDT). Измерения проводили в полуконтактном режиме работы с использованием зондового датчика CSG01 (размер - 3.4x1.6x0.3mm, радиус кончика иглы 10 нм, жесткость 0,03 Н/м).

Конфокальная лазерная микроскопия

Для визуализации пористой структуры, образцы матриц инкубировали в растворе иодистого пропидия (1 мкг/мл) в течение 30 мин. Супернатант декантировали и изучали образцы на инвертированном микроскопе Nikon TE-2000 (Япония).

Метод динамического рассеяния света

Определение размера частиц в пленке на основе хитозан-ПВС-ГК-Н проводилось методом динамического светорассеяния на приборе Photocor-FC. Сигнал с выхода фотоприемника обрабатывается цифровым коррелятором. Из полученной автокорреляционной функции компьютер вычисляет распределение дисперсных частиц по размерам или их средний параметр.

Бескапиллярное электроформование микро- и нановолокон [165]

Нетканые материалы получали на установке «Nanospider» NS LAB 200S (Elmarco s.r.o., Чехия). По принципу волокнообразования из полимерного раствора в электростатическом поле высокого напряжения, генерируемого между двумя электродами, соединенными с источником высокого напряжения.

Нанесение модифицирующего покрытия на нить

Нанесение модифицирующего покрытия из раствора хитозана на фиброин, и создание бикомпонентной нити «ядро-оболочка» проводили на экспериментальной лабораторной установке (рисунок 21).

С входной паковки 1 исходная нить поступает в фильерный комплект 2 (рисунок 22), где проходит ролик, погруженный в емкость с раствором хитозана. Из раствора нить подается в фильеру, где происходит отжим нити. Отжатая нить с нанесенным покрытием поступает в печь 3, где под воздействием температуры 45-50°C начинается процесс удаления растворителя. Через зону удаления растворителя нить движется вверх на следующий приемный ролик 4.

Удаление растворителя происходило в процессе обдува нити воздухом тепловентилятора 5, с температурой 45-50°C. Обдув необходим для интенсификации процесса испарения растворителя и высушивания бикомпонентной нити. На расстоянии пути нити с ролика 4 до приемной бобины 6 установлены два тепловентилятора, с температурой обдува нити 50-60°C. Общая длина пути нити с нанесенным покрытием составляет $2 \pm 0,5$ м.

Все описанные ниже эксперименты по культивированию клеток проведены М.Г. Дроздовой в Институте биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН под руководством д.х.н. Е.А. Марквичевой.

Культивирование клеток

Исследования проводили при температуре 37°C с использованием клеток линии мышинных фибробластов (L929) и остеосаркомы человека (HOS) по стандартным методикам, описанным в [166]. Микроскопические наблюдения за ростом клеток осуществляли с помощью светового инвертированного микроскопа (Reichert Microstar 1820E, Германия).

Определение цитотоксичности и жизнеспособности матриц

Цитотоксичность образцов изучали методом экстракт-теста: гели промывали стандартным раствором, инкубировали в стандартной среде при соотношении 1 мл среды на 50 мг образца и инкубировали 24 часа в CO₂ инкубаторе. Через 24 часа надосадочную жидкость (экстракт) собирали и проводили 2 разбавления (100 и 50 %).

Жизнеспособность клеток оценивали методом МТТ-теста: суспензию клеток L929 и НОS засекали в 96-луночный планшет и культивировали в течение 24 ч. Через 24 ч среду удаляли и вносили по 100 мкл экстрактов. Клетки, культивируемые в среде без добавления экстрактов, использовали в качестве контроля. Жидкость заменяли на раствор МТТ в DMEM, инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Кристаллы формазана, образованные в живых клетках, растворяли в ДМСО и измеряли оптическую плотность при 540/690 нм с использованием планшет-ридера Multiscan (Flow Laboratories, США).

Относительную жизнеспособность клеток рассчитывали следующим образом [оптическая плотность в тестовых лунках] / [оптическая плотность в контрольных лунках] × 100. Результаты были выражены как среднее ± стандартное отклонение для трех повторов.

Математическая обработка результатов измерений

Статистическая обработка результатов измерений проводилась с использованием стандартных программ.



Рисунок 21 - Экспериментальная установка для послойного нанесения растворов полимеров на хирургические нити. 1 – входная паковка; 2 – фильтрный комплект; 3 – печь; 4- приемный ролик; 5 – тепловентилятор; 6 – приемная бобина; 7,8 – тепловентиляторы

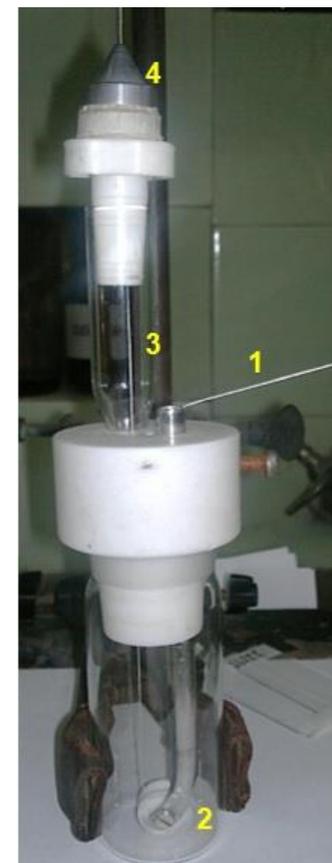


Рисунок 22 – Фильтрный комплект. 1 – исходная нить; 2 – направляющий ролик; 3- модифицированная нить; 4 – фильера

3 Результаты и их обсуждение

Разработка технологичных способов повышения биосовместимости материалов медицинского назначения – важнейшая междисциплинарная задача, для решения которой необходимо разработать технологии, исключающие применение токсичных растворителей или соединений, которые могут нанести урон живым организмам, и обеспечивающие получение материалов с необходимым комплексом свойств.

Гиалуроновая кислота и хитозан совместимы с различными типами тканей человека. Помимо присутствия в макромолекулярном составе этих полимеров реакционноспособных групп, их способность образовывать интерполиэлектролитные комплексы делает возможным получать биоматериалы, совмещающие в себе оптимальные свойства обоих компонентов. Однако тот факт, что они формируют нерастворимые в воде интерполиэлектролитные комплексы, требует специальных подходов к переработке формовочных композиций этих полимеров.

Для управления процессом получения композиций заданного состава на основе ИПЭК полисахаридов, с целью регулирования растворимости, влагопоглощения и морфологии конечного материала необходимо провести исследования реологических и гидродинамических свойств водных растворов гиалуроновой кислоты и хитозана, а также изучить процессы комплексообразования в исследуемых растворах.

3.1 Разработка материалов медико-биологического назначения на основе гиалуроновой кислоты

3.1.1 Сравнительное изучение гидродинамических свойств и стабильности растворов гиалуроновой кислоты в солевой форме и форме поликислоты

В литературе подробно исследованы свойства разбавленных и полуразбавленных растворов ГК. Известно, что в водных растворах макромолекулы ГК сильно гидратирована, что приводит к образованию вязких

растворов с экспоненциальной концентрационной зависимостью. При концентрации 1-4 % масс. растворы гиалуронатов представляют собой псевдопластические жидкости, которые при высоких концентрациях имеют вид гидрогелей, не стабильных при воздействии сдвига (системы с предельным напряжением сдвига).

В литературных источниках имеются хорошо согласующиеся и воспроизводимые данные о влиянии pH на вязкость как разбавленных, так и концентрированных растворов хитозана, в том числе выдержанных в течение различного времени [167, 168]. Однако, для ГК имеющиеся данные не могут дать однозначного ответа о свойствах растворов полимера [169]. В исходном виде, ГК представляет собой натриевую соль (ГК-Na), называемую гиалуронатом – макромолекулярная цепь которого развернута и образует собой спираль, закрученную в левостороннем направлении, состоящую из 4-кратных дисахаридных единиц. Наличие карбоксильных групп в повторяющемся дисахаридном звене придает ГК свойства слабой поликислоты ($pK_a \sim 4,3$) [170]. Для молекулы ГК в H-форме характерно большое количество водородных связей. Такие связи образуются как внутри макромолекулы ГК между соседними углеводными остатками, так и между соседними молекулами, что придает полимеру высокую влагоудерживающую способность.

Учитывая конформационные различия ГК в Na- в H-формах, в настоящей работе, исследования гидродинамических свойств растворов ГК, а также их стабильности во времени были проведены не только на солевой форме полимера, но и на растворе ГК, полученной, с использованием ионообменной смолы (катионит), и не содержащей низкомолекулярного фонового электролита, в отличие от основной части публикаций по исследованию pH-зависимости гидродинамической вязкости ГК, когда перевод карбоксильных групп кислоты в протонированную форму осуществляли добавлением в раствор ГК-Na сильной кислоты, изменяя тем самым и ионную силу раствора. Помимо этого, были исследованы растворы

ГК-0,5Na и ГК-Na, полученные частичной и полной нейтрализацией, соответственно, раствора ГК-Н.

Обменную реакцию на катионите для получения ГК в Н-форме проводили в статических условиях, для получения необходимого для работы количества раствора, так как известно, что кислая форма раствора ГК крайне неустойчива, и готовить большой объем раствора представляется нецелесообразным [171]. Для полного перехода ГК-Na в Н-форму необходимо соотношение групп SO_3H катионита и COONa гиалуроната, равное $\sim 50:1$ моль/моль, но, поскольку катионит представляет собой влажные гранулы, его введение может приводить к некоторому разбавлению раствора ГК. Приведенная на рисунке 23 кривая титрования полученного раствора ГК-Н раствором NaOH подтверждает, что рассчитанная концентрация полученного раствора ГК в Н-форме 0,0046 моль/л (0,18%) согласуется с исходной концентрацией, поэтому данные условия приготовления раствора ГК-Н были использовали в дальнейших экспериментах по исследованию свойств растворов и реакций комплексообразования.

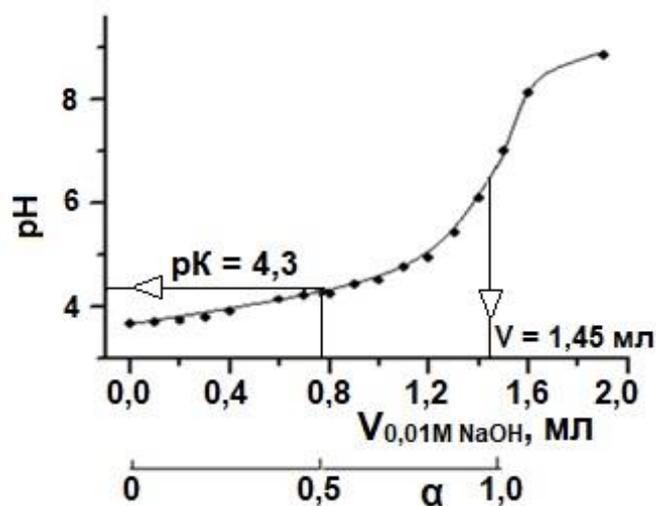


Рисунок 23 - Кривая титрования раствора ГК-Н (3 мл) раствором NaOH (0,01 моль/л)

Кроме того, полученная кривая титрования раствора ГК-Н позволяет экспериментально определить pH при степени ионизации COOH групп 0,5 и сопоставить полученное значение $pK=4,3$ с встречающимися в литературе

данными, а также определить количество NaOH, которое необходимо добавить к ГК-Н для получения раствора, содержащего половину (или полностью) нейтрализованные кислотные группы (ГК-0,5Na). В данном примере это количество равняется 0,08 мл (или 0,16 мл) 0,01М NaOH, соответственно, на 3 мл 0,18% -го раствора ГК-Н.

Из литературных данных известно [172], что при низких значениях pH раствора макромолекулы ГК в Н-форме подвержены быстрому кислотному гидролизу. Поэтому, исследование стабильности вязкостных свойств растворов полимеров при хранении представляет практический интерес, так как релаксационный характер процессов конформационных превращений цепей и в целом структуры растворов высокомолекулярных полимеров может протекать в течение часов и даже суток. Для исследования стабильности вязкостных свойств были использованы 0,18 и 0,05%-ные растворы ГК в Н-форме с pH 3,5, наполовину нейтрализованный раствор с pH 4,3 (ГК-0,5Na) и исходный гиалуронат натрия с pH 6,5, полученные данные для удобства сравнения представлены в относительных величинах (рисунок 24).

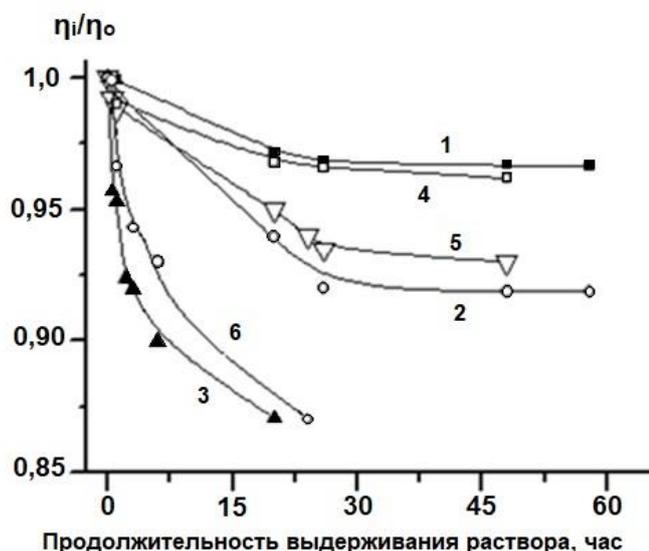


Рисунок 24 - Кинетика изменения вязкости 0,18 % (кривые 1-3) и 0,05 % (кривые 4-6) растворов ГК-Na при pH 6,5 (кривые 1,4), ГК-0,5Na при pH 4,3 (кривые 3,6) и раствора ГК-Н при pH 3,5 (кривые 2,5)

Следует отметить, что у всех исследуемых растворов наиболее резко значение вязкости снижается в течение первых 30 часов, затем снижение

замедляется. Закономерно, что наибольшей стабильностью из исследованных образцов обладают практически нейтральные растворы с рН 6,5 (кривые 1 и 4). Растворы ГК-Н с рН 3,5 оказались не самыми нестабильными и при хранении в течение суток их вязкость снижается лишь на 7-8% (кривые 2 и 5), в то время как вязкость менее кислого раствора с рН 4,3 снижается в большей степени – на 12-13% (кривые 3 и 6). Такой факт, возможно, объясняется тем, что более компактная конформация цепей полимера в растворе с рН 3,5 обеспечивает меньшую доступность гликозидных связей и соответственно меньшую скорость гидролиза. А в растворе с рН 4,3, где цепи поликислоты частично заряжены и менее компактны, доступность межзвенных связей и скорость их гидролиза увеличивается. Данное предположение было проверено в ходе эксперимента, когда из обозначенных выше растворов ГК-Na, ГК-0,5Na и ГК-Н после их выдерживания в течение 40 часов и нейтрализации до исходного значения рН = 6 выделяли сухие полимеры в форме ГК-Na методом лиофилизации, а затем вискозиметрическим методом (рисунок 25) определяли их MM_{η} .

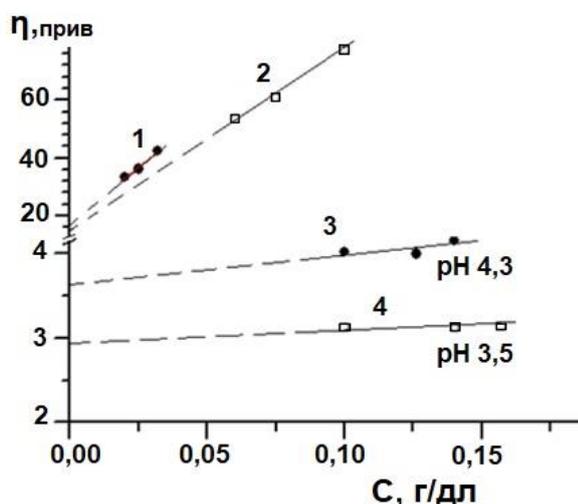


Рисунок 25 - Концентрационная зависимость приведенной вязкости растворов ГК-Na в 0,1 М NaCl исходного (1) и после выдерживания в течение 40 час в виде водных растворов с рН 5,6 (2); 4,3 (3) и 3,5 (4).

Из приведенного рисунка 25 видно, что если при выдерживании нейтрального раствора характеристическая вязкость и MM_{η} практически не

изменяются, то в результате выдерживания кислых растворов MM_n вопреки высказанному выше предположению резко снижается (с 835 до 100 и 130 кД в растворах с рН 3,5 и 4,3, соответственно).

Таким образом, большая степень падения вязкости раствора при рН 4,3 по сравнению с рН 3,5 не связана с более высокой скоростью деструкции полимера. Кроме деструкции падение вязкости растворов полимеров при хранении может быть обусловлено конформационными превращениями цепей и снижение степени структурирования раствора. Не исключено, что в растворе ГК-0,5Na с рН 4,3, полученном частичной нейтрализацией раствора ГК-Н, в ходе выдерживания параллельно с гидролизом происходит перераспределение плотности отрицательных зарядов на цепях таким образом, что это приводит к уменьшению их электростатического отталкивания, компактизации цепей и, как следствие, более выраженному снижению вязкости растворов именно в первые часы хранения. В то же время в растворе ГК-Н полученного с помощью ионного обмена, в которой практически нет диссоциированных карбоксильных групп подобная дополнительная компактизация цепей при хранении, очевидно, уже не имеет места, и снижение вязкости обусловлено только их деструкцией. Таким образом, при работе с ГК в Н-форме необходимо учитывать факт резкого снижения молекулярной массы полимера при длительном хранении и, соответственно, для получения ПЭК с хитозаном использовать только свежеприготовленные растворы ГК-Н.

3.1.2 Получение гидрогелей путем сшивки гиалуроновой кислоты диглицидиловым эфиром 1,4 бутандиола (БДДЕ)

Получение гидрогелей полимеров обуславливается образованием поперечных связей между линейными макромолекулами при модифицировании сшивающим реагентом и как результат – созданием трехмерной молекулярной сетки, обладающей отличными от раствора полимера реологическими и биологическими свойствами. Ковалентное сшивание предотвращает растворимость гидрогеля, одновременно

обеспечивая свободную диффузию воды внутри материала, и придает ему упругие свойства. Свойства гидрогелей, пористость, степень набухания и прочность, могут варьироваться за счет изменения условий сшивки [173]. На основании анализа приведенного в литературном обзоре (Глава 1.2.2) для получения гидрогелей ГК был выбран диглицидиловый эфир 1,4 бутандиола, который используется для получения на основе ГК филлеров, используемых в косметологии.

Процесс гелеобразования растворов гиалуроновой кислоты проводится в условиях сильнощелочной или кислой среды [50] при минимальном содержании воды, что обеспечивает максимальную скорость гелеобразования. В этих условиях раствор гиалуроновой кислоты представляет собой систему со свойствами геля, поэтому переработать такой раствор не представляется возможным, однако если гидрогель будет обладать способностью к влагоудерживанию не менее 1000%, то с помощью метода лиофильного высушивания возможно получение матриксов, которые благодаря высокой пористости и биосовместимости могут использоваться в качестве матриксов в регенеративной медицине и тканевой инженерии.

Получение гидрогелей ГК путем сшивки в щелочной среде. На основании литературных данных [51] были выбраны условия получения гидрогелей ГК в сильнощелочной среде. При заданных условиях, проведение реакции сшивки привело к созданию жестких структурированных гелей, с высокой степенью набухания в диапазоне от 1900% до 4000% (таблица 3, рисунок 26).

Таблица 3 - Влияние соотношения, сшивающий реагент – ГК на свойства гидрогеля ГК, сшитого БДДЕ. Концентрация полимера в смеси 16,2%

№ обр.	БДДЕ/ГК, моль/моль	Время сшивки, час	Модуль упругости G, кПа	α ,%
1	0,29	2	210	2000
2	0,2	2	230	1900
3	0,15	2	260	2100
4	0,1	2	160	4400
5	0,29	3	-	2330

При увеличении соотношения БДДЕ/ГК выше 0,15 моль/моль степень сшивки перестает влиять на равновесную степень набухания, что связано с достижением максимально возможной степени сшивки ГК. Эти данные согласуются с результатами, приведенными в [174]: при соотношении БДДЕ/ГК 0,36 моль/моль степень сшивки составила всего 3,4%. При уменьшении количества сшивающего реагента ниже 0,15 моль/моль степень набухания резко возрастает – до 4400%. Антибатно степени набухания изменяется модуль упругости гелей, набухших в воде до равновесного состояния, снижаясь с 260 до 160 кПа. Полученные данные закономерны, так как с увеличением содержания воды в гидрогеле растет его деформируемость и, соответственно, уменьшается модуль Юнга. Увеличение времени сшивки ГК при высоком содержании сшивающего реагента (0,29 моль/моль) также не приводит к сколько-нибудь значимому изменению степени набухания (п.5, таб.3), что подтверждает предположение о максимально достигаемой степени модификации ГК.



Рисунок 26 - Гидрогели ГК до (1) и после (2) набухания, БДДЕ/ГК 0,29 моль/моль

Общий модуль, измеренный методом ступенчатого нагружения гелей, не учитывает пластическую деформацию, которая безусловно, проявляется в свойствах системы, содержащей столь значительное количество воды. Метод реометрии позволяет выделить из комплексного модуля G^* модуль упругости G' (характеризующий накопленную энергию) и модуль потерь G'' в результате внутреннего трения при пластическом течении (рисунок 27). Как видно из данных рисунка, характеризующего соотношение между упругой частью вязкоупругого поведения и его вязкой составляющей, модуль упругости

превышает модуль механических потерь на 2 порядка. Столь высокая разница между G' и G'' наблюдается крайне редко и встречается только у полимерных студней первого рода, характеризующихся упругими свойствами и высокими деформациями.

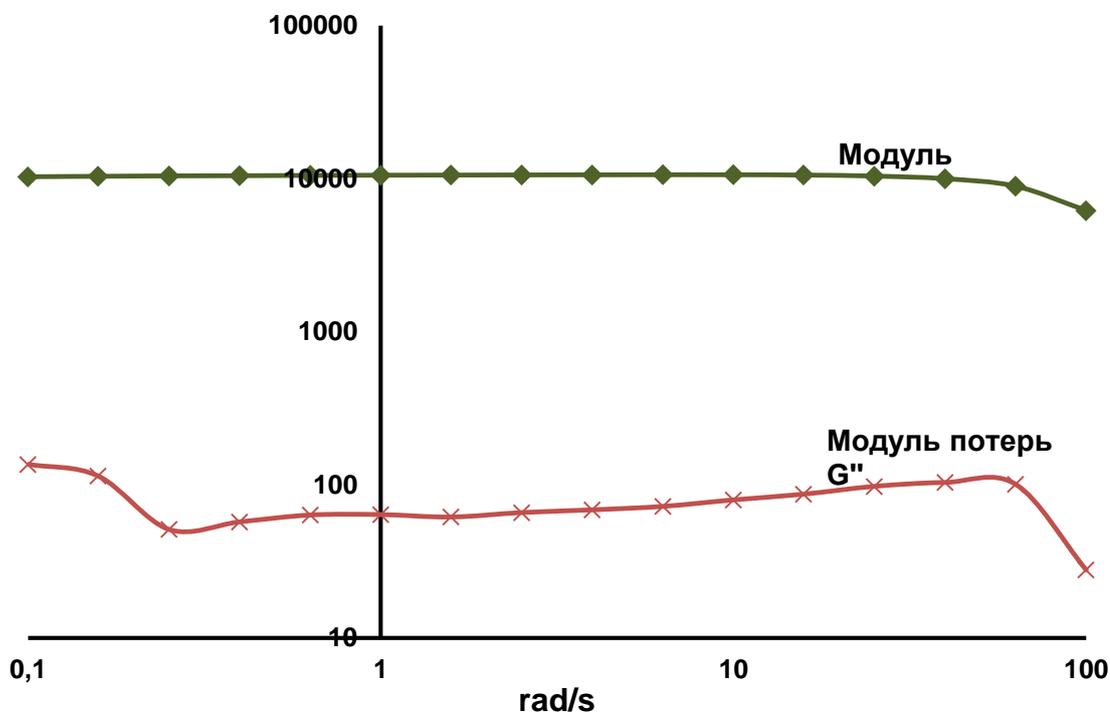


Рисунок 27 - Модуль упругости и модуль потерь образца гидрогеля ГК, сшитой при соотношении БДДЕ/ $\text{NH}_2 = 0,29$ моль/моль и набухшего в воде до равновесного состояния

Получение гидрогелей ГК путем сшивки в кислой среде. Проведение реакции сшивки в кислой среде создает возможность для получения гидрогелей с взаимопроникающими сетками ГК и хитозана, так как хитозан растворим в растворах органических кислот. Известны работы, в которых гидрогели ГК получали в условиях присутствия уксусной кислоты при pH 2-4,5 [175]. При таких условиях между ГК и БДДЕ образуется сложноэфирная связь, так как рК гиалуроновой кислоты выше значения pH гидроксильные группы депротонируются в меньшей степени и преобладает анионная карбоксильная группа. В таблице 4 приведены условия получения гидрогелей ГК в присутствии уксусной кислоты. Как видно (пункт 1 таблица 4), полученные в среде уксусной кислоты гидрогели слабо структурированы: их

степень набухания, составляет 6620%, что в 3 раза превышает степень набухания гидрогелей, сшитых в течение такого же времени в щелочной среде. Увеличение времени сшивки приводит к снижению равновесного набухания, которое, тем не менее, превышает 4000%. При этом следует отметить, что в кислой среде реакцию проводили при избытке сшивающего реагента.

Таблица 4 – Влияние условий получения на степень набухания гидрогелей ГК, сшитой БДДЕ в среде уксусной кислоты

№ обр.	Концентрация ГК в смеси, %	БДДЕ/ГК моль/моль	Среда	Время сшивки, час	α %
1	8,1	1,46	Кислая	3	6620
2	8,1	1,46	Кислая	5	4140
3	16,2	0,29	Щелочная	3	2000

3.1.3 Получение и исследование биополимерных матриц на основе гидрогелей гиалуроновой кислоты, сшитой БДДЕ для выращивания клеток

Структурная характеристика - важная особенность матриц обуславливающая их применение в регенеративной медицине и тканевой инженерии помимо биосовместимости и отсутствия цитотоксичности. Для благоприятного развития и культивирования клеточного материала необходимо учитывать механическую прочность и количество (размер) пор из которых состоит матрикс, а также природу ткани и ее физико-механические характеристики. Матрицы для культивирования клеток получали путем лиофильной сушки гидрогелей ГК, сшитых БДДЕ, набухших до равновесной степени набухания.

Методом конфокальной микроскопии были изучены лиофильно высушенные матрицы на основе гиалуроновой кислоты сшитой БДДЕ при различном соотношении сшивающего реагента. На рисунке 28 видно, что при содержании сшивающего реагента 0,29 моль/моль пор не наблюдается, что делает практически невозможным пролиферацию клеток, а снижение

сшивающего реагента до соотношения 0,1 моль/моль, приводит к образованию области широких пор.

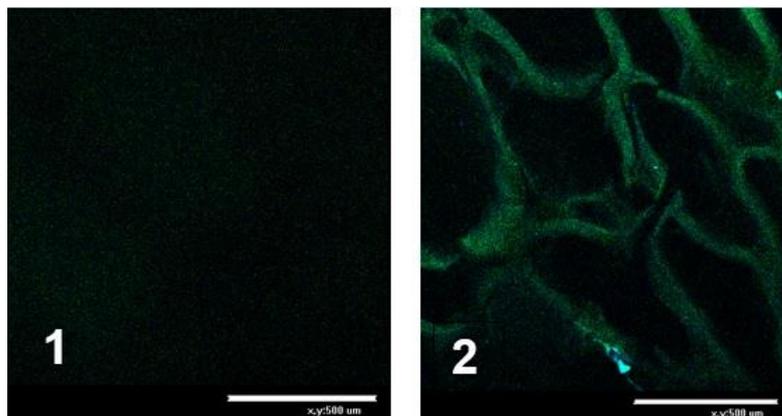


Рисунок 28 – Микрофотографии структуры матрицв гиалуроновой кислоты сшитой БДДЕ: 1 – 0,29 моль/моль; 2 – 0,1 моль/моль

С целью усиления остеокондуктивных свойств гидрогелей в систему гиалуроновая кислота – БДДЕ был добавлен гидроксиапатит - основной компонент минеральной составляющей костей и зубов. Введение его в систему позволяет придавать гладким стенкам гидрогеля шероховатость, позволяющую клеткам прикрепляться и пролиферировать в пространстве матрикса.

Цитотоксичность гидрогелей гиалуроновой кислоты (ММ 1000 кДа), содержащих 1% ГАП и 10% ГАП была исследована в процессе культивирования линии мышинных фибробластов L929 и клеток остеосаркомы человека (HOS). Морфологию и распределение клеток оценивали после 7 дней культивирования клеток L929 (рисунок 29) и клеток HOS (рисунок 30).

По сравнению с клетками мышинных фибробластов L929, где наблюдалось образование агрегатов клеток как в исходном гидрогеле ГК, так и вплоть до увеличения содержания гидроксиапатита до 10%, в случае клеток линии HOS, добавление уже 1% ГАП оказывало влияние на клетки и приводило к их распластыванию, а в случае 10% ГАП клетки образовывали плотный монослой.

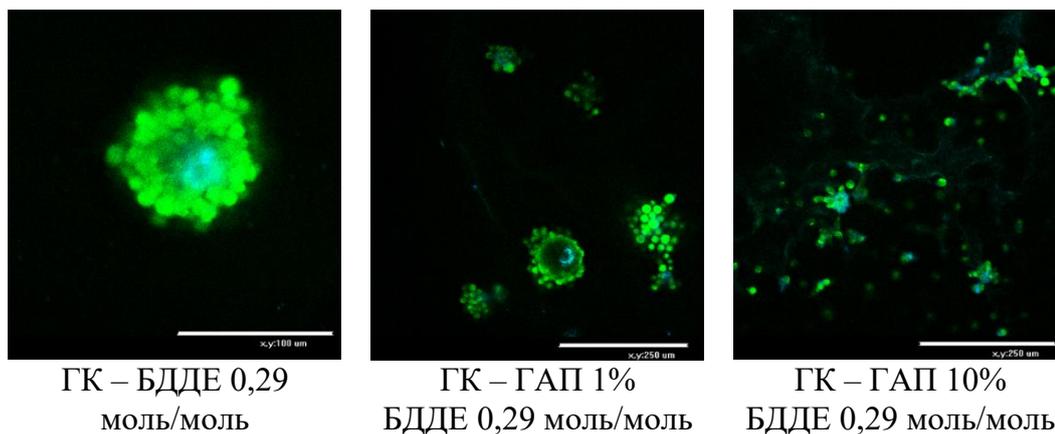


Рисунок 29 – Микрофотографии структуры матриксов и распределение фибробластов L929 после 7 дней культивирования в гидрогелях на основе ГК, в присутствии и отсутствии гидроксиапатита. Шкала 250 мкм.

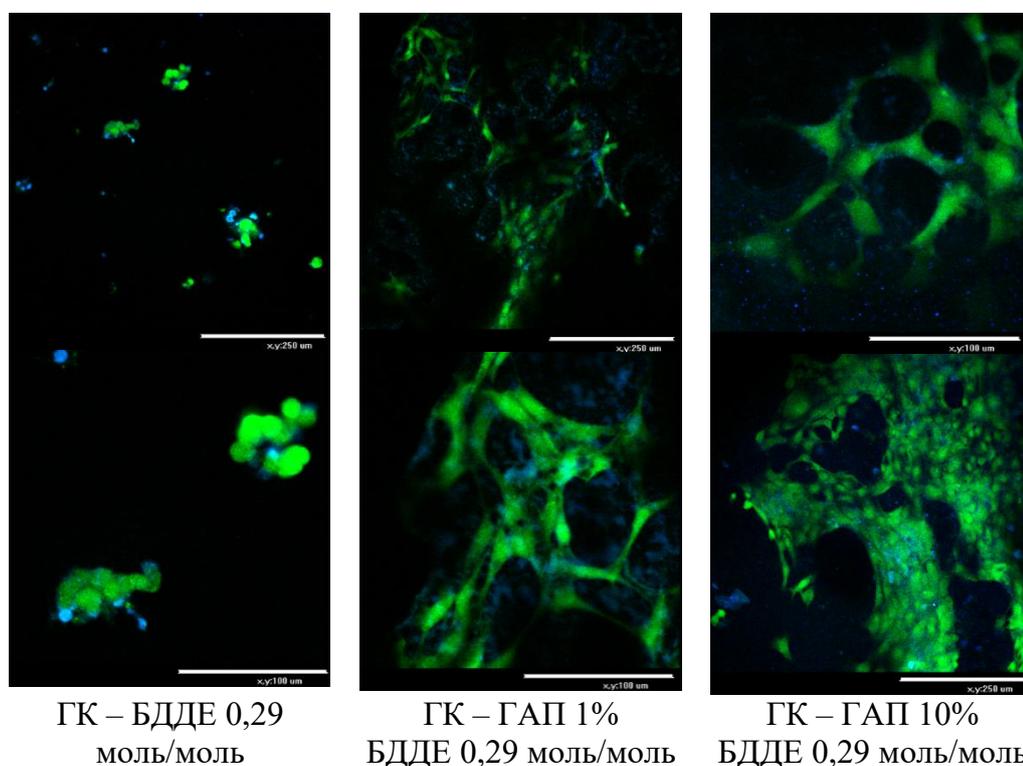


Рисунок 30 - Микрофотографии клеток NOS после 7 дней культивирования в гидрогелях на основе ГК, в присутствии и отсутствии гидроксиапатита.

Шкала 250 мкм и 100 мкм.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста в Институте биоорганической химии РАН. Для этого через 24 часа культивирования клеток в присутствии экстрактов матриксов ГК среду с экстрактами заменяли на раствор МТТ (0,5 мг / мл) в DMEM, далее

инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Затем смесь среды с МТТ декантировали, в лунки добавляли ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазана и измеряли оптическую плотность (ОП) на длине волны 540 нм с использованием планшет-ридера Multiscan (Flow Laboratories, США).

Данные цитосовместимости L929 и HOS после 7 дней культивирования, оцененные с помощью МТТ-теста (рисунок 31) показывают, что жизнеспособность клеток как L929, так и HOS была не высокой в случае гидрогелей без гидроксиапатита, в то время как при введении гидроксиапатита доля жизнеспособности клеток увеличивалась с ростом процентного содержания в системе гидроксиапатита, что согласуется с результатами конфокальной микроскопии. В целом можно сделать вывод о положительном влиянии остеокондуктивного компонента на жизнеспособность обоих типов клеток.

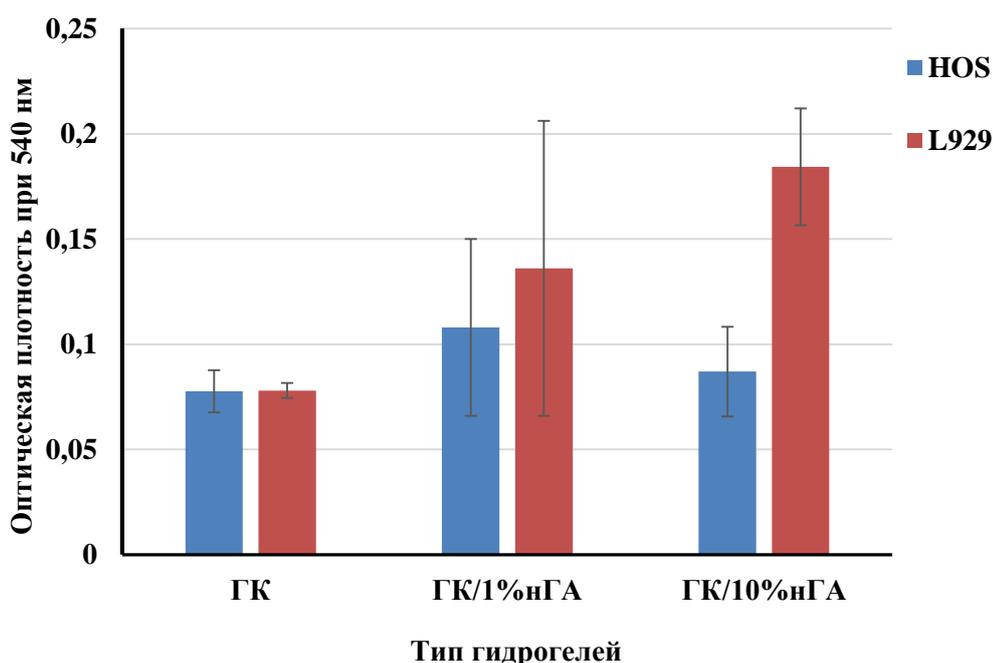


Рисунок 31 - Жизнеспособность фибробластов L929 и клеток HOS в гидрогелях ГК, в присутствии и отсутствии гидроксиапатита.

3.1.4 Электроформование волокнистых материалов на основе гиалуроновой кислоты

В силу особенности макромолекулы гиалуроновой кислоты принимать конформацию спирали в области физиологических значений рН, даже низкие концентрации полимера проявляют высокую вязкость раствора и значения поверхностного натяжения, что делает невозможным процесс ЭФ ГК из водных растворов.

3.1.4.1 Получение нановолокон из растворов гиалуроновой кислоты

На основании литературных данных были выбраны условия получения нановолокон ГК в системе растворителей $\text{NH}_4\text{OH}:\text{DMFA}$ [2:1] и $\text{NH}_4\text{OH}:\text{DMFA}$ [2:3]. Выбор именно такой системы растворителей обусловлен тем, что рН создаваемой присутствием NH_4OH 25% среды находится в области высоких значений (рН 10,5), что приводит к нарушению сильных межмолекулярных водородных связей полисахарида, переходу макромолекулы ГК из состояния спирали в клубок, без оказания существенного деструктирующего воздействия, как это происходит при использовании NaOH [144;145], DMFA , в свою очередь, известен как компонент, снижающий поверхностное натяжение формовочного раствора без значительных изменений показателей вязкости [141;142]. Используя такую систему растворителей становится возможным создавать композиции формовочных растворов гиалуроновой кислоты достаточно высокой концентрации (1-2%) при использовании полимера молекулярной массы 1000 кДа.

В таблице 5 приведены сравнительные характеристики электроформования ГК в системе растворителей $\text{NH}_4\text{OH}:\text{DMFA}$, показано, что наиболее стабильное формование наблюдается у образца номер 5, при концентрации гиалуроновой кислоты 0,9%. Однако, на поверхности приемной подложки образуется не волокнистый нетканый материал, а хрупкое пленочное покрытие. И хотя, согласно полученным АСМ-изображениям (рисунок 32-33) волокна со средним диаметром 60 ± 10 нм, действительно

присутствуют, использование такого вида материала для получения матриц – затруднительно, тем более, что как было указано в литературном обзоре, получить раствор хитозана в такой высокоосновной системе не представляется возможным, следовательно, данный тип системы растворителя не подходит для получения формовочной композиции растворов ПЭК хитозан-ГК.

Таблица 5 – Характеристика электроформования нативного раствора ГК (ММ 1000 кДа)

№ п/п	С ГК, % в растворе	Растворители	Соотношение растворителей	рН	Характеристика формования	d, нм
1	1,5	NH ₄ ОН:ДМФА	2:1	10,5	нет	-
2	1,5	NH ₄ ОН:ДМФА	2:3	10,5	нет	-
3	0,75	NH ₄ ОН:ДМФА	2:1	10,5	нет	-
4	0,75	NH ₄ ОН:ДМФА	2:3	10,5	Стабильное при 49-56 кВ	60
5	0,9	NH ₄ ОН:ДМФА	2:3	10,5	Стабильное формование при 45-50 кВ	70

Следует отметить, что процесс электроформования происходил при высоком значении напряженности электрического поля, что может свидетельствовать о высоком значении поверхностного натяжения формовочного раствора или все еще сильных межмолекулярных взаимодействиях в растворе гиалуроновой кислоты.

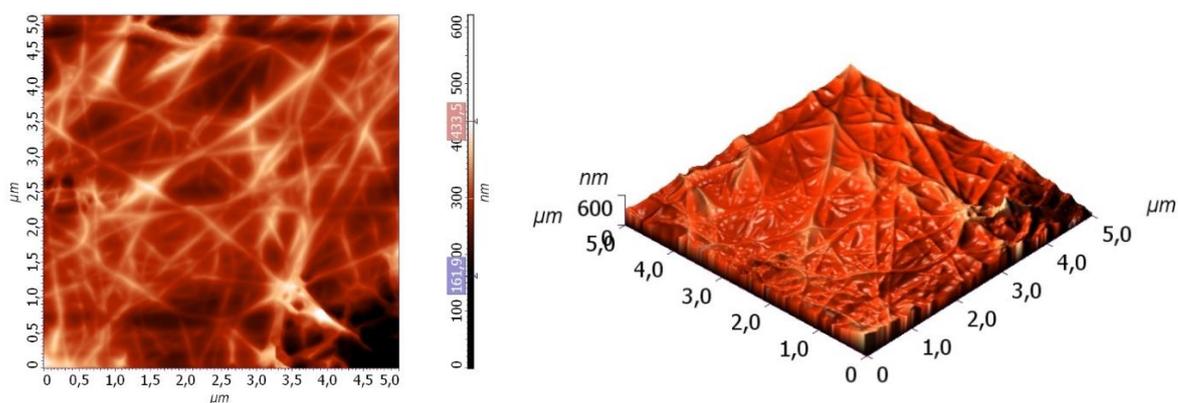


Рисунок 32 - АСМ изображения нановолокон ГК. Концентрация раствора полимера 0,75%; система растворителей: NH₄ОН: ДМФА [2:3]

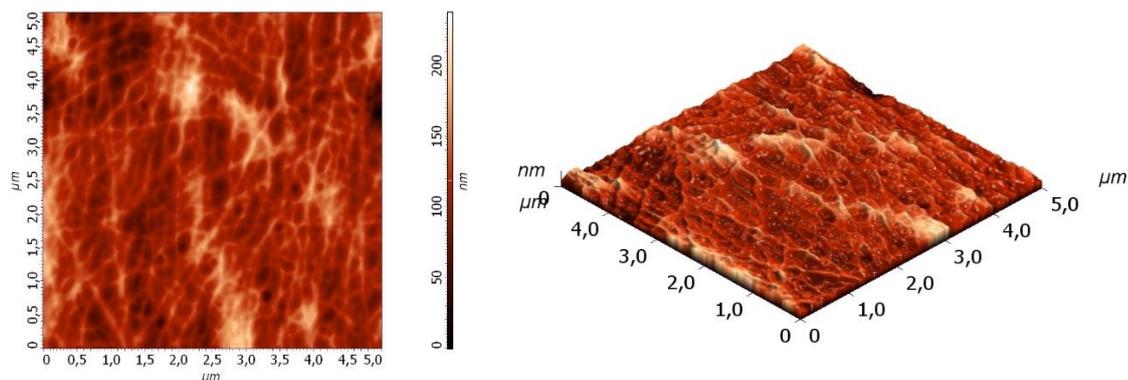


Рисунок 33 - АСМ изображения нановолокон ГК. Концентрация раствора полимера 0,9%; система растворителей: NH_4OH : ДМФА [2:3]

3.1.4.2 Получение нановолокон из водных растворов гиалуроновой кислоты и поливинилового спирта

Одним из наиболее распространённых способов придания растворам (полу-) жесткоцепных полимеров эффекта прядомости, является переработка растворов полимеров с использованием в качестве добавки менее жесткоцепного волокнообразующего компонента – таким как полиэтиленоксид или поливиниловый спирт [176, 177].

Поскольку ПВС получают гидролизом поливинилацетата, степень гидролиза является важным молекулярным параметром, определяющим реологические и физические свойства растворов ПВС [178, 179]. Так, в работе [180] показано, что ПВС со степенью гидролиза 87-89% обладает более низкими характеристиками механо- и водостойкости по сравнению с ПВС степень гидролиза которого находится в пределах значений 98-99%. В работе [181], проведен сравнительный анализ по определению влияния степени гидролиза ПВС на процесс электроформования и размер нановолокон: показано, что с увеличением степени гидролиза происходит увеличение диаметра нановолокна (190, 200, 220 и 470 нм для 88, 92, 96 и 99.9% соответственно). Кроме того, авторы отмечают, что с увеличением степени гидролиза наблюдается затруднение процесса электроформования, так как из-за сильных водородных связей происходит рост вязкости формовочного раствора. Помимо степени гидролиза на процесс формования и диаметр нановолокон оказывает влияние значение молекулярной массы полимера, на

основании литературных данных [182] и проведенных нами исследований по электроформованию растворов ПВС различной молекулярной массы, но с одинаковой степенью гидролиза 88% (таблица 6) было установлено, что наиболее подходящим является ПВС молекулярной массы 136 кДа, процесс электроформования которого оставался стабильным в диапазоне концентраций раствора до 10% а предельная вязкость раствора не превышала значения 1100 мПа*с (рисунок 34).

Экспериментальным путем были определены условия получения формовочных композиций на основе гиалуроновой кислоты и ПВС (таблица 7).

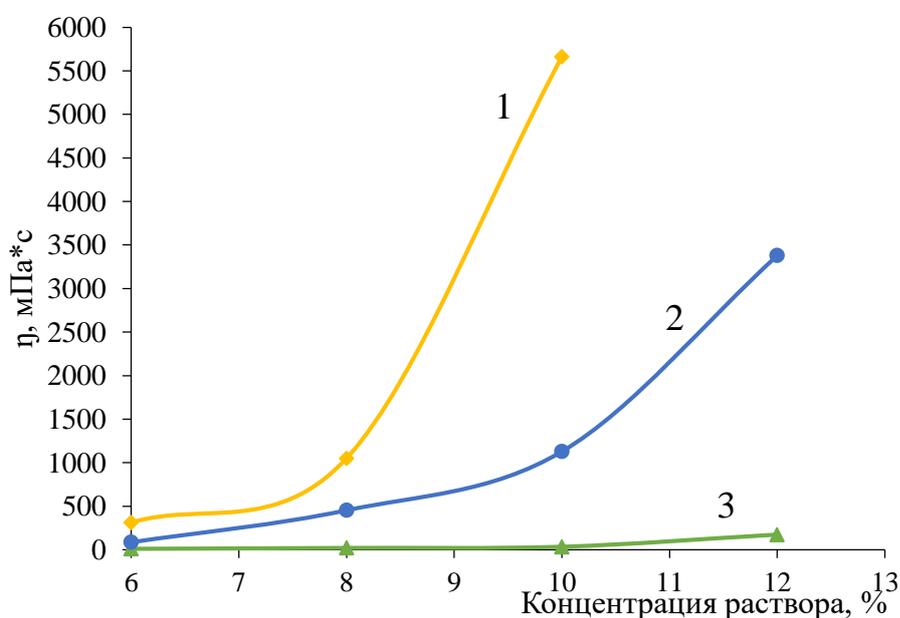


Рисунок 34 - Зависимость вязкости водных растворов ПВС от их концентрации при молекулярной массе полимера: 1 - 245 кДа; 2 – 136 кДа; 3 – 65 кДа

Как уже отмечалось, использование гиалуроновой кислоты высокой молекулярной массы (ММ 1000 кДа) для электроформования возможно только при рН среды 11 и выше, в случае же формирования смешанных водных растворов ГК-ПВС, необходимо использовать либо очень низкие концентрации полимера в растворе (0,25% и ниже) или же понижать молекулярную массу гиалуроновой кислоты. Для получения формовочных композиций с ПВС применялась гиалуроновая кислота с молекулярной массой 30 кДа и 100 кДа.

Таблица 6 - Характеристики процесса электроформования растворов ПВС различной молекулярной массы.

T = 25°C, расстояние от электрода до подложки 15,5 см. Степень гидролиза ПВС 88%.

ММ ПВС, кДа	Концентрация раствора, %			
	6%	8%	10%	12%
65 кДа	Деформация поверхности – 29 кВ. Начиная с 31 кВ идет сильное разбрызгивание раствора – формования нет	Деформация поверхности – 26. Начало формования при 31 кВ. Волокна тонкие, присутствует разбрызгивание.	Деформация поверхности – 27 кВ. Стабильное формование со всей поверхности капли. Волокна тонкие, обрывистые, наблюдается разбрызгивание	Деформация поверхности – 20 кВ. Начало формования 24 кВ. Стабильное формование 30,4 кВ. Волокна тонкие, легкие.
136 кДа	6%	8%	10%	12%
	Деформация поверхности при 27 кВ. Стабильное формование со всей поверхности при 32,6 кВ. Множественное образование конусов и дочерних струй на поверхности капли	Деформация поверхности при 21 кВ. Стабильное формование при 31-33,2 кВ. Волокна упругие, ложатся на подложку послойно.	Деформация поверхности при 27 кВ. Начало формования при 33 кВ, формование прерывистое, часто прекращается.	Деформация поверхности при 22 кВ. Начало формования при 27 кВ, формование нестабильное. При 45 кВ – проскок (остановка формования из-за высокого действия напряжения)
245 кДа	6%	8%	10%	12%
	Деформация поверхности при 25 кВ. Начало формования при 33,7 кВ. Стабильное формование со всей поверхности начиная с 36,8 кВ – образование упругих волокон.	Деформация поверхности при 26 кВ. Начало формования при 40-41 кВ – слабое прерывистое формование. При 45 кВ прерывистое формование со всей поверхности.	Во всем диапазоне приложенного на раствор напряжения идет образование конусов, но образования струй нет. Формование не идет.	

Как видно из таблицы 7 – стабильное формование наблюдалось у образцов растворов полученных на основе гиалуроновой кислоты молекулярной массы 30 кДа при концентрации ПВС в системе 3,6% [40:60] и 4,5% [50:50] при приложенном напряжении 34 кВ; однако, увеличение концентрации ПВС в формовочном растворе не приводило к улучшению процесса формования системы на основе ГК 100 кДа, что по-видимому связано с образованием сильных кооперативных взаимодействий между полимерами ПВС и ГК в растворе.

Таблица 7 - Характеристика электроформования системы раствора ГК-ПВС

№	Система	С, % по полимерам	Соотношение ПВС:ГК	Характеристика формования	Диаметр волокон, нм
Молекулярная масса ГК-На 30 кДа					
1	ПВС: ГК	9	50:50	Стабильное	188
2		9	40:60	Стабильное	150
3		9	30:70	Разбрызгивание	-
4		9	20:80	Нет	-
5		10	30:70	Нет	-
6		11	30:70	Нестабильное	-
7		12	30:70	Мутный раствор. Разбрызгивание	-
Молекулярная масса ГК-На 100 кДа					
1	ПВС: ГК	6	40:60	Нет	-
2		8	40:60	Нет	-
3		10	40:60	Нет	-

Согласно полученным АСМ-изображениям (рисунок 35, 36) средний диаметр волокон составил от 150 до 188 нм, что значительно выше значений, полученных для нативной ГК, и связано в большей степени с присутствием в формовочной системе ПВС.

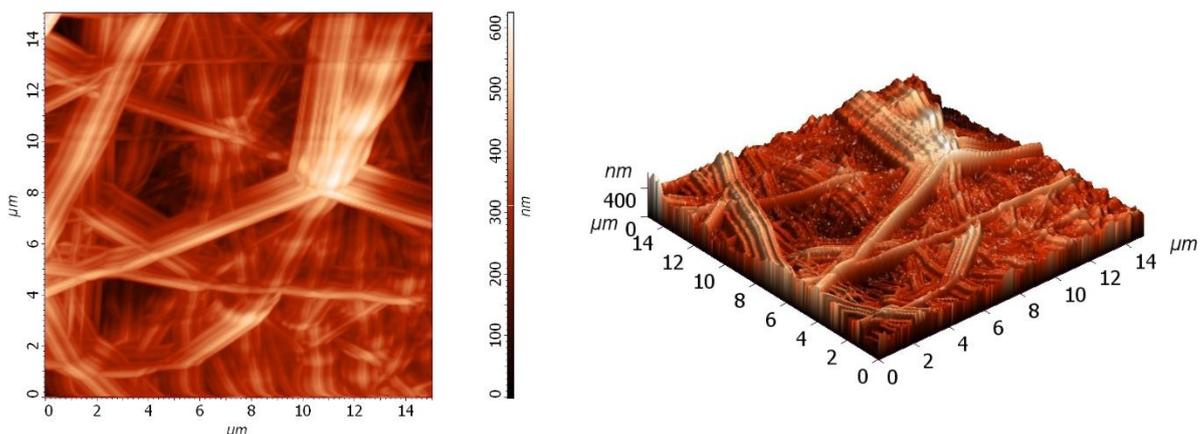


Рисунок 35 - АСМ изображение волокон ПВС:ГК [50:50]. Концентрация по полимерам в растворе 9%.

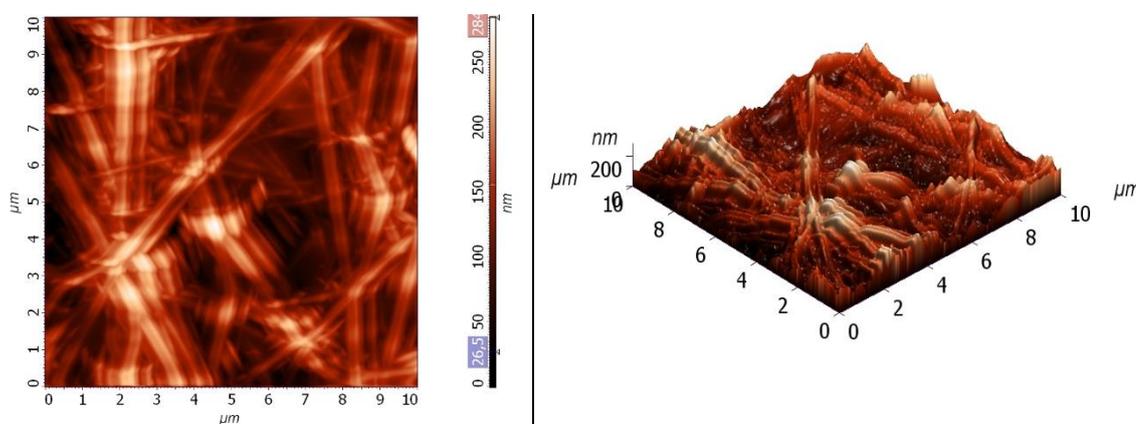


Рисунок 36 – АСМ изображение волокон ПВС:ГК [40:60]. Концентрация по полимерам в растворе 9%.

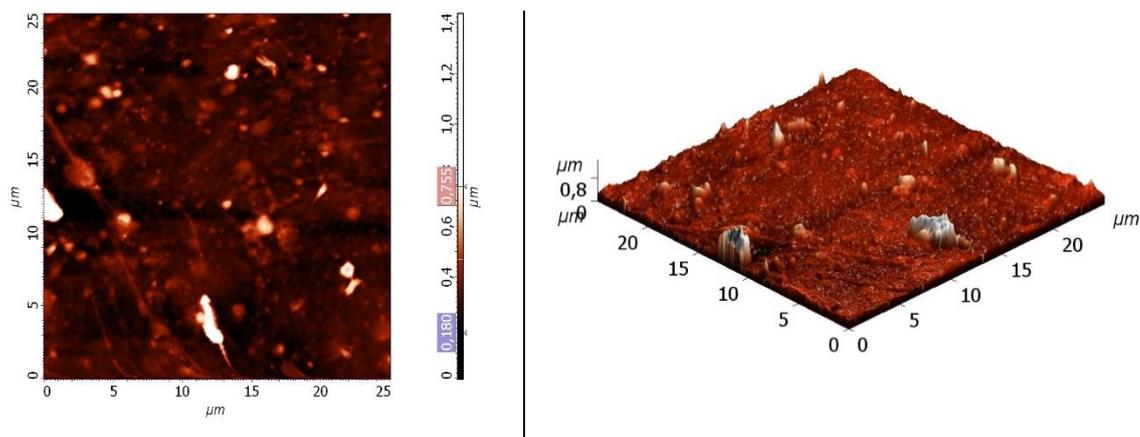


Рисунок 37 – АСМ изображение материала, полученного на основе системы ПВС:ГК [30:70]. Концентрация по полимерам в растворе 12%.

Процесс электроформования системы ПВС:ГК [30:70] при концентрации полимеров 12% был крайне нестабильным. Деформация поверхности капли раствора наступала при напряжении 36 кВ, отрыв капли и вытягивание волокон происходило при увеличении напряжения до 42 кВ.

Волокна были разрозненные, очень тонкие, зонтичного образования волокон свойственного стабильному процессу не наблюдалось. Процесс прекратился через 20 секунд, капля раствора на точечном электроде застыла. Исследование подложки с помощью метода АСМ (рисунок 37), показал наличие тонких единичных волокон диаметром 70-80 нм, в основном, на поверхности наблюдались точечные образования размером 3-5 мкм, что может быть деформированными свернутыми волокнами, следовательно, в этом случае условия получения формовочной композиции полимеров не подходят для успешного процесса ЭФ.

3.2 Разработка новых материалов для медицины и тканевой инженерии на основе полиэлектролитных комплексов гиалуроновой кислоты и хитозана

В литературном обзоре отмечались перспективы использования полиэлектролитных комплексов для создания материалов медико-биологического назначения. На их основе возможно создавать различные материалы: пленочные покрытия для адресной доставки лекарственных веществ, покрытия типа «ядро-оболочка» для филлеров в косметологии и хирургических шовных нитей; получать сшитые гидрогели и на их основе макропористые биополимерные системы – матрицы, которые могут послужить подложкой для выращивания различных типов тканей, что актуально для регенеративной медицины. Для получения материалов на основе полиэлектролитных комплексов гиалуроновой кислоты и хитозана необходимо разработать специальные приемы, позволяющие осуществить совместную переработку этих противоположно заряженных полисахаридов, а также изучить возможность введения в структуру композиций компонентов, влияющих на биосовместимость и остеокондуктивные свойства материала и способствовать его лучшему интегрированию с живыми тканями.

3.2.1 Изучение закономерностей фазового разделения в системе гиалуроновая кислота – хитозан

Стабильность и растворимость в воде ПЭК хитозана и гиалуроновой кислоты определяется композиционным составом, рН и степенью диссоциации функциональных групп [183]. Нерастворимые ПЭК с составом близким к стехиометрическому, как показано в работе [184], проще всего могут образовываться в кислой среде в области рН 3,5-5,0. В области более высоких значений рН для образования ПЭК ГК с хитозаном, последний следует вводить в систему в избытке.

Зависимость вязкости ГК от рН (рисунок 38) была получена в контексте ее возможного комплексообразования с хитозаном. Выбор концентрации растворов хитозана и ГК 0,05% и 0,18% при исследовании вязкостных свойств растворов полисахаридов был сделан с учетом расчётов для концентрации, при которой отсутствует перекрывание клубков c^* . Так, c^* , определяется как точка, в которой концентрация полимера внутри клубка равна концентрации раствора. Она может быть оценена из характеристической вязкости $[\eta]$, как:

$$c^* \cong 1/[\eta]$$

Для раствора ГК и хитозана концентрация перекрывания клубков в солевом растворителе ($c^* \sim 0,056 \pm 0,06$ и $\sim 0,18 \pm 0,02$ соответственно) в ~ 10 и ~ 5 раз меньше концентрации полимера [185], при которой зацепления цепей становятся существенными. Следовательно, вязкость растворов полисахаридов для выбранных концентраций обусловлена размерами и конформацией отдельных цепей, а не ассоциатов. Все экспериментальные данные хорошо согласуются с литературными данными [186].

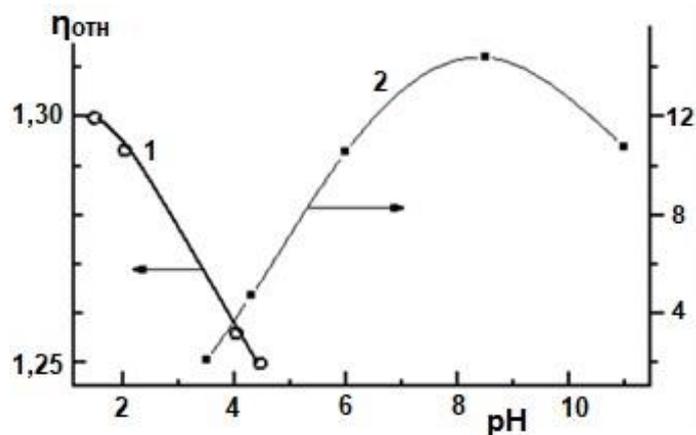


Рисунок 38 - Зависимость относительной вязкости 0,05 % раствора хитозана (1) и 0,18 % раствора ГК (2) от pH

В то же время раствор ГК-Na с концентрацией $\geq 0,2\%$ очень структурирован и имеет высокую начальную вязкость [187], что затрудняет проведение процесса ионного обмена и гомогенное смешение растворов полиэлектrolитов при комплексообразовании.

Установлено (рисунок 38), что вязкость раствора полиоснования хитозана (кривая 1) падает при увеличении pH до 4,5 поскольку снижается степень ионизации аминогрупп, а при $\text{pH} \geq 4,5$ начинается осаждение полимера. У растворов поликислоты при увеличении pH с 3,5 до 8 – 8,5 и степени ионизации карбоксильных групп вязкость, наоборот, увеличивается. Дальнейшее увеличение pH за счет введения избытка NaOH из-за повышения ионной силы системы и экранирование зарядов приводит к снижению вязкости. Полученные данные вполне согласуются с теоретическими представлениями о свойствах растворов полиэлектrolитов и позволяют определить области pH 3.5 – 4.5, где макромолекулы обоих полимеров, оставаясь в растворе, обладают наиболее свернутой (компактной) конформацией.

Принимая во внимание, что протонированная форма аминополисахарида хитозана растворима в воде, в результате комплексообразования между гиалуроновой кислотой и хитозаном могут образовываться как водорастворимые продукты реакции, так и нерастворимые

в воде комплексы. Результат такой реакции может определяться как соотношением полимеров, так и способом их смешения.

Учитывая это, была исследована возможность реакции комплексообразования в результате добавления к раствору ГК в Н-форме (рН 3,5) твердого хитозана в форме полиоснования. Было установлено, что взаимодействие между функциональными группами полиэлектролитов хитозана и ГК-Н происходит только на поверхности частиц твердого хитозана, что значительно замедляет и делает невозможным диффузию длинных и объемных цепей ГК внутрь частиц твердого хитозана, тем самым приводя к образованию набухшего поверхностного слоя из ПЭК между полисахаридами. Однако, такой способ получения ПЭК возможен для модификации твердых поверхностей полимерных материалов на основе хитозана: гранул, пленок, микрокапсул или матриц.

Изучение закономерностей фазового разделения в системе хитозан-ГК показало наличие широкой гетерогенной области составов. На рисунке 39 представлен процесс комплексообразования при смешении эквимоцентрированных растворов ГК-Na (рН 5,6) и хитозана (рН 4,5) в планшетах для культивирования. После смешения растворов фиксировали изменение фазового состояния систем, которое в некоторых ячейках сопровождалось образованием белого творожистого осадка, наибольшее количество которого содержалось в ячейках со смесями эквимольного состава, что может указывать на образование стехиометрических ПЭК, частицы которых стабилизированы большим числом ионных связей между полиэлектролитными цепями.

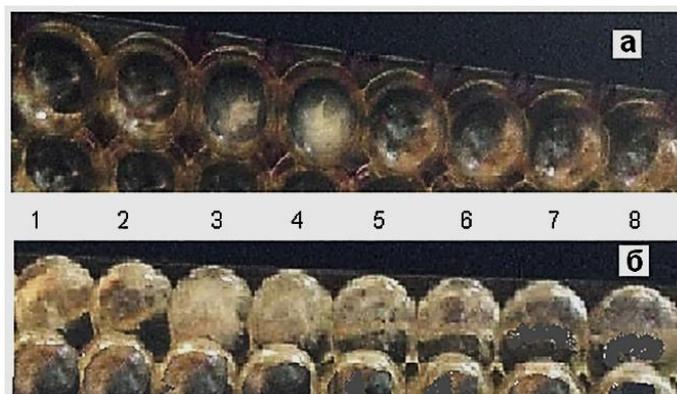


Рисунок 39 - Фазовое состояние смесей растворов ГК-На (рН 5,6) и хитозана (рН 4,5) и суммарной концентрацией полимеров 0,05% (а) и 0,18% (б). ММ хитозана 190 кДа; ММ Гк 1000 кДа.

Кроме того, обнаружено, что в смесях такого состава процесс комплексообразования вначале действительно сопровождается ростом вязкости системы, в результате чего образуются прозрачные гели, которые имеют низкую прочность, а при выдерживании в течение времени образуют осадок, то есть сначала образуется растворимый ПЭК нестехиометрического состава.

На рисунке 40 показано, как с помощью дозированного внесения раствора ГК-Н в раствор хитозана можно получать гидрогели ПЭК в форме гранул. Такой способ позволяет использовать такие гранулы в качестве матриц для иммобилизации лекарственного вещества. Однако, прочность таких гранул низкая и для получения стабильной системы следует использовать сшивающие реагенты.

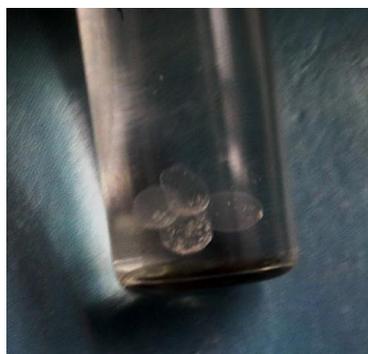


Рисунок 40 – Гранулы ПЭК гиалуроновой кислоты и хитозана

3.2.2 Изучение условий образования водорастворимых ПЭК хитозана и гиалуроновой кислоты

Образование не растворимых в воде полиэлектролитных комплексов связано, в основном, с двумя причинами: многоточечными электростатическими взаимодействиями между макромолекулами противоположно заряженных полиэлектролитов, приводящими к компактизации ассоциатов макромолекул в растворе; и снижением гидратации макромолекулы из-за уменьшения числа ионизованных групп, вовлекаемых в образование ионных связей.

Для определения пределов растворимости при разном соотношении ионизирующихся функциональных групп хитозана и ГК при комплексообразовании в растворе было проведено нефелометрическое титрование и кондуктометрическое титрование 3%-ного раствора хитозана ММ 190 кДа эквимольным раствором ГК в Н-форме (ММ 30 кДа), полученного с помощью катионита КУ-2-20 при рН среды 3,0 (рК ГК 4,3; рК хитозана 6,2). При таком значении рН $\alpha_{ГК} = 0$, а хитозан протонирован на 100%. Постепенное добавление ГК-Н не оказывало влияние на мутность системы вплоть до соотношения $COOH/NH_2 = [0,2 \text{ ммоль/ммоль}]$, однако, за счет снижения концентрации ионогенных групп и нейтрализации заряда полиэлектролитов, проявляющемся в уменьшении электропроводности исследуемого раствора (кривая 2, рисунок 41) в конечном итоге привело к помутнению раствора, что свидетельствует об образовании нерастворимых ПЭК (рисунок 42).

Результаты нефелометрического титрования позволили установить концентрационная область, в которой образующиеся ПЭК хитозана и гиалуроновой кислоты являлись водорастворимыми, и могут быть использованы для совместной переработки. При получении наночастиц и наноразмерных лекарственных форм, однако такие разбавленные растворы хитозана и ГК-Н невозможно использовать для получения гидрогелей.

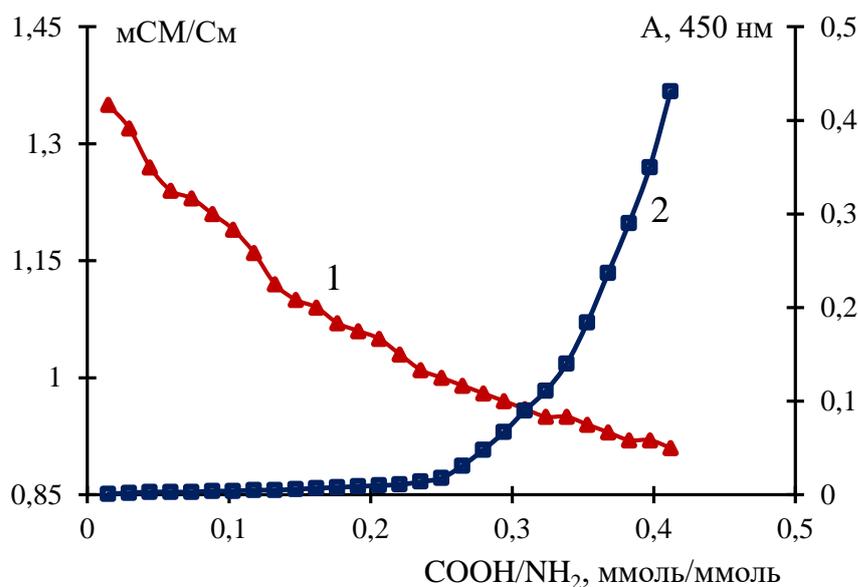


Рисунок 41 - Нефелометрическое титрование 0,3% раствора Хит-190 раствором ГК-Н при рН 3: 1 – кривая зависимости оптической плотности раствора от количества COOH–групп, 2 – кривая зависимости электропроводности раствора от содержания COOH–групп

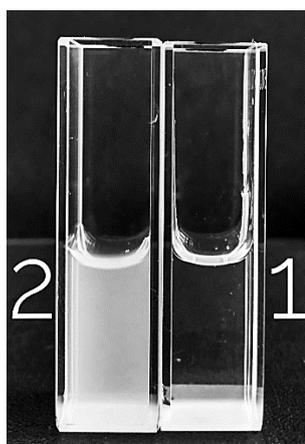


Рисунок 42 - Фотографии 0,3 % раствора хитозана (рН 3): 1 – чистого (раствор сравнения), 2 – с добавлением ГК-Н в соотношении [1:1], г/г

С целью определения условий получения биополимерных матриц для выращивания клеток было проведено исследование комплексообразования в 2%-ных растворах хитозана и ГК-Н. Однако, повышение концентрации полимеров привело к быстрой коагуляции смешанного раствора ГК-Н и хитозана во всем диапазоне составов.

Известно [188], что стехиометрические ПЭК нерастворимы в водной среде с низкой ионной силой и рН близким к нейтральному, из-за содержания

в структуре ПЭК протяженных менее гидрофильных областей и однотяжных фрагментов, а также присутствию межмолекулярных физических сшивок.

Предотвратить образование нерастворимых или создать возможность формирования растворимых в воде комплексов можно:

а) снижением числа контактов между макромолекулами путем понижения концентрации растворов хитозана и ГК;

б) экранированием зарядов повышением ионной силы растворов;

в) изменением ионизации функциональных групп путем варьирования рН растворов.

Учитывая, что из растворов низкой концентрации не удастся сформировать гидрогели, была изучена возможность формирования растворимых в воде комплексов полиэлектролитов путем регулированием ионной силы раствора введением фонового электролита и рН среды.

Изучение влияния ионной силы на образование водорастворимых ПЭК проводилась посредством нефелометрического титрования 2%-ного раствора хитозана эквимольным раствором ГК-Н в присутствии различного количества сильного электролита NaCl, содержание в растворе которого варьировалась от 0,2-0,5 моль/л. На рисунке 43 видно, что с повышением концентрации электролита в смешанных растворах происходит замедление роста оптической плотности раствора, связанного с влиянием NaCl на образование ионных связей между макромолекулами полиэлектролитов.

Образование прозрачной системы – нестехиометрических комплексов, наблюдалось при концентрации электролита 0,4-0,5 моль/л.

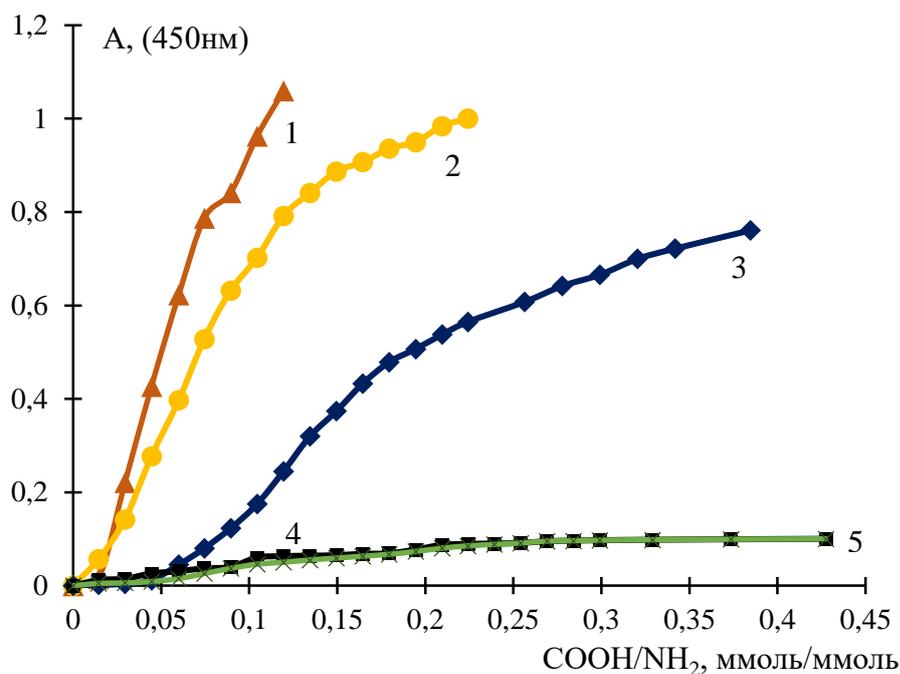


Рисунок 43 - Нефелометрическое титрование 2%-го раствора хитозана эквипонцентрированным раствором ГК-Н, в присутствии электролита. Содержание NaCl в растворе (рН 3): 1 – 0,2 моль/л; 2 – 0,3 моль/л; 3 – 0,35 моль/л, 4 – 0,4 моль/л; 5 – 0,5 моль/л

Изучение влияния рН на образование ПЭК проводилось методом нефелометрического титрования раствора хитозана раствором ГК-Н, содержащих NaCl концентрацией 0,5 моль/л; рН растворов составляло 3 и 4,2 (рН исходного 2%-ного раствора хитозана в 2%-ной уксусной кислоте). На рисунке 44 приведены кривые зависимости оптической плотности от содержания COOH/NH_2 , ммоль/ммоль в растворе при различных значениях рН. Показано, что увеличение рН, т.е. увеличение степени диссоциации ГК-Н, в большей степени влияет на образование нерастворимых ПЭК, чем снижение числа протонированных аминогрупп хитозана.

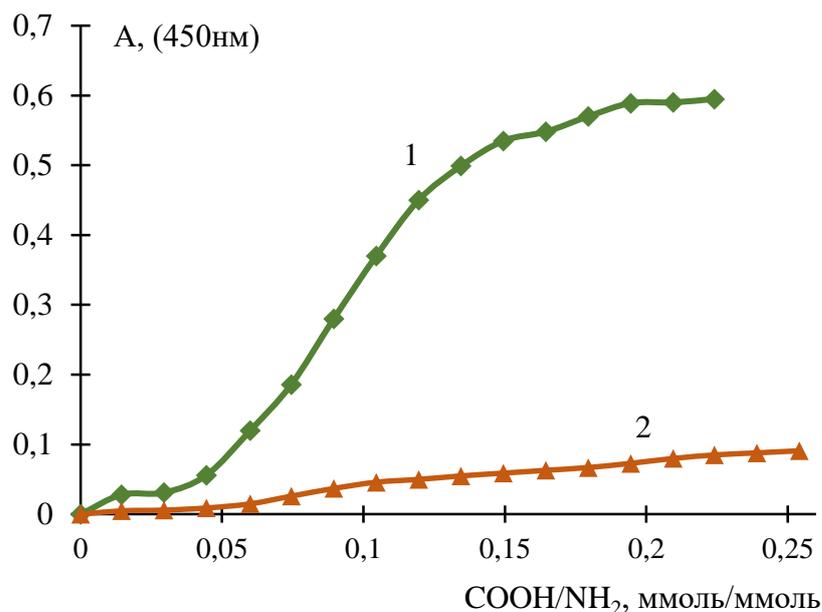


Рисунок 44 - Непелометрическое титрования раствора хитозана раствором ГК-Н, в присутствии 0,5 моль/л NaCl при: 1 – рН = 4,15; 2 – рН = 3

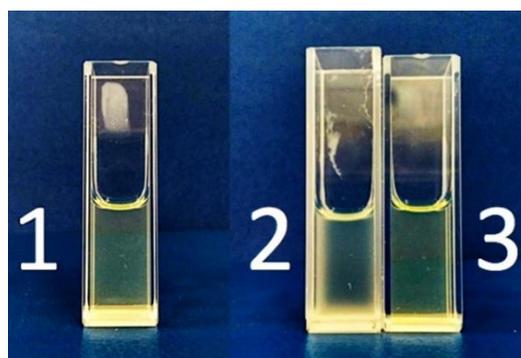


Рисунок 45 - Фотографии растворов: 1 – чистый 2% раствор хитозана (раствор сравнения); 2 - раствор хитозана с добавленным к нему 2%-ным раствором ГК-Н в соотношении 1:1 г/г, в присутствии NaCl 0,5 моль/л при: 2– рН 4,2; 3 – рН 3

Таким образом, для получения гомогенных систем на основе 2%-ных водных растворов хитозана и ГК необходимо введение фонового электролита и снижение рН были определены условия, позволяющие при смешении 2%-ных растворов хитозана и ГК получать гомогенные растворы. Полученные результаты были использованы для изучения процесса сшивки хитозана в присутствии ГК и получения на их основе не растворимых в воде материалов медицинского назначения.

3.2.3 Изучения условий гелеобразования в растворах хитозана и гиалуроновой кислоты в процессе химической сшивки

Для получения не растворимых в воде гидрогелей на основе изучаемых полимеров был использован метод химического сшивания с использованием сшивающих реагентов дженипина и глутарового альдегида.

Из работы [189] известно, что рН оказывает большое влияние на реакционную способность хитозана, так как реакционноспособная функциональная аминогруппа хитозана приобретает разные свойства в зависимости от активности ионов водорода. Хитозан способен растворяться в водной кислой среде, в результате чего приобретает положительный заряд благодаря группам $-NH^{3+}$. А в реакциях нуклеофильного присоединения, по механизму которой протекает процесс сшивки хитозана при получении гидрогеля, реакционно-способной является депротонированная форма аминогруппы хитозана. При уменьшении концентрации ионов водорода растёт число депротонированных аминогрупп и их реакционная способность в реакциях с Гр и ГА.

Оптимальным значением рН для сшивки хитозана дженипином является 5,6 – уже при рН 3,8 скорость сшивки падает в 5 раз [190]. 2%-ный раствор хитозана с ММ 190 кДа в 2% УК имеет рН около 4, что соответствует низкому содержанию реакционноспособных аминогрупп для реакции сшивки. Что бы увеличить число реакционноспособных аминогрупп в растворе хитозана, рН доводили до 5,6 с помощью NaOH. Мы показали, что в таких условиях в смешанных растворах хитозана и ГК происходит помутнение, вызванное выделением не растворимого в воде полиэлектrolитного комплекса. При прибавлении Дж в реакцию сшивки будут вовлечены все депротонированные аминогруппы хитозана, как индивидуальных молекул, так и входящих в состав ПЭК.

Глутаровый альдегид более реакционноспособен, чем дженипин и способен реагировать с хитозаном при значениях рН 3 и выше. Поэтому

процесс гелеобразования был изучен в условиях, которые обеспечивали образование гомогенного хитозана и ГК: рН 3,0, 0,5М NaCl.

В таблице 1 приведены условия сшивки и гелеобразования в растворах хитозана с ММ 190 кДа и его полиэлектролитных комплексов с ГК. Сшивку проводили при двух соотношениях сшивающего реагента и аминогрупп хитозана равном 0,01 и 0,02 моль/моль для дженипина и соотношении 0,08 моль/моль NH₂ в случае использования ГА.

Таблица 8 — Условия сшивки и гелеобразования в композициях, содержащих хитозан и ГК-Н

№ п/п	Соотношение хитозан:ГК, г/г	Ионная сила раствора I, М	рН	Сшивающий реагент (СР)	Соотношение СР/ NH ₂ , моль/моль
1	—	—	5,6	Дженипин	0,02
2	—	—			0,01
3	5:1	—			0,02
4	5:1	—			0,01
5	—	0,5	3	Глутаровый альдегид	0,08
6	5:1	0,5			0,08
7	—	—			0,08
8*	5:1	0,5			0,08

Изучено влияние ГК в Н-форме, рН раствора и присутствие сильного электролита на время гелеобразования систем хитозан-ГК, сшитых с помощью глутарового альдегида и дженипина (рисунки 46;47).

Изучение влияния ионной силы раствора на кинетику гелеобразования в растворах хитозана в присутствии ГА показало, что ионная сила 0,5М снижает время гелеобразования на порядок (рисунок 46). Это, по-видимому, связано с конкурентным взаимодействием с протоном хлорид-иона и увеличением числа депротонированных аминогрупп, концентрация которых оказывает определяющее влияние на кинетику реакции сшивки и гелеобразования в растворе хитозана.

Присутствие ГК в растворе хитозана замедляет реакцию сшивки как в случае использования ГА, так и Gr (рисунок 46, 47), это объясняется тем, что часть аминогрупп хитозана включена в состав ионных связей ПЭК, и концентрация свободных аминогрупп уменьшается. При понижении концентрации сшивающего реагента скорость реакции сшивания закономерно снижается.

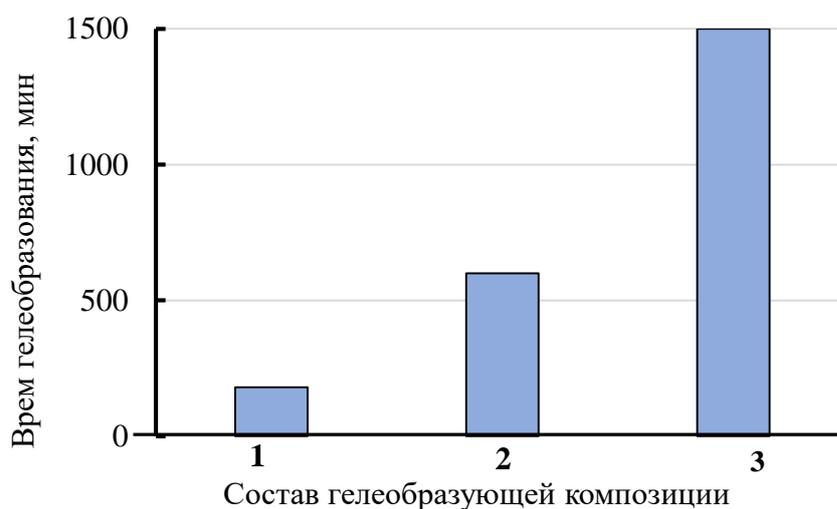


Рисунок 46 – Зависимость гелеобразования в 2%-ных растворах хитозана 190 кДа в присутствии ГК-Н при увеличенной ионной силы раствора, и pH 3. ГА/ NH_2 [0,08] моль/моль: 1 – Раствор хитозана содержащий 0,5M NaCl; 2 – Раствор хитозан-ГК-Н в присутствии 0,5M NaCl; 3 – Исходный раствор хитозана

Снижение времени гелеобразования наблюдается и при сшивании системы дженипином (рисунок 47), когда в растворе хитозана присутствует гиалуроновая кислота, что связано с уменьшением количества свободных аминогрупп хитозана из-за образования ионных связей между полиэлектролитами. Снижение соотношения сшивающего реагента на моль реакционной аминогруппы хитозана закономерно приводит к снижению скорости гелеобразования раствора.

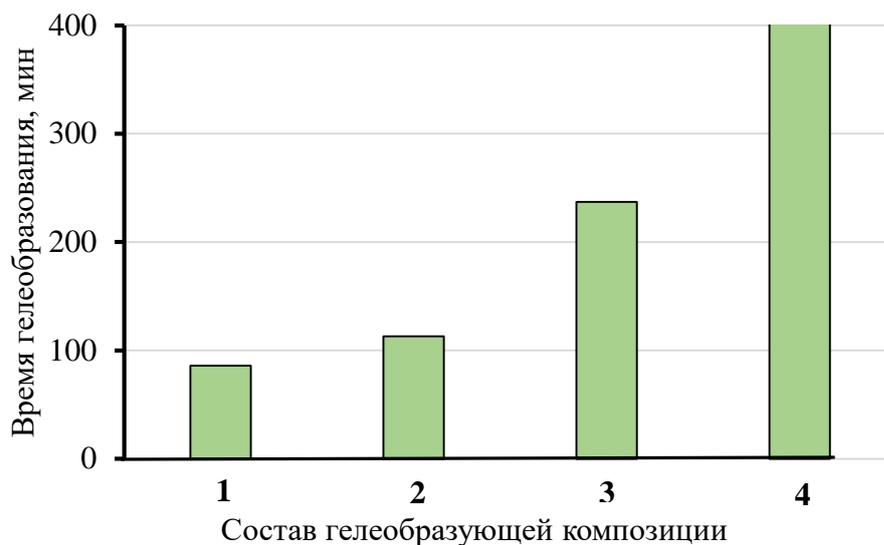


Рисунок 47 - Зависимость гелеобразования в 2%-ных растворах хитозана 190 кДа в присутствии ГК-Н, рН 3: 1 – Раствор хитозан-ГК-Н [5:1] Дж/ NH₂ [0,01] моль/моль; 2 - Раствор хитозан-ГК-Н [5:1] Дж/ NH₂ [0,02] моль/моль; 3 – Исходный раствор хитозана Дж/ NH₂ [0,01] моль/моль; 4 - Исходный раствор хитозана Дж/ NH₂ [0,02] моль/моль

3.2.4 Получение и исследование процесса набухания гидрогелей на основе химически сшитого хитозана и ГК

Высокая влагоудерживающая способность гидрогелей (пленок) и возможность ее регулирования за счет изменения условий сшивки создают перспективы для создания на их основе биodeградируемых матриц для тканевой инженерии и систем контролируемого выделения и доставки лекарственных соединений.

В условиях, приведенных в таблице 8 с использованием глутарового альдегида и дженипина были получены гидрогели на основе системы раствор хитозана – ГК-Н. Добавление дженипина к раствору хитозана приводит к появлению гидрогелей синей окраски, интенсивность которой увеличивается с увеличением содержания Дж, а добавление глутарового альдегида придает гидрогелям насыщенный желтый цвет (рисунок 48), характерный для соединений, содержащих альдиминные связи.

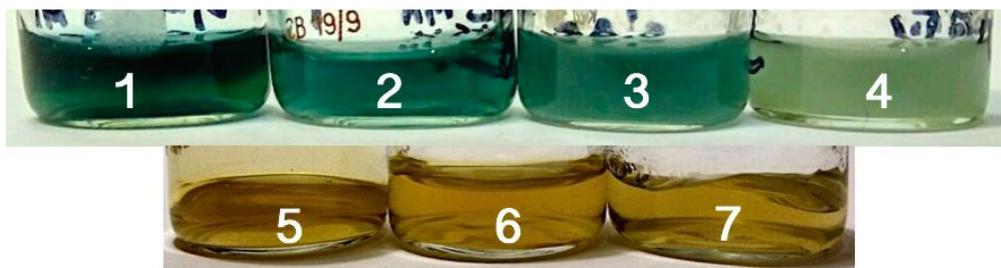


Рисунок 48 – Фотографии сшитых гидрогелей хитозана, обозначения в соответствии с таблицей 8.

В результате изучения кинетики набухания гидрогелей (рисунки 49, 50) были получены кинетические кривые, которые имели вид кривых с насыщением в области 3,5 тысяч процентов, что свидетельствует о нерастворимости гидрогелей и их высокой способности к влагоудерживанию.

Было установлено, что присутствие соли несколько снижает показатель степени набухания гидрогелей, однако в случае образцов с гиалуроновой кислотой — это не так заметно, так как гидрофильная природа ГК компенсирует влияние соли.

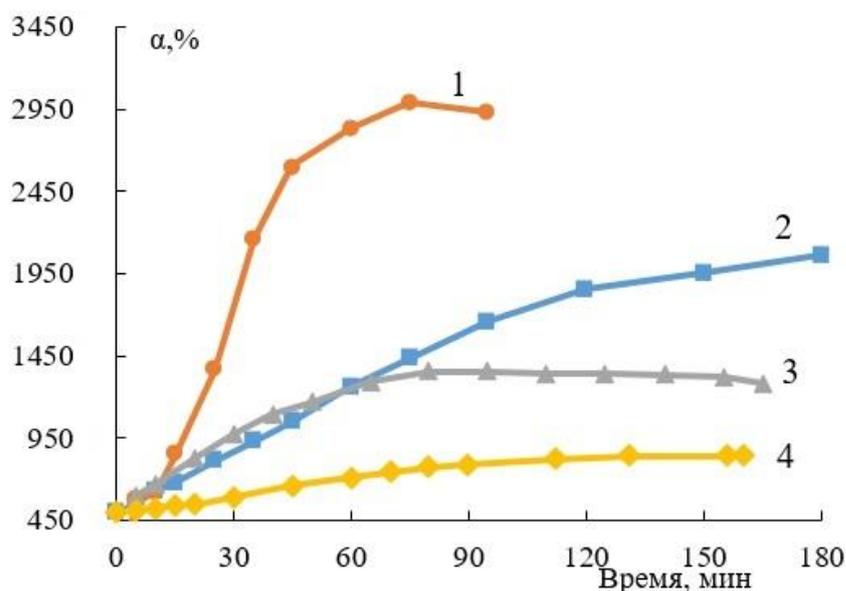


Рисунок 49 – Кинетика набухания гидрогелей хитозан-ГК-Н, сшитых дженипином. Кривые 1; 2; 3; 4 – соответствуют пунктам 4; 3; 2; 1 таблицы 8.

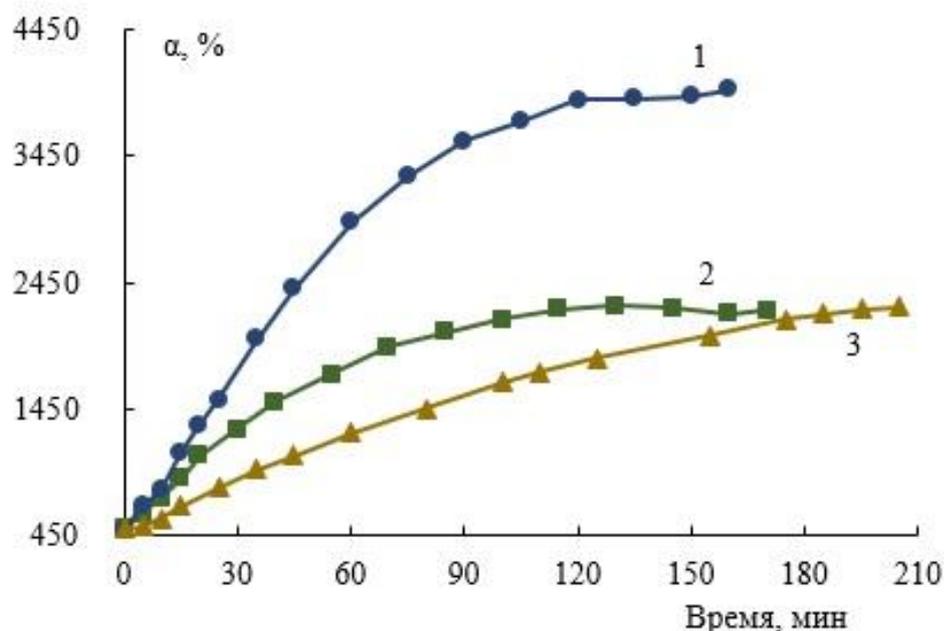


Рисунок 50 - Кинетика набухания гидрогелей хитозан-ГК, сшитых глутаровым альдегидом. Кривые 1; 2; 3 – соответствуют пунктам 7; 5 и 6 таблицы 8.

Для установления возможного влияния NaCl на влагопоглощение образцов, полученных в присутствии фонового электролита и изучение кинетики набухания образцов гидрогелей проводили одновременно с измерением удельной электрической проводимости воды. Согласно данным рисунка 51 увеличение концентрации ионов электролита в воде в течение времени происходит с разной скоростью, что указывает на отсутствие влияния электролита на осмотические свойства гидрогелей.

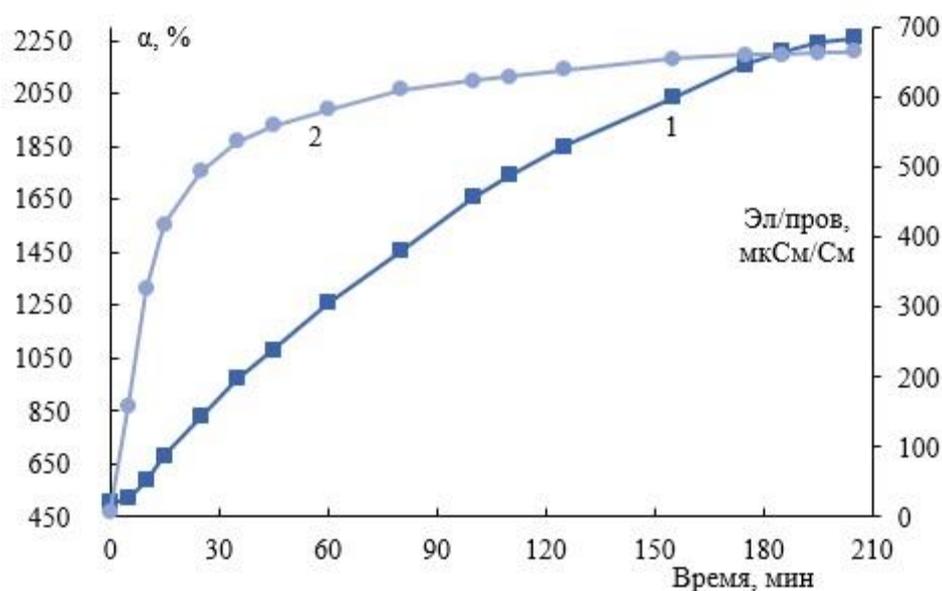


Рисунок 51 – Зависимость степени набухания (1) и изменения электропроводности (2) воды в процессе набухания гидрогеля, полученного в сшивкой ГА ($\text{ГА}/\text{NH}_2$, 0,08 моль/моль) хитозана в растворе, содержащем ГК

Однако, следует отметить, что такая высокая концентрация соли в гидрогеле (NaCl 0,5 моль/л) может повлиять на процесс порообразования при лиофильном высушивании гидрогелей и оказать неблагоприятное воздействие на выживаемость клеток, поэтому необходимо предусмотреть стадию промывки гидрогеля от избытка электролита.

3.2.5 Получение макропористых биodeградируемых матриц с использованием нерастворимых комплексов хитозана и гиалуроновой кислоты

Высокая пористость и необходимый размер пор в матрицах для тканевой инженерии создают оптимальные условия для обеспечения заселения, адгезии и пролиферации клеток [19]. Пористая структура с сообщающимися порами способствует метаболическому и газовому обмену во вновь образующихся тканях, а большая площадь поверхности и определенный размер пор способствуют прорастанию тканей. Пористую структуру гелей и пленок можно сформировать и зафиксировать путем замораживания и последующей лиофильной сушки, так как характеристики исходной системы определяют структуру полученного матрикса (характер и распределение пор по размерам),

а также степень адгезии и распластывания клеток, которые, в свою очередь, определяют их последующий рост и пролиферацию [66].

Композиционные гидрогели на основе хитозана различной молекулярной массы модифицированные ГК с ММ 5 кДа и 30 кДа получали двумя способами: 1) адсорбцией ГК на поверхности лиофильно высушенных гидрогелей хитозана сшитого дженипином; 2) формированием гидрогеля из гетерогенной композиции, представляющей собой дисперсию ПЭК хитзан-ГК в растворе хитозана, содержащей Дж или ГА. В качестве контрольных образцов использовались лиофильно высушенные гидрогели хитозана, сшитые дженипином и глутаровым альдегидом (таблица 9).

Условия сшивки (рН, соотношение Дж (ГА)/NH₂) были выбраны на основании зависимостей времени гелеобразования от содержания сшивающего реагента (рисунок 52) исходя из того, что система не должна терять способность к течению в течение 1,5 часов. Такого временного промежутка достаточно для обезвоздушивания и розлива раствора полимера в формы для замораживания.

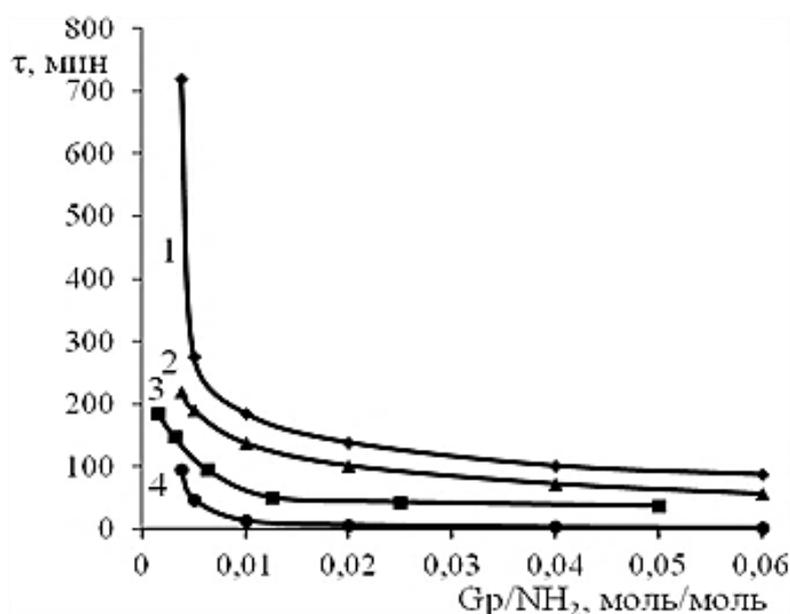


Рисунок 52 - Влияние соотношения, сшивающий реагент – аминогруппа хитозана (Дж (ГА)/NH₂) на время гелеобразования (τ) в растворах хитозана при разной концентрации и ММ хитозана (рН 5,6). 1- Концентрация раствора хитозана 2% (190 кДа); 2- Концентрация раствора хитозана 2% (320

кДа); 3- Концентрация раствора хитозана 3,2% (190 кДа); 4- Концентрация раствора хитозана 2% (320 кДа), сшивающий реагент ГА. Вязкость растворов хитозана (η) 0,35 Па·с (1) и 4,5 Па·с (2-4) [189]

Таблица 9 – Состав и условия получения макропористых матриц на основе хитозана и гиалуроновой кислоты

№	Полимер / ММ, кДа	С, %	pH	Сшивающий реагент	Соотношение [Дж(ГА)]/[NH ₂]	С Дж(ГА), %	ГК / ММ, кДа	Хит/ГК, г/г
1	Хит - 320 кДа	2,5	5,6	ГА	0,01	0,0525	-	-
2	Хит - 320 кДа	2,5	5,6	Гр	0,01	0,12	-	-
3	Хит - 190 кДа	4	5,6	Гр	0,003	0,059	-	-
4	Хит - 320 кДа	2,5	5,6	ГА	0,01	0,0525	Поверхностная модификация ГК 5 кДа и 30 кДа	
5	Хит - 320 кДа	2,5	5,6	Гр	0,01	0,12		
6	Хит - 190 кДа	4	5,6	Гр	0,003	0,059		
7	Хит - 320 кДа	2,5	5,6	ГА	0,01	0,4275	5/30	5:1
8	Хит - 320 кДа	2,5	5,6	Гр	0,01	0,95	5/30	5:1
9	Хит - 190 кДа	4	5,6	Гр	0,003	0,95	5/30	5:1

Образование ПЭК хитозана с ГК *на поверхности* пористого матрикса хитозана производилось путем погружения его в 2%-ный раствор ГК-На с молекулярной массой 5 кДа и 30 кДа и последующей промывкой в течение 60 минут дистиллированной водой от остатков непрореагировавшего полимера, замораживанием и повторной лиофильной сушкой. Согласно данным сканирующей электронной и конфокальной микроскопии характер и размер пор матрикса после такой операции остался неизменным (рисунок 53, 54). По образующемуся белому налету на поверхности сшитого хитозанового матрикса можно сделать вывод о образовании ПЭК (рисунок 55).

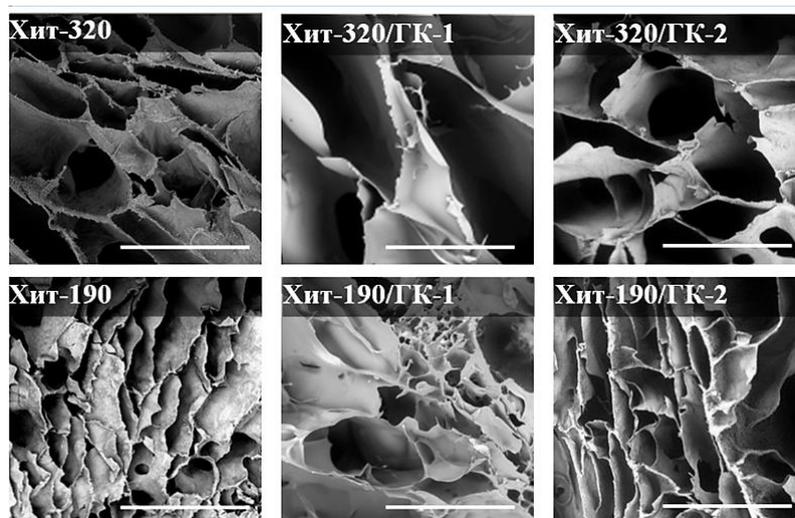


Рисунок 54 – СЭМ-микрофотографии структуры матриц хитозана модифицированных ГК-На. Обозначения: ГК-1 – проведена поверхностная модификация; ГК-2 – матрикс на основе дисперсии полимеров. Шкала 500 мкм.

Второй способ модифицирования матрикса на основе хитозана заключался в *диспергировании* водного раствора ГК-На в растворе хитозана, содержащим сшивающий реагент. В этом случае соотношение хитозан-ГК составляло [5:1], г/г. Такая система теряла прозрачность в результате формирования нерастворимого ПЭК между частью содержащегося в растворе хитозана и ГК – полученную дисперсию ПЭК хитозан-ГК в водном растворе хитозана в уксусной кислоты выдерживали при комнатной температуре в течении полутора часов, затем замораживали и лиофильно высушивали.

Такой метод получения высокопористого композитного матрикса позволяет равномерно распределить гиалуронат по всему объему образца.



Рисунок 55 – Фотографии макропористых матриц на основе сшитого хитозана и гиалуроновой кислоты: 1 – матрикс без ГК-На; 2 – поверхностная модификация ГК-На; 3 – матрикс на основе дисперсии полимеров

Внутреннюю морфологию образцов макропористых биополимерных матриц, полученных лиофильным высушиванием гидрогелей хитозана, модифицированного ГК в объеме материала и поверхностно модифицированных, исследовали методом конфокальная микроскопия в режиме моделирования пористой структуры. Установлено, что полученные материалы обладают системой сообщающихся пор размером 200-600 мкм, что позволяет их использовать в качестве матриц для тканевой инженерии.

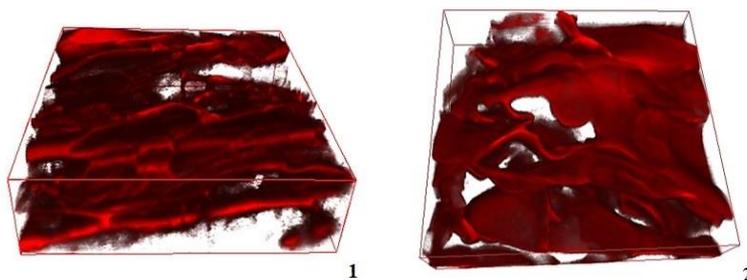


Рисунок 56 - Конфокальная микроскопия в режиме моделирования пористой структуры макропористых биополимерных матриц, полученных лиофильным высушиванием гидрогелей хитозана, модифицированного ГК-На в объеме материала (1) и поверхностно модифицированных (2)

3.2.6 Влияние способа модифицирования хитозановых матриц гиалуроновой кислотой на их цитотоксичность и процесс культивирования клеток

Для контроля цитотоксичности матриц на основе гидрогелей хитозана исследовали влияние экстрагируемых из матрикса веществ содержание жизнеспособных клеток методом тестирования экстрактов. Контролем выступали клетки, культивируемые в среде без экстрактов. В качестве модельной использовали линию мышечных фибробластов L929. На рисунке 57 представлена зависимость степени набухания матриц при инкубации в среде культивирования.

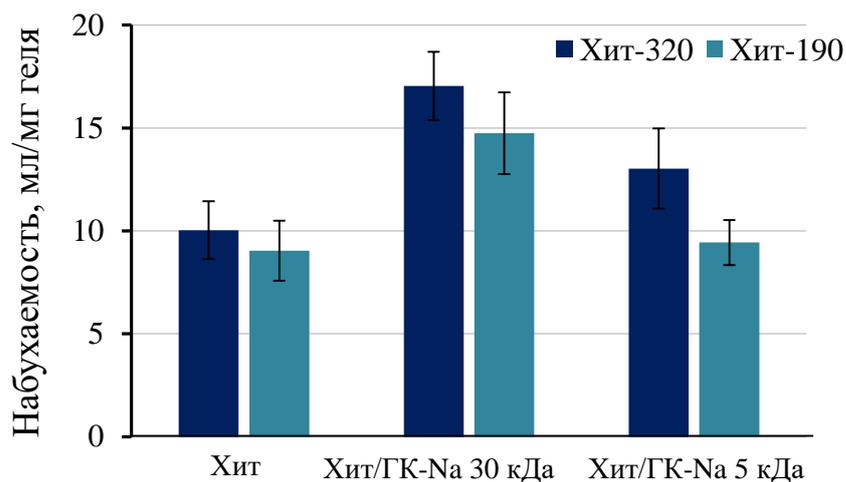


Рисунок 57 - Степень набухания образцов гидрогелей в среде для культивирования DMEM в течение 24 часа

Из диаграммы видно, что максимальная степень набухания в насыщенной ионами среде DMEM наблюдается у образцов поверхностно модифицированных гиалуроновой кислотой.

Поведение клеток линии мышечных фибробластов L929 исследовали с помощью МТТ-теста при их длительном культивировании в матриксах (рисунок 58), а оценку морфологии, роста и распределения клеток проводили с помощью метода конфокальной микроскопии на 4 день культивирования (рисунок 59).

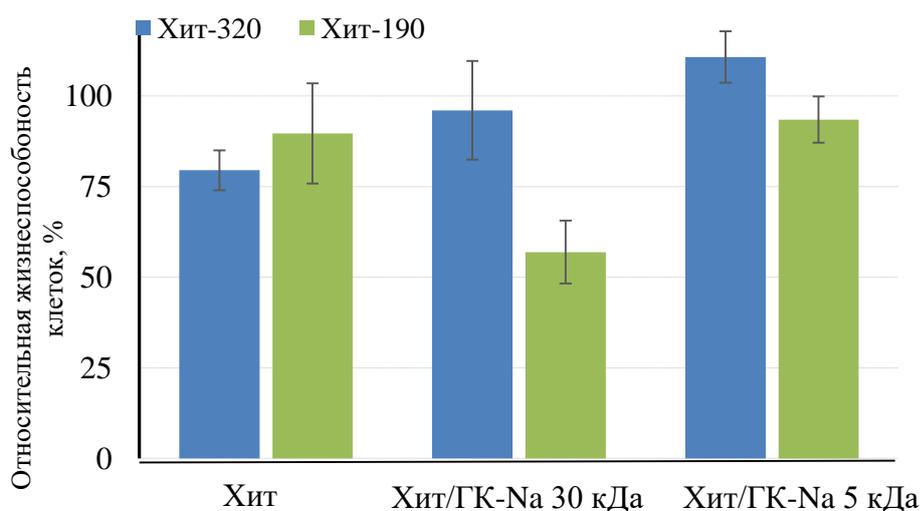


Рисунок 58 - Жизнеспособность клеток L929 в гидрогелях после 7 дней культивирования. Контроль (100%) – монослой клеток

Было установлено, что количество жизнеспособных клеток в матриксах, полученных в отсутствие гиалуроновой кислоты было значительно ниже, чем в содержащих ее образцах. Отметим, что введение гиалуроновой кислоты в состав матрикса на основе хитозана с ММ 320 кДа приводило к увеличению количества жизнеспособных клеток по сравнению с исходным образцом: на 16% для образца, полученного поверхностным модифицированием ГК-На и на 30% для объемно-модифицированного матрикса. В случае матриксов, полученных методом диспергирования ГК, как и образцов ГК не содержащих, клетки на поверхности матриксов были распределены равномерно и на 7 день культивирования образовывали плотный монослой (рисунок 60).

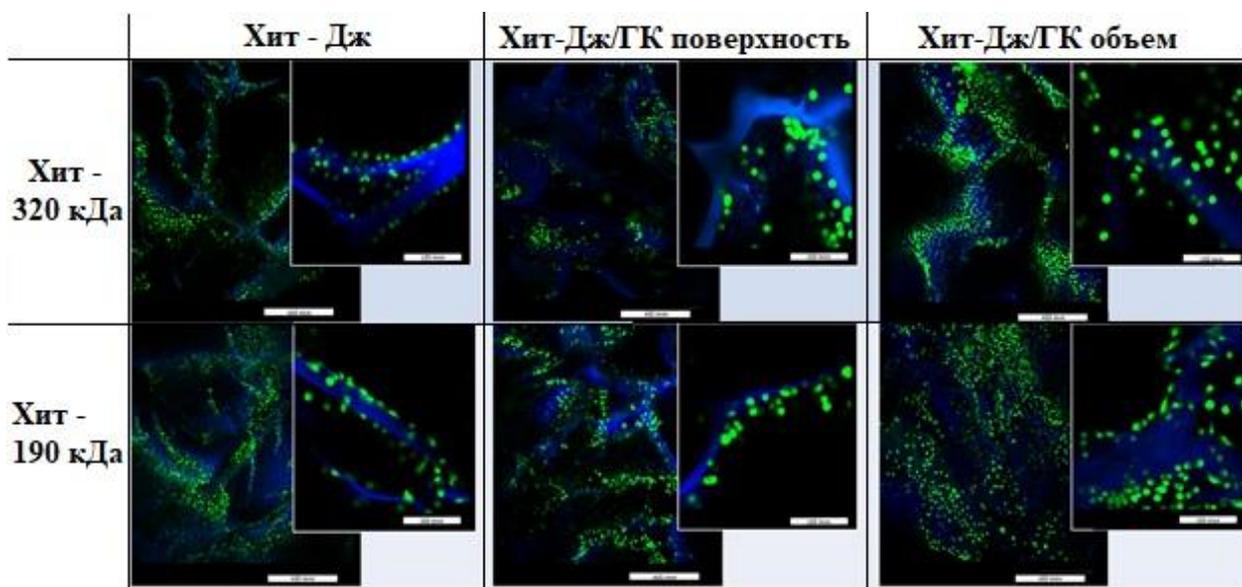


Рисунок 59 – Распределение и морфология клеток линии L929 в матриксах на основе хитозана модифицированных ГК после 4 дней культивирования.

Шкала 400 мкм.

Следует отметить, что в ряде матриксов (на рисунке 61, отмечены *) на основе хитозана молекулярной массы 320 кДа поверхностно модифицированных ГК-На клетки не пролиферируют по всему объему образца и образуют мультিকлеточные агрегаты. Это свидетельствует о некоторой цитотоксичности образцов. На образцы хитозановых матриксов (ММ 190 кДа) введение в состав композиции ГК-На не оказывало существенного влияния на рост и пролиферацию клеток, в одном случае даже вызвало

небольшое снижение доли жизнеспособных клеток, как видно, это характерно для образца, поверхностно модифицированного гиалуроновой кислотой (рисунок 60).

Таким образом можно заключить, что жизнеспособность клеток в биополимерных матриксах существенно зависит от состава композиции используемой для их получения. Достоверно установлено, что в большинстве случаев, *поверхностная* модификация хитозанового матрикса гиалуроновой кислотой *не* оказывала положительного эффекта на пролиферацию клеток в пористых матриксах, тогда как распределение ГК в объеме матрикса приводило к значительному увеличению количества жизнеспособных клеток.

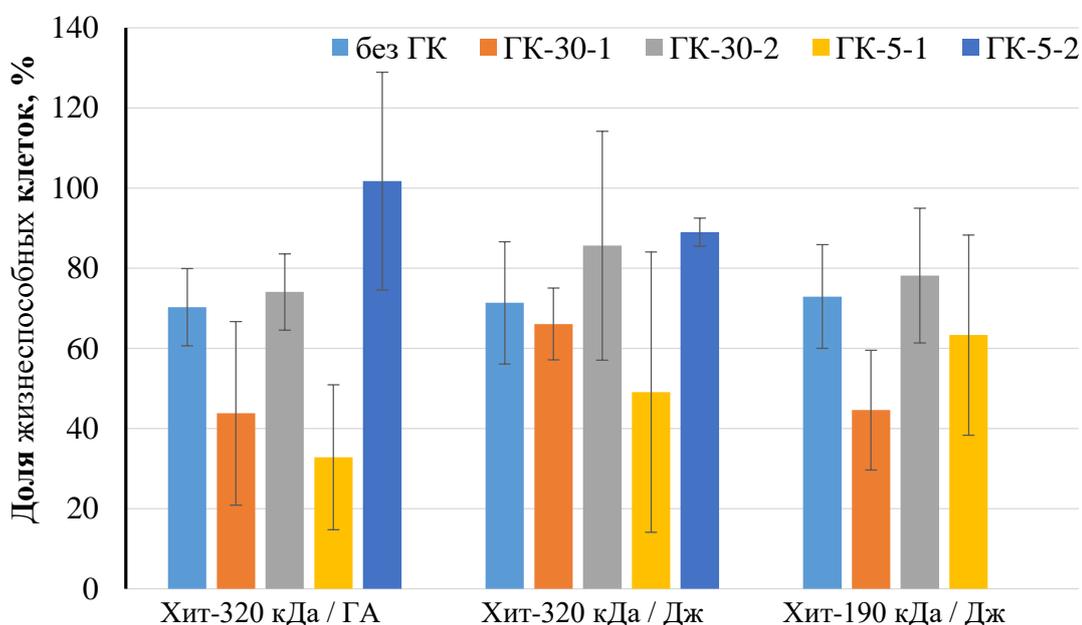


Рисунок 60 – Жизнеспособность клеток L929 в матриксах на основе хитозана после 7 дней культивирования. Контроль (100%) – монослой. Обозначения: ГК-1 – модифицирование поверхности матрикса; ГК-2 – модифицирование в объеме. Условия получения приведены в таблице 9, п. 3.2.5.

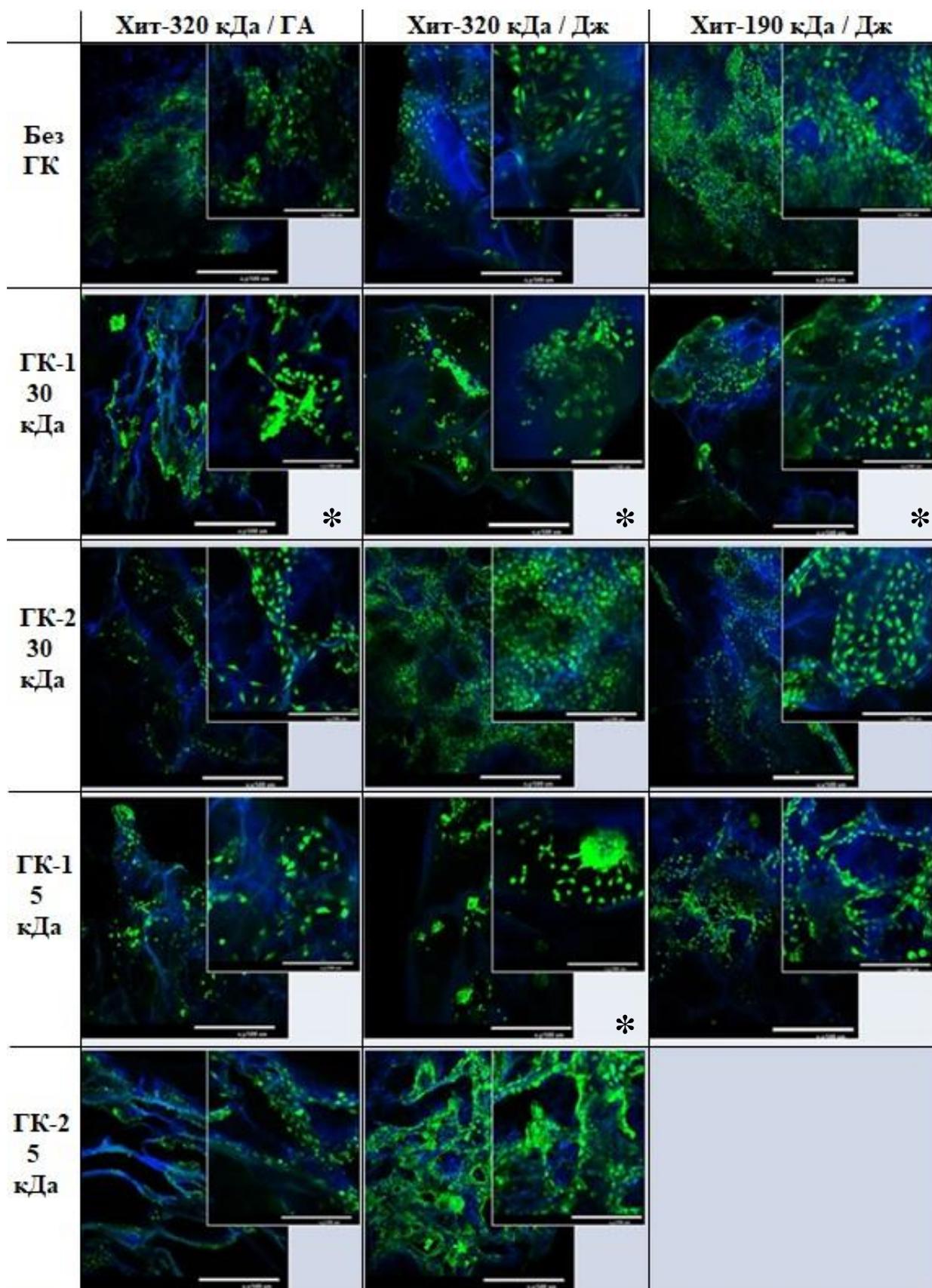


Рисунок 61 - Распределение и морфология клеток линии L929 в матрицах после 7 дней культивирования. Шкала 500 мкм и 200 мкм. Описание * см. в тексте.

3.2.7 Получение композиционных гидрогелей, на основе гиалуроновой кислоты и хитозана, сшитых диглицидиловым эфиром 1,4 бутандиола

В рассмотренных методах получения биполимерных матриц ГК связана с хитозаном за счет электростатических взаимодействий и кооперативных водородных связей. Введение сшивающего реагента ГА или Дж в композицию, содержащую эти полисахариды, вызывает ковалентную сшивку хитозана, но не ГК, функциональные группы которой менее реакционноспособны. В настоящем разделе изучена возможность получения композиционных гидрогелей, на основе гиалуроновой кислоты и хитозана, ковалентно сшитых диглицидиловым эфиром 1,4 бутандиола. Этот сшивающий реагент был использован нами ранее для получения ковалентно-сшитых гидрогелей ГК и матриц на их основе

Диглицидиловый эфир 1,4 бутандиола вступает во взаимодействие как с первичными, так и вторичными гидроксильными группами ГК с образованием простых или сложноэфирных связей [53, 54], а также способен реагировать с аминогруппами хитозана [87].

Получение гидрогелей хитозана сшитых БДДЕ.

Исходя из описанной ранее методики приготовления гелей гиалуроновой кислоты в присутствии уксусной кислоты [175] были определены условия получения сшитых БДДЕ гидрогелей хитозана молекулярной массы 320 кДа (таблица 10).

Таблица 10 – Влияние параметров процесса сшивки хитозана БДДЕ в среде уксусной кислоты на свойства гидрогелей хитозана

№ обр.	БДДЕ/ хитозан, моль/моль элементарного звена	Уксусная кислота/хитозан, моль/моль элементарного звена	Степень набухания α , %	Модуль упругости G, кПа
1	0,6	3,4	13600	340
2	0,6	2,0	7400	430
3	0,6	1,1	2560	534

Резкое увеличение степени набухания гидрогеля хитозана, времени достижения осмотического равновесия системы происходит с увеличением содержания уксусной кислоты моль/моль элементарного звена полисахарида (рисунок 62, 63). Антибатно этим показателям изменяется модуль упругости, вероятно за счет увеличения пластической составляющей общего модуля (модуля потерь). На рисунке 64 проиллюстрировано многократное увеличение объема гидрогеля хитозана при его набухании в воде.

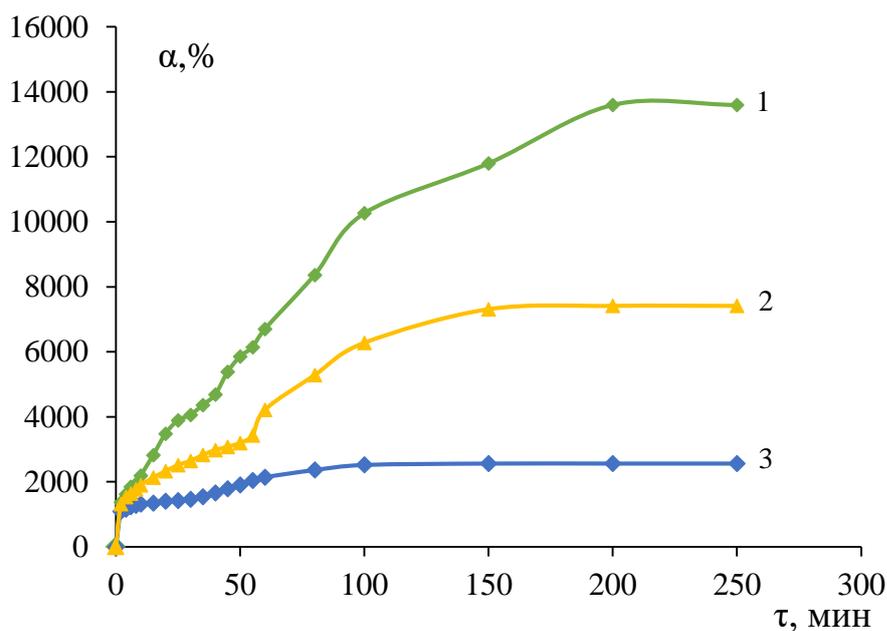


Рисунок 62 - Кинетика набухания гидрогелей хитозана полученных в кислой среде при $T = 55^{\circ}\text{C}$. Соотношение БДДЕ/хитозан 0,6 моль/моль, а уксусная кислота/хитозан: 1 – 3,4; 2 – 2,0; 3- 1,1.



Рисунок 63 – Образец гидрогеля хитозана, полученный в присутствии уксусной кислоты до (1) и после (2) достижения равновесной степени набухания в воде. Условия получения приведены в п.1 таблицы 10.

Получение сшитых БДДЕ гидрогелей на основе гиалуроновой кислоты и хитозана

Получение сшитых диглицидиловым эфиром 1,4 бутандиола гидрогелей на основе смеси гиалуроновой кислоты (ММ 1000 кДа) и хитозана (ММ 320 кДа) проводили в условиях гетерогенной системы: смесь порошков полисахаридов инкубировали в растворе УК, содержащей БДДЕ в течение 60 минут при температуре окружающей среды, затем на водяной бане температуру поднимали до 55°C, при которой набухшая система полимеров инкубировалась в течение 5 часов.

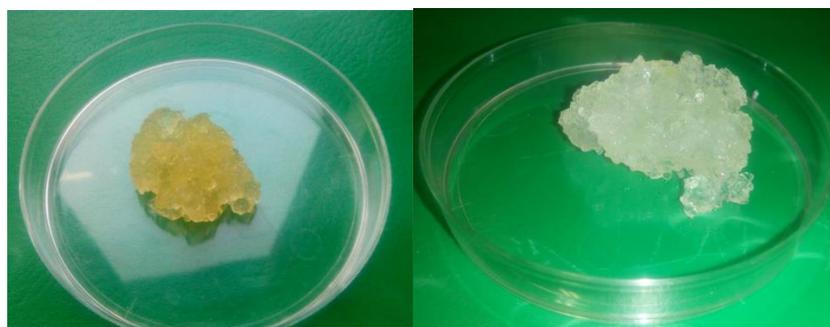


Рисунок 64 - Образец гидрогеля хитозан-ГК, полученный в присутствии уксусной кислоты до (1) и после (2) достижения равновесной степени набухания в воде. Условия получения приведены в п.3 таблицы 11.

В таблице 11 приведены сравнительные характеристики гидрогелей - как индивидуальных (гидрогели ГК или хитозан), так и полученных в при соотношении гиалуроновая кислота-хитозан 1:1 г/г. Как видно из полученных данных, степень набухания и модуль упругости гидрогеля, полученного при соотношении хитозана и ГК 1:1, изменяются не аддитивно содержанию компонентов. Степень набухания геля значительно ниже ожидаемой; кроме того, следует отметить увеличение модуля упругости, свидетельствующее об увеличении жесткости системы (снижении деформируемости). Эти данные указывают на образование полиэлектролитных комплексов хитозан-ГК, встроенных в структуру сетки геля. Полученные таким способом гидрогели были мутными, что так же указывает на образование ПЭК, однако в процессе набухания мутность становилась менее заметной (рисунок 64) за счет набухания самого ПЭК.

Таблица 11 – Влияние строения элементарного звена полисахарида на набухание гидрогеля Хит-/ГК, сшитого БДДЕ, в присутствии уксусной кислоты

№ обр.	Соотношение полимеров хитозан/ГК в смеси, г/г*	БДДЕ/гликопиранозное звено, моль/моль	Уксусная кислота/ГП-звено, моль/моль	Степень набухания α , %	Модуль упругости G, кПа
1	1:0	0,6	3,4	13600	340
2	0:1	0,6	3,4	3820	420
3	1:1	0,6	3,4	4300	475

*Время реакции 5 часов, T= 55°C

Характер кинетических кривых набухания гидрогелей, содержащих полиэлектролитные комплексы хитозана и ГК (рисунок 65), отличается от набухания гидрогелей сшитого хитозана (рисунок 62, кривая 1). Наличие второго участка на кривых набухания может быть связано с частичным разрушением полиэлектролитного комплекса по мере диффузии уксусной кислоты во внешний раствор в процессе набухания сшитого гидрогеля, приводящей к уменьшению степени протонирования аминогрупп хитозана, входящих в состав ПЭК.

Набухшие гидрогели после лиофильного высушивания могут быть использованы в качестве матриц для тканевой инженерии.

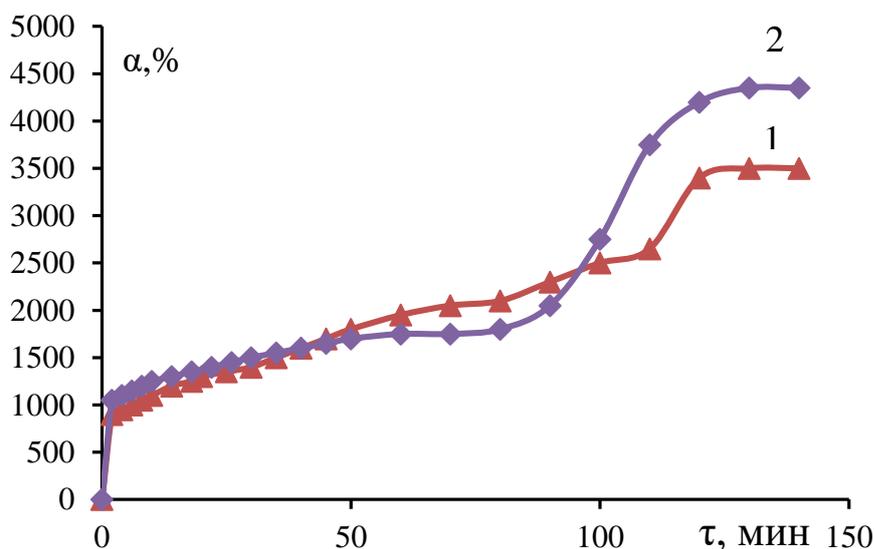


Рисунок 65 - Кинетика набухания гидрогелей из смеси ГК и хитозана, сшитой БДДЕ полученных в кислой среде в условиях, приведенных в таблице 11 (п.3) при разном содержании уксусной кислоты: 1 – 3,4 моль/моль; 2 – 2,0 моль/моль.

3.2.8 Получение нановолокнистых материалов на основе композиций полиэлектролитов гиалуроновой кислоты и хитозана

Как было сказано в литературном обзоре, электроформование – это эффективный способ получения нетканых мембранных полотен, с развитой системой взаимосвязанных волокон, которые могут активно применяться для создания перевязочных материалов, систем с контролируемой доставкой лекарственных соединений и матриц для тканевой инженерии [110, 113].

Использование полисахаридов гиалуроновой кислоты и хитозана для создания наноразмерных материалов имеет ограничения, связанные с трудностью переработки этих полимеров в формовочные растворы в силу особенностей их макромолекулярной структуры. В настоящей главе предпринята попытка на основании немногочисленных литературных данных и экспериментальных исследований в рамках которых будут установить возможность получения нановолокон на основе композиции полиэлектролитов гиалуроновой кислоты и хитозана, сочетающих свойства обоих биополимеров.

Смешанный раствор хитозана и ГК содержит не растворимый в воде ПЭК и не обладает способностью к формованию. Высокая вязкость низкоконцентрированных растворов нативной гиалуроновой кислоты, жесткие конформации макромолекул, полиэлектролитная природа и некоторые другие особенности полисахаридов, используемых в работе, требуют более детального подхода к решению задачи по получению нановолокон методом электроформования.

Существует большое количество работ, посвященных получению нановолокнистого материала на основе хитозана [191], однако, получение формовочного раствора связано с использованием концентрированных растворов уксусной и трихлоруксусной кислот, что может негативно отразиться на биологических свойствах готового материала. Большое число работ направлено на изучение возможности максимального снижения концентрации кислоты в формовочном растворе. Однако, без использования

волокнуобразующей добавки не представляется получить нановолокнистый материал из растворов в нетоксичных растворителях. Перспективным методом получения нановолокон на основе хитозана является получение смешанных растворов хитозан-ПВС [50:50] и [25:75] в растворах уксусной кислоты (50%) [192].

Ранее, в главе 3.2.2, нами было установлено, что при pH 3 и добавлении фонового электролита, возможно получение водорастворимых полиэлектролитных комплексов на основе хитозана и ГК-Н. Можно предположить, что добавление в такую композицию волокнуобразующего полимера позволит получить наноразмерный материал содержащий оба полисахарида.

На основании литературных данных и проведенных ранее экспериментов были выбраны условия получения формовочной композиции хитозан - ГК-Н – ПВС при pH 3 в присутствии электролита (таблица 12, п.1). К раствору хитозана в УК при перемешивании добавляли водный раствор ПВС. В полученном растворе растворяли NaCl до концентрации 0,5 моль/л. Далее при перемешивании на магнитной мешалке покапельно был добавлен раствор ГК-Н (pH 2,8) содержащий NaCl 0,5 моль/л и глутаровый альдегид. Полученная система оставалась стабильно прозрачной, однако электроформование такой композиции полимеров оказалось неуспешным.

Деформация поверхности капли на поверхности раствора происходила только при высоком напряжении (44 кВ), а дальнейшее увеличение напряжения (до 56 кВ) приводило к пробое. Причиной является высокое содержание электролита приводящее к росту электропроводности раствора до 38,5 мСм/см, что превышает рекомендуемые значения.

Учитывая, что сформовать волокно из водорастворимого ПЭК хитозан – ГК не представляется возможным, были получены формовочные композиции на основе водного раствора гибкоцепного волокнуобразующего ПВС, содержащие тонкие дисперсии ПЭК хитозана и ГК. Композиции получали по методике, приведенной выше, но без использования фонового электролита. В

таблице 12, п.2 приведена характеристика формовочной композиции. При добавлении при перемешивании к смешанному раствору хитозан-ПВС раствора ГК-Н, происходило образование опалесцирующей системы, что указывает на образование комплексов полиэлектролитов. Система была кинетически устойчивой, размер частиц, измеренный методом динамического светорассеяния, составил 80-130 нм.

Полученная композиция была переработана методом электроформования со свободной поверхности раствора при напряжении 29-33 кВ, с образованием на приемной подложке слоя нетканого волокнистого материала. На полученных АСМ-изображениях сформованного материала (рисунок 6б) наблюдается разветвленная сеть волокон со средним диаметром 177 нм.

Таблица 12 – Характеристика формовочной композиции

№1	Хит	ПВС	ГК-Н	УК, %	NaCl	Хит:ПВС	Хит:ГК	ГА
ММ, кДа	190	136	30	50	0,5М	25:75	5:1	[0,08] МОЛЬ/МОЛЬ NH ₂
С%, в р-ре	2	5	0,4					
рН	3,0	3,0	2,8					
η мПа*с	487							
α, мСм/см	38,5							
Формование	Нет							
№2	Хит	ПВС	ГК-Н	УК, %	NaCl	Хит:ПВС	Хит:ГК	ГА
ММ, кДа	190	136	30	50	-	25:75	5:1	[0,08] МОЛЬ/МОЛЬ NH ₂
С%, в р-ре	2	5	0,4					
рН	2,2	2,2	2,8					
η мПа*с	743							
α, мСм/см	1,81							
Формование	Стабильное							
d, нм	177							

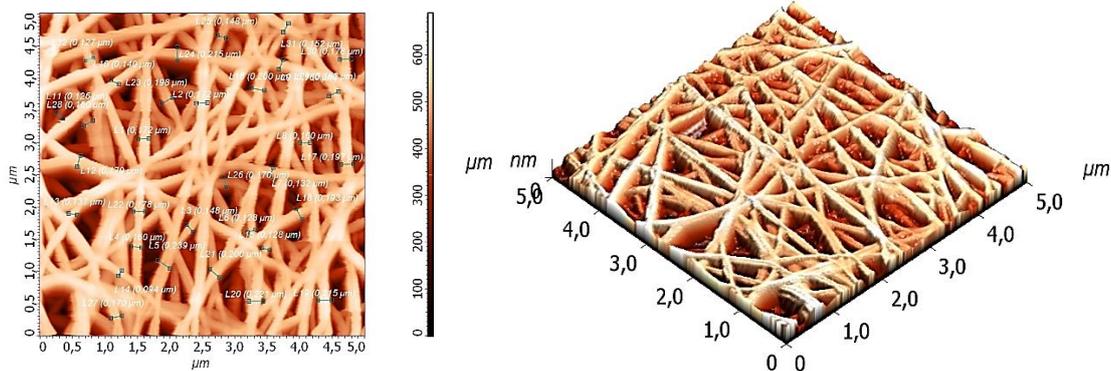


Рисунок 66 – АСМ-изображения волокон полученных на основе сшитой глутаровым альдегидом системы хитозан-ГК-Н-ПВС

Формовочная композиция была также использована для получения тонкой пленки с использованием технологии нанесения покрытия методом центрифугирования. Метод центрифугирования (spin-coating technology) представляет собой метод нанесения тонких пленок, основанный на покрытии подложки полимерным раствором с последующим быстрым ее вращением, приводящим к испарению растворителя и образованию тонкой пленки. Была приготовлена пленка толщиной 300 нм. Как видно, из АСМ-изображений (рисунок 67) на поверхности пленки наблюдаются наноразмерные образования, которые отсутствуют на поверхности пленки, не содержащей ГК. Это может служить дополнительным свидетельством наличия полиэлектrolитных комплексов полисахаридов.

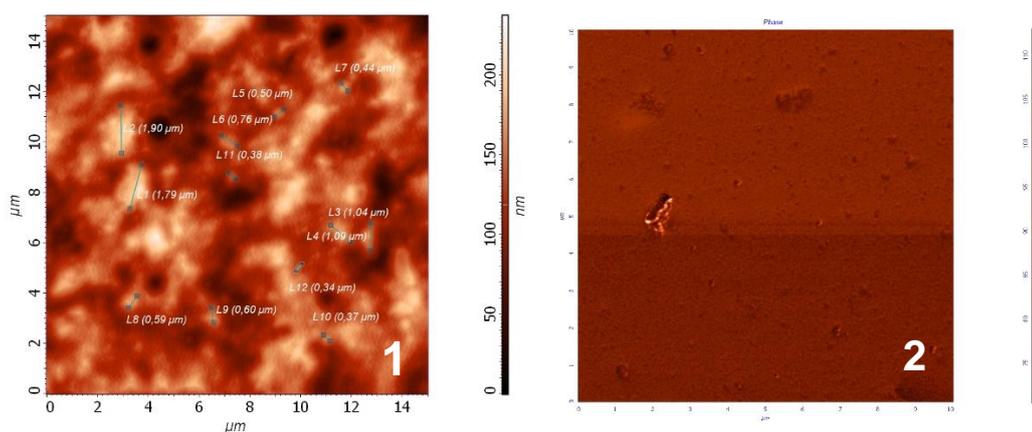


Рисунок 67 – АСМ-изображения пленки на основе раствора сшитой глутаровым альдегидом системы хитозан-ПВС в присутствии ГК-Н (1) и отсутствии ГК-Н (2)

Для исследования растворимости материала, полученного на основе формовочной системы п. 2 таблицы 12, получены материалы с различным количеством сшивающего реагента.

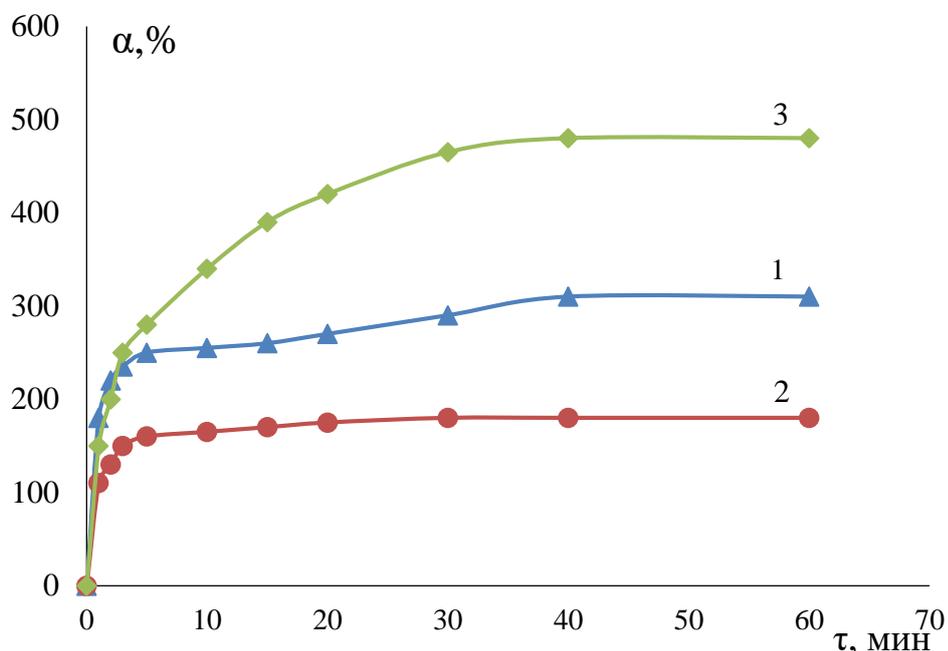


Рисунок 68 – Кинетика набухания материала на основе ПВС, содержащего хитозан-ГК-Н, сшитых: 1 – ГА/ NH_2 [0,08] моль/моль; 2 – ГА/ NH_2 [0,16] моль/моль; 3 – Дж/ NH_2 [0,08] моль/моль pH 2,0

Как видно из рисунка 68, с повышением содержания ГА степень набухания образцов сшитых глутаровым альдегидом закономерно снижается. Более высокая степень набухания образца, сшитого Дж (480%) связана с меньшей его реакционной способностью по сравнению с ГА и меньшей степеню сшивки при одинаковом соотношении функциональных групп.

Изменение состава нестехиометрического ПЭК хитозан:ГК оказывает влияние на диаметр волокон и саму возможность получения волокна методом электроформования, что может быть связано, как с основными параметрами процесса электроформования – вязкостью и электропроводностью, так и размером частиц ПЭК, влияющим на дефектность волокон, формирующим нетканый материал. В таблице 13 приведены данные, иллюстрирующие влияние содержания ГК на параметры формовочных композиций и процесса электроформования волокнистого материала.

Таблица 13 – Влияние содержания ГК на параметры формовочных композиций и процесса электроформования волокнистого материала

№	Соотношение [хитозан:ГК]	Концентрация ГК-Н в смеси, %	Динамическая вязкость η , мПа*с	Удельная электропроводность α , мСм/см	Характеристика электроформования	d, нм
1	5:0,5	0,2	675	1,73	Стабильное	224
2	5:1	0,4	743	1,81	Стабильное	177
3	5:2	0,8	1180	1,92	Формования нет	-

Увеличение содержания ГК в составе ПЭК приводит к уменьшению диаметра волокон, а при достижении соотношения хитозан:ГК 5:2 формование прекращается, что может быть связано как с увеличением вязкости формовочной композиции, так и увеличением размеров ПЭК, приводящим к обрывности волокна. Таким образом, установлен состав формовочной композиции для электроформования волокнистого материала на основе ПВС, содержащего ПЭК хитозана с ГК и сочетающего их биологические свойства.

3.2.9 Модифицирование хирургической шовной нити композициями на основе полисахаридов хитозана и ГК

Эффективным путем получения хирургических нитей, сочетающих мягкость многофиламентных нитей и гладкую поверхность мононитей, является создание композитных нитей со структурой «ядро-оболочка». Нанесение на поверхность нитей покрытия позволяет регулировать гибкость, шероховатость поверхности и надежность узла, придавать многофиламентным нитям атравматичность, пониженную капиллярность, изменять цвет, вводить в нити лекарственное, в частности, антимикробное вещество.

Наиболее популярными, своего рода «золотым стандартом», не рассасывающегося шовного материала являются хирургические шовные нити на основе натурального шелка (фиброина). Они обладают рядом качеств делающих их наиболее привлекательными для использования в хирургии –

они произведены на основе натурального компонента; не растворимы, следовательно, продукты деградации не оказывают влияния на окружающие ткани; обеспечивают минимальное скольжение нити и прочность фиксации в узле; прочность узла, сохраняющаяся до формирования рубца [193, 194, 195].

Однако, «натуральность» шелковой нити, может вызывать аллергическую реакцию организма, скольжение нити, в особенности многофиламентной, вызывать «пилящий» эффект, травмирование ткани и увеличенной кровоточивости в месте ввода нити, крученая шелковая нить – фитильна – то есть обладает способностью впитывать в себя тканевую жидкость из раны, и если рана инфицирована, то существует риск развития патогенных организмов и как результат возникновение воспалительного и нагноительного процессов [196, 197].

Повышение биосовместимости хирургической шовной нити из натурального шелка может происходить за счет формирования на ее поверхности не растворимого в воде биополимерного покрытия путем последовательного нанесения растворов хитозана и гиалуроновой кислоты.

Изучение влияния этанола на реологические свойства растворов полиэлектролитов гиалуроновой кислоты и хитозана

С целью повышения скорости испарения растворителя при формировании оболочки на поверхности нити в состав формовочного раствора в качестве соразтворителя, был введен этанол.

В проведенных исследованиях [198], выполненных с использованием образца хитозана с ММ 160 кДа и степенью деацетилирования 86%, было установлено, что в состав раствора хитозана без потери полимером растворимости можно ввести до 40% этанола. Поэтому в качестве растворителей хитозана (ММ 190 кДа) были использованы водные растворы ледяной уксусной кислоты с мольным соотношением NH_2 – уксусная кислота 1:1, и водные растворы с таким же мольным соотношением, содержащие 40% этанола.

Реологические исследования растворов проводились с применением метода вибрационной вискозиметрии при одновременном отслеживании изменения вязкости и температуры. На рисунке 69 показано (кривая 2), что повышение вязкости происходит в большей степени при увеличении концентрации раствора хитозана: для растворов с концентрацией 1% вязкость увеличивается всего на 31 мПа*с, а для 4%-ных растворов увеличение вязкости составляет уже 690 мПа (таблица 14).

Введение этанола приводит к увеличению прочности гидродинамических контактов, поддерживающих структуру раствора хитозана. Это проявляется в увеличении энергии активации вязкого течения (таблица 14), которую определяли из температурных зависимостей динамической вязкости растворов разной концентрации на вибрационном вискозиметре. Увеличение прочности контактов может быть связано с ухудшением качества растворителя, содержащего этанол. Исключение составил раствор хитозана с наиболее высокой из исследуемых концентрацией раствора хитозана 4%.

Таблица 14 – Реологические свойства растворов хитозана

Концентрация раствора хитозана, %	Содержание этанола, % от массы раствора хитозана	Начальная вязкость η_0 , мПа*с	Степень структурирования n	Энергия активации вязкого течения E_a , кДж/моль
1	0	14,0	-	23,1
2	0	59,2	0,764	28,1
3	0	168,0	-	27,5
4	0	530,0	-	28,4
1	40	45,1	-	29,7
2	40	121,5	0,853	35,3
3	40	341,0	-	31,4
4	40	1220,0	-	19,3

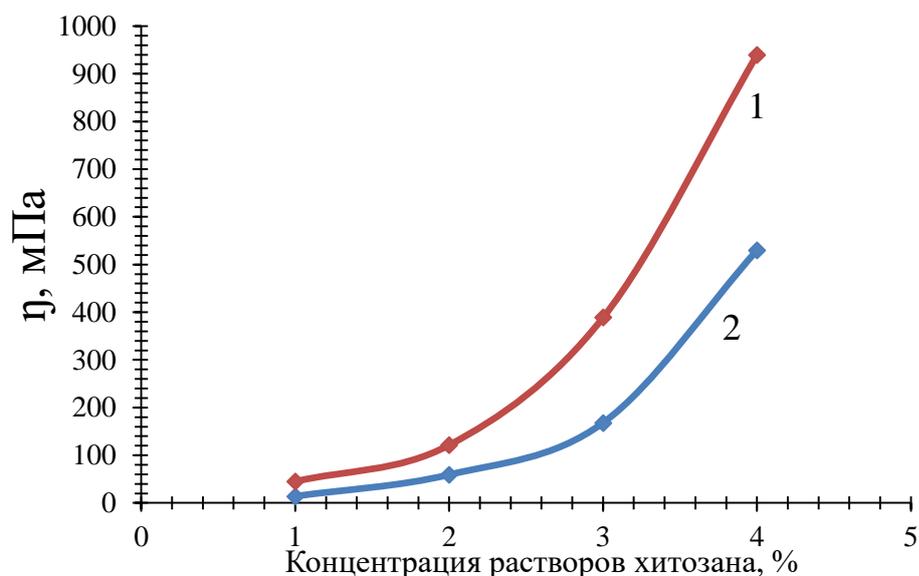


Рисунок 69 – Зависимость вязкости растворов хитозана от концентрации при $T = 25^{\circ}\text{C}$. 1 – в присутствии этанола 40% масс; 2 – в отсутствие этанола

Резкое снижение E_a возможно связано с формированием кластерной структуры раствора при увеличении его концентрации. Прочность коагуляционных контактов между кластерами ниже, чем между отдельными макромолекулами, поэтому для разрушения структуры такого раствора требуется меньшая энергия.

Интересно отметить, что введение в состав растворителя 40% масс, этанола не оказывает существенного влияния на вязкость и реологическое поведение растворов гиалуроновой кислоты во всем исследуемом диапазоне концентраций от 0,25 до 1 % (рисунок 70, таблица 15). Этот факт может быть связан с отсутствием влияния этанола на характер ионных взаимодействий в растворе сильного электролита (натриевая соль гиалуроновой кислоты полностью диссоциирована на ионы), а этанол, как и вода, является полярным растворителем.

Таблица 15 – Реологические свойства растворов гиалуроновой кислоты

Концентрация раствора ГК, %	Содержание этанола, % от массы раствора ГК	Начальная вязкость η_0 , мПа*с	Степень структурования n	Энергия активации вязкого течения E_a , кДж/моль
0,25	0	49,8	-	4,41
0,5	0	133,0	-	3,86
1	0	716	0,240	9,92
0,25	40	58,0	-	5,5
0,5	40	113,0	-	5,40
1	40	686	0,268	9,92

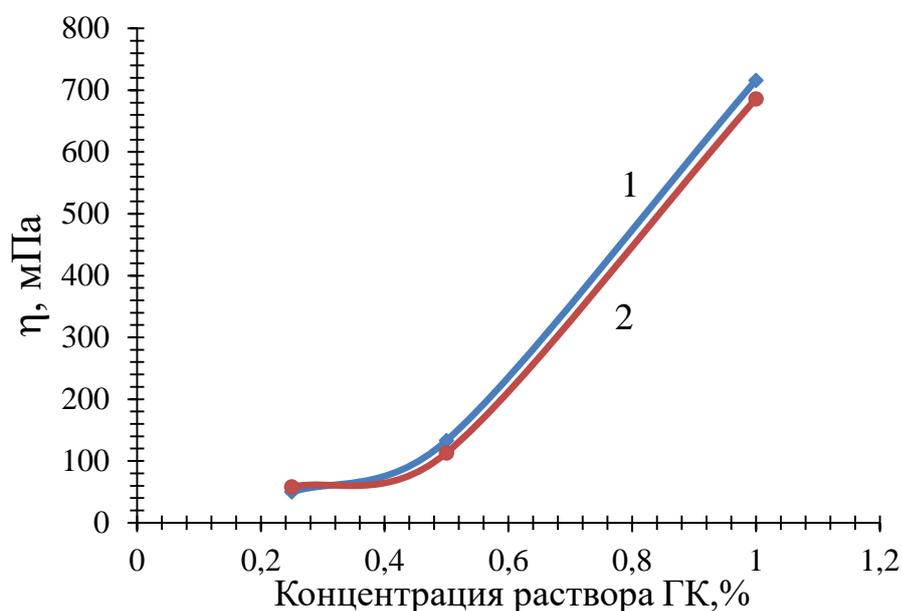


Рисунок 70 - Зависимость вязкости растворов ГК от концентрации при $T = 25^\circ\text{C}$: 1 – без этанола; 2 – содержащих этанол (40% масс)

Вязкость водных и водно-спиртовых растворов гиалуроновой кислоты слабо зависит от температуры. Энергия активации не зависит от состава раствора и имеет очень низкие значения, хотя и увеличивается с ростом концентрации (таблица 19).

Исходя из проведенных исследований было установлено, что введение этанола в состав раствора ГК с целью ускорения отверждения раствора полимера на поверхности хирургической нити не будет оказывать влияния на процесс нанесения гиалуроновой кислоты на шелковую нить, однако из-за влияния спирта на вязкостную характеристику хитозана в работе следует использовать меньшую концентрацию его раствора.

Модифицирование нитей из фиброина растворами гиалуроновой кислоты и хитозана

Для нанесения покрытий на шелковую нить из фиброина была использована установка (п.2.2) разработанная для получения биологически активных полиэфирных нитей с покрытием из полигидроксibuтирата. С целью определения оптимальных условий нанесения растворов хитозана и ГК на нить из натурального шелка были использованы растворы с различной концентрацией хитозана 1-6% в спиртосодержащих растворах (при постоянном соотношении хитозан-уксусная кислота и содержании этанола 40%) и ГК 0,25-1,5% в воде (таблицы 16 и 17).

Максимальный привес и толщина покрытия для хитозана были достигнуты при концентрации раствора 3%, а для ГК – 1 %. Экстремальный характер зависимости содержания биополимера на нити от концентрации формовочного раствора объясняется влиянием вязкости на процесс нанесения раствора на нить. Толстый слой высоковязкого раствора не удерживается на нити, а сильные межмолекулярные взаимодействия в растворах с высокой вязкостью снижают адгезию раствора к поверхности материала – в результате на поверхности нити удерживается лишь небольшая часть формовочного раствора.

Следует отметить, что высокое содержание этанола в формовочных растворах обеспечивает достаточную скорость отверждения пленки на поверхности нити – нити не слипаются между собой, и как видно из рисунка 86, раствор полимера склеивает фибриллярную структуру комплексной нити, что может снизить травматичность ввода нити и фитильный эффект.

Таблица 16 – Характеристика нитей из фиброина, покрытых хитозаном из растворов* разной концентрации, содержащих этанол

Концентрация хитозана, %	Вязкость раствора, мПа*с	Линейн.плотность нити, Текс исходная	Диаметр исход. нити, мм	Линейн.плотность нити, Текс с покрытием	Диаметр модиф. нити, мм	Привес, %	Содержание, %
1	45,1	37,20	0,15-0,19	40,62	0,20	9,19	8,42
2	121,5	37,20	0,15-0,19	41,60	0,22	11,83	10,6
3	341,0	37,20	0,15-0,19	45,29	0,29	21,70	17,8
4	1220,0	37,20	0,15-0,19	40,64	0,20	9,24	8,46
6	-	37,20	0,15-0,19	38,23	0,19	2,76	2,69

**/2 моль уксусной кислоты /моль NH₂, 40% этанола от массы формовочного раствора. ММ хитозана 190 кДа.*

Таблица 17 – Характеристика нитей из фиброина, покрытых ГК-На из растворов* разной концентрации, содержащих этанол.

Концентрация ГК, %	Вязкость раствора, мПа*с	Линейн.плотность нити, Текс исходная	Диаметр исход. нити, мм	Линейн.плотность нити, Текс с покрытием	Диаметр модиф. нити, мм	Привес, %	Содержание, %
0,25	58,0	37,20	0,15-0,19	37,78	0,20	1,56	1,54
0,5	113,0	37,20	0,15-0,19	38,21	0,22	2,72	2,64
1	686/3168*	37,20	0,15-0,19	38,34	0,25	3,06	2,97
1,5	-	37,20	0,15-0,19	37,78	0,20	1,65	1,63

**/ 40% этанола от массы формовочного раствора.*

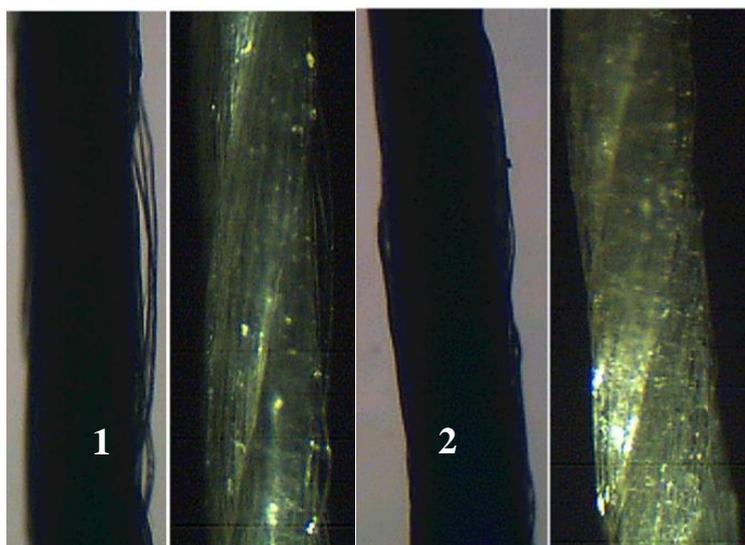


Рисунок 71– Фотографии хирургических нитей. 1 – исходная нить; 2 – бикомпонентная модифицированная нить.

При получении бикомпонентных нитей необходимо, чтобы поверхностный слой полимера не разрушался в водной среде. В случае хитозанового покрытия снизить растворимость в воде можно путем депротонирования аминогрупп или сшивки бифункциональными соединениями. Гиалуроновая кислота не содержит реакционноспособных аминогрупп, обеспечивающих высокую скорость сшивки в мягких условиях, а перевод из солевой формы в форму слабой кислоты не приводит к потере растворимости в воде. Поэтому, используя способность полисахаридов образовывать ПЭК для нанесения раствора ГК, была использована бикомпонентная нить, полученная обработкой шелковой нити спиртосодержащим раствором хитозана. Были использованы оптимальные условия нанесения на нить хитозана и ГК. Как видно из таблицы 18, общий привес нити после нанесения ГК на хитозан-содержащий материал оказался меньше привеса, измеренного после нанесения покрытия из ГК, а суммарное содержание меньше, чем содержание хитозана. Это свидетельствует о частичной десорбции хитозана в раствор ГК при прохождении нити через формовочный раствор.

Таблица 18 – Характеристика нити из фиброина с послойным нанесением раствора хитозана и ГК

Концентрация полимера в растворе при послойном нанесении ХТЗ/ГК, %	Линейн.плот. нити, Текс исходная	Диаметр нити, мм	Линейн.плот. нити, Текс с покрытием	Диаметр модиф. нити, мм	Привес, %	Содержание, %
3	37,20	0,15-0,19	45,29	0,29	21,7	17,8
1	45,29	0,29	44,30	0,20	-2,18	-2,13
3/1	37,20	0,15-0,19	44,30	0,20-0,25	19,08	16,02

Для предотвращения перехода хитозана в раствор ГК его необходимо перевести в нерастворимое в воде при любом значении рН состояние путем химического сшивания. Учитывая низкую токсичность продуктов взаимодействия хитозана и дженипина в качестве сшивающего реагента был выбран дженипин. Однако было установлено, что в присутствии 40% этанола гелеобразование в 2-4%-ных растворах хитозана не происходит даже при соотношении Дж/ NH_2 , соответствующем максимальной растворимости дженипина в воде. В предварительных опытах была определена максимальная концентрация этанола в формовочном растворе хитозана, при которой происходит процесс гелеобразования, - 25%. Введение спирта влияет на реакцию взаимодействия аминогрупп с Дж, снижая скорость реакции и, соответственно увеличивая время начала гелеобразования в растворе хитозана (рисунок 72).

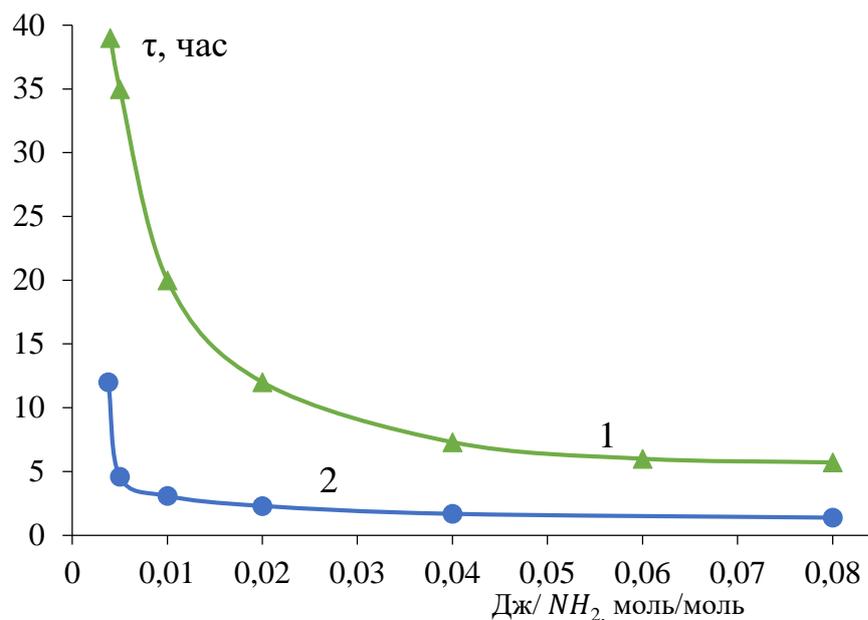


Рисунок 72 - Время начала гелеобразования в 2%-ном растворе хитозана, при $t^\circ = 25^\circ\text{C}$ и разным соотношением Дж/ NH_2 . Раствор хитозана содержал 25% этанола (1) pH 5,6; Раствор хитозана в отсутствие этанола, pH 5,6 (2)

На основании изучения кинетики гелеобразования в 2%-ном растворе хитозана при различных соотношениях Дж/ NH_2 было выбрано содержание дженипина, при котором время начала гелеобразования не превышало 6 часов. По истечении этого времени возможно осуществлять формирование второго слоя на поверхности нити. Выбор концентрации раствора хитозана не 3, а 2%, обусловлен увеличением вязкости раствора при введении этанола, о чем было сказано выше.

Путем нанесения на нить, модифицированную хитозаном, сшитым Дж, 1%-го раствора ГК-На был получен материал, содержащий 9,24% хитозана и 1,27% ГК в составе полиэлектролитного комплекса. Общий привес шелковой нити составил 11,6% (таблица 19). Полученная нить имела голубой цвет (рисунок 73), что имеет дополнительное значение при использовании материала в хирургии.

Таблица 19 – Свойства нити из фиброина с послойным нанесением раствора хитозана, содержащим Дж, и раствора ГК-На

Концентрация полимера в растворе при послойном нанесении ХТЗ/ГК, %	Дж/НН ₂ , моль/моль	Линейн. плот. нити, Текс исходная	Диаметр исход. нити, мм	Линейн. плот. нити, Текс с покрытием	Диаметр модиф. нити, мм	Привес, %	Содержание, %
2	0,08	37,20	0,15-0,19	40,99	0,23	10,2	9,24
1	0,08	37,20	0,15-0,19	41,52	0,26	1,29	1,27
2/1	0,08	37,20	0,15-0,19	41,52	0,26	11,60	10,40



Рисунок 73 - Фотография бикомпонентной шовной нити из фиброина, поверхностно-модифицированной раствором хитозана в присутствии дженипина, и раствором ГК-На.

На АСМ-изображениях полученного материала (рисунок 74) заметны отдельные образования размером от 200 нм до 2 мкм, которые отсутствуют на поверхности исходной нити, что позволяет идентифицировать их как фазу полиэлектролитного комплекса хитозан – гиалуроновая кислота, включенную в матрицу хитозана.

Для моделирования системы хитозан, сшитый дженипином, - ГК, путем диспергирования (20000 с^{-1} , 10 мин) 1% раствора ГК в 2%-ном растворе хитозана, содержащем Дж, была получена формовочная композиция, представляющая собой дисперсную систему, вязкость которой была существенно ниже вязкости как раствора хитозана, так и гиалуроновой кислоты. Это свидетельствует о том, что хитозан и ГК вошли в состав новой фазы, а концентрация дисперсионной среды, и, следовательно, вязкость

понижилась. Из полученной композиции методом полива с последующим испарением растворителя была получена пленка, толщиной 100 ± 20 мкм.

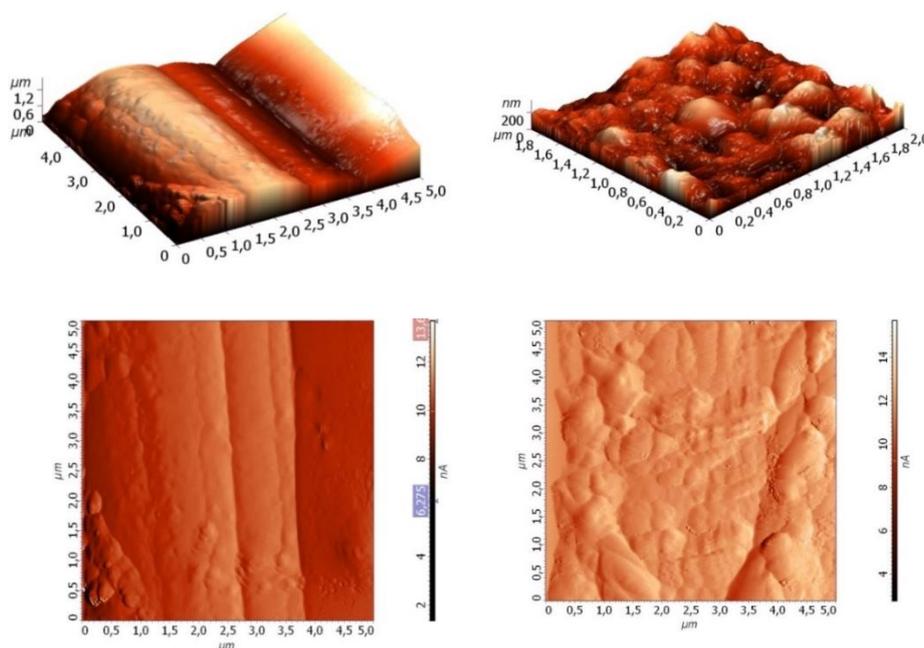


Рисунок 75 – АСМ изображения исходной хирургической нити (слева) и шовной нити, послойно модифицированной хитозаном сшитым дженипином, и ГК-Na (справа)

Изучение кинетики набухания полученной пленки показало, что материал не растворяется в воде, а степень набухания пленки выше, чем пленки, сшитой Дж (рисунок 76). Сравнение АСМ-изображений поверхности пленок из хитозана, сшитого дженипином, и пленки полученной из композиции, содержащей ГК, показывает наличие фазовых образований (рисунок 77), аналогичных структурным элементам, визуализируемым на послойно модифицированной шелковой нити, что подтверждает предположение о формировании на ее поверхности фазы полиэлектролитного комплекса хитозан – ГК-Na.

Таким образом, проведенные исследования позволили разработать метод получения шовной нити, послойно модифицированной хитозаном сшитым дженипином, и ГК-Na. Полученная шовная нить благодаря наличию в ее составе биосовместимых полимеров, обладающих собственной биологической активностью, может быть использована в общей хирургии для

ушивания послеоперационных ран и в качестве мезонитей для компрессионной пластической хирургии.

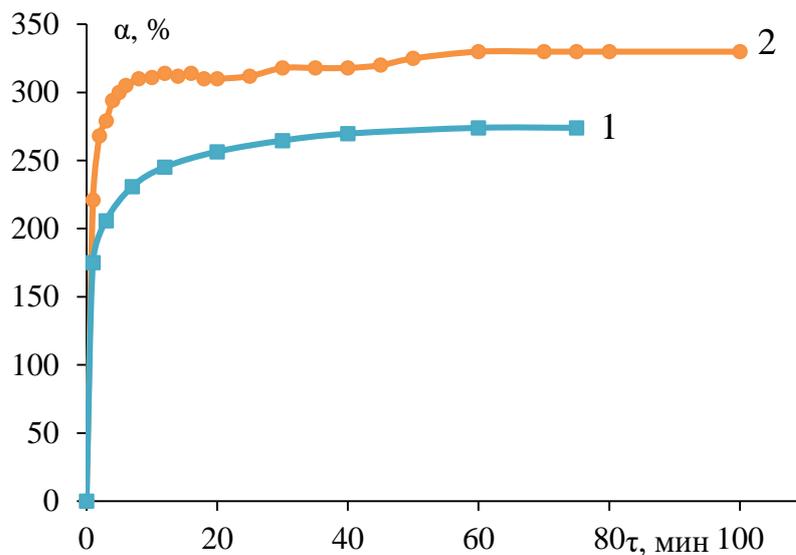


Рисунок 76 – Кинетические кривые набухания пленок, полученных из 2% раствора хитозана (рН 5,6) и Дж 0.04 моль/моль (1) и их смеси с 1% раствором ГК (5:1) (2)

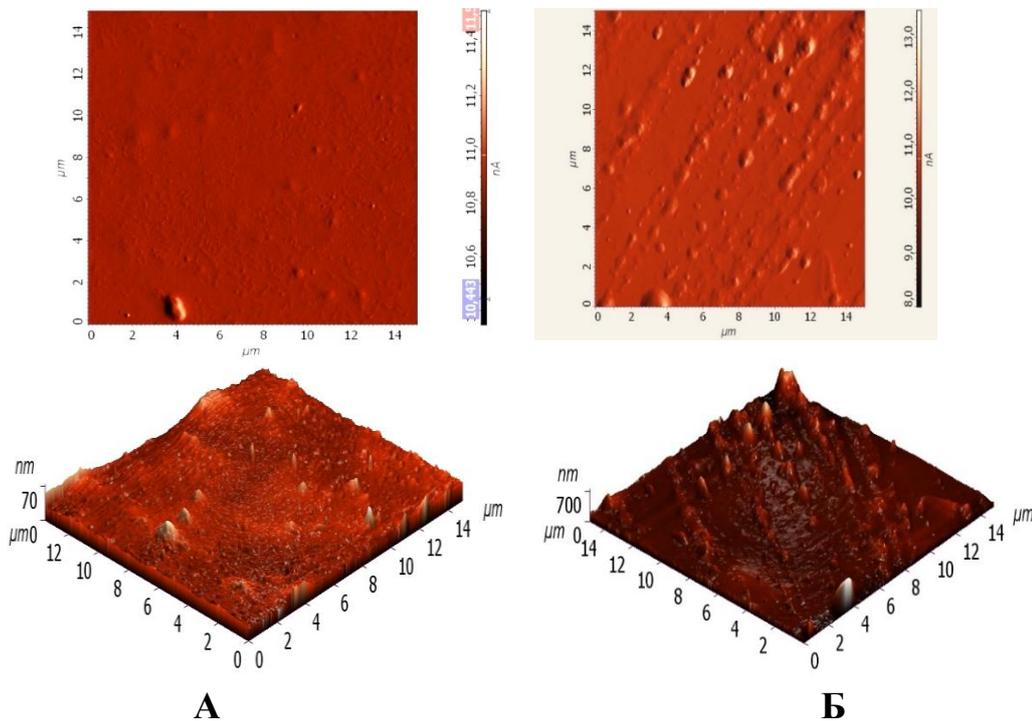


Рисунок 77 – АСМ-изображения поверхности пленок на основе 2% раствора хитозана (рН 5,6) и Дж 0,04 моль/моль (А) и их смеси с 1% раствором ГК (5:1) (Б)

Полученные результаты легли в основу разработки проекта производственной линии по модификации хирургических шовных нитей совместно с компанией ООО «Мартинекс», представленного на рисунке 78.

Разработанный проект линии представляет собой устройство, укомплектованное механизмом непрерывной работы, чтобы предупредить оператора об обрыве нити. С входной паковки нити проходят внутри натяжного устройства, для придания нитям рабочего натяжения, не растягивая их. Направляющие ролики покрыты специальной резиной - с помощью моторедуктора нить направляется внутрь погружного резервуара, где содержится раствор полимера. Бак может содержать не более 100 мл холодного раствора. После прохождения резервуара, нити проходят внутри фильеры для удаления избытка раствора с поверхности нити. Фильеры легко меняются в зависимости от требуемого диаметра нити (от 0,1 до 2,0 мм). Далее, нити с нанесенным покрытием сушат в одноступенчатом туннеле с подачей горячего воздуха с длиной, подходящей для однократного или тройного прохода нити. Нагревание обеспечивается электрическими резисторами. Принудительная циркуляция воздуха достигается наличием вытяжки. Перед окончательной намоткой, нити с покрытием проходят дополнительные натяжные ролики, для получения равномерного покрытия без растяжения. Обработанная нить окончательно наматывается на бобины с помощью намоточного устройства.

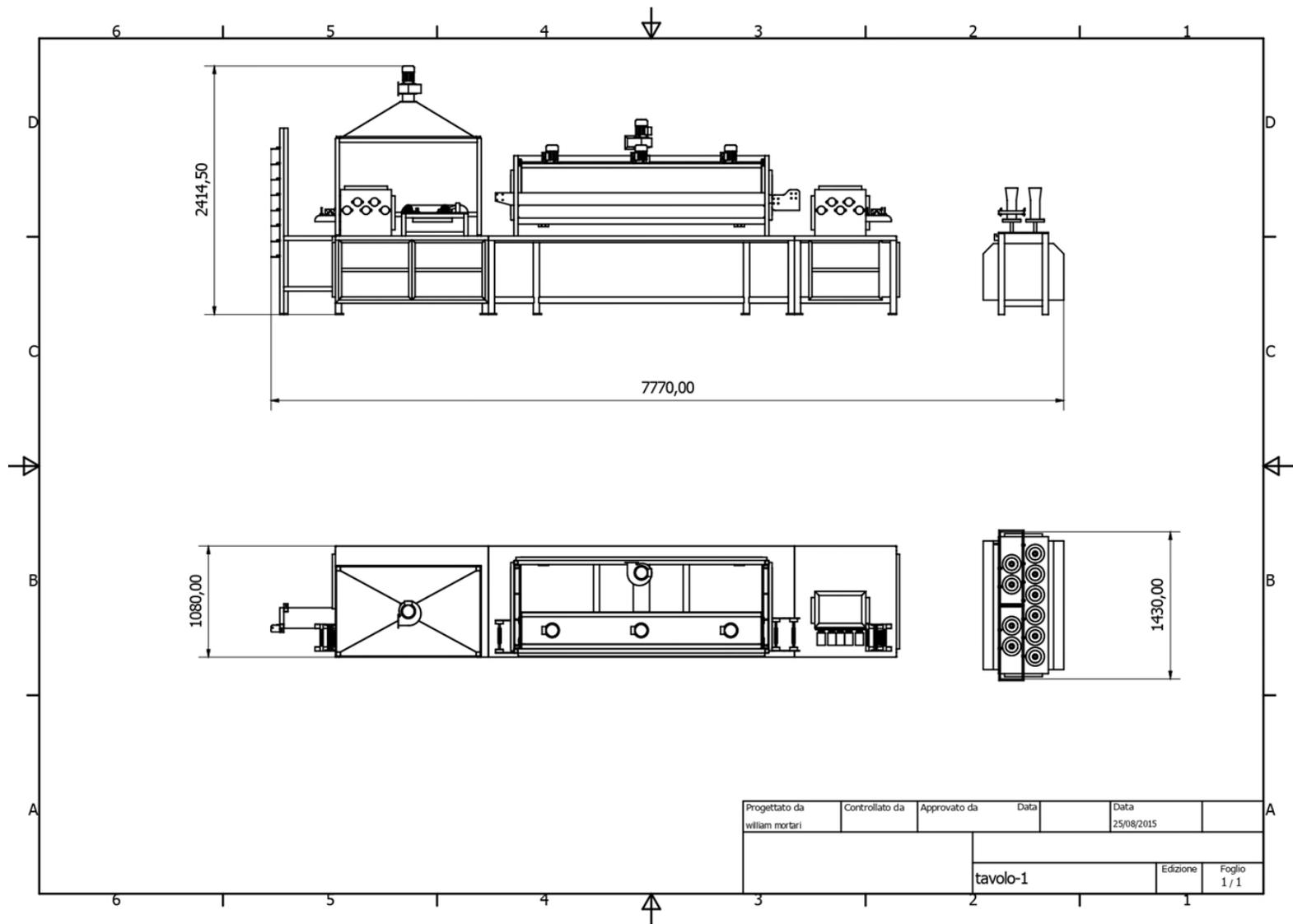


Рисунок 78 – Проект производственной линии Silky-10 ООО «Мартинекс». Описание см. в тексте.

Проведенные в главе 3 исследования с целью разработки технологии получения материалов медико-биологического назначения позволили определить условия получения как водорастворимых, так и не растворимых комплексов на основе полиэлектролитных комплексов гиалуроновой кислоты и хитозана, которые могут применяться при создании материалов медико-биологического назначения.

С применением разработанных методик модифицирования матриксов биополимеров были получены сшитые гидрогели на основе полиэлектролитного комплекса хитозан-гиалуроновая кислота, которые после лиофильного высушивания были использованы в качестве матрицы для выращивания живых культур – по результатам теста на цитотоксичность доказана биосовместимость матриксов.

Использование в качестве добавок фибриллярного белка фиброина и остеокондуктивного компонента гидроксиапатита позволяет контролировать образование и раз пор в биологических матриксах, а также оказывает положительное влияние на рост и пролиферацию клеток.

Применение волокнообразующего полимера для придания эффекта прядомости формовочному раствору на основе ПЭК хитозан-ГК позволяет получать наноразмерный материал, который может использоваться как раневое покрытие или же, в качестве подложки для выращивания живых клеток.

Послойное нанесение на хирургическую шовную нить покрытия на основе нерастворимого комплекса гиалуроновой кислоты и хитозана сшитого дженипином, действительно сглаживает поверхность многофиламентной нити, что снижает травматичность, а придание нити контрастной окраски в результате применения дженипина позволяет облегчать использование нити в регенеративной медицине.

Выводы

Результаты проведенных в диссертационной работе исследований обеспечивают расширение современных представлений об особенностях получения полимерных материалов медико-биологического назначения на основе ГК и ее ИПЭК с хитозаном и позволяют сделать следующие выводы:

1. Впервые исследованы вязкостные свойства и стабильность водных растворов ГК с разной степенью нейтрализации и установлены особенности процесса комплексообразования Н-формы ГК и хитозана.

2. Установлена возможность получения водорастворимых комплексов гиалуроновая кислота-хитозан путем изменения рН и введения фонового электролита.

3. Разработаны методы получения и модификации материалов медико-биологического назначения на основе гиалуроновой кислоты и ее комплексов с хитозаном.

4. Разработаны два способа получения пористых биополимерных матриц: путем поверхностной модификации лиофильно высушенных гидрогелей хитозана, сшитого дженипином, и модификации в объеме бикомпонентного гидрогеля. В сравнительных экспериментах на живых клетках установлено отсутствие их цитотоксичности.

5. Установлено, что введение остеокондуктивного компонента (гидроксиапатит) позволяет контролировать архитектуру сшитых БДДЕ матриц гиалуроновой кислоты и влияет на культивирование и пролиферацию клеток по всему объему пористого материала;

6. Показана возможность получения методом электроформования нановолокнистого материала, содержащего ИПЭК ГК – хитозан с диаметром волокон 180 нм, с использованием ПВС в качестве волокнообразующей добавки.

7. Разработан процесс модификации хирургической шовной нити путем нанесения не растворимой в воде оболочки из сшитого хитозана и его полиэлектролитных комплексов с гиалуроновой кислотой. Разработана технологическая схема опытной установки по модификации шовных нитей.

Список литературы

1. Kaiser L.R. The future of multihospital systems // Top Health Care Financ. – 1992. –Vol.18. – Iss.4. – P. 32-45
2. Gianluca S., Salman Y. G. Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine // Journal of Microscopy and Ultrastructure. – 2015.- Vol.3.- Iss.3.- P. 101-107
3. Saidi R.F., Hejazii Kenari S.K. Clinical transplantation and tolerance: are we there yet? // Int. J Organ Transplant Med.- 2014.- Vol. 5.- Iss.4.- P. 137-145
4. ISO 19090:2018(E)
5. Qazi T.H., Rai R., Boccaccini A.R. Tissue engineering of electrically responsive tissues using polyaniline based polymers: A review // Biomaterials. -2014. –Vol. 35.- P. 9068– 9086
6. Arca H.Ç., Şenel S. Chitosan based systems for tissue engineering part 1: hard tissues // J. Pharm. Sci. – 2008.- Vol. 33.- P. 35–49
7. Гумаргалиева К.З., Заиков Т.Е., Моисеев Ю.В. Макрокинетические аспекты биосовместимости и биodeградируемости полимеров // Успехи химии. - 1994.- Т. 63.- №10.- С. 905-921
8. Морфологические и биохимические аспекты биodeградации полимеров / под ред. Пхакадзе Г.А. К.: Наукова думка, 1986. 152 с.
9. Laschke M. W., Menger M. D. Prevascularization in tissue engineering: Current concepts and future directions // Biotechnology Advances. – 2016. –Vol. 34. - Iss.2.- P. 112-121
10. Place E. S., Evans N. D., Stevens M. M. Complexity in biomaterials for tissue engineering // Nature Materials. - 2009. – Vol.8. – Iss. 6. – P. 457-470
11. Штильман М.И. Полимеры медико-биологического назначения. М.: Академкнига, 2006. 399 с
12. Middleton J.C., Tipton A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices // Biomaterials. - 2000. - V. 21.- Iss. 23. - P. 2335-2346
13. Hakkarainen M. Aliphatic Polyesters: Abiotic and Biotic Degradation and Degradation Products // Advances in Polymer Science. - 2002. - V. 157.- P. 115-134
14. Reed A.M., Gilding D.K. Biodegradable polymers for use in surgery poly(glycolic)/poly(lactic acid) homo- and copolymers: 2 In vitro degradation // Polymer. - 1979. - V. 20.- P. 1459-1464
15. Naba A., Clauser K. R. The extracellular matrix: Tools and insights for the “omics” era. // Matrix Biology. - 2016.- Vol. 49. – P. 10-24

16. Russo L., Cipolla L. Glycomics: New Challenges and Opportunities in Regenerative Medicine // Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany). – 2016.- Vol. 22. – P.13380–13388
17. Johnson J. L., Jones M. B., Ryan S. O., & Cobb B. A. The regulatory power of glycans and their binding partners in immunity// Trends in Immunology. – 2013.- Vol. 34.- Iss. 6. – P. 290–8.
18. Wang, D. Glyco-epitope Diversity: An Evolving Area of Glycomics Research and Biomarker Discovery // Journal of Proteomics & Bioinformatics. – 2014.- Vol. 7(2)
19. Armen Tchobanian. Polysaccharides for tissue engineering: Current landscape and future prospects // Carbohydrate Polymers.- 2019.- Vol. 205.- P. 601-625
20. De Isla N., Huseltein C., Jessel N. Introduction to tissue engineering and application for cartilage engineering.// Bio-Med. Mater. Eng. - 2010. - Vol. 20. - № 3–4. - P. 127–133.
21. Nettles D.L., Elder S.H., Gilbert J.A. Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering// Tissue Eng. - 2002. - Vol. 8. - № 6. - P. 1009–1016
22. Jing X. U., Ling A. I., Bai H. Y., Jiang J. Q., Xia W. S., Liu X. Y. Research progress of modification of hyaluronic acid. Polymer Bulletin, 19 (2011) 78-84.
23. B. Paul, D. Aeschlimann. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels // Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials.- 2015.- Vol. 47.- P.152-169
24. Юсова А. А., Гусев И. В., Липатова И. М. Свойства гидрогелей на основе смесей альгината натрия с другими полисахаридами природного происхождения // Химия растительного сырья. - 2014. - №4. - С. 59-66
25. Хлыстова Т.С., Олтаржевская Н.Д., Эйзенах И.А., Липатова И.М. Лечебные гидрогелевые материалы для направленной доставки лекарственных препаратов в онкоурологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. (15) 1. – С. 113-114
26. Щедрина М.А., Олтаржевская Н.Д., Коровина М.А., Решетов И.В., Гусев И.В. Возможности биополимерных композиций на основе полисахаридов для стимуляции регулируемой атипичной репаративной регенерации мягких тканей // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – Т. 17. – С. 84-85
27. Yasser A.Attia, Mohamed I. Kobeasy. Evaluation of magnetic nanoparticles influence on hyaluronic acid production from *Streptococcus equi* // Carbohydrate Polymers.- 2018.- Vol. 192.- P. 135-142

28. Badle S.S., Jayaraman G. Ratio of intracellular precursors concentration and their flux influences hyaluronic acid molecular weight in *Streptococcus zooepidemicus* and recombinant *Lactococcus lactis* // *Bioresource Technology*.- 2014.- 163.- P. 222-227
29. Cowman M.K., Matsuoka S. Experimental approaches to hyaluronan structure // *Carbohydrate Research*.- 2005.- 340.- P. 791-809
30. V.C. Hascall, P.H. Weigel. Hyaluronan // *Reference Module in Biomedical Sciences Encyclopedia of Cell Biology*. – 2016.- Vol. 1 .- P. 279-287
31. Ferguson E.L., Roberts J.L. Evaluation of the physical and biological properties of hyaluronan and hyaluronan fragments. // *Int. J. Pharm.* – 2011. – vol.420, №1. – P.84-92
32. Gao F., Liu Y., He Y. et al. Hyaluronan oligosaccharides promote excisional wound healing through enhanced angiogenesis. // *Matix. Bid.* – 2010. – vol.29, №2. – P. 107-116
33. Tesar B. M., Jiang D., Liang J. et al. The role of hyaluronan degradation products as innate alloimmune agonists // *Am J Transplant*.- 2006.- Vol. 6.- P. 2622—2635
34. Jihoon Kim, Ji-Youn Chang, Yoon-Young Kim et al. Effects of molecular weight of hyaluronic acid on its viscosity and enzymatic activities of lysozyme and peroxidase // *Archives of Oral Biology*.- 2018. –Vol. 89.- P. 55–64
35. Бурлакова Е.Б. Эффект сверхмалых доз // *Вестн. РАН.* — 1994. — Т. 64. — № 5. — С. 425–434
36. Матвеева Е.А. Биохимические изменения в синовиальной жидкости при развитии дегенеративно-дистрофических процессов в коленном суставе: Дис. ... д-ра биол. наук. — Тюмень, 2007. — С. 486.
37. Hennink W. E., Van Nostrum C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels // *Advanced drug delivery reviews*. – 2012. – Vol. 64. – P. 223-236.
38. Хасанов А. Г. и др. Разработка и применение имплантантов на основе гликозаминогликанов и комплексов метиленового синего в хирургии. Уфа: 2005, 213 с.
39. Gangliang Huang, Junrong Chen/ Preparation and applications of hyaluronic acid and its derivatives. // *Biomac*.- 2018. - In Press
40. R.Fitzgerald, J.Carqueville, P.T.Yang. An approach to structural facial rejuvenation with fillers in women // *International Journal of Women's Dermatology*. – 2018.- In Press
41. Theda C.Kontis. Midface Volumization with Injectable Fillers // *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*.- 2015.- Vol. 23.- P. 233-242

42. Gianluca Sampogna, Salman Yousuf Guraya. Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine // *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. - 2015.- Vol. 3.- Iss. 3. – P.101-107
43. Stella J.A., D'Amore A., Wagner W.R., Sacks M.S. On the biomechanical function of scaffolds for engineering load-bearing soft tissues // *Acta Biomater.* - 2010. - Vol. 6(7). – P. 2365–2381
44. Schanté, C., Zuber, G., Herlin, C., & Vandamme, T. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications // *Carbohydrate Polymers*. – 2010. – P. 469-48
45. Balazs, E., & Leshchiner, A. (1968). US4582865
46. Collins, M., & Birkinshaw, C. Investigation of the swelling behavior of crosslinked hyaluronic acid films and hydrogels produced using homogeneous reactions // *Journal of Applied Polymer Science*. -2008a. – Vol. 109(2). – P. 923–931
47. Collins, M., & Birkinshaw, C. Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine/* - 2008b. – Vol. 19(11). – P. 3335–3343
48. Gatta, A., Schiraldi, C., Papa, A., D'Agostino, A., Cammarota. Hyaluronan scaffolds via diglycidyl ether crosslinking: Toward improvements in composition and performance // *Carbohydrate Polymers*. – 2008. - 536-54
49. Nishi C. In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification // *J. Biomed. Mater. Res.* — 1995. — No. 29. — P. 829–834
50. Malson, T., & Lindqvist, B. (1986). Gels of crosslinked hyaluronic acid for use as a vitreous humor substitute. WO1986000079
51. De Belder, A., & Malson, T. (1986). WO86000912
52. Tomihata K., & Ikada Y. Preparation of cross-linked hyaluronic acid films of low water content // *Biomaterials*.- 1997.- Vol. 18(3). – P.189–195
53. Nishi C., Nakajima N., & Ikada, Y. (1995). In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification // *Journal of Biomedical Materials Research*.- 1995. – Vol. 29(7).- P. 829–834
54. Koenraad De Boule, Richard Glogau, Taro Kono. A Review of the Metabolism of 1,4-Butanediol Diglycidyl Ether–Crosslinked Hyaluronic Acid Dermal Fillers // *Dermatol Surg*.- 2013.- Vol.39.-P.1758–1766
55. Agnihotri S. A., Mallikarjuna N. N., Aminabhavi T. M. Recent advances on chitosan– based micro–and nanoparticles in drug delivery // *J. Control. Release*. - 2004. – Vol. 100(1).- P. 5–28
56. Krajewska B. Membrane–based processes performed with use of chitin/chitosan materials // *Sep. Purif. Tech.* – 2005. – Vol. 41(3). – P. 305–312

57. Casettari L. and Illum L. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs // *J. Control. Release.* – 2014. – Vol. 190. – P. 189–200
58. Benediktsdóttir B. E., Baldursson Ó., and Másson M. Challenges in evaluation of chitosan and trimethylated chitosan (TMC) as mucosal permeation enhancers: From synthesis to in vitro application // *J. Control. Release.* – 2014. – Vol. 173. – P. 18–31
59. Мезина Е.А., Макарова Л.И., Липатова И.М. Хитозан-волоконистые матрицы для пролонгированного выделения лекарственного препарата лидокоина // *Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология.* – 2013. - №12. – С. 108-112.
60. Kean, T., & Thanou, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan // *Advanced Drug Delivery Reviews.* - 2010. – Vol. 62(1). –P. 3-11
61. Kong M., Chen X. G., Xing K., Park H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review // *Int. J. Food Microbiol.* – 2010. – Vol. 144(1). – P. 51–63
62. Zhou H.Y., Chen X.G., Kong M., Liu C.S., Cha D.S., Kennedy J.F. Effect of molecular weight and degree of chitosan deacetylation on the preparation and characteristics of chitosan thermosensitive hydrogel as a delivery system // *Carbohydrate Polymers.* – 2008. - Vol. 73. - P. 263-273
63. Kong M., Chen X.G., Liu C.S., Yu L.J., Ji Q.X., Xue Y.P., Cha D.S., Park H.J. Preparation and antibacterial activity of chitosan microspheres in a solid dispersing // *Frontiers of Materials Science in China.* – 2008. - Vol. 2. – P. 214-220
64. No H.K., Park N.Y., Lee S.H., Meyers S.P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights // *International Journal of Food Microbiology.* – 2002. - Vol. 74. - no. 1-2. - P. 65-72
65. Rampino A., Borgogna M., Blasi P., Bellich B. and Cesàro A. Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability // *Int. J. Pharm.* – 2013. – Vol. 455(1-2). – P. 219-228
66. Q. Gan, T. Wang, C. Cochrane, P. McCarron, Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery // *Colloids Surf.* – 2005. – Vol. 44(2-3). – P. 65-73
67. Hu B., Pan C., Sun Y. Optimization of fabrication parameters to produce chitosan–tripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins // *J. Agric. Food Chem.* – 2008. – Vol. 56(16). – P. 7451-7458
68. Иванцова Е.Л., Иорданский А.Л., Новая биоразлагаемая композиция поли(3-гидроксипропанат) хитозан для пролонгированного транспорта биологически активных веществ // *Москва: «Химико-фармацевтический журнал».* – 2011. - Т.45, № 1. – С. 39-44.

69. Инновационные аспекты применения хитозана в медицине / И.Н. Большаков. - Красноярск: «Рыбпром: технологии и оборудование для пререработки водных биоресурсов», № 2. 2010 г., 42-47
70. Успенский С.А. Получение хитозансодержащих нитей и исследование их свойств: дис. ... канд. хим. наук: 05.17.06. – М., 2011. – 112 с.
71. Жуковский В.А. Научное обоснование и разработка технологии волокнистых хирургических материалов со специальными свойствами: дис. ... д.т.н. 05.17.06. – С.-П., 2013
72. Федоров М. Б. Получение и исследование волокнистых и пленочных материалов на основе полигидроксибутирата: дис. ... канд. хим. наук: 05.17.06. - М., 2009. – 138 с.
73. T. Józwiak et al. Effect of ionic and covalent crosslinking agents on properties of chitosan beads and sorption effectiveness of Reactive Black 5 / Reactive and Functional Polymers. – 2017. – Vol. 114. – P. 58–74
74. Khan, M. A holistic review of hydrogel applications in the adsorptive removal of aqueous pollutants: Recent progress, challenges, and perspectives // Water Research. – 2016. – Vol. 106. – P. 259-271
75. Mustafa Sahin, Nuriye Kocak Gulsin. Synthesis of Crosslinked Chitosan with Epichlorohydrin Possessing Two Novel Polymeric Ligands and Its Use in Metal Removal // Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials. – 2011. - Vol.21. – Iss. 1. – P. 69–80
76. Aqil A., Tchemtchoua V.T. Preparation and characterizations of EGDE crosslinked chitosan electrospun membranes // Hemorheol Microcirc. – 2015. – Vol. 60(1). – P. 39-50.
77. Croisier F., Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering // Eur. Polym. J. – 2013. – Vol. 49. – P. 780–792
78. Chiou M.S., Li H.Y. Equilibrium and kinetic modeling of adsorption of reactive dye on cross-linked chitosan beads // J. Hazard. Mater. – 2002. - Vol.93. – P. 233–248.
79. Leung H-W. Ecotoxicology of glutaraldehyde: review of environmental fate and effects studies // Ecotoxicol Environ Saf. – 2001. – P. 49:26–39
80. Chen S.C., Wu Y. C. A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery // Journal of Controlled Release. – 2004. - Vol. 96. - No. 2. - P. 258-300
81. Cui L., Jia J., Guo Y., Liu Y., Zhu P. Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin // Carbohydrate Polymers. – 2014. - Vol. 99. – P. 31- 38

82. Sung H.W., Huang R.N., Huang L.L.H., Tsai C.C. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation // *Biomaterial Science Polymer*. – 1999. - Vol. 10. – P. 63-78.
83. Fwu-Long Mi, Shin-Shing Shyu. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin // *J. Polym. Sci. Part A: Polym.* – 2005. - Chem. 43. – P. 1985–2000.
84. Muzzarelli R.A.A., Mehtedi M.E. Genipin-Crosslinked Chitosan Gels and Scaffolds for Tissue Engineering and Regeneration of Cartilage and Bone // *Marine Drugs*. – 2015. - Vol. 13. - No. 12. – P. 7314-7338
85. H.W. Sung, Y. Chang, I.L. Liang. Fixation of biological tissues with a naturally occurring crosslinking agent: fixation rate and effects of pH, temperature, and initial fixative concentration // *Journal of Biomedical Research*. – 2000. - Vol. 52. – P. 77-87
86. Muzzarelli R.A.A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids // *Carbohydrate Polymers*. – 2009. - Vol. 77. - no. 1. –P. 1-9
87. Subramanian A1, Lin HY. Crosslinked chitosan: its physical properties and the effects of matrix stiffness on chondrocyte cell morphology and proliferation. // *J Biomed Mater Res A*. – 2005. – Vol. 75(3). – P. 742-53.
88. Swapan K. Roy Jason G. Todd Wolfgang G. Glasser Crosslinked hydrogel beads from chitosan US5770712A
89. Merz Pharma Gmbh & Co. Kga Process for depleting epoxide species in crosslinked polysaccharide gel compositions and compositions obtained thereby WO2017076495A1
90. Chitosan hemostatic material formed through covalent crosslinking and preparation method thereof CN104474576A
91. US Patent 2116942. Method and apparatus for the production of fibers / Formals A., patented 10.05.1938
92. Li D., Y.X. Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel // *Advanced Materials*. - 2004. – Vol. 16(14). - P. 1151-1170
93. Taylor G. Disintegration of water drops in an electric field // *Proc. R. Soc. London, Ser. A*. – 1964. – Vol. 280. – P. 383–397
94. Reneker D. H., Yarin A. L. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. // *J. Appl. Phys.* – 2000. - Vol. 87. –P. 4531–4547
95. Продукция Elmarco NS LAB [электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.elmarco.com/nanofiber-equipment/electrospinning-equipment-ns-lab/>. – (Дата обращения 22.02.2019)

96. P. Gupa [et. al.] Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent // *Polymer*. – 2005. – Vol. 46. – P. 4799–4810
97. Fong, H. Beaded nanofibers formed during electrospinning / H. Fong, I. Chun, D.H. Reneker // *Polymer*. – 1999. – Vol. 40. – P. 4585-4592
98. Deitzel, J.M., et al., Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers. // *Polymer*. - 2001. – Vol. 42(19). - P. 8163-8170
99. Филатов Ю.Н. Электроформование волокнистых материалов (ЭФВ-процесс) / Ю.Н. Филатов. – М.: ГНЦ РФ НИФХИ им. Л.Я. Карпова, 2001. – 231 с
100. Lu, J.-W., et al., Electrospinning of sodium alginate with poly(ethylene oxide). // *Polymer*. - 2006. – Vol. 47(23). – P. 8026-8031
101. Афанасов И.М., Матвеев А.Т. Получение нановолокон методом электроформования. – М., 2010. – 83 с.
102. Demir, M., et al., Electrospinning of polyurethane fibers. // *Polymer*. - 2002.- Vol. 43(11). P. 3303-3309
103. Greiner, A. and J. Wendorff, Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers // *Angew Chem Int Ed*. - 2007. – Vol. 46. - P. 5670–5703
104. Silke Megelski, Jean S. Stephens. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers // *Macromolecules*. – 2002. –Vol. 35. – P. 8456-8466
105. Casper C. L., Stephens J. S. Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process // *Macromolecules*. – 2004. – Vol. 37(2). – P. 573-578.
106. Baumgarten, P. K. Electrostatic spinning of acrylic microfibers // *J. Colloid Interface Sci*. – 1971. – Vol. 36. – P. 71–79
107. Gibson P., Schreuder-Gibson H. Transport properties of porous membranes based on electrospun nanofibers // *Colloids Surf*. – 2001. – Vol. 187–188. – P. 469–481
108. Yin, G., Zhao, Q. The electrospun polyamide 6 nanofiber membranes used as high efficiency filter materials: filtration potential, thermal treatment, and their continuous production // *J. Appl. Polym. Sci*. – 2013. – Vol. 128. – P.1061–1069
109. Kuo, Y.-Y., Bruno. Filtration performance against nanoparticles by electrospun nylon-6 media containing ultrathin nanofibers // *Aerosol Sci. Technol*. – 2014. – Vol. 48. – P.1332–1344.
110. Renuga Gopal, Satinderpal Kaur. Electrospun nanofibrous filtration membrane // *Journal of Membrane Science*. – 2006. – Vol. 281. – Iss.1–2. - P.581-586

111. Jonathan G Merrell, Shaun W McLaughlin. Curcumin-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanofibres: Diabetic wound dressing with anti-oxidant and anti-inflammatory properties // Vol.36. – Iss.12. – P. 1149-1156
112. Sill TJ, Von Recum HA. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. // Biomaterials, 2008, 29:1989-2006
113. Xiao-Yan Li. Nanofibers Fabricated Using Triaxial Electrospinning as Zero Order Drug Delivery Systems // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2015. – Vol. 7 (33). – P.18891–18897
114. Langer, R., Vacanti, J.P. Tissue engineering.// Science. – 1993. –Vol. 260. – P. 920
115. Liu, X., Ma, P.X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering // Ann. Biomed. Eng. – 2004. – Vol. 32. – P. 477
116. Sharma, B., Elisseeff, J.H. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues // Ann. Biomed. Eng. – 2004. – Vol. 32. – P.148
117. Hutmacher, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage // Biomaterials. – 2000. – Vol. 21. – P. 2529
118. Сургученко В.А. Особенности адгезии и пролиферации фибробластов мышцы линии NIH/3T3 на пленках из бактериального сополимера поли (3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерата) с различной шероховатостью поверхности / В.А. Сургученко [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2012. – № 1. – С. 72-77
119. Marco Santoro, Sarita R.Shah. Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2016. – Vol. 107. – P. 206-212
120. Mohammad Mehrasa, Mohammad Ali Asadollahi. Electrospun aligned PLGA and PLGA/gelatin nanofibers embedded with silica nanoparticles for tissue engineering // International Journal of Biological Macromolecules. – 2015. – Vol. 79. – P.687-695
121. A. Wee, L.Y. Lim. Flexible chitin films as potential wounddressing materials: wound model studies // J. Biomed. Mater. Res. – 2003. – Vol. 66. – P. 224–232
122. Min B., Lee S.W. Chitin and chitosan nanofibers: electrospinning of chitin and deacetylation of chitin nanofibers // Polymer. -2004. – Vol. 45. – P. 7137–7142
123. Ohkawa K., Cha D., Kim H., Nishida A., Yamamoto H. Electrospinning of chitosan // Macromol. Rapid Commun. – 2004. – Vol. 25. – P. 1600–1605
124. Du J., Hsieh Y. Nanofibrous membranes from aqueous electrospinning of carboxymethyl chitosan// Nanotechnology. – 2008. –Vol. 19. – P. 125707
125. Ignatova M., Starbova K. Electrospun nanofibre mats with antibacterial properties from quaternised chitosan and poly (vinyl alcohol) // Carbohydr. Res. – 2006. – Vol. 341. – P. 2098–2107

126. Skotak M., Leonov A.P. Biocompatible and biodegradable ultrafine fibrillar scaffold materials for tissue engineering by facile grafting of L-lactide onto chitosan // *Biomacromolecules*. – 2008. – Vol. 9. – P. 1902–1908
127. Torres-Giner S., Ocio M.J. Development of active antimicrobial fiber based chitosan polysaccharide nanostructure using electrospinning // *Eng. Life Sci.* – 2008. – Vol. 8. – P. 303–314
128. Chen J., Chang G. Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing // *Colloid Surf A: Physicochem. Eng. Aspects*. – 2008. – Vol. 313–314. – P. 183–188
129. Zeng-xiao Cai, Xiu-mei Mo. Fabrication of Chitosan/Silk Fibroin Composite Nanofibers for Wound-dressing Applications // *Int. J. Mol. Sci.* – 2010. – Vol. 11(9). – P. 3529-3539
130. Jiajia Chen, Gu Cheng. Enhanced physical and biological properties of silk fibroin nanofibers by layer-by-layer deposition of chitosan and rectorite // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2018. – Vol. 523. – P. 208-216
131. Narayan Bhattarai, Dennis Edmondson. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility // *Biomaterials*. – 2005. – P. 6176–6184
132. Mojtaba Koosha, Hamid Mirzadeh. Electrospinning, mechanical properties, and cell behavior study of chitosan/PVA nanofibers // *Journal of biomedical materials research*. – 2015. – Vol. 103. – Iss. 9. – P. 3081-3093
133. Saeed Ahmadi Majd, Mohammad Rabbani Khorasgani. Application of Chitosan/PVA Nano fiber as a potential wound dressing for streptozotocin-induced diabetic rats // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2016. – Vol. 92. – P. 1162-1168
134. J.D. Schiffman, C.L. Schauer. One-step electrospinning of cross-linked chitosan fibers // *Biomacromolecules*. – 2007. - Vol. 8. – P. 2665–2667
135. M.E. Frohbergh. Electrospun hydroxyapatite-containing chitosan nanofibers crosslinked with genipin for bone tissue engineering // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 33. – P. 9167-9178,
136. J. Necas, L. Bartosikova. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review // *Veterinari Medicina*. – 2008. – Vol. 53. – P. 397–411
137. Shailesh Pate. Clinical Role of injectable hyaluronic acid in skin rejuvenation: a literature review // *Journal of Aesthetic Nursing*.-Vol. 7. - No. 2
138. J. Li, A. He, C.C. Han. Electrospinning of hyaluronic acid (HA) and HA/gelatin blends // *Macromol. Rapid Commun*. – 2006. – Vol. 27. – P. 114–120
139. Chul Um, Dufei Fang. Electro-Spinning and Electro-Blowing of Hyaluronic Acid // *Biomacromolecules*. – 2004. – Vol. 5 (4). – P. 1428–1436

140. Kim, S., C. Lee. Effect of ionic salts on the processing of poly (2acrylamido-2-methyl-1-propane sulfonic acid) nanofibers // *Journal of Applied Polymer Science*. - 2005. – Vol. 96(4). - P. 1388-1393
141. Liu, Guiping Ma, Dawei Fang. Effects of solution properties and electric field on the electrospinning of hyaluronic acid // *Carbohydrate Polymers*. – 2001. -Vol. 83. – Iss. 2. – P. 1011-1015
142. Kim, T., H. Chung. Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid/collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition/leaching of salt particles // *Acta Biomaterialia*. – 2008. – P. 1611–1619
143. Li, J. Electrospinning of Hyaluronic Acid (HA) and HA/Gelatin Blends // *Macromolecular rapid communications*. - 2006. – Vol. 27(2). - P. 114
144. Eric K. Brenner, Jessica D. Schiffman. Electrospinning of hyaluronic acid nanofibers from aqueous ammonium solutions // *Carbohydr. Polym.* – 2012. – Vol. 87. – P. 926
145. Maleki A., Kjoniksen A.-L. Effect of pH on the behavior of hyaluronic acid in dilute and semidilute aqueous solutions // *Macromolecular Symposia*. – 2008. – Vol. 274(1). – P. 131–140
146. Investigation into the Electrospinning of Hyaluronic Acid A Thesis Submitted to the Faculty of Drexel University by Eric Karl Brenner in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Materials Science and Engineering, 2009
147. Chialin Sheu, K. T. Shalumon. Dual crosslinked hyaluronic acid nanofibrous membranes for prolonged prevention of post-surgical peritoneal adhesion // *J.Mater. Chem. B*. – 2016. – Vol. 4. – P. 6680
148. X. Wang. Formation of water-resistant hyaluronic acid nanofibers by blowing-assisted electro-spinning and non-toxic post treatments // *Polymer*. – 2005. – Vol. 46. – P. 4853–4867
149. Wenwen Sun, Guangkai Chen. Polyelectrolyte-complex multilayer membrane with gradient porous structure based on natural polymers for wound care // *Carbohydrate Polymers*. – 2018. – Vol. 181. – P. 183-190
150. Alexander Shovsky, Imre Varga. Formation and Stability of Water-Soluble, Molecular Polyelectrolyte Complexes: Effects of Charge Density, Mixing Ratio, and Polyelectrolyte Concentration // *Langmuir*. - 2009. – Vol. 25 (11). – P. 6113–6121
151. B. Philipp, H. Dautzenberg. Polyelectrolyte complexes—recent developments and open problems // *Prog Polym Sci*. – 1989. – Vol. 14 (1). -91–172
152. Huaping Tan, Constance R.Chu. Injectable in situ forming biodegradable chitosan–hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30Ю – Iss.13. – P. 2499-2506

153. Papadakis C.M., Tsitsilianis C. Responsive hydrogels from associative block copolymers: physical gelling through polyion complexation // *Gels*. – 2017. – Vol. 3 (1). – P. 3
154. Fu J., Schlenoff J.B. Driving forces for oppositely charged polyion association in aqueous solutions: enthalpic, entropic, but not electrostatic // *J Am Chem Soc*. – 2016. – Vol. 138 (3). – P. 980–990
155. Hamman J.H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems // *Mar Drugs*. – 2010. – Vol. 8 (4). – P. 1305–1322
156. Dautzenberg, H. Polyelectrolyte complex formation in highly aggregating systems. 1. Effect of salt: polyelectrolyte complex formation in the presence of NaCl // *Macromolecules*. – 1997. – Vol. 30(25). – P. 7810–7815
157. Narambuena, C. F., Leiva, E. P. M. Effect of chain stiffness on the morphology of polyelectrolyte complexes // *Polymer*. – 2010. – Vol. 51(14). P. 3293–3302.
158. Kayitmazer, A. B., Koksal, A. F. Complex coacervation of hyaluronic acid and chitosan: effects of pH, ionic strength, charge density, chain length and the charge ratio // *Soft Matter*. – 2015. – Vol. 11(44). – P. 8605–8612
159. S.Hirano, C.Mizutani,. Formation of the polyelectrolyte complexes of some acidic glycosaminoglycans with partially N-acetylated chitosans // *Biopolymers*. – 1978. – Vol. 17. – P. 805
160. Denuziere A., Ferrier D. Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes Physico-chemical aspects// *Carbohydr. Polym.*- 1996. – Vol. 29. – P. 317-323
161. L.Rusu-Balaita, J.Desbrieres. Formation of a biocompatible polyelectrolyte complex: chitosan-hyaluronan complex stability // *Polym. Bull*. – 2003. – Vol. 50. – P. 91-98
162. G.Lalevée, G.Sudre. Polyelectrolyte complexes via desalting mixtures of hyaluronic acid and chitosan—Physicochemical study and structural analysis // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – Vol. 154. – P. 86-95
163. Guiping Ma, Yang Liu. Hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte complexes nanofibers prepared by electrospinning // *Materials Letters*. – 2012. – Vol. 74. – P. 78–80
164. Subrata Deb Nath, Celine Abueva. Chitosan–hyaluronic acid polyelectrolyte complex scaffold crosslinked with genipin for immobilization and controlled release of BMP-2 // *Carbohydrate Polymers*. – 2015. – Vol. 115. – P. 160-169
165. Техническая документация к технологическому устройству NS LAB. Руководство пользователя установки для производства нановолокон. – Чехия, Elmarco. – 122 с

166. Кильдеева Н.Р., Касаткина М.А., Дроздова М.Г., Демина Т.С., Успенский С.А., Михайлов С.Н., Марквичева Е.А. Биодegradируемые матриксы на основе хитозана: получение, изучение свойств и использование для культивирования животных клеток // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016. – Т.52. - №5. – С. 504-512
167. Нудьга Л. А., Петрова В. А., Бочек А. М. и др. // Высокомолекулярные соединения, Серия Б. – 1997. – Т. 39(7). – С. 1232
168. Скляр А. М., Гамзаде А. И., Роговина Л. З. и др. // Высокомолекулярные соединения, Серия А. – 1981. – Т. 23(6). – С. 1396
169. Edwin R. Morris, David A. Rees. Conformation and dynamic interactions in hyaluronate solutions // Journal of Molecular Biology. – 1980. – Vol. 138. –P. 383-400
170. Nakajima A., Shinoda K. Complex formation between oppositely charged polysaccharides // Journal of Colloid and Interface Science. – 1976. – Vol. 55(1). – P. 126
171. I. Gatej, M. Popa. Role of the pH on Hyaluronan Behavior in Aqueous Solution // Biomacromolecules. – 2005. – Vol. 6(1). – P. 61-67
172. Selyanin M. A., Boykov P. Y. Hyaluronic Acid: Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine// Ed. by F. Polyak, John Wiley & Sons, Ltd. – 2015. – P. 253
173. Butler M.F., Ng Y.-F., Pudney P.D. /Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers// J. Polym. Sci. Part A: Pol. Chem.- 2003. - Vol.41.- P.3941–3953
174. Kenne, L., Gohil, S., Nilsson et. al. Modification and cross-linking parameters in hyaluronic acid hydrogels—Definitions and analytical methods// Carbohydrate polymers. - 2013. - Vol. 91(1). - P. 410-418
175. Belder A.N., Maelson T. Gel for preventing adhesion between body tissues and process for its production // Patent US WO 1986000079 A1
176. Jia Y.-T., Gong J. Fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method // Carbohydr. Polym. - 2007. – Vol. 67, №3. - P. 403-409
177. Don T.-M., King C.-F.. Preparation and characterization of chitosan-g-poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl alcohol) blends used for the evaluation of blood-contacting compatibility // Carbohydr. Polym. - 2006. - Vol.63, №3. - P.331-339
178. Lozinsky, V. I., Vainerman E. S. Study of cryostructurization of polymer systems. VII. Structure formation under freezing of poly(vinyl alcohol) aqueous solutions // Colloid Polym. – 1986. - Sci. 264. – P.19-24
179. Yamaura, K., N. Shindo. Mechanical denaturation of high polymers in solutions – 37. Effect of micro-gel on the flow-induced crystallization of poly(vinyl

- alcohol) from its aqueous solution, and the flow-induced crystallization of low molecular weight poly(vinyl alcohol) // *Colloid Polym.-* 1981. - Sci. 259. – P. 1143-1146
180. Chiellini, E., Corti, A., D'Antone, S. & Solaro, R. Biodegradation of poly(vinyl alcohol) based materials // *Prog. Polym.* – 2003. - Sci. 28. - P.963–1014
 181. Jong-Chul Park, Takeru Ito. Electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers: effects of degree of hydrolysis and enhanced water stability // *Polymer Journal.* – 2010. – Vol. 42. – P. 273–276
 182. Koski A., Yim K. Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning // *Materials Letters.* – 2004. – Vol. 58. – Iss. 3–4. – P. 493-497
 183. Rusu-Balaita L., Desbrières J., Rinaudo M. Formation of a biocompatible polyelectrolyte complex: chitosan-hyaluronan complex stability // *Polymer Bulletin.* – 2003. – Vol. 50(1). – P. 91-98
 184. Huaping T., Constance R. C. Injectable in situ forming biodegradable chitosan–hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering// *Biomaterials.* – 2009. – Vol. 30. – P. 2499-2506
 185. Boris D.C., Colby R.H. Rheology of sulfonated polystyrene solutions // *Macromolecules.* – 1998 - Vol. 31(17). – P. 5746-5755
 186. Morris G. A., Castile J. Macromolecular Conformation of Chitosan in Dilute Solution: a New Global Hydrodynamic Approach // *Carbohydrate Polymer.* – 2009. – Vol. 76. – P. 616-621
 187. Дубровский С.А., Зеленецкий А.Н., Успенский С.А., Хабаров В.Н. Влияние добавок буры на реологические свойства водных растворов гиалуроната натрия // *Высокомолекулярные соединения, Серия А.* – 2014. – Т. 56. - №2. – С. 206-212
 188. Кабанов В.А. Физико-химические основы и перспективы применения растворимых интерполиэлектrolитных комплексов (Обзор) // *Высокомолек. соед. А.* - 1994. - Т. 36. - № 2. - С. 183-197
 189. Белоконь М.А. Использование сшивающих реагентов ковалентного или ионного типа для получения материалов медико-биологического назначения на основе гидрогелей хитозана: автореферат дис. ... канд. техн. наук.– М., 2017. - 20 с
 190. Кильдеева Н.Р., Перминов П.А., Владимиров Л.В., Новиков В.В., Михайлов С.Н. О механизме реакции глутарового альдегида с хитозаном // *Биоорганическая химия.* – 2009. – Т. 35. – с. 397-407
 191. Sencadas V., Correia D.M. Determination of the parameters affecting electrospun chitosan fiber size distribution and morphology // *Carbohydrate Polymers.* – 2012. – Vol.87. – P. 1295–130

192. Сони́на А.Н., Сима́ненко́ва О.М., Вихорева Г.А., Гальбра́йх Л.С. Свойства формовочных растворов хитозана, ПВС и их смесей и переработка их методом электроформования // Композиты и наноструктуры. – 2012. – №2. – С. 44-50
193. Бонцевич Д. Н. Хирургический шовный материал. - М.: Проблемы здоровья и экологии, 2005. – С. 46.
194. Семенов Г. М., Петришин В. Л., Ковшова М. В. // Хирургический шов. – СПб.: Питер, 2013. – С. 256
195. ГОСТ 31620-2012 «Материалы хирургические шовные. Общие технические требования. Методы испытаний»
196. Егиев В. Н. // Хирургия. 1998. Т. 3. – С. 33-38
197. Петров С. В. // Общая хирургия: Учебник для вузов. — 2-е изд. — 2004. — 768 с
198. Успенский С.А., Сони́на А.Н., Вихорева Г.А, Черны́шенко А.О., Кече́кьян А.С., Гальбра́йх Л.С. Структура и свойства хитозановых пленок и хитозансодержащих нитей, сформованных из уксуснокислотных спиртосодержащих растворов полимера // Химические волокна. - 2010.- №6.-С.18-21